



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

Tabata Cruz Manoel

Estudo das interações de complexos de inclusão flavonoide/ciclodextrina
com modelos de membrana biológica por simulações de dinâmica
molecular

São José do Rio Preto
2016

Tabata Cruz Manoel

Estudo das interações de complexos de inclusão flavonoide/ciclodextrina
com modelos de membrana biológica por simulações de dinâmica
molecular

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo

São José do Rio Preto
2016

Manoel, Tabata Cruz.

Estudo das interações de complexos de inclusão flavonoide/ciclodextrina com modelos de membrana biológica por simulações de dinâmica molecular / Tabata Cruz Manoel. -- São José do Rio Preto, 2016
75 f. : il., tabs.

Orientador: Alexandre Suman de Araújo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Dinâmica molecular.
4. Ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. 5. Flavonoides.
6. Membranas (Biologia) 7. Quercetina. I. Araújo, Alexandre Suman de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.
CDU – 539.2

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

Tabata Cruz Manoel

Estudo das interações de complexos de inclusão flavonoide/ciclodextrina
com modelos de membrana biológica por simulações de dinâmica
molecular

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal
USP – Ribeirão Preto

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

São José do Rio Preto
23 de fevereiro de 2016

À minha mãe, pelo apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar e acima de tudo, a Deus, por me dar à luz nos momentos de escuridão e dificuldade e pela sabedoria nos momentos em que pensei em desistir.
- Ao Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo, pela orientação e amizade nesses anos, estando sempre disposto a ajudar; pela paciência e valiosos ensinamentos.
- Aos amigos do grupo de pesquisa, Carolina, Rafaela, Ingrid, Fernando e Gabriela, pelos conhecimentos compartilhados, pelas conversas.
- Aos professores do Departamento de Física, pelos ensinamentos ao longo da graduação e pós-graduação.
- À minha mãe Célia, por todo esforço empregado na minha formação profissional e pessoal. Agradeço pelos incentivos, pelas palavras, por todo carinho e por nunca me deixar desistir, mesmo quando as coisas pareciam mais difíceis.
- À minha irmã Tatiane, por todo apoio e incentivo.
- Ao meu Pai Henrique e meu padrasto Dionísio, por estarem sempre ao meu lado, me apoiarem nessa jornada.
- Ao meu namorado Felipe, pelo amor, apoio e respeito em todos os momentos.
- Ao CNPQ pelo apoio financeiro imprescindível.

*“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar se último limite
e dar o melhor de si mesmo”
(Ayrton Senna da Silva)*

RESUMO

As ciclodextrinas são um grupo de oligossacarídeos cíclicos, que apresentam um formato de cone truncado com cavidade hidrofóbica e exterior hidrofílico. Isto faz com que as ciclodextrinas possam encapsular fármacos, o que propicia melhoras na biodisponibilidade, estabilidade e proteção das moléculas encapsulada. Por esta característica, as ciclodextrinas constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos de grande utilidade, por formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares e atuarem como moléculas carregadoras de substâncias de interesse biológico e baixa solubilidade. Dentre os compostos com ação farmacológica encontra-se os flavonoides, em destaque a molécula de quercetina, um fármaco natural com diversas propriedades biológicas, como anticâncer, antioxidante, antialérgica, porém devido sua baixa solubilidade torna-se necessária a formação de complexos de inclusão com moléculas carregadoras como a β -ciclodextrina. O presente trabalho busca investigar, por meio de simulações computacionais, as diferentes formas de interação dos flavonoides com a ciclodextrina e do complexo formado por bicamadas lipídicas, a fim de contribuir para um melhor entendimento do processo de formação com complexo de inclusão ciclodextrina/flavonoide e de entrega do fármaco à célula.

Palavras-chaves: Dinâmica Molecular. Ciclodextrina. Quercetina. Membrana. Energia Livre. Adaptive Biasing Force.

ABSTRACT

The cyclodextrins are cyclic oligosaccharides that present a structure in form of a truncated cone, with a hydrophobic inside surfaces and hydrophilic outside. This causes the cyclodextrin can encapsulate drugs provides improvements in bioavailability, stability and protection of encapsulated molecules. By this feature, the cyclodextrins are a new class of pharmaceutical excipients useful for forming inclusion complexes with reversible nonpolar molecules and act as carrier of molecules with high biological interest and low solubility. Among the compounds with pharmacological action it is the flavonoid, featured the quercetin molecule; a drug with natural biological proprieties such as anticancer, antioxidant, antialergic, however, due to its low solubility, it becomes necessary the formation of inclusion complexes with carrier molecules. This study aims to investigate, through computer simulation, different forms of interaction of flavonoids with cyclodextrin and the complex formed by lipid bilayers, in order to contribute to a better understanding of the formation process with inclusion complex cyclodextrin/flavonoids and the drug delivery to cell.

Keywords: Molecular Dynamics. Cyclodextrin. Quercetin. Membrane. Free Energy. Adaptive Biasing Force.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Três ciclodextrinas naturais	16
Figura 1.2 – Estrutura molecular da β -ciclodextrina, secção transversal da molécula e a representação cônica	17
Figura 1.3 – Estrutura e dimensão das ciclodextrinas	18
Figura 1.4 – Representação esquemática da formação de complexo de inclusão	19
Figura 1.5 – Possíveis tipos de complexos de inclusão entre a molécula de ciclodextrina e a molécula hóspede.	20
Figura 1.6 – Estrutura básica dos flavonoides	22
Figura 1.7 – Estrutura das principais subclasses dos flavonoides	22
Figura 1.8 – Estrutura de diferentes tipos de flavonóis.....	23
Figura 1.9 – Estrutura do Colesterol	24
Figura 1.10 – Esquema representativo da estrutura da membrana celular	25
Figura 1.11 – Movimento dos lipídios na membrana.	26
Figura 1.12 – Representação bidimensional da molécula de POPC.....	27
Figura 4.1 – Representação dos átomos tratados pela Mecânica Molecular.....	30
Figura 4.2 – Representação da interação e do potencial harmônico.	32
Figura 4.3 – Representação da interação e do potencial harmônico para variação do ângulo	33
Figura 4.4 – Representação da interação do potencial harmônico variando a estrutura tridimensional.....	33
Figura 4.5 – Representação da variação angular e do potencial Torcional.....	35
Figura 4.6 – Representação esquemática do potencial de Lennard Jones	35
Figura 4.7 – Representação esquemática do potencial eletrostático	35
Figura 4.8 – Representação das condições periódicas de contorno.....	39
Figura 4.9 – Representação do raio de corte.....	40
Figura 5.1 – Duas orientações da colesterol em relação à ciclodextrina	47
Figura 5.2 – Duas orientações da quercetina em relação à ciclodextrina	48
Figura 5.3 – Orientação do colesterol em relação à bicamada de POPC	49

Figura 5.4 – Orientação da quercetina em relação à bicamada de POPC	46
Figura 6.1 – Gráfico área por lipídio da membrana de POPC	50
Figura 6.2 – Gráfico do perfil densidade de massa da membrana de POPC	51
Figura 6.3 – Gráfico do parâmetro de ordem da membrana de POPC.....	52
Figura 6.4 – Esquema da caixa de água com membrana após a equilibração.....	53
Figura 6.5 – Gráfico do perfil de energia livre para inclusão do colesterol na β -ciclodextrina ao longo do eixo z para orientação I, para diferentes tempos.	53
Figura 6.6 – Representação obtida para os mínimos e máximos obtidos a partir do perfil de energia livre	54
Figura 6.7– Gráfico do perfil de energia livre para inclusão do colesterol na β -ciclodextrina ao longo do eixo z para orientação II, para diferentes tempos.	55
Figura 6.8– Gráfico do perfil de energia livre após a convergência e o gráfico do número de amostras ao longo da coordenada de reação.....	55
Figura 6.9 – Representação obtida para os mínimos e máximos obtidos a partir do perfil de energia livre	56
Figura 6.10– Gráfico do perfil de energia livre para inclusão da quercetina na β -ciclodextrina ao longo do eixo z para orientação I, para diferentes tempos.	57
Figura 6.11– Gráfico do perfil de energia livre após a convergência e o gráfico do número de amostras ao longo da coordenada de reação.....	58
Figura 6.12 – Representação obtida para os mínimos e máximos obtidos a partir do perfil de energia livre	59
Figura 6.13– Gráfico do perfil de energia livre para inclusão da quercetina na β -ciclodextrina ao longo do eixo z para orientação I, para diferentes tempos.	59
Figura 6.14- Gráfico do perfil de energia livre após a convergência e o gráfico do número de amostras ao longo da coordenada de reação.....	60
Figura 6.15 – Representação obtida para os mínimos e máximos obtidos a partir do perfil de energia livre	60
Figura 6.16– Gráfico do perfil de energia livre para inclusão do colesterol na bicamada de POPC para diferentes tempos.	62
Figura 6.17– Gráfico do perfil de energia livre após a convergência e o gráfico do número de amostras ao longo da coordenada de reação.....	62
Figura 6.18 – Representação obtida para os mínimos e máximos obtidos a partir do perfil de energia livre	64

Figura 6.19– Gráfico do perfil de energia livre para inclusão da quercetina na bicamada de POPC para diferentes tempos.	65
Figura 6.20– Gráfico do perfil de energia livre após a convergência e o gráfico do número de amostras ao longo da coordenada de reação.....	66
Figura 6.21 – Destaque na região de mínimo do gráfico de perfil de energia livre quercetina/POPC	66
Figura 6.22 – Representação mais estável para inclusão da quercetina na bicamada de POPC	67
Figura 7.2 – Ciclo termodinâmico para associação do colesterol na β -ciclodextrina e na bicamada de POPC.....	69
Figura 7.2 – Ciclo termodinâmico para associação do quercetina na β -ciclodextrina e na bicamada de POPC.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Características das três ciclodextrinas naturais.....	18
Tabela 1.2 – Exemplos de fármacos em forma de complexos de inclusão.....	21
Tabela 1.3 – Subclasses dos flavonoides com exemplos.....	22
Tabela 5.1 – Parâmetros para simulação para equilibração da bicamada de POPC.....	46
Tabela 5.2 – Parâmetros para simulação para os sistemas A, B, C e D.....	47
Tabela 6.1 – Valores de energia de associação para ambas orientações do colesterol na formação de complexos de inclusão	56
Tabela 6.2 – Valores de energia de associação para ambas orientações da quercetina na formação de complexos de inclusão	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å – *Angstrom*

ABF – *Adaptive Biasing Force*

CD – Ciclodextrina

CPC – Condições Periódicas de Contorno

fs – femtosegundo

K – Kelvin

Kcal/mol – Quilocalorias por mol

NAMD – *Nanoscale Molecular Dynamics*

ns – Nanosegundo

OMS – Organização Mundial da saúde

OP – Parâmetro de ordem

PDM – Perfil densidade de massa

PME – Soma de Ewald – Potencial Means Square

POPC – palmitoil-oleoil-fosfatidil-colina

ps – picosegundo

QCT – Quercetina

SUS – Sistema único de saúde

UV – ultravioleta

α – alfa

β – beta

γ – gama

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 - Ciclodextrinas.....	16
1.1.1 - Estrutura	16
1.1.2 – Complexos de Inclusão.....	18
1.1.3 – Aplicação das Ciclodextrinas nas áreas farmacêutica	20
1.2 – Moléculas de interesse para o estudo da formação de complexos de inclusão.	21
1.2.1 – Quercetina	21
1.2.2 Colesterol	24
1.3 – Membrana Biológica	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVO	29
3.1 – Objetivo Geral	29
3.2 - Objetivos Específicos.....	29
4. MÉTODOS	30
4.1 - Mecânica Molecular e Campo de Força	30
4.1.1 – Potencial Harmônico.....	31
4.1.2 - Potencial Torcional.....	34
4.1.3 – Potenciais não ligados	34
4.1.4 - Energia Potencial Total	36
4.2- Método de Dinâmica Molecular	36
4.3 – Métodos de integração	37
4.3.1 – Algoritmo de Verlet.....	37
4.4 Condições Periódicas de Contorno	38
4.5 – Raio de Corte e Método do PME.....	39
4.6 – Cálculo do Perfil de Energia Livre.....	40
4.7 –Análises Aplicadas.....	42
4.7.1 – Área por Lipídios	42
4.7.2 –Perfil Densidade de Massa (P.D.M).....	42
4.7.3 –Parâmetro de Ordem (P.O).....	42
4.8 – Energia Livre de Ligação.....	43
5 – DETALHES COMPUTACIONAIS	45
5.1 – Construção e equilibração da bicamada lipídica	45
5.2 – Construção e simulação dos sistemas para cálculo da energia livre pelo método do ABF	46
6 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
6.1 – Bicamada lipídica	50
6.2 – Cálculo de energia livre pelo método do ABF	53
7 – Conclusões e Perspectivas	68

8 – Referências	71
------------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de doenças alérgicas vem aumentando em todo o mundo. Pesquisas recentes mostraram que, em média, 30-35% das pessoas já foram afetadas por essas doenças em algum estágio de suas vidas [1]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 300 milhões de pessoas de todas as etnias, idades e classes sociais sofram de asma em todo o mundo [2].

Tratamentos contra asma representam um dos maiores gastos para o sistema único de saúde (SUS), superando os gastos do combate a Aids. Dados mostram que são mais de 367 mil internações hospitalares por ano decorrente da asma e um gasto superior a 600 milhões de reais anuais [3]. Este número tende a aumentar uma vez que a sociedade tende a se tornar mais urbanizada, uma vez que passam a ter contato com maiores índices de poluição. Nos últimos 20 anos, segundo o Ministério da Saúde, este aumento atingiu 40%. Somente no Brasil são em média oito mortes por dia devido a complicações relacionadas à asma [4].

Os métodos tradicionais de tratamento de tais doenças são, na maioria das vezes, ineficientes ou impõe ao indivíduo uma baixa qualidade de vida [5]. Devido a este problema, mostra-se necessário o desenvolvimento de novas drogas destinadas a este tipo de tratamento.

Fármacos desenvolvidos a partir de compostos naturais representam uma grande parte dos medicamentos disponíveis no mercado, o que estimula a busca por novas moléculas nessa fonte. Dentre os compostos naturais com potencial ação antialérgica podemos destacar os flavonoides [6]. Todavia essas substâncias apresentam baixa solubilidade, diminuindo sua biodisponibilidade.

Em busca de novas tecnologias, a indústria farmacêutica busca formulações que resultem em preparações mais estáveis. Um aumento considerável na biodisponibilidade de drogas é conseguido através da formação de complexos de inclusão dessas moléculas com uma classe de moléculas carregadoras denominadas ciclodextrina [7]. Apesar de sua ampla utilização em diversos medicamentos já comercializados, pouco se sabe sobre o processo de entrega do fármaco à célula em nível atômico/molecular.

O presente trabalho busca investigar, por meio de simulações computacionais, as diferentes formas de interações dos flavonoides com a

ciclodextrina e do complexo formado com bicamadas lipídicas, a fim de contribuir para um melhor entendimento do processo de formação do complexo de inclusão ciclodextrina/flavonoide e de entrega do fármaco à célula.

1.1 - Ciclodextrinas

1.1.1 - Estrutura

As ciclodextrinas (CD) são um grupo de moléculas naturais cíclicas constituídas por unidades de glicopirranose unidas por ligações $\alpha(1-4)$. Estes oligossacarídeos são obtidos a partir da degradação enzimática do amido sob ação da enzima glicosiltransferase [8]. As primeiras informações sobre as ciclodextrinas foram obtidas por Viller em 1891, porém, foi em 1903 que Schardinger obteve uma descrição mais detalhada desses oligossacarídeos cíclicos, envolvendo sua preparação, isolamento e caracterização [9].

A estrutura química das ciclodextrinas, suas propriedades físico-químicas e suas habilidades em formar complexos de inclusão foram confirmadas entre 1935 e 1955, por Freudenberg, French, Cramer e Colaboradores [8].

Dentre todas as variedades de ciclodextrinas destacam-se três, as chamadas ciclodextrinas naturais [8], com seis, sete e oito unidades de glicose, denominadas respectivamente de α , β e γ (Figura 1.1). As ciclodextrinas com menos de seis unidades de glicose são estereoquimicamente impossíveis de se obter, enquanto com mais de oito unidades de glicose, quando obtidas, apresentam baixo rendimento.

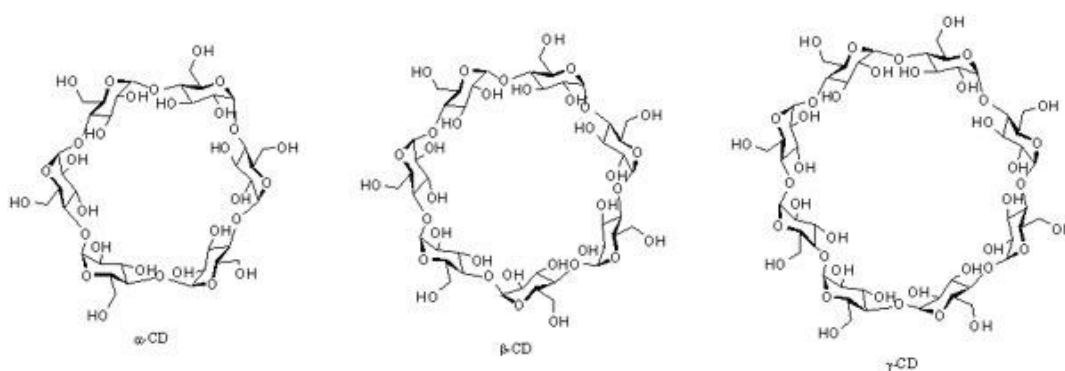


Figura 1.1 – Estruturas moleculares das três ciclodextrinas naturais, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, compostas, respectivamente, por 6, 7 e 8 unidades de glicose [9]

Por experimentos de difração de raio X, se determinou que as ciclodextrinas possuem uma estrutura cônica com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita formada pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6 (Figura 1.2).

As hidroxilas situadas nas extremidades conferem a CD um caráter hidrofílico, tornando-as solúveis em água. Por sua vez, no interior da cavidade encontram-se os grupos CH e os oxigênios das ligações glicosídicas conferindo a ela um caráter hidrofóbico [7].

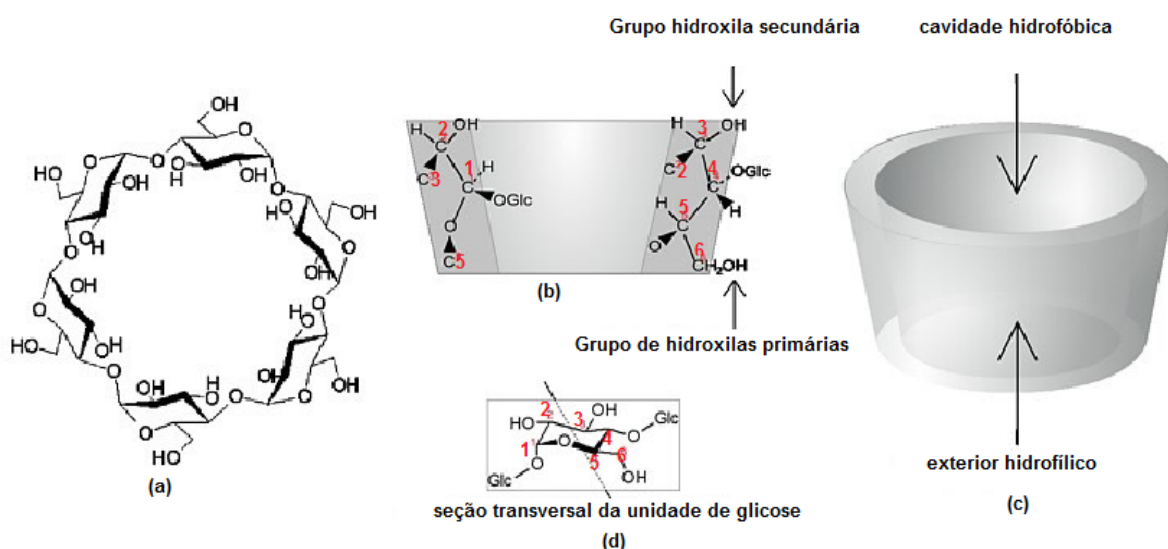
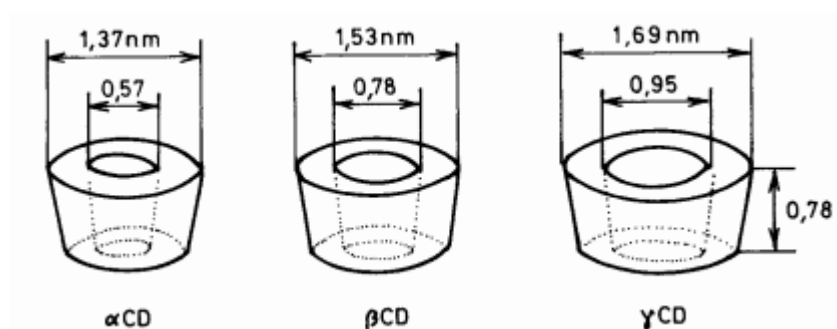


Figura 1.2 - Estrutura β-ciclodextrina. (a) Estrutura molecular da β-ciclodextrina. (b) Seção transversal da molécula de ciclodextrina mostrando o arranjo das unidades de glicose. (c) Representação cônica destacando a cavidade hidrofóbica e o exterior hidrofílico. (d) Seção transversal da unidade de glicose. [10].

Observou-se, também, que as três ciclodextrinas naturais apresentam a mesma altura, porém diferentes diâmetros e solubilidade (Figura 1.3 e Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Características das três ciclodextrinas naturais [11].

Propriedade	α - ciclodextrina	β - ciclodextrina	γ - ciclodextrina
Número de unidades de glicose	6	7	8
Solubilidade aquosa (g/100mL a 25°C)	14,5	18,5	23,2
Diâmetro externo (Å)	13,7	15,3	16,9
Diâmetro da cavidade (Å)	5,7	7,8	9,5
Altura (Å)	7,8	7,8	7,8

**Figura 1.3** – Estrutura e dimensões das ciclodextrinas. As três ciclodextrinas possuem mesma altura, se diferenciando apenas no diâmetro da cavidade interna e externa. [12].

1.1.2 – Complexos de Inclusão

Devido a sua cavidade hidrofóbica, na qual substâncias podem ser “aprisionadas” para formarem complexos de inclusão, as ciclodextrinas podem hospedar diferentes compostos, cuja estequiometria mais usual é 1:1 [12].

A química do fenômeno de inclusão molecular representa um sistema de complexidade estrutural dentro da química supramolecular, onde a ciclodextrina é o hospedeiro e o substrato o hóspede, os quais se mantêm juntos por forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio [13].

Quando a ciclodextrina se encontra em um meio aquoso, sua cavidade é preenchida por moléculas de água, mantendo um conjunto instável. Ao adicionar ao meio uma molécula hidrofóbica, esta tende a deslocar as moléculas de água que se

encontravam, originalmente, no interior da cavidade da ciclodextrina. Isto ocorre devido a presença de água no interior da cavidade ser termodinamicamente desfavorável (interações polar-apolar) [14]. O processo do deslocamento das moléculas de água e a inclusão da substância hidrofóbica está esquematizado na Figura 1.4.

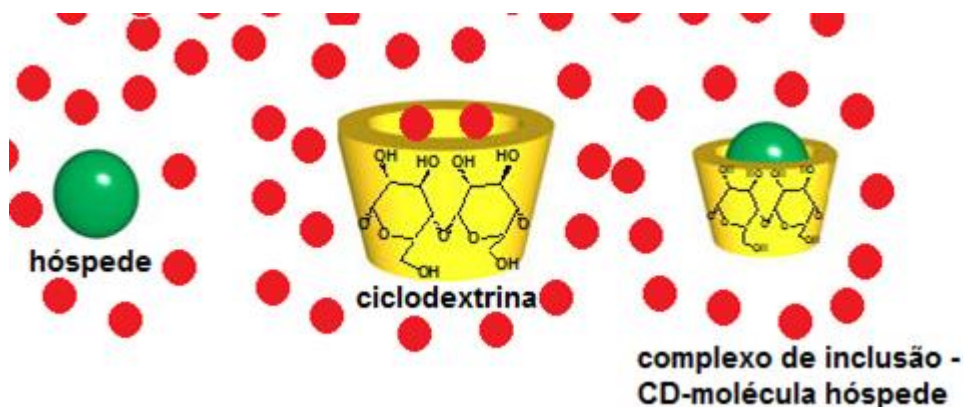


Figura 1.4 – Formação do complexo de inclusão (Figura adaptada de [15])

Este processo leva a encapsulação total ou parcial da molécula hóspede, estando o complexo rodeado de moléculas do solvente. As moléculas incluídas, normalmente, se orientam de forma a minimizar o contato com a parte hidrofílica e maximizando o contato com a parte hidrofóbica do interior da cavidade da ciclodextrina [9].

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão, geralmente, com moléculas de tamanho compatível com as dimensões de sua cavidade. Quando a inclusão envolve moléculas significativamente maiores, a complexação poderá ser feita entre as moléculas ciclodextrina-hóspede com uma estequiometria diferente de 1:1.

Conforme a figura 1.5 [16], os complexos de inclusão podem ser classificados como:

- **Inclusão Completa:** Quando a molécula hóspede é de tamanho menor que a ciclodextrina e consegue entrar por completo em sua cavidade (Figura 1.5-a).
- **Inclusão Axial:** Quando a molécula hóspede possui um comprimento maior que a cavidade, mas diâmetro compatível. Desta forma ela entra na ciclodextrina mantendo as extremidades para fora (Figura 1.5-b).

- Inclusão Parcial: Quando a molécula hóspede possui dimensões maiores que o diâmetro da ciclodextrina (Figura 1.5-c).
- Inclusão com estequiometria diferente: Quando a estequiometria ciclodextrina-hóspede não é 1:1 (Figura 1.5-d, também chamada de inclusão “sandwich”, 1.5-e e 1.5-f).

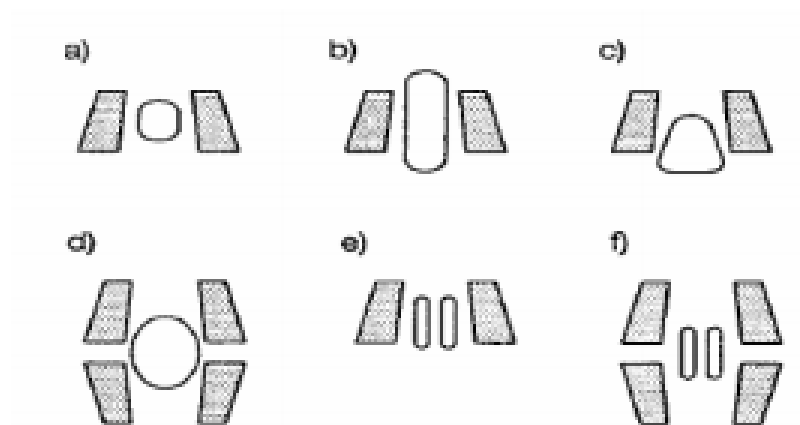


Figura 1.5 – Possíveis tipos de complexos de inclusão entre a molécula de ciclodextrina e a molécula hóspede [16].

1.1.3 – Aplicação das Ciclodextrinas nas áreas farmacêutica

Com o objetivo de melhorar a ação dos fármacos, as indústrias farmacêuticas vêm utilizando complexos de inclusão destes com moléculas de ciclodextrinas.

O motivo da utilização desses complexos se dá pelo baixo custo na obtenção das moléculas de α , β e γ -ciclodextrinas. Outro fator favorável é dado pelo tamanho do diâmetro de sua cavidade ser compatível com a maioria dos fármacos, o que permite a formação de complexos de inclusão, obtendo as seguintes vantagens [12]

- Aumento da solubilidade e dissolução de fármacos pouco solúveis.
- Aumento da biodisponibilidade e estabilidade
- Diminuição da irritação gástrica, dérmica causada por

determinados fármacos.

- Diminuição ou eliminação de odores e sabores desagradáveis.

Algumas das aplicações mais frequentes nas áreas farmacêuticas são apresentadas na tabela 1.2

Tabela 1.2 – Exemplos de alguns fármacos comercializados em forma de complexos de inclusão.

Propriedade	Princípio ativo	Ciclodextrina	Referências
Aumento da solubilidade	Gliclazide	B-CD	[17]
Melhora da biodisponibilidade	Naproxeno	B-CD	[18]
Diminuição de efeitos secundários	Piroxicam	B-CD	[19]
Inibição da degradação	Prostaciclina	α , β e γ -CD	[20]
Aumento da degradação	Espironalactona	β -, γ -CD e derivados	[21]

1.2 – Moléculas de interesse para o estudo da formação de complexos de inclusão.

A molécula hóspede de interesse para este trabalho será a Quercetina, um flavonoide natural que possui propriedades farmacológicas.

1.2.1 – Quercetina

Os flavonoides (Figura 1.6) são uma designação dada a um grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis. Eles podem ser distribuídos em seis subclasses (Tabela 1.3) e possuem as características de terem um *backbone* similar, constituído de 3 moléculas aneladas ligadas a grupos hidroxil, diferenciando nos grupos substituintes.

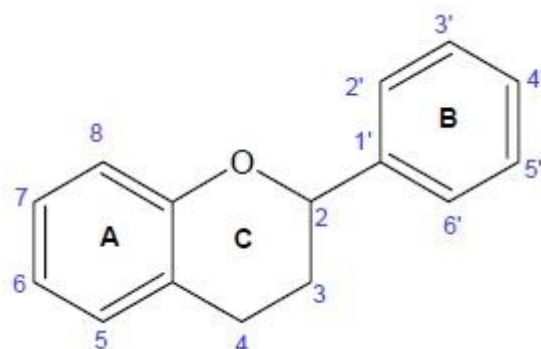


Figura 1.6 – Estrutura básica dos flavonoides, composta de três grupos anelados. [22]

Tabela 1.3 – Subclasses dos flavonoides com exemplos [17].

Subclasses	Exemplos
Flavonas	Aspiginina, Tangeritina
Flavonóis	Quercetina, Kaempferol
Flavononas	Hesperetina, Eriodictiol
Calconas	Epicatequina, Galocatequina
Antocianinas	Cianidina, Malvidina
Isoflavonas	Genisteina, Daidzeina

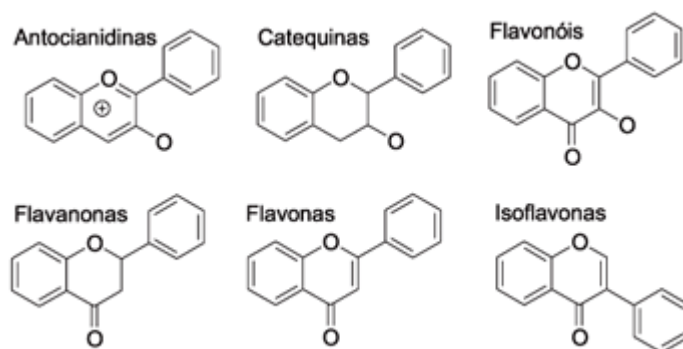


Figura 1.7 – Estrutura das principais subclasses dos flavonoides [23]

Nosso estudo estará voltado à molécula de Quercetina, uma molécula da subclasse dos flavonóis.

Os flavonóis são encontrados em uma variedade de vegetais e frutas. Estima-se que a ingestão diária esteja por volta de 20-50 mg/dia nas populações ocidentais [24].

Todos os flavonóis têm em comum o *backbone*, composto de 3 hidoxiflavone. A determinação do tipo de flavonol é dada pela localização do OH (Figura 1.8).

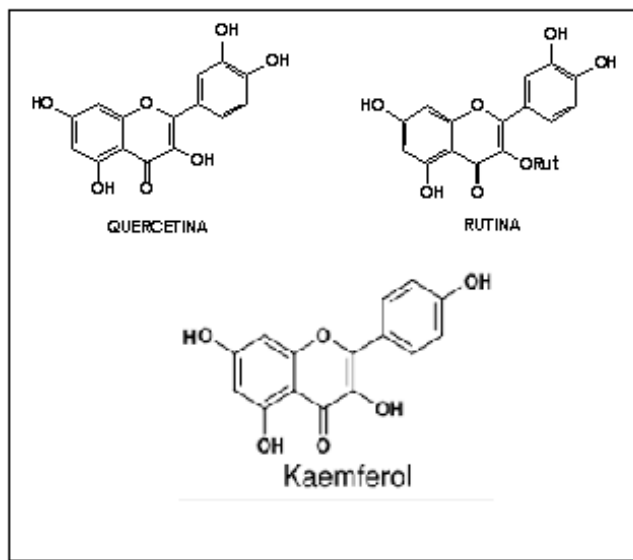


Figura 1.8 – Estrutura de diferentes tipos de flavonóis, mostrando que o que diferencia um do outro é a localização do grupo hidroxil OH [25].

A quercetina apresenta efeito benéfico a saúde, tais como: ação antioxidante, eliminação de radicais livres, ação anticâncer, atividade anti viral e ação antialérgica [26]. Estudos realizados com cobaias mostraram que a quercetina ingerida oralmente ou administrada por inalação tem atividade antiasmática [27]. Porém esses compostos apresentam limitações, como a baixa solubilidade em água quando ingeridas oralmente [28].

Para contornar esse problema, é possível utilizar a β -CD que possui propriedade de formação de complexos de inclusão aumentando, assim, sua solubilização.

Pode prever-se que, se a absorção de um fármaco é limitada pela sua solubilidade, em vez da permeabilidade, a utilização de potenciadores de solubilidade, como a β -CD, aumenta a absorção.

Diversos estudos experimentais foram realizados a fim de elucidar a interação fármaco-ciclodextrina, como cromatografia, espectroscopia UV e fluorescência, porem eles não fornecem informações em nível atômico molecular das interações hóspede-hospedeiro. Assim, o uso de simulações computacionais para uma avaliação dessas interações a nível atômico molecular é de grande interesse [29].

Mecanismos teóricos que descrevem a entrega de um fármaco para a célula

propõe a troca de uma molécula de colesterol presente na membrana celular pela molécula de um fármaco carregado pela ciclodextrina. Esta troca é proposta pelo fato de a molécula de colesterol ter maior afinidade com a cavidade da ciclodextrina, assim, ao sair da membrana, ela gera uma perturbação no meio, deixando propício para entrada do fármaco [30].

1.2.2 Colesterol

O colesterol é um componente estrutural presente na membrana plasmática dos mamíferos. Ele está envolvido na regulação da permeabilidade e na fluidez da membrana [31].

Os elementos presentes na fórmula química do colesterol são o carbono, o oxigênio e o hidrogênio. A estrutura química do colesterol é arranjada em quatro anéis A, B, C e D, conforme a figura 1.9.

O colesterol é insolúvel em água e ele precisa ser transportado de um tecido para o outro por meio do sangue, que é um meio aquoso. Para que isso seja possível, o colesterol é convertido em lipoproteínas, que são estruturas esféricas que tem seu centro composto por substâncias hidrofóbicas, como o colesterol e outros lipídios, e são cercadas por proteínas hidrofílicas, possibilitando a dissolução em água [32].

Devido sua característica hidrofóbica, o colesterol possui alta afinidade com moléculas de ciclodextrina, possibilitando, assim, a troca entre o fármaco carregado pela CD e o colesterol presente na membrana celular.

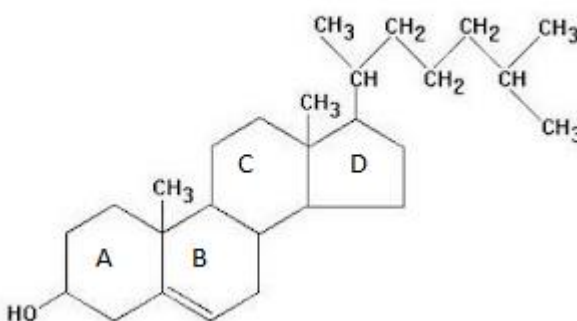


Figura 1.9 – Estrutura do Colesterol, composto com carbono, oxigênio e hidrogênio, arranjada em quatro anéis A, B, C e D [32].

1.3 – Membrana Biológica

A membrana celular, ou também chamada de membrana plasmática (Figura 1.10), é uma estrutura que delimita todas as células vivas e estabelece uma fronteira entre o meio extracelular e o meio intracelular, o citoplasma.

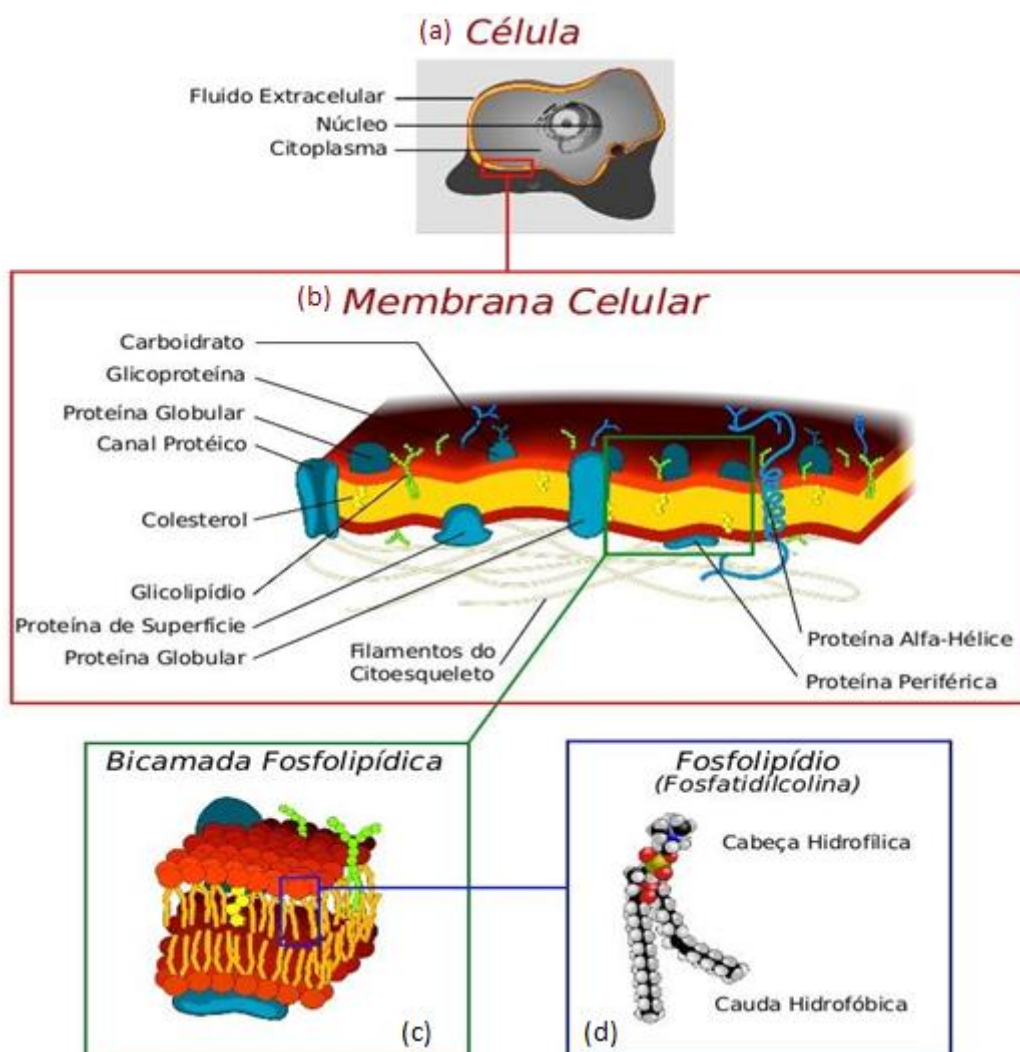


Figura 1.10 – Esquema representativo das estruturas da membrana celular. (a) Representação da membrana separando o meio intracelular do extracelular. (b) Representação da membrana biológica com seus componentes. (c) Representação da membrana Fosfolipídica. (d) Representação de um fosfolipídio [33]

Sua estrutura é uma bicamada lipídica formada pelo acoplamento de lipídios anfipáticos, ou seja, que apresentam uma extremidade (“cabeça”) hidrofílica e uma “cauda” hidrofóbica. Quando se encontram em um meio aquoso se orientam de forma que as cabeças fiquem voltadas para o exterior e as caudas hidrofóbicas se dirigem

ao interior (Figura 1.10 c).

Os lipídios presentes na membrana biológica (fosfolipídios, os esfingolipídios, esteróis, etc), que não se mantem de forma estática e sim apresentam movimentos, que podem ser nos sentidos horizontal e vertical ou de translocação transmembranar, conhecido como flip-flop (figura 1.11) [34].

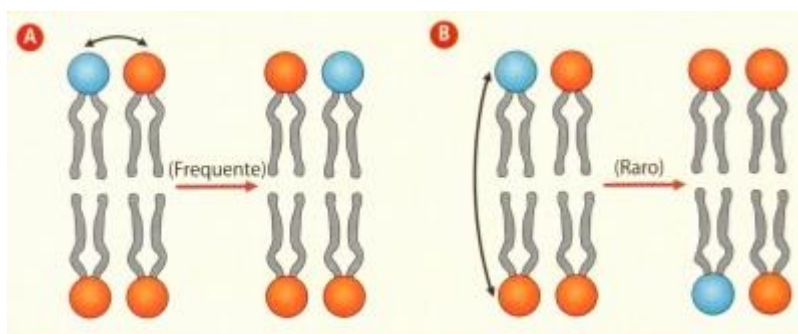


Figura 1.11 – Movimentos dos lipídios na membrana.

A presença do colesterol na membrana é responsável pela regulação da permeabilidade e da fluidez da membrana.

Em 1972, S. J. Singer e G. L. Nicolson propuseram o modelo do mosaico fluido, segundo o qual a membrana biológica é uma estrutura dinâmica, fluida, cuja base é uma bicamada de fosfolipídios (bicamada lipídica), sobre a qual se encontram distribuídas moléculas proteicas inseridas [35], conforme ilustra a figura 1.10 b.

A figura 1.12 representa uma molécula de palmitoil-oleoil-fosfatidil-colina (POPC) que está presente na maioria das células eucariotas e são comumente usadas em estudos com modelos para membrana plasmática [36]. Ela consiste em um grupo colina ligado a um fosfato e às duas caudas, uma saturada e outra insaturada.

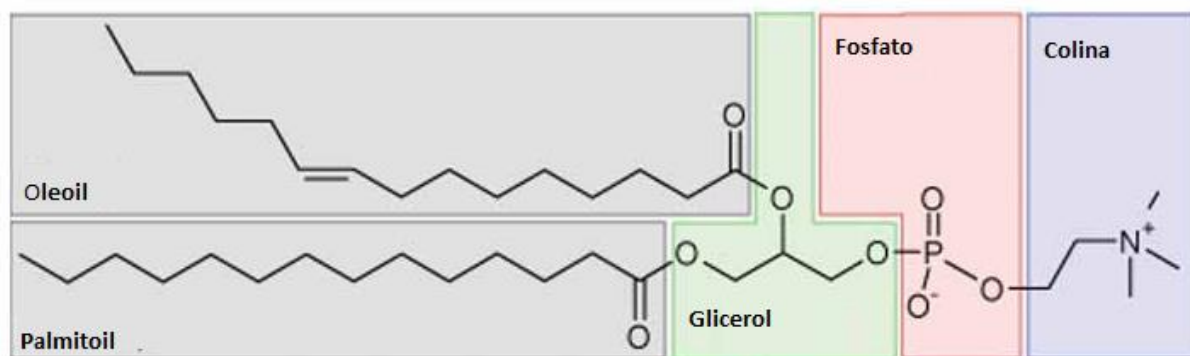


Figura 1.12 – Representação bidimensional da molécula de POPC, representada em roxo as caudas oleoil e palmitoil, em verde o grupo glicerol, em vermelho o grupo fosfato e em azul o grupo colina [37].

2. JUSTIFICATIVA

A quercetina é um composto natural que apresenta ação anticâncer, ação anti atividade viral, ação antialérgica, antiasmática, etc. Todavia, devido sua baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, no meio biológico, sua biodisponibilidade é baixa. A utilização de complexos de inclusão da quercetina com a β -ciclodextrina aumentam sua biodisponibilidade, entretanto, pouco se sabe sobre o processo de dissociação desse complexo e a conseqüente entrega do fármaco à célula.

A maioria dos estudos realizados até o momento a fim de analisar a complexação da ciclodextrina com compostos como o colesterol e a quercetina são experimentais. Esses estudos nos fornecem resultados satisfatórios para a análise da solubilidade, complexação, mas não nos fornecem informações quando necessário uma análise à nível atômico molecular da formação desses complexos.

Para a caracterização dos microestados que descrevem a dinâmica do processo, é necessária uma investigação através de simulações computacionais.

Um dos mecanismos proposto que descrevem a entrega do flavonoide à célula sugere uma troca da molécula de flavonoide por uma de colesterol entre a ciclodextrina e a membrana. Isto ocorre devido à alta afinidade entre a ciclodextrina e o colesterol. Assim, ao se aproximar da membrana, a CD tira uma molécula de colesterol da membrana, libera o flavonoide e este entra na membrana pela perturbação causada pela retirada do colesterol [30].

Com o intuito de contribuir com a caracterização e descrição dos processos acima citados, o presente trabalho pretende investigar os mecanismos de formação do complexo de inclusão ciclodextrina/quercetina e de inserção/remoção da quercetina e do colesterol no modelo de membrana do tipo bicamada de fosfatidilcolina (POPC) utilizando simulações de dinâmica molecular.

3. OBJETIVO

3.1 – Objetivo Geral

Estudar o fenômeno de inclusão do colesterol e da quercetina na β -ciclodextrina através de simulações de dinâmica molecular.

Estudar o fenômeno de inclusão/remoção da quercetina e do colesterol em uma membrana de POPC por simulações de dinâmica molecular.

3.2 - Objetivos Específicos

- Montar, estabilizar e validar o modelo de membrana de fosfatidilcolina.
- Investigar, por simulações de dinâmica molecular, a interação da ciclodextrina com as moléculas de colesterol e de quercetina e encontrar a conformação de mínima energia e a energia de ligação a partir do método Adaptive Biasing Force (ABF).
- Buscar a conformação de mínima energia e a energia livre de ligação para inserção da quercetina na bicamada de POPC a partir dos métodos de dinâmica molecular e ABF.
- Buscar a conformação de mínima energia e a energia livre de ligação para inserção de uma molécula de colesterol na bicamada de POPC a partir dos métodos de dinâmica molecular e ABF.
- Relacionar os resultados obtidos.

4. MÉTODOS

4.1 - Mecânica Molecular e Campo de Força

O uso de simulações computacionais nos mais diversos sistemas é realidade nos dias de hoje. Sua utilização nos estudos de sistemas moleculares possibilita observar comportamentos, organizações e interações entre os componentes em nível atômico. Para que a representação computacional seja satisfatória é necessária uma boa modelagem dos sistemas reais.

Uma modelagem molecular detalhada pode ser obtida utilizando mecânica quântica, porém, tal abordagem exige a realização de cálculos complexos para descrever o comportamento dos elétrons e núcleos, o que pode tornar inviável, do ponto de vista computacional, a modelagem dos sistemas de interesse.

Uma alternativa para este problema é representar as interações moleculares utilizando funções potenciais clássicas que forneçam resultados que se aproximem o máximo dos obtidos com a mecânica quântica. Essa abordagem é conhecida como Mecânica Molecular. A mecânica molecular é um método que é utilizado para calcular a estrutura e a energia de moléculas não levando em consideração a presença explícita dos elétrons, baseado na aproximação de Born- Oppenheimer [38].

Pelo fato de a massa atômica ser muito maior que a massa eletrônica se admite que os elétrons, que se movem muito mais rápido que os núcleos, ajustam-se ao movimento destes últimos [39].

Resumidamente, a mecânica molecular trata os átomos como esferas unidas por molas com constante de forças característica, conforme representado na figura 4.1.

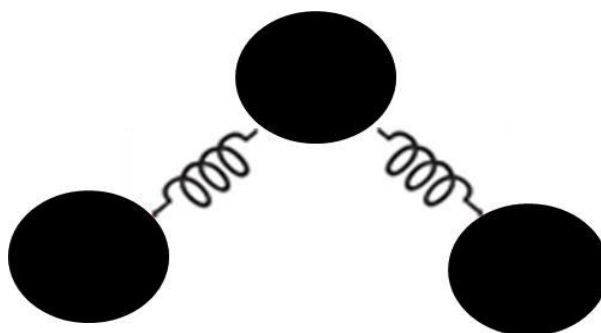


Figura 4.1 – Representação dos átomos tratados pela Mecânica Molecular, onde as esferas representam os átomos e as molas as ligações.

O campo de forças, neste caso, é constituído pelo somatório dos termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema, as quais podem ser associadas com penalidades energéticas ao desvio da geometria de seus valores de referência: quanto maior o desvio, maior a penalidade energética e maior a energia [40].

A principal vantagem da Mecânica Molecular é a rapidez na avaliação de sistemas moleculares complexos.

Nessa base de teoria, o sistema estudado é representado como termos de energia potencial ligados (potencial harmônico linear, potencial harmônico angular, potencial diedro próprio, potencial diedro impróprio, etc) e termos de energia potencial não ligados (Potencial de Lennard Jones, Potencial eletrostático, etc). O conjunto desses termos e os parâmetros que descrevem cada tipo de átomo modelado é chamado de campo de forças.

Existem diversos campos de forças propostos, sendo os principais utilizados para modelar sistemas biomoleculares o AMBER, o CHARMM, o GROMOS e o OPLS [41]. A construção de um campo de força é feita a partir de resultados de cálculos quânticos ab-initio de pequenas moléculas, por ajustes de dados experimentais, como Difração de raio-X, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear, entre outros [42].

A confiabilidade dos resultados obtidos é baseada na elaboração de um campo de forças com parâmetros bem definidos. A escolha do campo de força depende do sistema a ser estudado. Dependendo da parametrização do campo de força os resultados obtidos podem ser muito acurados.

A seguir descrevemos cada um dos termos mais comuns em campos de forças utilizados em simulações de biomoléculas.

4.1.1 – Potencial Harmônico

O potencial harmônico descreve ligações covalentes entre pares de átomos e ângulos em ligações químicas vizinhas, representando vibrações das moléculas. Devido à agitação térmica há oscilações nos comprimentos das ligações químicas (Figura 4.2). Considerando os átomos uma esfera com massa e as ligações químicas

como uma mola, as oscilações nos comprimentos podem ser dadas pela lei de Hooke para um sistema massa-mola:

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 \quad (1)$$

onde V_b é o potencial que descreve a variação no comprimento da ligação, b é o comprimento da ligação, b_0 é o comprimento da ligação na posição de equilíbrio e K_b é a constante de força para a restituição do equilíbrio.

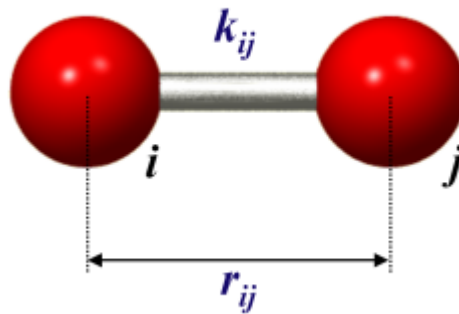


Figura 4.2 – Representação da oscilação em torno da posição de equilíbrio da ligação, tratando os átomos e suas ligações como um sistema massa mola, onde k_{ij} representa a constante de força entre os dois átomos i e j separados a uma distância r_{ij} [43].

Quando há três átomos ou mais, além do comprimento da ligação é possível que haja uma variação em torno do ângulo de equilíbrio (figura 4.3). Essa variação também é dada pela lei de Hooke para o sistema massa mola:

$$V_\theta = \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2)$$

onde V_θ é o potencial que descreve a variação no comprimento do ângulo entre três átomos, θ é a variação do ângulo em um instante qualquer, θ_0 é o ângulo de equilíbrio e K_θ é a constante de força para restituição do ângulo de equilíbrio.

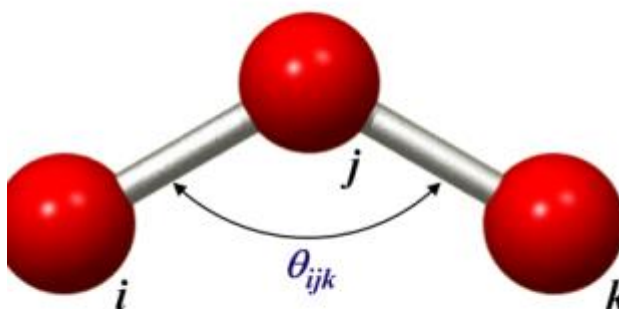


Figura 4.3 – Representação das oscilações em torno do ângulo de equilíbrio θ_{ijk} , tratando os átomos i, j, k e suas ligações como um sistema massa mola [43].

Em alguns campos de forças, outro potencial harmônico é definido para manter a estrutura tridimensional do conjunto de quatro átomos (Figura 4.4), descrevendo as oscilações da mesma. Esse potencial é denominado potencial torcional impróprio e também é descrito pela lei de Hooke:

$$V_{\phi} = \frac{1}{2} K_{\phi} (\Phi - \Phi_0)^2 \quad (3)$$

onde V_{ϕ} é o potencial que descreve a torção imprópria, ϕ é a variação do ângulo tetraédrico em um instante qualquer, ϕ_0 é o ângulo tetraédrico de equilíbrio e K_{ϕ} é a constante de força para a restituição do ângulo de equilíbrio.

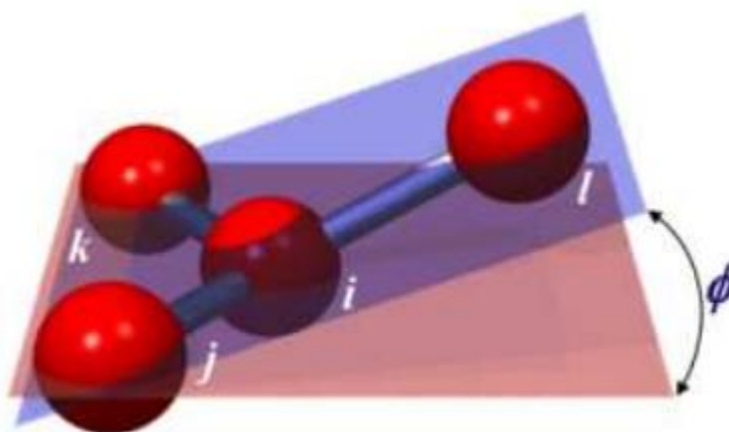


Figura 4.4 – Representação das oscilações em torno do ângulo ϕ de forma a variar a estrutura tridimensional do sistema, sendo i, j, k e l os átomos dessa ligação [43].

4.1.2 - Potencial Torcional

Esse potencial descreve as rotações em torno das ligações (Figura 4.5), também conhecido como potencial diedro próprio e é dado por:

$$V_{\varphi} = K_{\varphi}[1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad (4)$$

Nesta função a periodicidade do potencial é dada pela função cosseno. K_{φ} é a constante que define a altura da barreira de torção, n é o número de mínimos para a torção de uma ligação química específica, φ é o ângulo diedral e δ é a fase, podendo esta ser igual a 0° ou 180° [52].

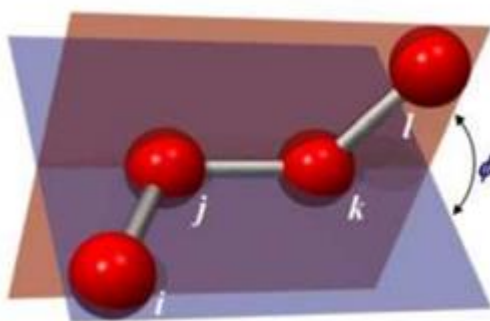


Figura 4.5 – a) Representação da variação angular diédrico ϕ em torno das ligações químicas entre os átomos i, j, k e l [43].

4.1.3 – Potenciais não ligados

A fim de descrever as interações entre átomos quimicamente não ligados são inseridos termos de curto e longo alcance à função potencial.

Pequenas flutuações na distribuição de carga de um átomo na presença de outro, fazem com que estes dois passem a ter uma interação atrativa dipolo-dipolo, conhecida como interação de van der Waals. À medida que esses dois átomos se aproximam surge um termo repulsivo que impede com que as nuvens eletrônicas desses átomos não se interpenetrem, devido ao princípio de exclusão de Pauli[44]. Estas características podem ser modeladas a partir do potencial de Lennard Jones (equação 5).

$$V_{vdw} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

onde i e j são os dois átomos integrantes, ε_{ij} é a profundidade do poço entre a barreira atrativa e a repulsiva, σ_{ij} é o diâmetro de Lennard-Jones e r_{ij} é a distância entre os núcleos atômicos.

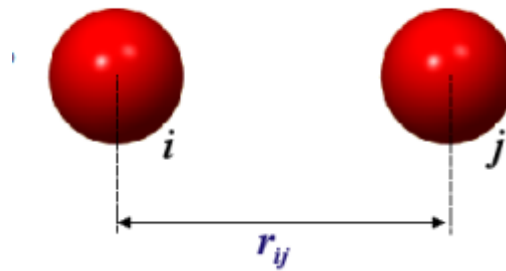


Figura 4.6 – Representação esquemática do potencial de Lennard Jones que descreve as interações de Van der Waals, com dois átomos i e j separados a uma distância r_{ij} [43].

Por sua vez, a descrição da energia potencial eletrostática é dada pela lei de Coulomb (equação 6)

$$V_{el} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}} \quad (6)$$

onde q_i e q_j são as cargas dos átomos i e j , separados pela distância r_{ij} . A permissividade do espaço livre é ε_0 e a constante dielétrica do meio é ε_r . Esse potencial é dito de longo alcance, pois varia com o inverso da distância de separação entre os átomos.

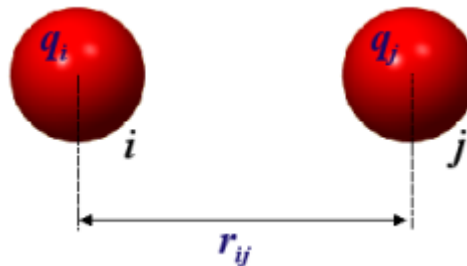


Figura 4.7 – Representação esquemática do potencial eletrostático, onde duas partículas carregadas se encontram a uma distância r_{ij} [43]

4.1.4 - Energia Potencial Total

A energia potencial total é a principal função de todo cálculo a mecânica molecular. Ela é capaz de reproduzir interações intra e intermolecular. O potencial total é dado pela soma dos termos de potenciais que ocorrem entre átomos ligados e átomos não ligados acima mencionados, descritos pelo campo de força:

$$V(r) = V_b + V_\theta + V_\phi + V_\varphi + V_{vdw} + V_{el} \quad (7)$$

4.2- Método de Dinâmica Molecular

A simulação de Dinâmica Molecular é uma técnica computacional que fornece a trajetória do sistema molecular investigado ao longo do tempo, permitindo o cálculo de algumas de suas características físico-químicas. É baseado na Mecânica Clássica e tem como foco principal o estudo do comportamento de um sistema de partículas ao longo do tempo. Ele permite calcular as propriedades de equilíbrio e transporte de um sistema pela integração das equações de movimento.

O conceito de Dinâmica Molecular foi proposto por Alder e Wainwright, em 1957, que trabalhavam com modelos de esferas rígidas com choques perfeitamente elástico, que representavam as interações atômicas [45].

Dado a superfície potencial, pode-se calcular a força que atua em cada partícula do sistema, obtendo-se as equações de movimento das mesmas, segundo as leis de Newton. A partir da integração das equações de movimento, obtêm-se as posições e velocidades da partícula ao longo do tempo.

Para um sistema de N átomos com posições $r_1, r_2, \dots, r_N$, se o potencial total de interação $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$ é uma função diferenciável em relação às coordenadas atômicas, então:

$$F_i = - \frac{\partial V(r_1, r_2, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad (8)$$

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (9)$$

onde t representa o tempo, F_i a força sobre cada átomo i , e m_i sua massa.

A força F_i é calculada a partir do potencial, o que torna possível a integração numérica das equações de Newton em pequenos intervalos de tempo Δt . Obtém-se então a trajetória para as partículas. Uma vez obtida a trajetória, é possível realizar o cálculo de propriedades de interesse para o sistema estudado [46].

4.3 – Métodos de integração

A obtenção da trajetória do sistema envolve a resolução de uma equação diferencial de segunda ordem, porém não há solução analítica para este caso, fazendo-se necessário o uso de métodos numéricos. O método de Dinâmica Molecular está baseado na resolução da integração das equações de movimento em pequenos intervalos de tempo δt .

A força total que cada partícula sofre, numa determinada configuração, em um tempo t , é calculada e em seguida obtém-se a aceleração, a velocidade e a posição resultante. Incrementa-se, então, um intervalo de tempo δt , escolhido de forma que a força seja constante, calcula-se novamente sua aceleração, velocidade e posição, e assim sucessivamente.

Existem vários algoritmos para integração das equações de movimento que utilizam o método de diferenciação finita. Todos assumem que os parâmetros aceleração, velocidade e posição possam ser descritas por uma expansão em série de Taylor [47].

Diferentes algoritmos de integração podem ser usados para este processo, sendo o mais comum o Algoritmo de Verlet.

4.3.1 – Algoritmo do método *Leapfrog*

Este algoritmo possui dois passos. Primeiro ele calcula as velocidades no tempo $\left(t + \frac{1}{2\delta t}\right)$, as posições então são calculadas no tempo $(t + \delta t)$ a partir das velocidades calculadas

$$v_{xi}(t + \delta t/2) = v_{xi}(t - \delta t/2) + h a_{xi}(t) \quad (10)$$

$$r_{xi}(t + \delta t/2) = r_{xi}(t) + h v_{xi}(t + \delta t/2) \quad (11)$$

Caso seja necessário saber a velocidade no tempo em que as coordenadas são calculadas, então pode-se usar:

$$v_{xi}(t) = v_{xi}(t - \delta t/2) + (\delta t/2)a_{xi}(t) \quad (12)$$

O nome *leapfrog* vem do fato de que as coordenadas e velocidades não são calculadas simultaneamente, que caracteriza uma desvantagem desse método.

4.4 Condições Periódicas de Contorno

A simulação por Dinâmica Molecular tem por objetivo reproduzir as propriedades macroscópicas do sistema a ser estudado, para isso é necessário um elevado número de partículas (da ordem do número de Avogrado). Porém trabalhar com essa grande quantidade de partículas gera problemas devido ao elevado custo computacional [48]. Para contornar esse problema utiliza-se um número relativamente pequeno de partículas, diminuindo, assim, esse custo, o que torna possível a simulação do sistema.

Por sua vez, diminuindo o número de partículas, faz com que o sistema modelado perca as características do sistema real a ser reproduzido. Para isso, utiliza-se as Condições Periódicas de Contorno (CPC), onde os átomos do sistema são colocados em uma caixa, a qual é rodeada por caixas imagens da central, ou seja, replica-se periodicamente a caixa central em todas as direções do espaço sem a necessidade de definir as coordenadas dos átomos que foram replicados.

Ao longo da simulação, quando um átomo se desloca na caixa central, suas imagens movem-se da mesma maneira. Quando um átomo sai por uma face, outra entra em sua face oposta, a fim de conservar constante o número de átomos do sistema (Figura 4.6).

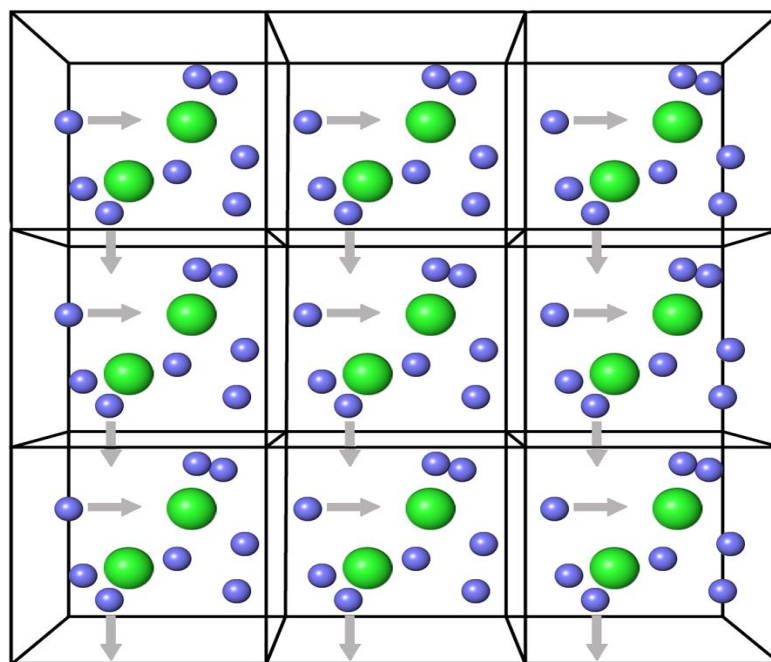


Figura 4.8 – Representação das condições periódicas de contorno. Com as setas representa-se o movimento de um átomo na caixa central e o mesmo movimento é reproduzido nas células imagem [49].

4.5 – Raio de Corte e Método do PME

Em simulações de Dinâmica Molecular a tarefa de maior custo computacional é realizar os cálculos das interações não ligadas, que geralmente são definidas pelas funções potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb.

O potencial de Lennard-Jones define as interações de curto alcance ($V \sim r^{-6}$), uma vez que, para grandes distâncias, o potencial tende a zero.

Para o tratamento dessas interações emprega-se o raio de corte (Figura 4.7) que é definido como, no máximo, metade do tamanho da célula (convenção de mínima imagem) a fim de evitar interações da partícula com sua própria imagem [48]. Com isso, interage com as partículas reais ou com as imagens que se encontram dentro do raio de corte.

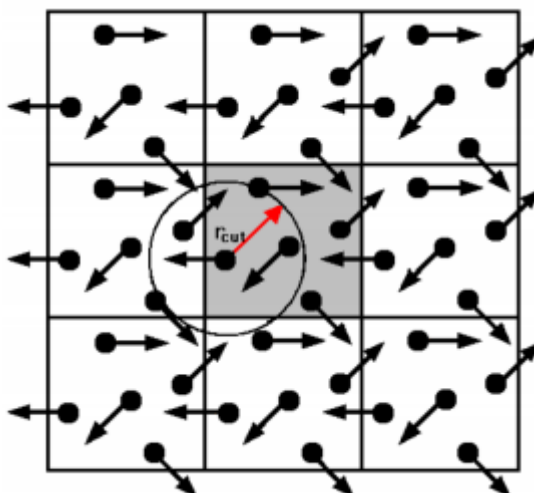


Figura 4.9 – Representação bidimensional do raio de corte definido por um círculo traçado em relação a uma partícula, no qual a partícula só interage com as outras partículas dentro do raio delimitado [50].

As interações eletrostáticas, representadas pelo potencial de Coulomb, decaem lentamente ($V \sim r^{-1}$) e, portanto, não convergem para zero nas dimensões da caixa de simulação, sendo então consideradas interações de longo alcance. O simples truncamento da função potencial, utilizando o raio de corte, produz efeitos que comprometem a simulação. Para contornar esse problema, faz-se uso da soma de Ewald, normalmente utilizando a implementação conhecida como PME (do inglês *Particle Mesh Ewald*). Nesta técnica, uma determinada partícula interage com as demais partículas do sistema e com todas suas imagens em um arranjo infinito de células periódicas, que no limite apresentam forma esférica [51,52].

4.6 – Cálculo do Perfil de Energia Livre

Utilizando mecânica estatística podemos calcular a energia livre de um dado sistema, ao longo da coordenada de reação z , pela seguinte expressão:

$$A(z) = -\frac{1}{\beta} \ln P(z) + A_0 \quad (13)$$

onde $\beta = 1/k_B T$ é o fator de temperatura, definido pela constante de Boltzmann k_B e a temperatura T ; A_0 é uma constante e $P(z)$ é a densidade de probabilidade canônica de encontrar o sistema em z [53].

A densidade de probabilidade é definida como:

$$P(z) = \frac{\sum_i^n e^{-\beta U_i(z)}}{S} \quad (14)$$

onde $e^{-\beta U_i(z)}$ é o peso de Boltzmann para qualquer microestado do sistema e $U_i(z)$ é a energia potencial do sistema para o valor z da coordenada de reação. A função de partição S é escrita como a soma dos pesos de Boltzmann para todos os estados N do sistema (equação 15)

$$S = \sum_N \sum_i^n e^{-\beta U_i(N)} \quad (15)$$

Porém as equações 13 e 14 não podem ser aplicadas na prática para a estimar o perfil de energia livre por um caminho de reação utilizando simulações no equilíbrio, uma vez que amostrar suficientemente cada ponto desse caminho com essa técnica exigiria, mesmo para sistemas pequenos, um alto custo computacional.

Para contornar esse problema são empregados métodos avançados de Dinâmica Molecular para cálculos de energia livre que potencializam a capacidade de amostrar o espaço configuracional e reduzir o custo computacional. Dentre os diversos métodos para essa finalidade, um dos mais bem sucedidos é o *Adaptive Biasing Force* (ABF) [53].

O método do ABF calcula o perfil de energia (A) ao longo da coordenada de reação (z) a partir da aplicação de uma força iterativa F^{ABF} que permite sobrepor barreiras de energia ao longo do caminho de reação.

$$F^{ABF} = \nabla_r A = -\langle F_z \rangle_z \nabla_r z \quad (16)$$

onde A é a energia livre e $-\langle F_z \rangle_z$ é a força média no sistema em um valor de z , projetada sobre a direção z .

A aplicação da F^{ABF} é feita na direção oposta à força média, de forma que a resultante ao longo da coordenada de reação seja nula, o que leva o sistema a percorrer a coordenada de reação apenas por forças difusivas, gerando uma amostragem homogênea da mesma.

4.7 –Análises Aplicadas

4.7.1 – Área por Lipídios

Os lipídios ocupam uma área superficial fixa definida por suas cabeças polares. Em uma bicamada, a área por lipídio é estimada a partir do cálculo da área ocupada por uma face da bicamada no plano xy dividido pelo número de lipídios que se encontram nessa face.

Em uma simulação computacional esse cálculo é utilizado como parâmetro de equilíbrio do sistema, uma vez que o sistema se encontra equilibrado quando sua área por lipídio tende a se manter constante.

4.7.2 –Perfil Densidade de Massa (P.D.M)

A partir de uma varredura ao longo do eixo z (normal a bicamada) é possível identificar a quantidade de massa das moléculas do sistema. Esse mapeamento fornece o perfil densidade de massa, com isso podemos verificar se as moléculas do sistema se encontram no local certo e também a espessura da bicamada.

4.7.3 –Parâmetro de Ordem (P.O)

O parâmetro de Ordem é um parâmetro que indica a ordenação do sistema.

A expressão usada para o cálculo do parâmetro de ordem é dada pela equação 17.

$$S_i = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta_i - 1 \rangle \quad (17)$$

sendo θ_i o ângulo entre o eixo molecular i e a Normal da bicamada.

O eixo molecular pode ser calculado como o vetor que une os átomos de carbono C_{i-1} e C_{i+1} em relação ao i-ésimo carbono do sistema, como demonstrado na figura 4.10 [54].

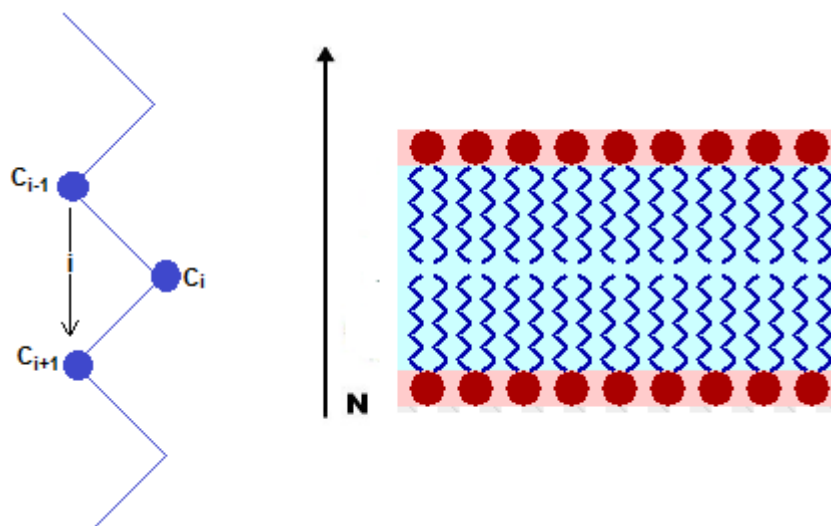


Figura 4.10 – Definição do eixo molecular i e da vetor normal a membrana N .

Analisando a figura 4.10 e a equação 17 observa-se que para uma situação de ordem absoluta $\theta = 180^\circ$ o parâmetro de ordem S_i vale 1 e para uma situação de desordem com $\theta = 90^\circ$ o parâmetro de ordem S_i vale -0,5.

Partindo deste princípio, uma diminuição da área da membrana, faz com que haja maior proximidade dos lipídios, restringindo seus movimentos, podendo aumentar a ordem do sistema. O contrário também vale, caso haja um aumento da área, ocorrerá uma maior mobilidade das cadeias, sendo assim, diminuição do parâmetro de ordem.

4.8 – Energia Livre de Ligação

É possível obter a constante de associação de um ligante k_a , e consequentemente a energia livre de ligação, a partir da integração do perfil de energia livre ao longo da coordenada de reação ξ . A constante de associação pode ser estimada usando a equação 18 [31,55].

$$K_a = \pi \cdot N_{av} \int r_{med}^2 \cdot e^{\left(-\frac{\Delta G(\xi)}{RT}\right)} d\xi \quad (18)$$

onde N_{av} é o número de Avogrado, $\Delta G(\xi)$ é o valor da energia livre do sistema em ξ , r_{med} é o raio médio percorrido pela molécula no eixo xy , R é a constante universal dos gases e T a temperatura do sistema.

Os limites de integração são definidos como os valores de ξ correspondentes às

situações onde o ligante está na solução e complexado no receptor. [56]

A partir do valor de K_a é possível calcular a energia livre de associação, $\Delta G_{\text{associação}}$, a partir da equação 19.

$$\Delta G_{\text{associação}} = -RT \ln K_a \quad (19)$$

onde R é a constante de Boltzmann, T a temperatura do sistema e K_a é a constante de associação calculada a partir da equação 19.

5 – DETALHES COMPUTACIONAIS

Neste presente trabalho foram realizadas diferentes simulações a fim de obter um melhor entendimento sobre a entrega do fármaco à célula pela molécula de ciclodextrina.

O trabalho foi dividido em duas etapas diferentes. Na primeira etapa foi construída, solvatada e equilibrada uma bicamada lipídica, e posteriormente, na segunda etapa, montou-se diferentes sistemas para o cálculo de perfis de energia livre utilizando o método do ABF.

5.1 – Construção e equilibração da bicamada lipídica

Com o objetivo de simular um modelo para membrana biológica foi contruída uma bicamada lipídica composta de 59 moléculas de Palmitoil-Oleoil-Fosfatidil-Colina (POPC) (figura 1.12) com 30 moléculas em uma face e 29 moléculas na outra.

A bicamada foi construída a partir do software Visual Molecular Dynamics (VMD) [57]. Uma vez construída, ela foi inserida em uma caixa de solvatação com arestas 54Å no eixo x, 52Å no eixo y e 96Å no eixo z.

Após a montagem do sistema, foi realizado uma minimização de energia de 10000 passos para o rearranjo das moléculas. Em seguida realizou-se uma simulação de 26ns com passos de integração de 2fs e mantendo pressão e temperatura constante, respectivamente, a 1atm e 298K. Foram impostas condições periódicas de contorno nas simulações e raio de corte de 12Å. Para as interações não ligadas de curto alcance e as interações coulombianas de longo alcance foram tratadas utilizando PME. As simulações foram realizadas com o pacote “NAnoscale Molecular Dynamics programs” (NAMD) [58]. O NAMD é um pacote gratuito para cálculos de Dinâmica Molecular e é conhecido pela eficiência em trabalhos em paralelo [59].

O campo de força utilizado foi o CHARMM36 [60] e o modelo que descreve a água é o TIP3P [61].

Na tabela 5.1 encontra-se, resumidamente, os parâmetros computacionais utilizados na simulação.

Tabela 5.1 – Dados das simulações para equilibração da bicamada de POPC.

Passos de integração	2 fs
Minimização	10000 passos
Pressão	1 atm
Temperatura	298 K
Equilibração	26 ns
Raio de Corte	12 Å
Campo de Força	CHARMM36
Moléculas de POPC	59
Moléculas de água	13206
Pacote de Simulação	NAMD

5.2 – Construção e simulação dos sistemas para cálculo da energia livre pelo método do ABF

Com o objetivo de elucidar o método de entrega de fármaco à célula pela ciclodextrina foram montados diferentes sistemas e realizados o cálculo da energia livre a partir do método do ABF. Os sistemas foram divididos em:

- a) Sistema A – Inclusão de uma molécula de colesterol na β -ciclodextrina
- b) Sistema B - Inclusão de uma molécula de quercetina na β -ciclodextrina
- c) Sistema C – Inclusão de uma molécula de colesterol na bicamada de POPC
- d) Sistema D – Inclusão de uma molécula de quercetina na bicamada de POPC

Para a simulação acima descritas foram adotados parâmetros em comum. Os sistemas foram simulados considerando condições periódicas de contorno no eixo x, y e z em um ensemble NTP (número de partículas, temperatura e pressão constante), utilizando o programa NAMD [58]. Para as interações não ligadas de curto alcance e as interações coulombianas de longo alcance foram tratadas utilizando PME. O campo de força utilizado foi o CHARMM36 [60] e o modelo que descreve a água é o TIP3P [61]. Foi realizado uma minimização de 5000 passos com passos de integração de 2

fs. Os sistemas foram simulados a pressão de 1 atm e temperatura de 298K.

Na tabela 5.2 está listado, resumidamente, os parâmetros em comum utilizados nos 4 sistemas: Sistema A, Sistema B, Sistema C e Sistema D.

Tabela 5.2 – Dados das simulações para os sistemas A, B, C e D.

Minimização	5000 passos
Passos de integração	2 fs
Pressão	1 atm
Temperatura	298 K
Raio de corte	12 Å
Equilibração	1 ns
Campo de força	CHARMM36
Modelo de água	TIP3P
Pacote de simulação	NAMD

O sistema A é composto por uma molécula de colesterol, uma molécula de β -ciclodextrina e solvatado em uma caixa de água de dimensões 40Å x 40Å x 80Å. Foi tomada como coordenada de reação ξ a distância entre o centro de massa dos oxigênios glicosídicos da ciclodextrina e um átomo de referência da molécula de colesterol. A molécula de colesterol foi deslocada ao longo da coordenada de reação, de forma a passar pelo interior da ciclodextrina e tomar a posição estando apenas em água novamente. Foram realizadas simulações em duas orientações do colesterol em relação à ciclodextrina (figura 5.2).

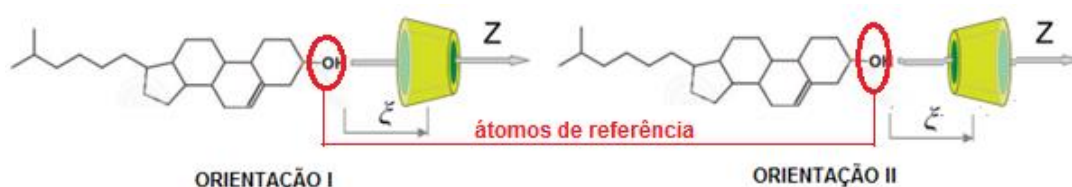


Figura 5.1 – Duas orientações do colesterol penetrando na cavidade da β -ciclodextrina, destacando, em vermelho, os átomos tomados como referência no colesterol para a escolha do caminho de reação.

A coordenada de reação foi dividido em 18 janelas de 2Å cada, percorrendo assim 36Å ao longo do caminho de reação. Para ambas as orientações, durante o cálculo da energia livre foram mantidos fixos por restrições suaves os oxigênios

glicosídicos da ciclodextrina a fim de que ela não transladasse.

O sistema B é composto por uma molécula de quercetina, cujas coordenadas foram obtidas a partir da modelagem realizada pela Ms Carolina Penhavel de Sousa durante seu trabalho de mestrado [62], uma molécula de β -ciclodextrina e solvatada em uma caixa de água de dimensões 40Å x 40Å x 80Å. Da mesma forma que no sistema A, foram tomados como referência para a coordenada de reação a distância entre o centro de massa dos oxigênios glicosídicos da CD e um átomo de referência na molécula de quercetina (figura 5.3). A molécula de quercetina foi deslocada ao longo da coordenada de reação, de forma a passar pelo interior da ciclodextrina e tomar a posição estando apenas em água novamente.

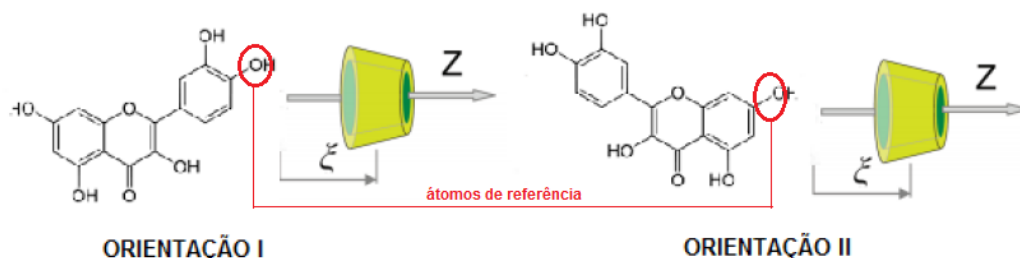


Figura 5.2– Duas orientações do quercetina penetrando na cavidade da β -ciclodextrina, destacando em vermelho os átomos tomados como referência na quercetina para a escolha do caminho de reação.

A coordenada de reação foi dividido em 18 janelas de 2Å cada e foram mantidos fixos os oxigênios glicosídicos da ciclodextrina, da mesma forma que no sistema A.

O sistema C é composto por uma molécula de colesterol e pela bicamada de POPC solvatada e equilibrada.

Foi tomado como coordenada de reação ξ a distância entre um átomo de referência no colesterol e os fósforos da face esquerda da membrana (Figura 5.4). O caminho de reação foi dividido em 27 janelas de 2Å cada.

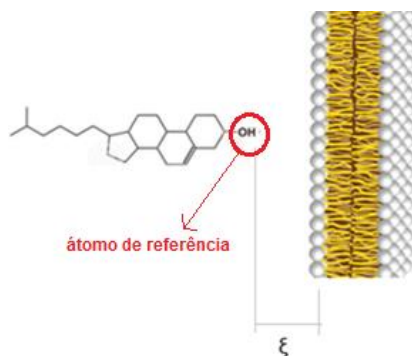


Figura 5.3 – Orientação do colesterol penetrando na bicamada

O sistema D é o mesmo que o sistema C, mas com a troca da molécula de colesterol por uma molécula de quercetina (Figura 5.5).

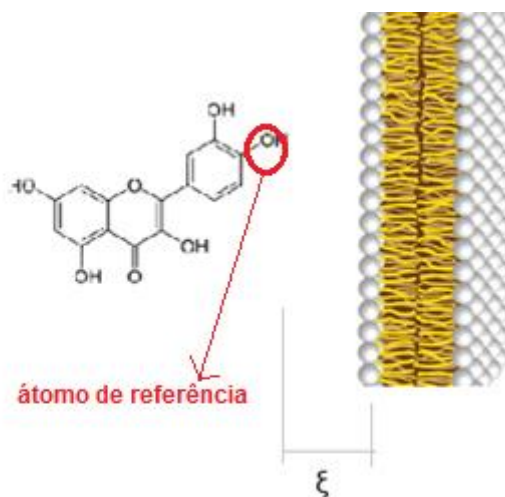


Figura 5.4 – Orientação da quercetina penetrando na bicamada

6 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados serão apresentados e discutidos individualmente para cada sistema estudado.

6.1 – Bicamada lipídica

a) Área por lipídio

Como já mencionamos anteriormente, o cálculo da área por lipídio é um fator a ser analisado como critério de equilíbrio do sistema.

Neste trabalho utilizamos uma bicamada homogênea de POPC, cujo valor de área por lipídio experimental é de $68,3 \pm 1,5 \text{ \AA}^2$ [63].

A área por lipídio calculada ao longo dos 26 ns de simulação é mostrada na figura 6.1a. Podemos observar uma queda nos valores ao decorrer da simulação até atingir um patamar, por volta de 12ns, em que se mantém oscilando em torno de um valor médio (Figura 6.1b). Tomando a média desses valores após os primeiros 12ns de simulação obtivemos um valor de $71.29 \pm 1,5 \text{ \AA}^2$.

Comparando o resultado deste trabalho com o valor experimental, concluímos que a bicamada se encontra equilibrada.

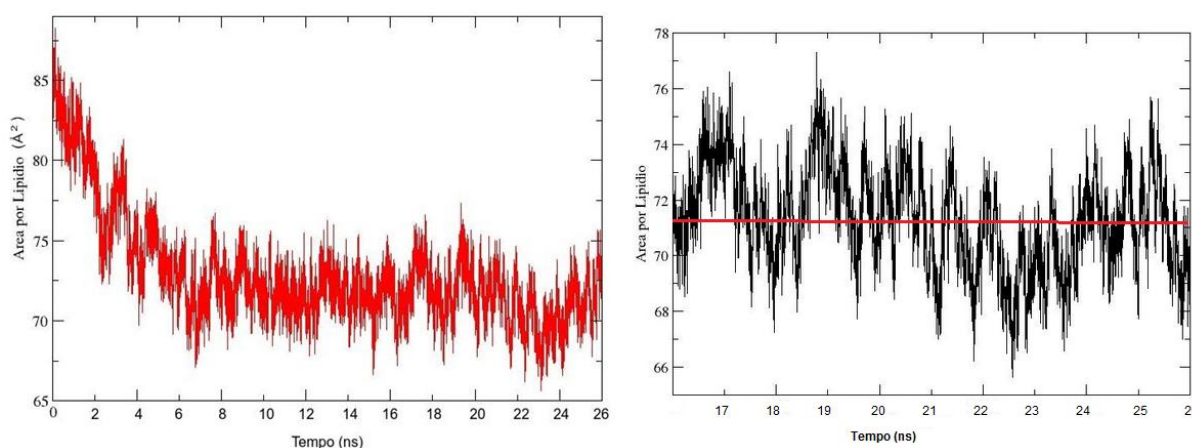


Figura 6.1 – Área por lipídio de uma bicamada de POPC – (a) Área por lipídio total, ao longo dos 36ns de simulação; (b) área por lipídio a partir dos primeiros 16ns de simulação. A linha vermelha representa o valor médio do gráfico.

b) Perfil densidade de Massa (PDM)

Outro parâmetro para análise é o perfil densidade de massa, no qual uma varredura ao longo do eixo z (normal à bicamada) identifica a quantidade de massa das moléculas do sistema em cada ponto.

A partir da sobreposição dos PDM de cada tipo molécula do sistema é possível observar a interface entre a membrana e o solvente, bem como a espessura da membrana.

Na figura 6.2 temos o PDM obtidos a partir da nossa simulação.

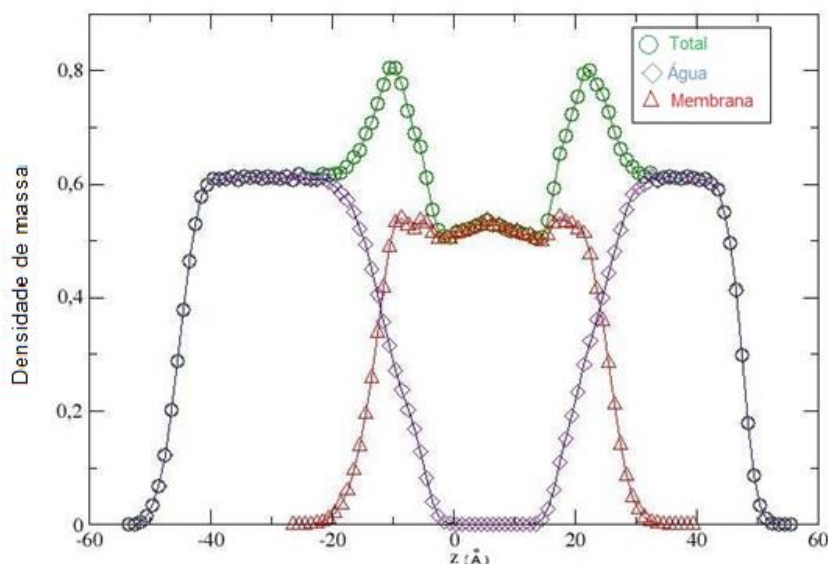


Figura 6.2 - Perfil de Densidade de Massa da bicamada de POPC em relação ao eixo z. Em azul estão a distribuição das águas, enquanto a distribuição da membrana está em vermelho. Em verde está o PDM de todos os componentes do sistema.

Os perfis de densidade de massa apontam a posição de uma molécula em relação ao eixo z (Normal da membrana). Como se pode observar na Figura 6.2, dentro da região que vai de $-12\text{\AA}$ até $25\text{\AA}$ temos uma alta densidade de membrana (em vermelho) e nesta região é possível observar uma baixa densidade de moléculas de água, o que demonstra que no interior da bicamada de POPC não há águas. Também é possível observar a espessura desta bicamada, que é dada pela região de interface entre a membrana (vermelho) e a água (azul) resultando em $37\text{\AA}$, comparados com $39\text{\AA}$ fornecidos pela literatura [63].

c) *Parâmetro de Ordem (P.O.)*

Para analisar o ordenamento das cadeias alifáticas do POPC, foi realizado o cálculo do P.O. das cadeias palmitoil e oleoil, que conta com uma insaturação no carbono 9.

De acordo com a definição, quanto maior o alinhamento dos átomos de carbono nas cadeias com o eixo z perpendicular à bicamada, maior o parâmetro de ordem. Analisando a figura 6.3 observamos um maior alinhamento na cadeia saturada em comparação com a cadeia insaturada. Isso ocorre pois a instauração promove um desordenamento obrigatório devido a geometria da ligação C=C. Também é possível observar que os átomos localizados no início da cadeia apresentam maior parâmetro de ordem comparado com os localizados na outra extremidade, devido à grande mobilidade nesta região.

Comparando com os resultados teóricos [61], obtidos a partir da mesma composição da bicamada e o mesmo campo de força, observa-se semelhança entre os resultados.

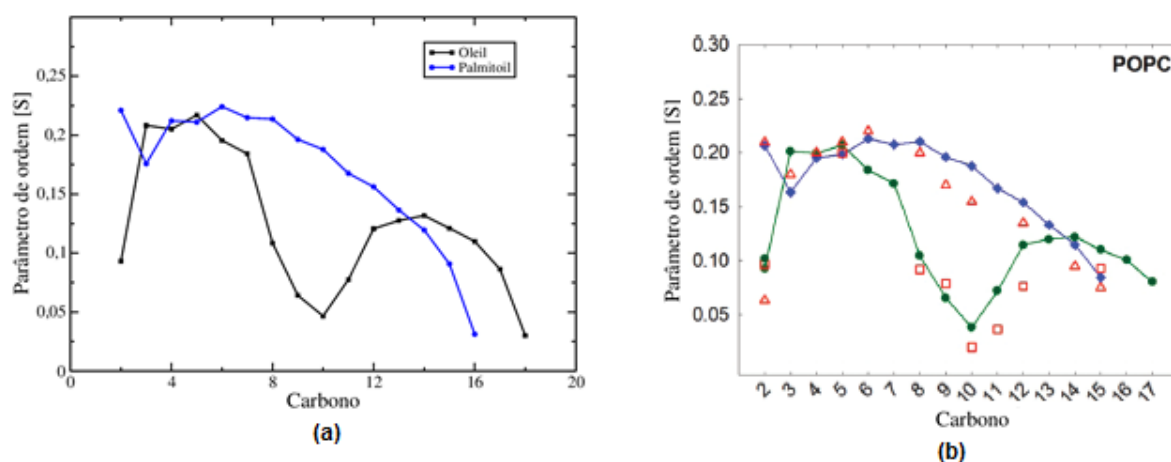


Figura 6.3 – Parâmetro de Ordem das cadeias alifáticas da bicamada de POPC. (a) O gráfico mostra o ordenamento das cadeias alifáticas, palmitoil (saturada) em azul e oleil (insaturada) em preto. (b) Gráfico do Parâmetro de ordem obtido em [61].

Após os 26ns de equilibração, temos, de acordo com os resultados acima, uma bicamada lipídica de POPC equilibrada, apresentada na figura 6.4.

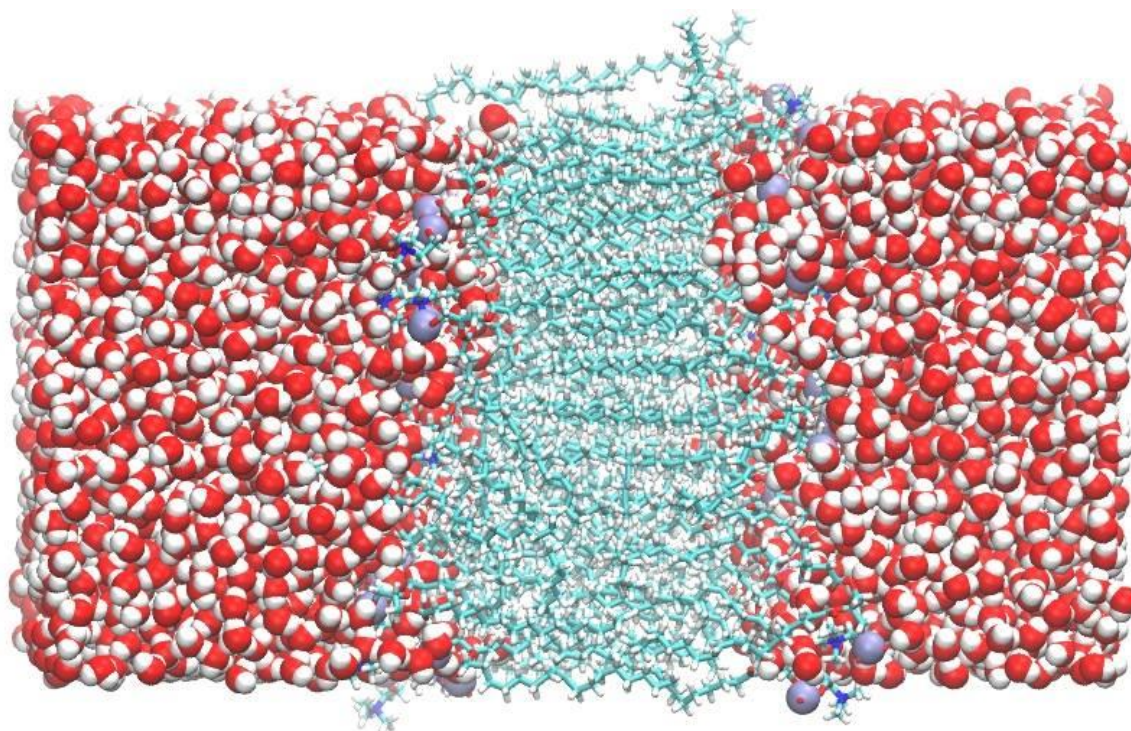


Figura 6.4 – Sistema Bicamada e água após a equilibração

6.2 – Calculo de energia livre pelo método do ABF

a) Sistema A – Inclusão da molécula de colesterol na β -CD

O perfil de energia livre caracterizado pela inclusão do colesterol na orientação I da figura 5.2 está mostrado na figura 6.5a. Podemos observar no perfil de energia livre dois mínimos separados por uma barreira.

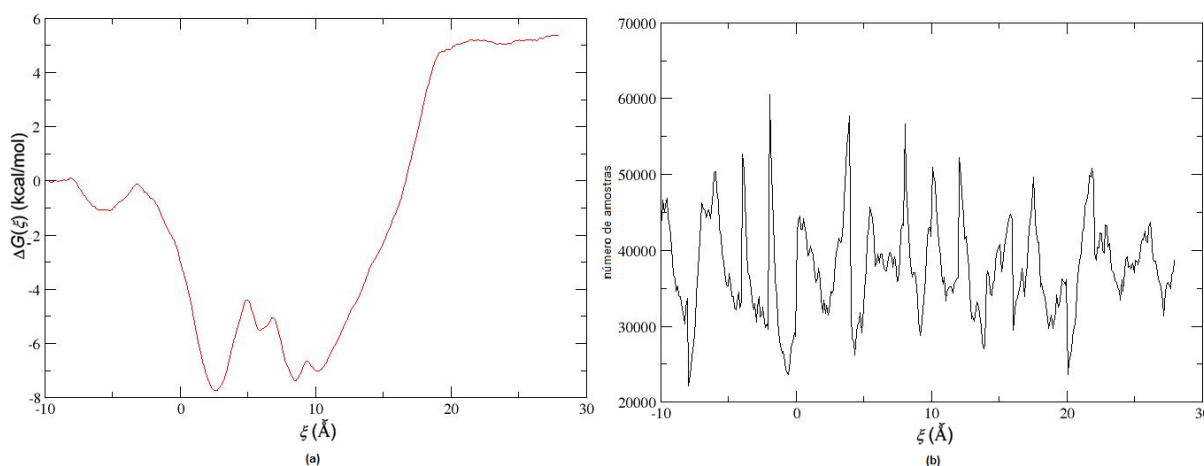


Figura 6.5 – Perfil de energia livre obtida a partir do método do ABF para inclusão do colesterol na β -ciclodextrina. (a) Perfil de energia livre para 20ns por janela, totalizando 360ns. (b) número de amostras ao longo da coordenada de reação

O gráfico de como o sistema foi amostrado ao longo da coordenada de reação encontra-se na figura 6.5b e é possível observar que o sistema visitou todos os pontos da coordenada de reação de maneira homogênea.

Estes cálculos foram realizados para validar nossa aplicação do ABF, já que nossos resultados concordaram com os já publicados por outro grupo em 2006 [31].

Observando a figura 6.5a nota-se um primeiro mínimo por volta de 2,5 Å correspondente a uma energia de aproximadamente -7,6 kcal/mol. A estrutura representativa deste ponto é mostrada na figura 6.6a, na qual podemos observar que os anéis A e B estão na região interna da CD. A medida que o colesterol penetra na cavidade surge uma barreira de energia, por volta de 5Å e -4,5kcal/mol, devido ao impedimento estérico. A estrutura desta posição é mostrada na figura 6.6b, na qual observa-se uma porção volumosa do colesterol no interior da cavidade, o que indica que essa barreira aparece devido ao impedimento estérico. Um segundo mínimo surge por volta de 8,4Å com energia livre de -7,2kcal/mol. Neste ponto o anel A e o grupo metil se encontram fora da cavidade e os anéis C e D dentro (figura 6.6c). Conforme o colesterol percorre a cavidade até sair por inteiro a energia aumenta progressivamente até atingir um patamar, quando o colesterol está na solução.

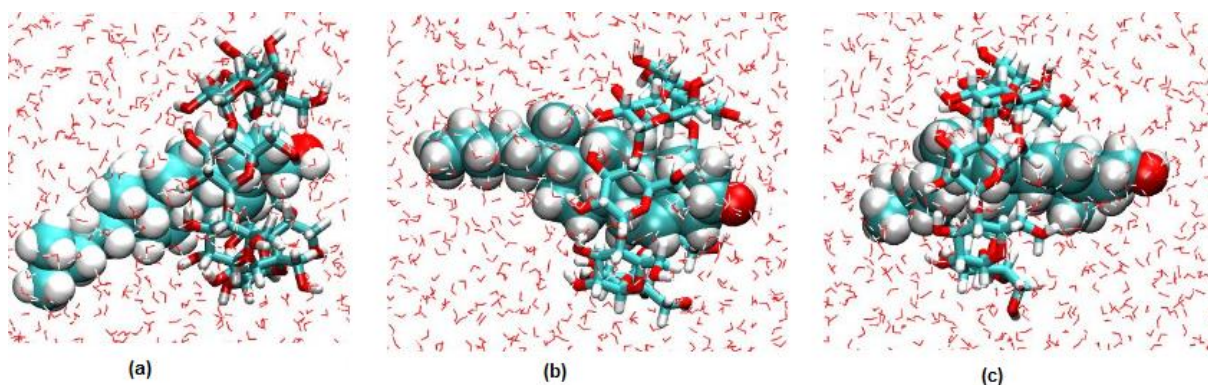


Figura 6.6 – Estrutura da inclusão do colesterol na β -CD para orientação I. (a) Próximo do primeiro mínimo, (b) próximo do máximo, (c) próximo ao segundo mínimo.

Para a orientação II, inicialmente calculou-se o perfil de energia livre até que o mesmo estivesse convergido (figura 6.7), o que aconteceu com 12ns por janela, totalizando 216ns de simulação e a partir deste fez-se as análises necessárias.

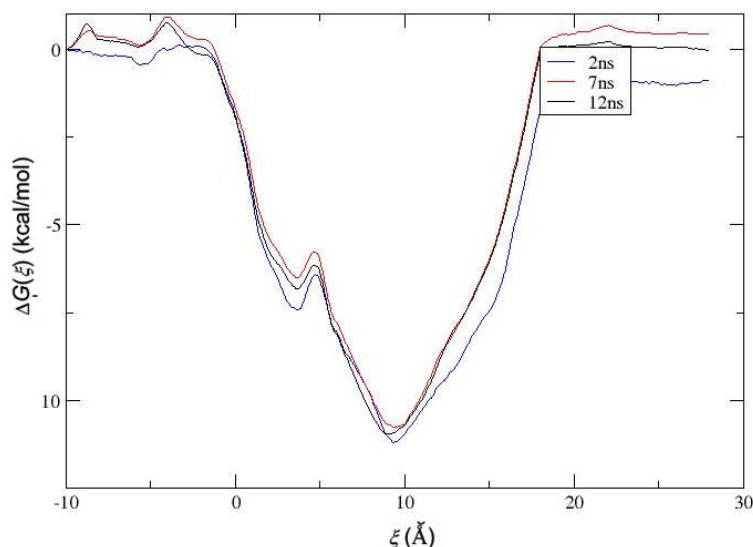


Figura 6.7 – Perfil de energia livre para inclusão do colesterol na orientação II. Destacando em azul a curva para 2ns, em vermelho para 7ns e em preto para 12ns.

A partir do perfil convergido, ou seja, 12ns (figura 6.8), podemos observar um primeiro mínimo suave por volta de 3,6 Å com energia livre de -7kcal/mol. Neste ponto o anel A está dentro da cavidade (figura 6.9a). Conforme penetra na cavidade uma pequena barreira de energia aparece, por volta de 4,7Å, cuja estrutura está descrita na figura 6.9b e apresenta o primeiro anel saindo da cavidade.

A medida que o colesterol percorre o interior da cavidade surge outro ponto de mínimo em 9Å cuja energia -10,7kcal/mol. Neste ponto o grupo hidroxil, o anel A e B e o grupo metil encontram-se fora da cavidade e os anéis C e D no interior (figura 6.9c). Após este ponto a energia aumenta gradativamente até atingir um patamar quando não há mais interações entre o colesterol e a ciclodextrina.

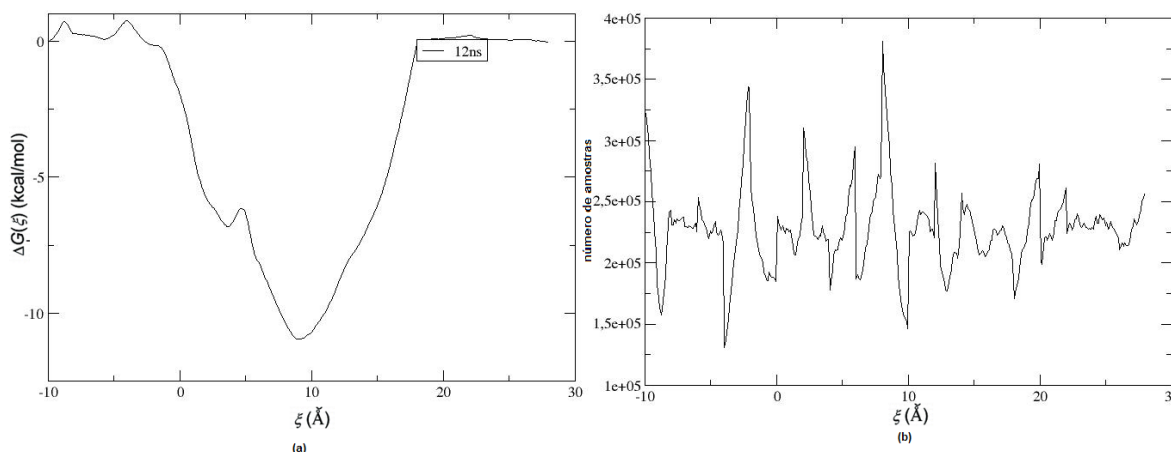


Figura 6.8 – Perfil de energia livre obtida a partir do método do ABF para inclusão do colesterol na β -ciclodextrina pela orientação II. (a) Perfil de energia livre para 12ns (b) número de amostras ao longo da coordenada de reação

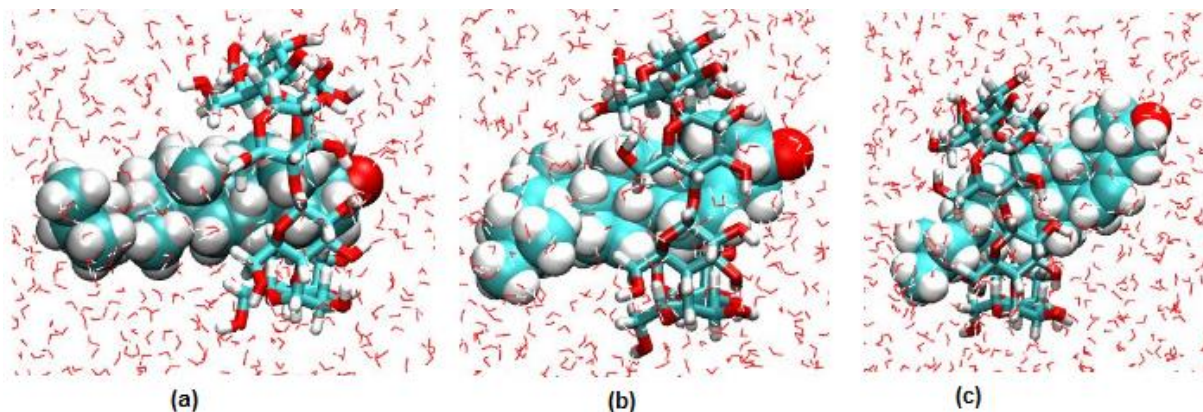


Figura 6.9 – Estrutura da inclusão do colesterol na β -CD para orientação II. (a) Próximo do primeiro mínimo, (b) próximo do máximo, (c) próximo ao segundo mínimo.

A partir da equação 19 é possível calcular a energia livre de associação do colesterol com a β -ciclodextrina. Os valores obtidos encontram-se na tabela 6.1

Tabela 6.1 – Valores para energia de associação para ambas orientações para formação com complexo de inclusão

Orientação	$\Delta G_{\text{associação}}$ (kcal/mol)
I	-4,6*
II	-1,8

* $\Delta G_{\text{associação-teórico}} = -4,5$ kcal/mol calculado pelo mesmo método deste trabalho [31] e $\Delta G_{\text{associação-experimental}} = -5,7$ kcal/mol [64]

Um fato a ser considerado é que, se fossemos analisar o valor da energia apenas pela curva do perfil de energia livre, consideraríamos a orientação II como mais favorável, uma vez que esta possui um mínimo mais acentuado (-11kcal/mol) comparado com a orientação I (-7,9kcal/mol), por isso é necessário fazer o uso da equação 20 para obter o valor real da energia de associação.

Analisando os resultados da tabela 6.1 podemos concluir que é mais favorável que a complexação ocorra na orientação I, uma vez que a energia de associação se mostrou mais negativa, ou seja, mais estável.

b) Sistema B – Inclusão da molécula de quercetina na β -CD

Inicialmente calculou-se o perfil de energia livre para a inclusão da quercetina na

β -ciclodextrina para a orientação I (Figura 6.10). Para esta orientação foram necessários 30ns por janela, totalizando 540ns de simulação, para a convergência do perfil de energia livre.

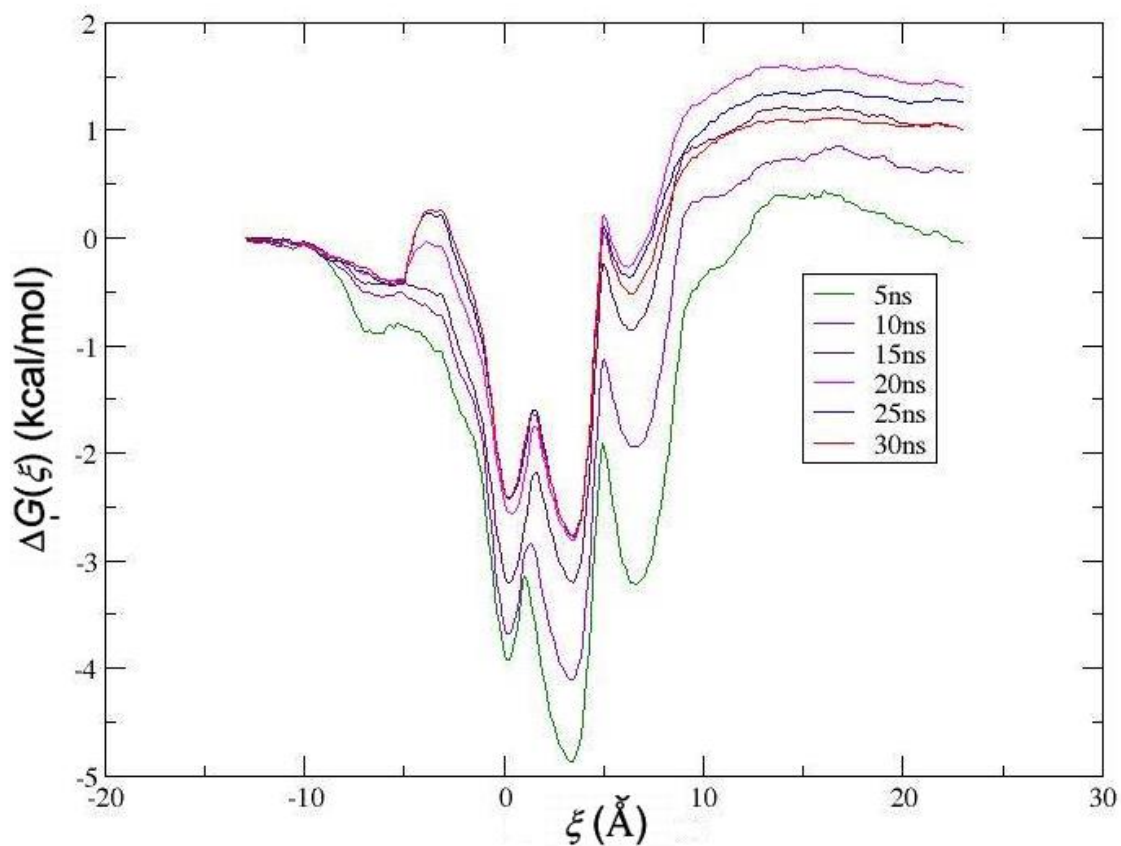


Figura 6.10– Perfil de energia livre para a inclusão da quercetina na β -ciclodextrina ao longo do eixo z.

A partir do perfil convergido (figura 6.11) podemos fazer as análises necessárias.

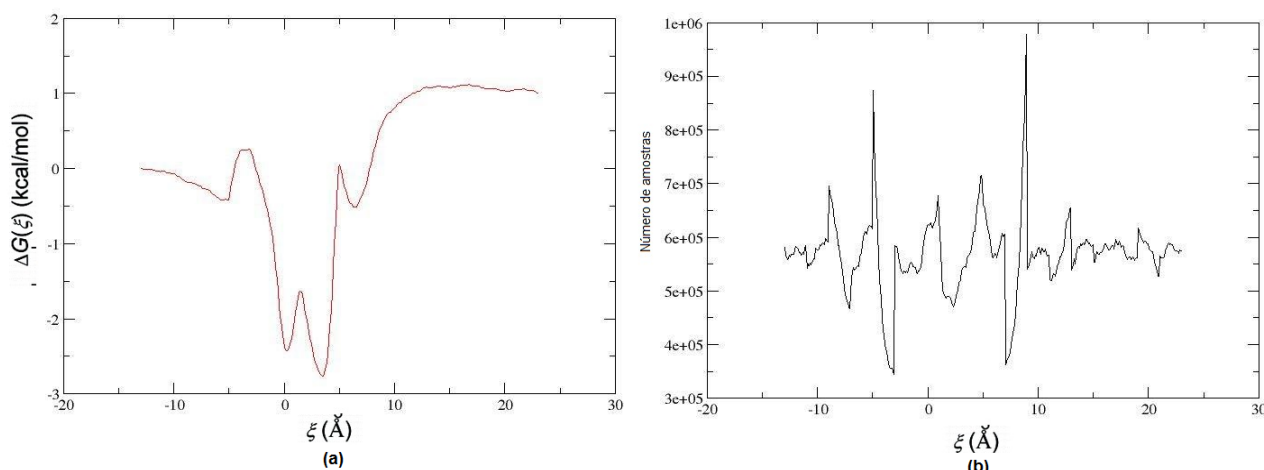


Figura 6.11 – (a) Perfil de energia livre para inclusão da QCT na β -CD, após a convergência do mesmo. (b) Número de amostras ao longo da coordenada de reação.

O gráfico de como o sistema foi amostrado ao longo da coordenada de reação encontra-se na figura 6.11b e é possível observar que o sistema visitou todos os pontos da coordenada de reação de maneira homogênea.

Analisando a figura 6.11-a, podemos observar que a energia decresce conforme a quercetina se aproxima da β -CD, levando ao primeiro mínimo por volta de $0,25\text{\AA}$ com energia livre $-2,4$ kcal/mol. A estrutura representativa deste ponto é mostrada na figura 6.12-a. Neste complexo, o anel B da quercetina, adentra na cavidade da CD, levando ao primeiro mínimo de energia.

Conforme a QCT mergulha na cavidade, uma barreira de energia aparece, devido ao impedimento estérico causados pelos grupos ramificados Figura 6.12-b.

O segundo mínimo acontece por volta de $3,5\text{\AA}$ com energia livre de $-2,8$ kcal/mol. O segundo complexo *host-guest* é mostrado na figura 6.12-c. Podemos observar que o primeiro anel está saindo do interior da cavidade, enquanto os anéis C e A estão entrando.

Com a saída da quercetina do interior da cavidade, a energia livre aumenta progressivamente, até atingir um patamar, quando as duas espécies químicas não interagem mais.

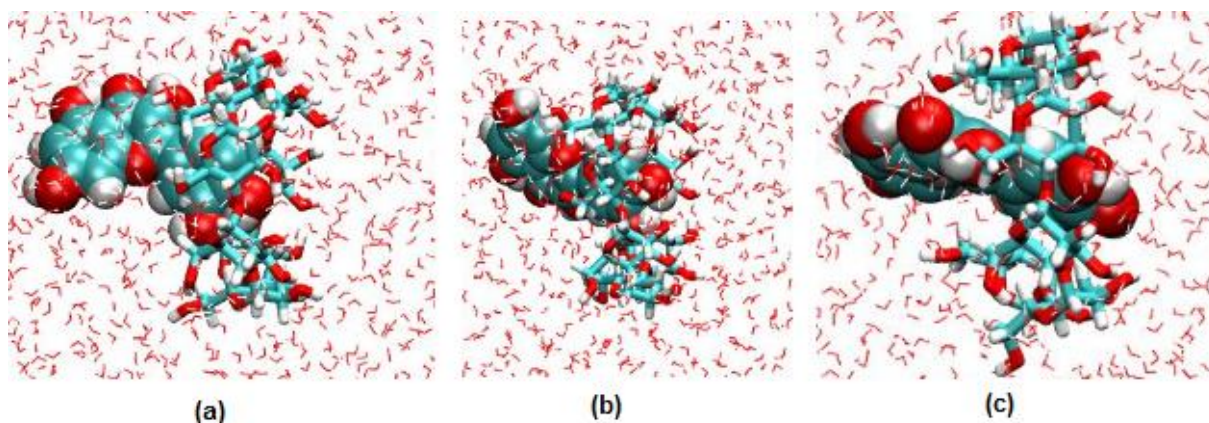


Figura 6.12 – (a) Representação do primeiro mínimo apresentado no gráfico da inclusão quercetina-ciclodextrina. (b) Representação do primeiro máximo, mostrando que o primeiro anel encontra-se dentro da cavidade e o segundo começa a entrar. (c) Representação do segundo mínimo, quando o primeiro anel já saiu da cavidade e os demais estão no interior.

As mesmas análises foram feitas para a orientação II, porém foram necessários 45ns por janela, totalizando 810ns de simulação, para a convergência do perfil de energia livre (figura 6.13).

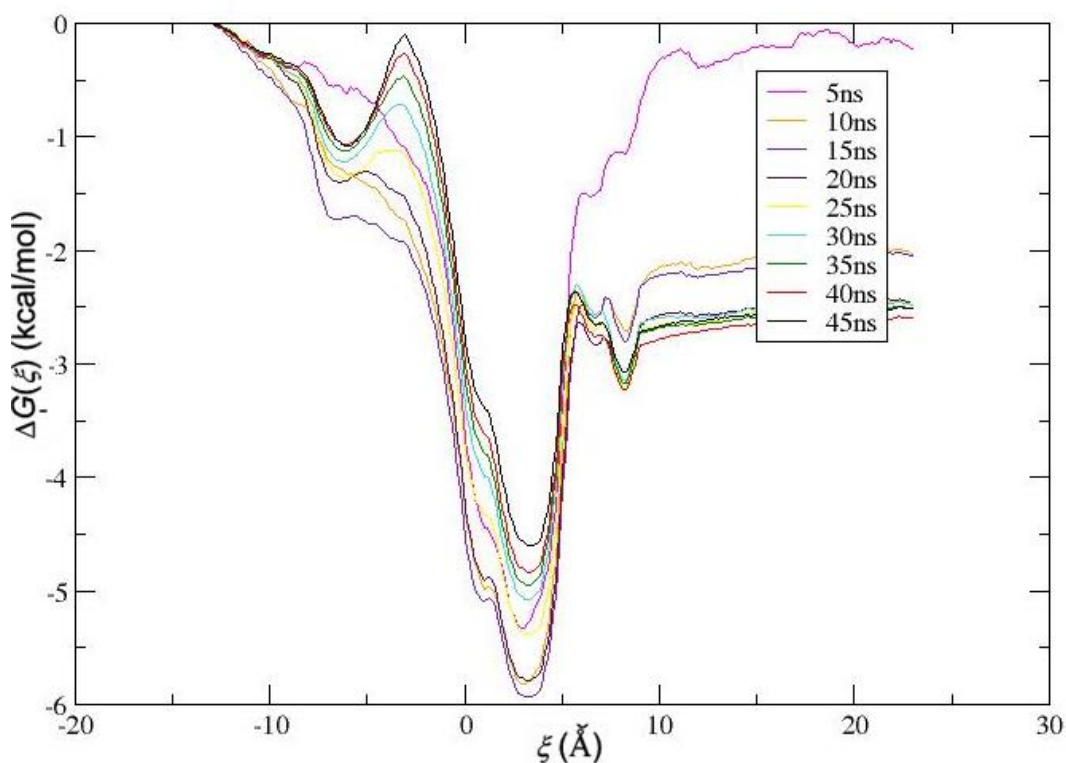


Figura 6.13– Perfil de energia livre para a inclusão da quercetina na β -ciclodextrina na orientação II ao longo do eixo z

A partir do perfil convergido, ou seja, 45ns, podemos fazer as análises

necessárias.

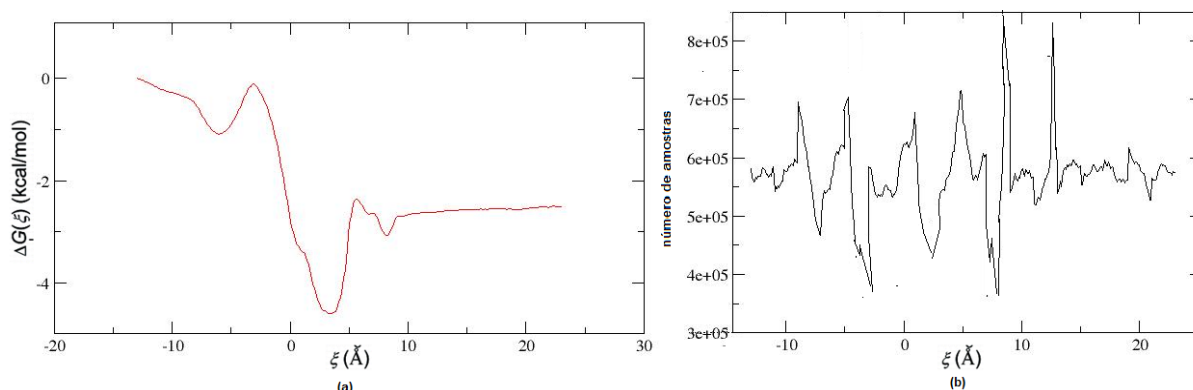


Figura 6.14 – (a) Perfil de energia livre para inclusão da QCT na β -CD, após a convergência do mesmo, para orientação II. (b) Número de amostras ao longo da coordenada de reação.

Podemos observar, a partir da figura 6.14a, que a medida que a quercetina se aproxima da ciclodextrina a energia diminui gradativamente. Uma pequena barreira surge neste momento, por volta de $-4,9\text{\AA}$, para uma posição específica da quercetina em relação a ciclodextrina, que é o momento em que os grupos OH se aproximam da cavidade (figura 6.15a). Conforme a quercetina segue no caminho de reação surge um mínimo bem acentuado em $3\text{\AA}$ e energia $-4,5\text{kcal/mol}$. A estrutura que representa este ponto está ilustrada na figura 6.15b e tem a característica de ter o grupo OH saindo do interior da cavidade e os dois primeiros anéis mergulhados no interior. A medida que a quercetina continua o caminho a energia aumenta gradativamente, passa por um ponto de máximo (figura 6.15c) e atinge um patamar, quando já não há mais interação entre a QCT e a CD.

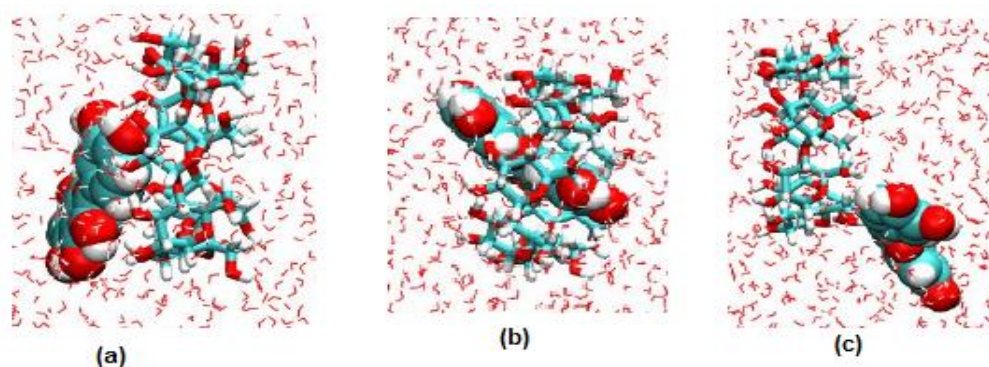


Figura 6.15 – (a) Representação do primeiro máximo apresentado no gráfico da inclusão quercetina-ciclodextrina. (b) Representação do mínimo global, mostrando que o primeiro anel se encontra dentro da cavidade e o segundo começa a entrar. (c) Representação do segundo máximo, quando a quercetina se encontra no exterior da cavidade.

A partir da equação 19 é possível calcular a energia livre de associação da quercetina com a β -ciclodextrina. Os valores obtidos encontram-se na tabela 6.2

Tabela 6.2 – Valores de energia de associação para inclusão da quercetina na β -ciclodextrina para ambas orientações

Orientação	$\Delta G_{\text{associação}}$ (kcal/mol)
I	-2,3
II	-1,9

Novamente, a partir da tabela 6.2 observamos que a orientação que possui energia de associação mais negativa (orientação I com $\Delta G_{\text{associação}} = -2,3 \text{ kcal/mol}$) é a que possui um gráfico (figura 6.10) com uma profundidade menor, quando comparada com a outra orientação.

Analisando os resultados da tabela 6.2 podemos concluir que é mais favorável que a complexação ocorra na orientação I, uma vez que a energia de associação se mostrou mais negativa, ou seja, mais estável.

c) Sistema C – Inclusão de uma molécula de colesterol na bicamada de POPC

Após as simulações e análises da formação do complexo de inclusão da β -ciclodextrina com as moléculas de colesterol e quercetina, partimos para a análise da energia livre de associação dessas moléculas em relação a bicamada de POPC previamente equilibrada.

Inicialmente começamos a análise com a molécula de colesterol. Partiu-se da estrutura inicial descrita na figura 5.4 de forma que o átomo O3 encontra-se de frente para a face esquerda da bicamada. A partir deste ponto o colesterol foi movido ao longo do caminho de reação e o perfil de energia livre obtido foi descrito na figura 6.16.

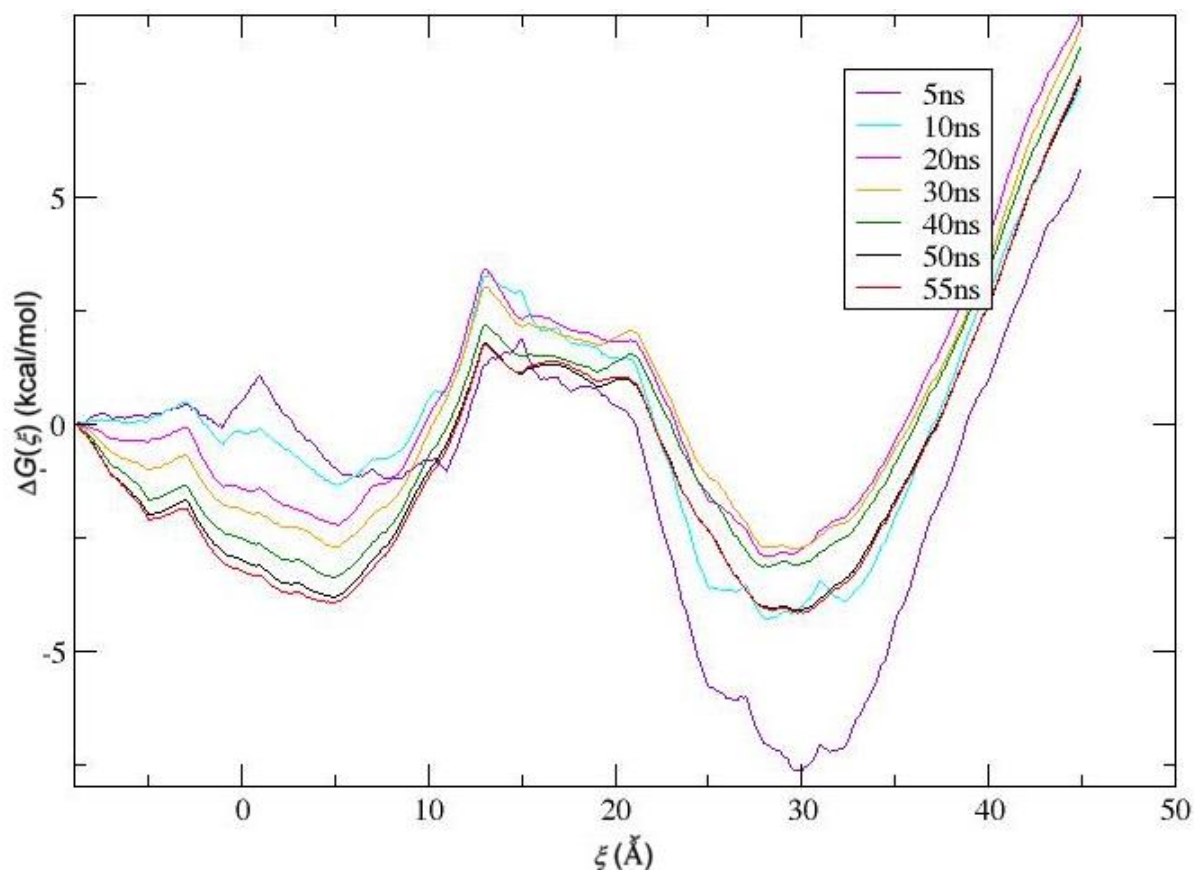


Figura 6.16– Perfil de energia livre para a inclusão do colesterol na bicamada de POPC.

Foram necessários 55ns por janela, totalizando 1,485 μ s de simulação, para a convergência do perfil de energia livre.

A partir do perfil convergido (figura 6.17a), ou seja, 55ns podemos fazer as análises necessárias.

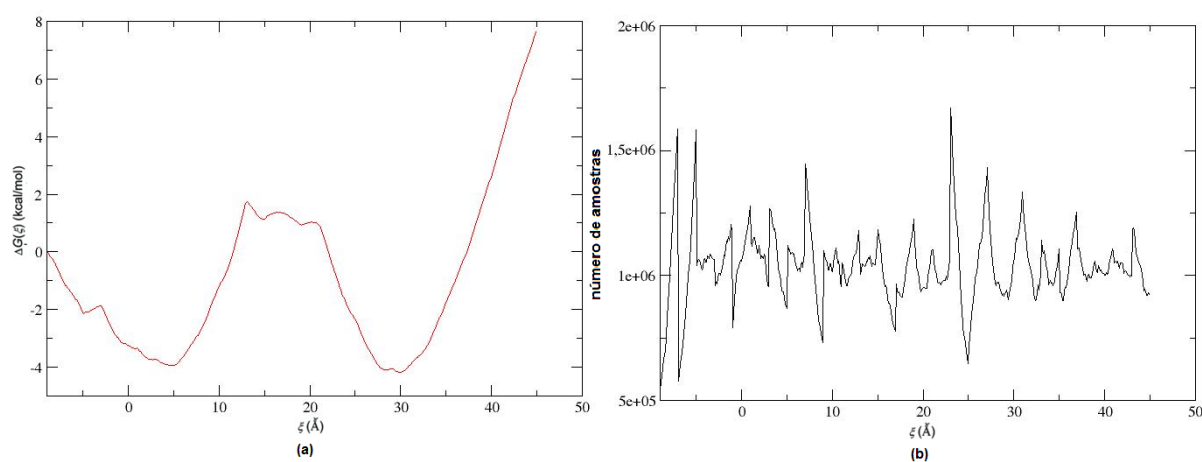


Figura 6.17 – (a) Perfil de energia livre para inclusão do colesterol na bicamada, após a convergência do mesmo. (b) Número de amostras ao longo da coordenada de reação.

Podemos observar a partir de 6.17a dois mínimos com energia por volta de -4kcal/mol, o primeiro em 5Å e o segundo em 30Å, separados por um máximo em 12Å.

O primeiro mínimo apresenta a estrutura descrita na figura 6.18a, na qual o colesterol se orienta na bicamada de forma a ficar uma configuração mais estável. Ao iniciar a entrada ele é posicionado com o grupo hidrofílico voltado para as cabeças polares da bicamada, conforme a orientação descrita na figura 5.4. A medida que ele penetra na cavidade, ele se rotacional até que seu grupo polar esteja em contato com o grupo polar da bicamada e sua calda hidrofílica esteja em contato com a calda hidrofílica das moléculas de POPC na bicamada. Esta necessidade de reorientação do colesterol na bicamada levou o perfil de energia livre demorar para convergir.

Seguindo no caminho de reação aparece uma barreira por volta de 10Å e energia positiva de 2kcal/mol. Observando a figura 6.18b notamos que nesta posição tanto a cabeça hidrofílica, quando a calda hidrofóbica do colesterol se encontra na região apolar da membrana, algo que não é favorável energeticamente.

Seguindo na direção da outra face da bicamada outro mínimo surge, por volta de 30Å com energia praticamente igual ao do primeiro mínimo, de -4kcal/mol. Este ponto está representado na figura 6.18c que é o momento que a cabeça polar do colesterol se encontra em contato com a face hidrofílica da membrana e o corpo apolar se encontra na região hidrofóbica. A medida que seguimos pelo caminho de reação a energia aumenta, até o colesterol perder o contato com a bicamada.

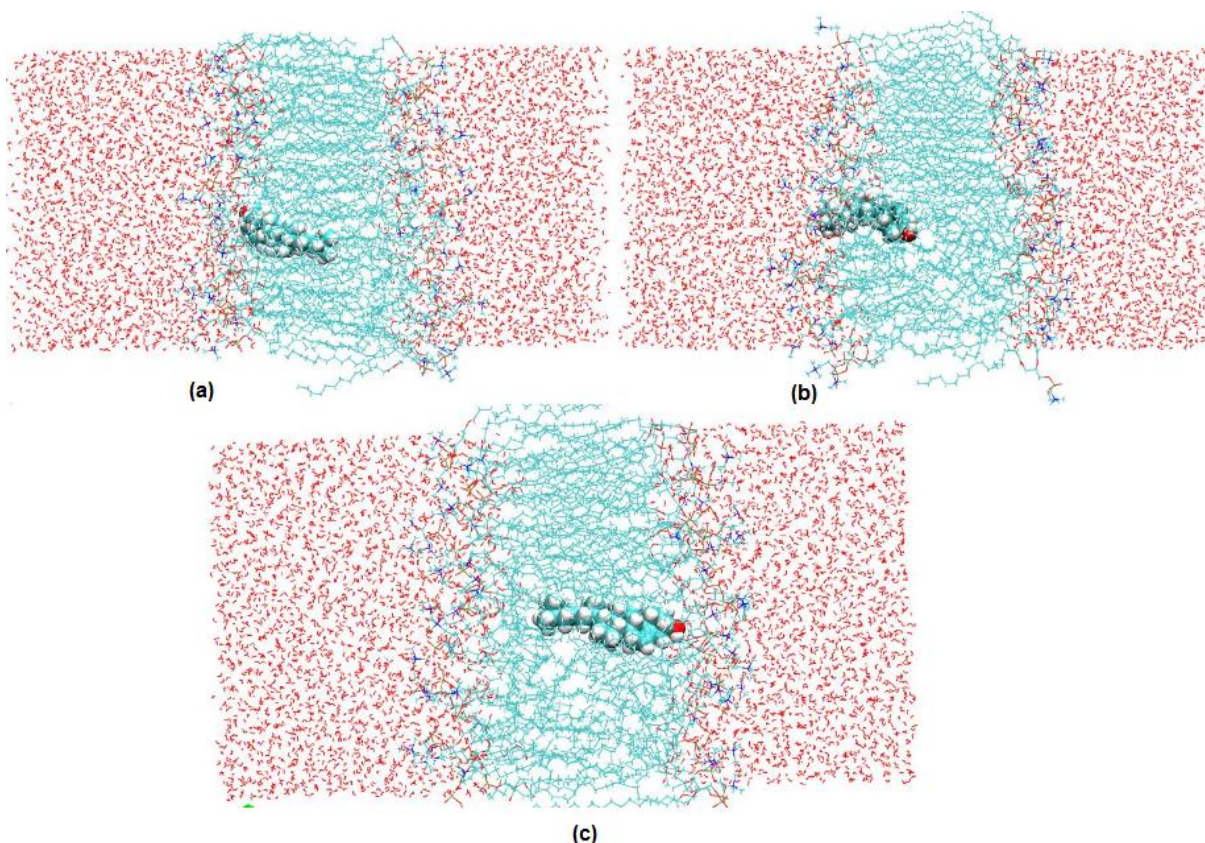


Figura 6.18 – (a) Representação do primeiro mínimo apresentado no gráfico da inclusão colesterol-ciclodextrina. (b) Representação do máximo, mostrando que neste ponto o colesterol se encontra por inteiro na região hidrofóbica da bicamada. (c) Representação do segundo mínimo, quando a parte hidrofílica do colesterol se encontra com a cabeça polar da bicamada.

A partir da equação 19 é possível calcular a energia livre de associação do colesterol com a bicamada de POPC. O valor obtido foi de $\Delta G_{\text{associação}} = -1,9 \text{ kcal/mol}$.

d) Sistema D – Inclusão de uma molécula de quercetina na bicamada de POPC

Para inclusão da quercetina na bicamada de POPC, partiu-se da estrutura inicial, amostrada na figura 5.5, e dividiu-se o caminho de reação em 28 janelas de 2Å, a fim de obter a convergência dos cálculos mais rapidamente.

A fim de verificar a estabilidade da inserção da quercetina na membrana, foram realizados cálculos de ABF. O gráfico da figura 6.19 mostra que, 20ns por janela, totalizando 540ns de simulação, são o suficiente para convergência da energia.

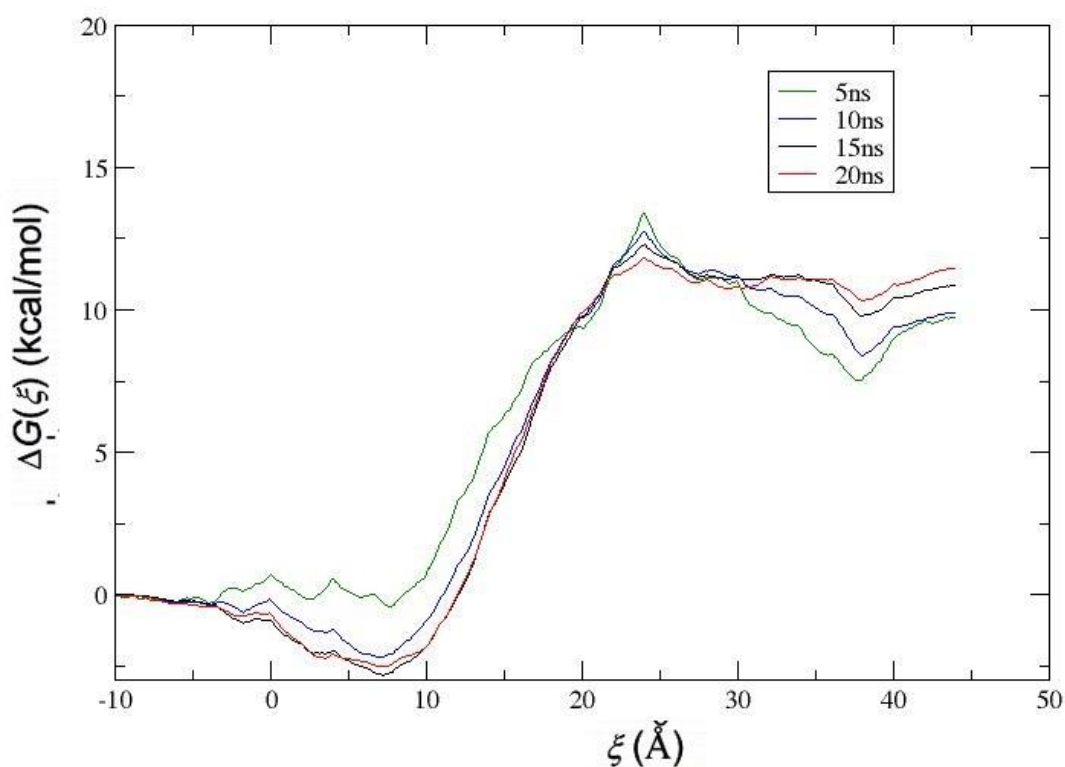


Figura 6.19 – Perfil de energia livre da inserção da quercetina na membrana de POPC. Foram realizados os cálculos do PMF para diferentes tempos até a obtenção da convergência no mesmo.

Analisando a curva do PMF após 20ns (Figura 6.20-a), ou seja, após a convergência, é possível encontrar a posição mais estável da quercetina no sistema. A partir da figura 6.20-b pode-se analisar que o sistema foi amostrado de forma homogênea, ou seja, a molécula de quercetina visitou todo o caminho de reação, que mostra que os resultados são confiáveis.

Destacando a região de mínima energia (Figura 6.20), pode-se notar uma região de mínima energia mais destacada, que é a posição mais estável da quercetina na membrana.

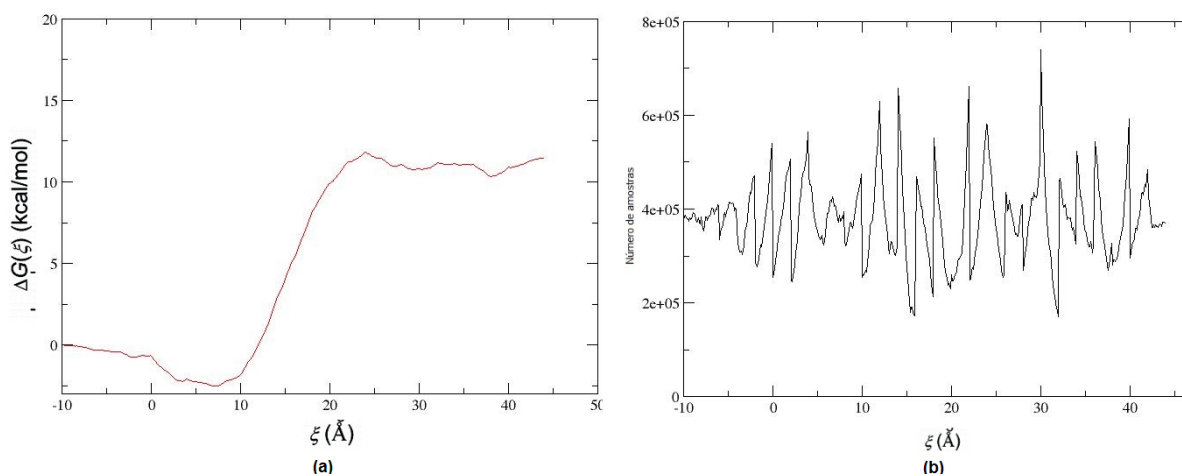


Figura 6.20 – (a) Perfil de energia livre após a convergência. (b) Número de amostras ao longo da coordenada de reação.

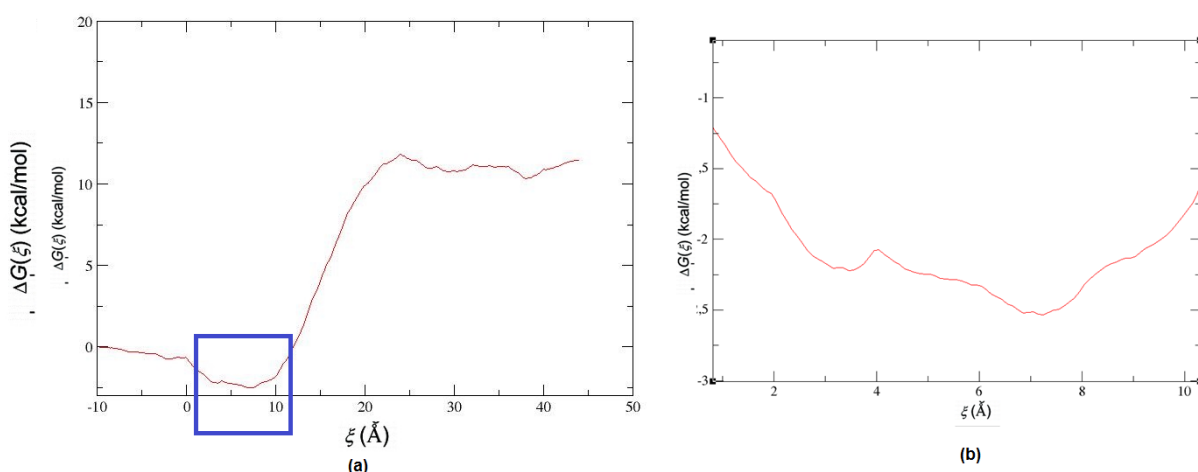


Figura 6.21 – (a) PMF total para 20ns destacando-se em azul a região que será ampliada. (b) Região ampliada do PMF, mostrando com detalhe um mínimo, que é a região de maior estabilidade da molécula da quercetina.

Analisando a figura 6.21-b observa-se um mínimo de energia por volta de 7,2Å com energia livre de -2,5kcal/mol.

Pelo fato da quercetina não possuir uma região hidrofílica e hidrofóbica bem definida, a posição mais estável dela não necessitou um rearranjo em relação a posição de entrada na bicamada. Isto justifica o fato de o perfil de energia livre convergir mais rapidamente, quando comparado a inserção do colesterol na bicamada, e também o fato de ter apenas uma região de mínimo de energia.

A estrutura associada a este ponto é dada pela figura 6.22. Conforme a molécula penetra no interior da membrana, a energia aumenta rapidamente, mostrando que, voltar para o meio aquoso é um processo energeticamente

desfavorável.

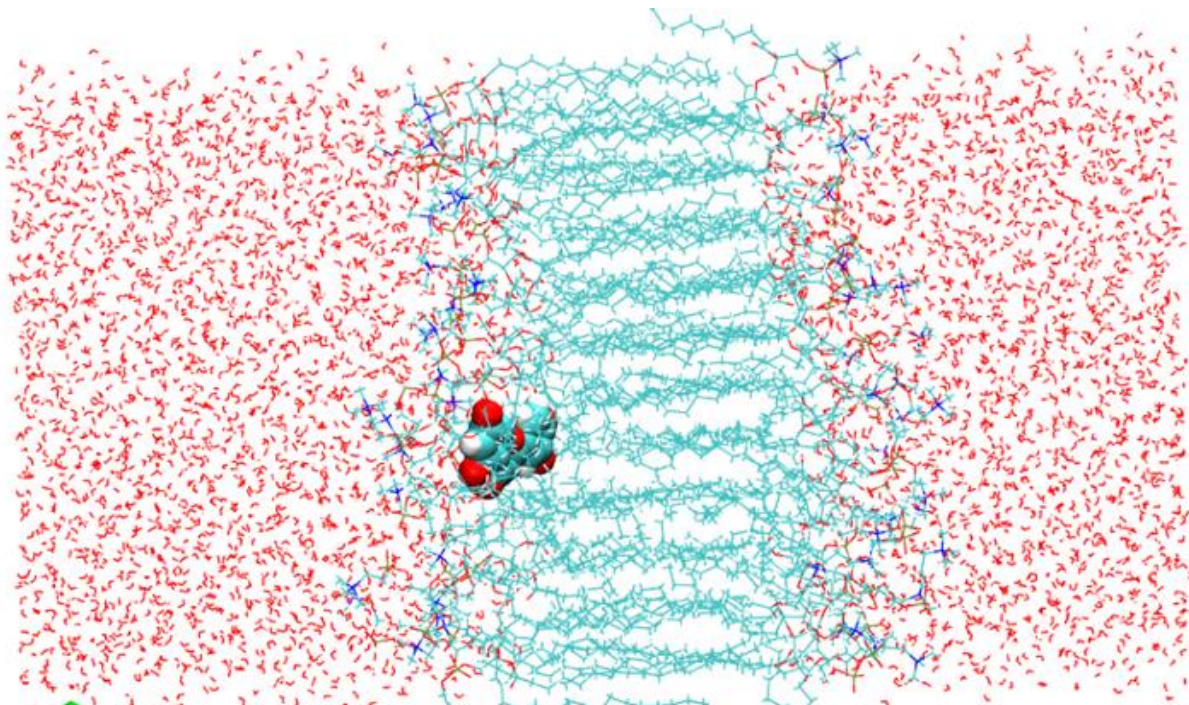


Figura 6.22 – Posição mais estável da quercetina, referente ao mínimo de energia observado no gráfico da figura 6.21-b.

A partir da figura acima pode-se notar que a posição de maior estabilidade da quercetina, ao longo do caminho de reação, é quando ela está, quase que totalmente, penetrada na membrana.

A partir da equação 19 é possível calcular a energia livre de associação da quercetina com a bicamada de POPC. O valor obtido foi de $\Delta G_{\text{associação}} = -1,9\text{kcal/mol}$.

7 – Conclusões e Perspectivas

Relacionando os resultados obtidos no item 6 deste trabalho, podemos observar que, comparando a energia de associação do colesterol com a β -ciclodextrina ($\Delta G_{\text{associação}} = -4,6 \text{ kcal/mol}$) com a energia de associação da quercetina com a β -ciclodextrina ($\Delta G_{\text{associação}} = -2,3 \text{ kcal/mol}$), concluímos que o colesterol possui maior afinidade com a β -ciclodextrina, formando complexos mais estáveis.

Por sua vez, comparando as energias de associação do colesterol e da quercetina com a bicamada de POPC, ambas de $-1,9 \text{ kcal/mol}$, concluímos que ambas as moléculas possuem afinidade com a bicamada, e quando estão apenas na presença desta, ambos complexos são estáveis.

Analisando agora a energia de associação do colesterol nos dois sistemas, β -ciclodextrina ($\Delta G_{\text{associação}} = -4,6 \text{ kcal/mol}$) e bicamada de POPC ($\Delta G_{\text{associação}} = -1,9 \text{ kcal/mol}$) é fácil de notar que o colesterol prefere estar com a ciclodextrina, do que na bicamada de POPC pura.

Fazendo as mesmas análises para energia de associação da quercetina nos dois sistemas β -ciclodextrina ($\Delta G_{\text{associação}} = -2,3 \text{ kcal/mol}$) e bicamada de POPC ($\Delta G_{\text{associação}} = -1,9 \text{ kcal/mol}$), concluímos que para quercetina, estar em qualquer um dos dois sistemas é igualmente favorável, uma vez que a energia de associação para ambos é próxima.

A diferença da energia livre entre esses dois processos (associação à ciclodextrina ou à bicamada de POPC), $\Delta\Delta G$, pode ser calculada a partir de um ciclo termodinâmico, conforme a figura 6.1:

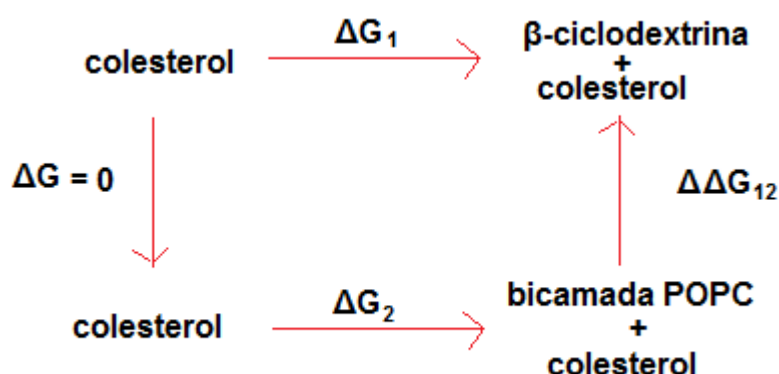


Figura 7.1 – Ciclo termodinâmico para associação do colesterol na β -ciclodextrina e na bicamada de POPC. Todos os sistemas estão em solução.

No esquema da figura 6.1, ΔG_1 é a energia livre de associação do colesterol na ciclodextrina e ΔG_2 é a energia livre de associação do colesterol na bicamada de POPC.

A diferença nas energias livres de associação pode ser escrita como $\Delta\Delta G_{12} = \Delta G_1 - \Delta G_2 = -4,6 - (-1,9) = -2,7 \text{ kcal/mol}$.

Para a associação da molécula de quercetina temos o ciclo termodinâmico descrito na figura 6.2.

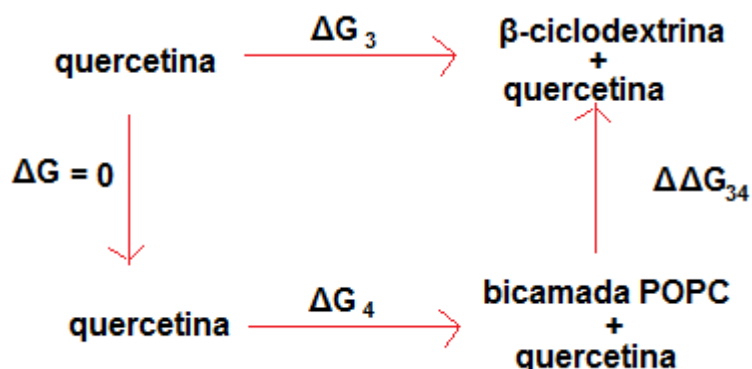


Figura 7.2 – Ciclo termodinâmico para associação da quercetina na β -ciclodextrina e na bicamada de POPC. Todos os sistemas estão em solução.

No esquema da figura 6.2, ΔG_3 é a energia livre de associação da quercetina na ciclodextrina e ΔG_4 é a energia livre de associação da quercetina na bicamada de POPC.

A diferença nas energias livres de associação pode ser escrita como $\Delta\Delta G_{34} = \Delta G_3 - \Delta G_4 = -2,3 - (-1,9) = -0,4 \text{ kcal/mol}$.

A partir desses resultados concluímos que é mais fácil o colesterol sair da bicamada e ir para a β -ciclodextrina, do que a quercetina fazer esse caminho.

Relacionando esses resultados com o modelo teórico de entrega de fármaco à célula, que propõe a troca da molécula de colesterol presente na membrana por uma molécula de quercetina presente na ciclodextrina, vimos, com os resultados obtidos, uma boa coerência, uma vez que o colesterol apresenta maior afinidade com a molécula de β -ciclodextrina, o que nos faz concluir que há a possibilidade desta saída do colesterol da membrana para a molécula de ciclodextrina. Com isso o colesterol tende a expulsar a quercetina que estava na cavidade da ciclodextrina, e está fica no meio aquoso, cuja posição é extremamente desfavorável. Como esta molécula tem afinidade com a bicamada, ela tende a entrar nesta região, ocorrendo assim a troca.

Para melhor compreensão dos resultados, como perspectivas futuras a este trabalho, está a realização da inclusão das moléculas de colesterol e de quercetina em bicamadas com diferentes porcentagens de colesterol em sua composição e também outros tipos de bicamada e outros complexos com diferentes flavonoides e outros tipos de ciclodextrinas.

8 – Referência

- [1] SuperSAN elimina de ambientes fechados agentes causadores de doenças alérgicas respiratórias, (n.d.).
http://www.maxpressnet.com.br/Conteudo/1,424115,SuperSAN_elimina_de_ambientes_fechados_agentes_causadores_de_doencas_alergicas_respiratorias,424115,9.htm (accessed January 25, 2016).
- [2] GINA 2015_rev_wms.pdf - GINA_Report_2015_Aug11.pdf, (n.d.).
http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015_Aug11.pdf (accessed January 25, 2016).
- [3] Saútil, Doenças Respiratórias, Saútil. (n.d.). <http://www.sautil.com.br/saude-para-voce/saude-respiratoria/conteudo/doencas-respiratorias> (accessed January 25, 2016).
- [4] IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, J. Bras. Pneumol. 32 (2006) S447–S474. doi:10.1590/S1806-37132006001100002.
- [5] I.C. Camelo-Nunes, D. Solé, Allergic rhinitis: indicators of quality of life, J. Bras. Pneumol. 36 (2010) 124–133. doi:10.1590/S1806-37132010000100017.
- [6] E. Middleton, C. Kandaswami, Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions, Biochem. Pharmacol. 43 (1992) 1167–1179.
- [7] A. Gillet, A. Grammenos, P. Compère, B. Evrard, G. Piel, Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome, Int. J. Pharm. 380 (2009) 174–180. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.06.027.
- [8] M.A.F.O. Britto, N. Jr, C. S, H.F. dos Santos, Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos, Quím. Nova. 27 (2004) 882–888. doi:10.1590/S0100-40422004000600008.
- [9] J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, Chem. Rev. 98 (1998) 1743–1754.
- [10] Physical Properties of Cyclodextrins, (n.d.). http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/disido_cy/cyen/info/03_physical_cy (accessed January 25, 2016).
- [11] F.V. Rui Saltão, Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos, (2001).
- [12] J. Szejtli, Cyclodextrin Technology, Softcover reprint of the original 1st ed. 1988 edition, Springer, Dordrecht, 2010.
- [13] M.. Bender, M. Komiyama, Cyclodextrin Chemistry, Softcover reprint of the original 1st ed. 1978 edition, Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.
- [14] J. Szejtli, Medicinal applications of cyclodextrins, Med. Res. Rev. 14 (1994) 353–386.

- [15] E.M.M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochem.* 39 (2004) 1033–1046. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9.
- [16] R.M. Budal, Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas, Doutorado, UFSC, 2003.
<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/85781>.
- [17] J.R. Moyano, M.J. Arias-Blanco, J.M. Gines, A.M. Rabasco, J.I. Pérez-Martínez, M. Mor, et al., Nuclear magnetic resonance investigations of the inclusion complexation of gliclazide with beta-cyclodextrin, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 72–75. doi:10.1021/js960212n.
- [18] F.J. Otero-Espinar, S. Anguiano-Igea, N. García-Gonzalez, J.L. Vila-Jato, J. Blanco-Méndez, Oral bioavailability of naproxen- β -cyclodextrin inclusion compound, *Int. J. Pharm.* 75 (1991) 37–44. doi:10.1016/0378-5173(91)90248-M.
- [19] P.S. R. Bettini, Permeation of piroxicam and piroxicam-beta-cyclodextrin inclusion compound through artificial membranes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38 (1992) 203–208.
- [20] K. Uekama, F. Hirayama, T. Wakuda, M. Otagiri, Effects of Cyclodextrins on the Hydrolysis of Prostacyclin and Its Methyl Ester in Aqueous Solution, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 29 (1981) 213–219. doi:10.1248/cpb.29.213.
- [21] P. Jarho, D. Vander Velde, V.J. Stella, Cyclodextrin-catalyzed deacetylation of spironolactone is pH and cyclodextrin dependent, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 241–249. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2<241::AID-JPS11>3.0.CO;2-0.
- [22] Flavonóides - bioquímica - InfoEscola, (n.d.).
<http://www.infoescola.com/bioquimica/flavonoides> (accessed January 25, 2016).
- [23] P.H. Março, R.J. Poppi, I.S. Scarminio, Analytical procedures for identifying anthocyanins in natural extracts, *Quím. Nova.* 31 (2008) 1218–1223.
doi:10.1590/S0100-40422008000500051.
- [24] P.M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3 edition, Wiley, Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2009.
- [25] D.L. Gazzoni, Alimentos Funcionais, (n.d.).
http://www.gazzoni.eng.br/alimentos_funcionais.htm (accessed January 25, 2016).
- [26] Y. Zheng, I.S. Haworth, Z. Zuo, M.S.S. Chow, A.H.L. Chow, Physicochemical and structural characterization of quercetin-beta-cyclodextrin complexes, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 1079–1089. doi:10.1002/jps.20325.
- [27] G.S. Kelly, Quercetin, *AMR.* 16 (2011) 172–194.
- [28] M.C. Bergonzi, A.R. Bilia, L. Di Bari, G. Mazzi, F.F. Vincieri, Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins, *Bioorg. Med. Chem.*

- Lett. 17 (2007) 5744–5748. doi:10.1016/j.bmcl.2007.08.067.
- [29] M.A.M.D. Lyra, L.D.S. Alves, D.A.F. Fontes, Jos.L. Soares-Sobrinho, P.Jos. Rolim-Neto, Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina, *Rev. Ciênc. Farm. Básica E Apl.* 31 (2010) 117–124.
- [30] R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R.K. Khar, Cyclodextrins in drug delivery: An updated review, *AAPS PharmSciTech.* 6 (2005) E329–E357. doi:10.1208/pt060243.
- [31] Y. Yu, C. Chipot, W. Cai, X. Shao, Molecular Dynamics Study of the Inclusion of Cholesterol into Cyclodextrins, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 6372–6378. doi:10.1021/jp056751a.
- [32] J. Fogaça, Composição Química do Colesterol. Química do Colesterol, Bras. Esc. (n.d.). <http://brasilecola.uol.com.br/quimica/composicao-quimica-colesterol.htm> (accessed January 25, 2016).
- [33] Cell membrane, Wikipedia Free Encycl. (2015). https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cell_membrane&oldid=691698787 (accessed January 25, 2016).
- [34] A.A. Gurtovenko, I. Vattulainen, Molecular Mechanism for Lipid Flip-Flops, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 13554–13559. doi:10.1021/jp077094k.
- [35] modelo de mosaico fluido, Infopédia. (n.d.). [http://www.infopedia.pt/\\$modelo-de-mosaico-fluido](http://www.infopedia.pt/$modelo-de-mosaico-fluido) (accessed January 25, 2016).
- [36] M.I.K. Weissheimer, Estdo da interação líquido iônico, de interesse farmacológico com membrana POPC por simulação de dinâmica molecular, Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015. <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/129929/000976984.pdf?sequence=1> (accessed January 26, 2016).
- [37] sci9bestq3bm - Soy Lecithin-lan, (2006). <https://sci9bestq3bm.wikispaces.com/Soy+Lecithin-lan> (accessed January 25, 2016).
- [38] H. Verli, Métodos de mecânica molecular, (n.d.). http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/aula_6.pdf (accessed January 25, 2016).
- [39] I.N. Levine, Quantum Chemistry, 7 edition, Prentice Hall, Boston, 2013.
- [40] E.J. Barreiro, C.R. Rodrigues, M.G. Albuquerque, C.M.R. de Sant’Anna, R.B. de Alencastro, Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal, *Quím. Nova.* 20 (1997) 300–310. doi:10.1590/S0100-40421997000300011.
- [41] A.G.M. Pacheco, M. MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA E ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR DA ENZIMA LANOSTEROL 14 α -

- DESMETILASE DO *Moniliophthora perniciosa*, Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.
http://www2.uefs.br/ppgbiotec/portugues/arquivos/corpo%20discente/mestrado/2008/alessandra_gomes_marques_pacheco-dissertacao.pdf.
- [42] J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* by Israelachvili, Jacob N. (1992) Hardcover, Academic Press, 1990.
- [43] PumMa » Theory » Potentials, (2007).
<http://cbio.bmt.tue.nl/pumma/index.php/Theory/Potentials> (accessed January 25, 2016).
- [44] S.T. Broggio-Costa, Estudos conformacionais por dinâmica molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos Mastoparanos em misturas de TFE-água, *Bibl. Digit. Vêrsila*. (n.d.). <http://biblioteca.versila.com/> (accessed January 25, 2016).
- [45] B.J. Alder, T.E. Wainwright, *Studies in Molecular Dynamics. I. General Method*, *J. Chem. Phys.* 31 (1959) 459–466. doi:10.1063/1.1730376.
- [46] L. Verlet, Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules, *Phys. Rev.* 159 (1967) 98–103. doi:10.1103/PhysRev.159.98.
- [47] A.M. Namba, V.B. da Silva, C.H.T.P. da Silva, *Molecular dynamics: theory and applications in drug design*, *Eclética Quím.* 33 (2008) 13–24. doi:10.1590/S0100-46702008000400002.
- [48] M.. Allen, D.. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids*, Reprint edition, Clarendon Press, 1989.
- [49] <http://www.ufrgs.br/bioinfo>, Galeria de Figuras - Capítulo 8, Bioinfo. (n.d.).
http://www.ufrgs.br/bioinfo/th_gallery/capitulo-8/ (accessed January 25, 2016).
- [50] 21310_5.PDF, (n.d.). http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/21310/21310_5.PDF (accessed January 25, 2016).
- [51] P.P. Ewald, Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale, *Ann. Phys.* 369 (1921) 253–287. doi:10.1002/andp.19213690304.
- [52] R.. Hockney, J.. Eastwood, *Computer Simulation Using Particles*, CRC Press, Bristol England ; Philadelphia, 1989.
- [53] J. Hénin, C. Chipot, Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations, *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 2904–2914. doi:10.1063/1.1773132.
- [54] K. Murzyn, T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane, *Biophys. J.* 88 (2005) 1091–1103. doi:10.1529/biophysj.104.048835.

- [55] W. Cai, T. Sun, P. Liu, C. Chipot, X. Shao, Inclusion Mechanism of Steroid Drugs into β -Cyclodextrins. Insights from Free Energy Calculations, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 7836–7843. doi:10.1021/jp901825w.
- [56] T. Auletta, M.R. de Jong, A. Mulder, F.C.J.M. van Veggel, J. Huskens, D.N. Reinhoudt, et al., β -Cyclodextrin Host–Guest Complexes Probed under Thermodynamic Equilibrium: Thermodynamics and AFM Force Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 1577–1584. doi:10.1021/ja0383569.
- [57] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual Molecular Dynamics, *Journal of Molecular Graphics.* 14 (1996) 33–38.
- [58] NAMD - Scalable Molecular Dynamics, (n.d.).
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/> (accessed January 26, 2016).
- [59] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, et al., Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1781–1802. doi:10.1002/jcc.20289.
- [60] A.D. MacKerell, B. Brooks, C.L. Brooks, L. Nilsson, B. Roux, Y. Won, et al., CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization, in: *Encycl. Comput. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470845015.cfa007/abstract> (accessed January 26, 2016).
- [61] J.B. Klauda, R.M. Venable, J.A. Freites, J.W. O'Connor, D.J. Tobias, C. Mondragon-Ramirez, et al., Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: Validation on six lipid types, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 7830–7843. doi:10.1021/jp101759q.
- [62] C.P. de [UNESP Souza, Desenvolvimento de modelos para flavonoides e cumarinas utilizando o campo de força CGenFF, *Aleph.* (2014) 116 f. : il. grafs. tabs. color.
- [63] N. Kucerka, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains, *J. Membr. Biol.* 208 (2005) 193–202. doi:10.1007/s00232-005-7006-8.
- [64] R.A. Rajewski, G. Traiger, J. Bresnahan, P. Jaberaboansar, V.J. Stella, D.O. Thompson, Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether β -cyclodextrin derivatives, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 927–932. doi:10.1002/jps.2600840805.