

UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MAÍRA THEISEN

**UM ESTUDO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO ENTRE ESQUALAMINA E  
MEMBRANAS BACTERIANAS**

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MAÍRA THEISEN

**UM ESTUDO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO ENTRE ESQUALAMINA E  
MEMBRANAS BACTERIANAS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso - QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof. Dr. Hubert Karl Stassen

Orientador

Porto Alegre, 2013

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hubert Karl Stassen por confiar no meu trabalho e me fazer querer continuar no caminho da Química Teórica. Muito obrigada pela oportunidade e pela paciência, principalmente durante a elaboração desse trabalho.

Agradeço a minha família por sempre terem me apoiado e entendido a distância durante a graduação. Vocês são os responsáveis pelo que sou hoje.

Aos amigos que fiz na UFRGS durante esses 5 anos. Vocês estiveram presentes ao meu lado nos meus bons e maus momentos. Vocês me ajudaram a persistir e fizeram com que eu não desistisse da química. Obrigada também pelas festas, jantas na CB, sessões de cinema, e claro, pelas incontáveis horas de estudo juntos.

Ao meu namorado Masahiro, por todo o apoio, as conversas, séries e comilanças. Sem o teu incentivo (e os “puxões de orelha”) acredito que não teria conseguido lidar com a pressão deste último semestre.

As minhas primas Camila, Indjara e Leticia por sempre estarem ao meu lado, inclusive quando eu mais precisava.

Aos professores e colegas do laboratório de Química Teórica, que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado durante a iniciação científica.

Por fim, quero agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação e para que eu estivesse aqui.



O começo de todas as ciências é o espanto das coisas serem o que são.

Aristóteles

## RESUMO

O estudo das interações entre fármaco e membrana é de grande importância na elaboração de medicamentos e na explicação do mecanismo de ação destes. A atividade de um fármaco resulta do contato com membranas celulares, portanto, é importante saber quais grupos do fármaco interagem mais fortemente com determinados grupos dos fosfolipídeos ou lipídeos que estão presentes na membrana.

Neste trabalho buscou-se compreender quais as interações que ocorrem entre a Esqualamina (um aminoesteróide com potencialidade farmacológica) e membranas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. Foi usada como modelo para as bactérias Gram-positivas uma membrana na forma de bicamada fosfolipídica composta somente pelo fosfolipídeo POPG. Para as bactérias Gram-negativas foi utilizada uma bicamada composta por fosfolipídeos do tipo POPG e POPE, além de lipídeos A na parte exterior.

Utilizando-se o método de Dinâmica Molecular obteve-se 4 sistemas distintos com tempo final de simulação entre 90 nanosegundos e 200 nanosegundos. Os sistemas diferem quanto ao número de Esqualaminas e/ou composição da membrana.

Para verificar os sistemas foram feitas análises de Perfil de Densidade, Função de Distribuição Radial, espessura da membrana e área por fosfolipídeo. Foi observado que as moléculas de Esqualamina interagem com os grupos propostos para as diferentes membranas, além de o número de Esqualaminas no sistema alterar as interações que ocorrem. Para os três sistemas que possuíam o aminoesteróide verificou-se que o tempo de simulação é muito curto para que possam ser extraídos resultados definitivos.

**Palavras-Chave:** membranas, fosfolipídeos, Esqualamina, bactérias, POPG, lipídeo A, Dinâmica Molecular, Perfil de Densidade, Função de Distribuição Radial.

## LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Molécula de Esqualamina.....	3
FIGURA 2 – Estrutura dos Fosfolídeos POPE e POPG.....	5
FIGURA 3 – Representação do LPS da bactéria <i>E. coli</i> .....	6
FIGURA 4 – Membrana de bactéria Gram-positiva ( <i>S. aureus</i> ).....	7
FIGURA 5 – Membrana exterior de bactéria Gram-negativa ( <i>E. coli</i> ).....	7
FIGURA 6 – Mecanismo de ação sugerido para a Esqualamina.....	8
FIGURA 7 – Representação das componentes do campo de força.....	10
FIGURA 8 – Campo de força GROMOS 53a6.....	11
FIGURA 9 – Configuração em 5 ns do sistema contendo 4 Esqualaminas (sistema 1) – visão lateral.....	12
FIGURA 10 – Configuração em 5 ns do sistema contendo 4 Esqualaminas (sistema 1) – visão superior.....	13
FIGURA 11 – Configuração inicial do sistema contendo 8 Esqualaminas (sistema 2) – visão lateral.....	13
FIGURA 12 – Configuração inicial do sistema contendo 8 Esqualaminas (sistema 2) – visão superior.....	14
FIGURA 13 – Membrana exterior de bactéria Gram-negativa contendo lipídeo A (sistema 3).....	15
FIGURA 14 – Configuração inicial do sistema contendo 4 Esqualaminas (sistema 4) – visão lateral.....	15
FIGURA 15 – Configuração inicial do sistema contendo 4 Esqualaminas (sistema 4) – visão superior.....	16
FIGURA 16 – Perfil de Densidade do sistema 1 em 50 nanosegundos.....	17
FIGURA 17 - Perfil de Densidade do sistema 1 em 100 nanosegundos.....	18
FIGURA 18 - Perfil de Densidade do sistema 1 em 150 nanosegundos.....	18
FIGURA 19 - Perfil de Densidade do sistema 1 em 200 nanosegundos.....	19
FIGURA 20 – Estrutura da Esqualamina – grupos analisados na RDF.....	21
FIGURA 21 – Estrutura do fosfolípido POPG – grupos analisados na RDF.....	21

FIGURA 22 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50 ns.....	22
FIGURA 23 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100 ns.....	22
FIGURA 24 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150 ns.....	23
FIGURA 25 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 200 ns.....	23
FIGURA 26 – RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50 ns.....	24
FIGURA 27 – RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100 ns.....	25
FIGURA 28 – RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150 ns.....	25
FIGURA 29 – RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 200 ns.....	26
FIGURA 30 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50 ns.....	27
FIGURA 31 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100 ns.....	27
FIGURA 32 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150 ns.....	28
FIGURA 33 – RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 200 ns.....	28
FIGURA 34 - Perfil de Densidade do sistema 2 em 50 nanosegundos.....	29
FIGURA 35 – Perfil de Densidade do sistema 2 em 100 nanosegundos.....	30
FIGURA 36 – Perfil de Densidade do sistema 2 em 150 nanosegundos.....	30
FIGURA 37 - Figura 37: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.....	32
FIGURA 38 - Figura 38: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.....	32
FIGURA 39: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.....	33

FIGURA 40: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.....	34
FIGURA 41: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.....	34
FIGURA 42: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.....	35
FIGURA 43: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.....	36
FIGURA 44: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.....	36
FIGURA 45: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.....	37
FIGURA 46: Perfil de Densidade do sistema 3 em 50 ns.....	38
FIGURA 47: Perfil de Densidade do sistema 3 em 90 ns.....	38
FIGURA 48: Perfil de Densidade do sistema 4 em 50 ns.....	40
FIGURA 49: Perfil de Densidade do sistema 4 em 100 ns.....	40
FIGURA 50: Molécula de lipídeo A – grupos analisados nas RDF.....	41
FIGURA 51: RDF do oxigênio do grupo OH1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.....	42
FIGURA 52: RDF do oxigênio do grupo OH1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.....	42
FIGURA 53: RDF do oxigênio do grupo OH2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.....	43
FIGURA 54: RDF do oxigênio do grupo OH2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.....	44
FIGURA 55: RDF do oxigênio do grupo P2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.....	45
FIGURA 56: RDF do oxigênio do grupo P2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.....	45
FIGURA 57: RDF do oxigênio do grupo P1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.....	46
FIGURA 58: RDF do oxigênio do grupo P1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.....	47



**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Comparativo da atividade antimicrobiana de diferentes espécies.....	4
TABELA 2 – Composição dos sistemas 1 e 2.....	14
TABELA 3 – Composição dos sistemas 3 e 4.....	16
TABELA 4 – Espessura da membrana.....	19
TABELA 5 – Cálculo da área por fosfolípídeo.....	20
TABELA 6 – Espessura da membrana.....	31
TABELA 7 – Cálculo da área por fosfolípídeo.....	31

## LISTA DE ABREVIACOES

DM – Dinâmica Molecular

POPG – Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol

LPS – Lipopolissacarídeos

MIC – do inglês, Minimal Inhibitory Concentration (Mínima Concentrao Inibidora)

POPE – Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Etanolamina

OM – do inglês, Outer Membrane (Membrana Exterior)

SPC – do inglês, Simple Point Charge (Carga Pontual Simples)

ns – nanosegundos

PD – Perfil de Densidade

RDF – do inglês, Radial Distribution Function (Funo de Distribuo Radial)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
3.1 Esqualamina.....	3
3.2 Fosfolípídeo POPG.....	4
3.3 Lipopolissacarídeos (Lipídeo A).....	5
3.4 Membrana de células procarióticas.....	6
3.4.1 Bactérias Gram-positivas.....	6
3.4.2 Bactérias Gram-negativas.....	7
3.5 Interação da Esqualamina com membranas.....	8
3.6 Dinâmica Molecular.....	9
3.7 Campo de Força.....	10
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
4.1 Modelos de bactérias Gram-positivas.....	12
4.2 Modelos de bactérias Gram-negativas.....	14
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>17</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem se tornado cada vez mais importante a pesquisa por novas moléculas que possam ser usadas como fármacos. Primeiramente é preciso encontrar uma molécula que tenha potencial para ser usada como fármaco e depois são feitos testes para comprovar este potencial. Uma etapa muito importante na elaboração de muitos novos fármacos é o estudo do mecanismo de ação destes, ou seja, como e onde ocorre a interação do fármaco com seu alvo.

Um tipo de fármaco muito pesquisado são os antimicrobianos, substâncias que matam ou inibem o desenvolvimento de micro-organismos, pois estes organismos possuem a capacidade de tornar-se resistentes a antibióticos, medicamentos com a capacidade de interagir com micro-organismos (especialmente bactérias) que causam infecções ao organismo, matando-os ou inibindo seu crescimento. A ação de muitos desses fármacos ocorre junto à membrana celular e o resultado esperado é o rompimento desta célula. O mecanismo de ação pode sofrer influência do tipo de bactéria que está sendo tratada, sabendo-se que elas podem ser divididas em dois grupos: Gram-negativas e Gram-positivas. Estes grupos diferem-se quanto a estrutura da membrana celular, sendo a membrana das bactérias Gram-negativas mais complexa e mais difícil de ser rompida.

Neste trabalho a Esqualamina (um aminoesteróide proveniente do tubarão *Squalus acanthias*) foi utilizada como agente antimicrobiano e foram estudadas as interações desta molécula com membranas celulares. Trabalhou-se com diferentes composições dos modelos de membrana, assim, pode-se estudar o mecanismo de ação da Esqualamina com membranas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O trabalho foi desenvolvido através de simulações computacionais, utilizando-se como metodologia a Dinâmica Molecular (DM), que nos permite analisar sistemas biológicos (sistemas complexos) e acompanhar sua trajetória ao longo do tempo.

## 2 OBJETIVOS

Realizar simulações com uma membrana constituída somente por fosfolípídeo POPG (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol), servindo de modelo para as bactérias Gram-positivas e outra simulação utilizando lipídeo A, porção lipídica dos lipopolissacarídeos (LPS), que serve de modelo para membrana de bactérias Gram-negativas. Pretende-se então, fazer uma análise detalhada das interações que ocorrem entre a Esqualamina e membranas de células procarióticas (bactérias).

Objetivos Específicos:

- Analisar a ocorrência de despolarização no modelo de membrana celular.
- Comparar as interações da Esqualamina com os diferentes modelos de membranas celulares.
- Comparar as interações nos sistemas com diferentes quantidades de Esqualamina.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

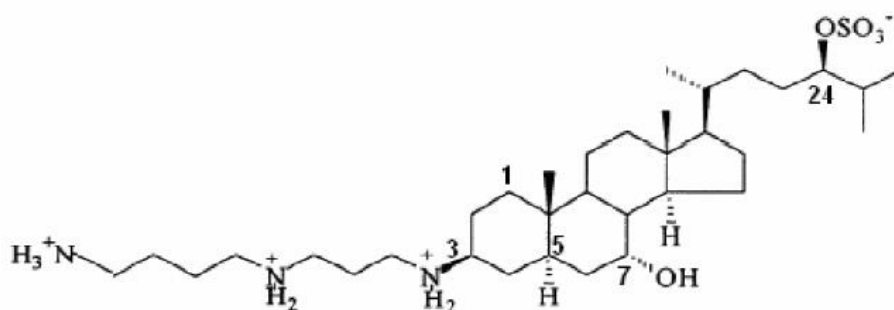
#### 3.1 Esqualamina

Nos últimos anos, um grande número de antibióticos de baixo peso molecular tem sido isolados de diversos animais. Entre eles encontra-se a Esqualamina, descoberta por Moore et al. em 1993. Caracteriza-se por ser um antibiótico de amplo espectro. A molécula foi primeiramente extraída do tubarão *Squalus acanthias*, mas devido às baixas concentrações em que era encontrada (cerca de 0,002% em massa do fígado) (MOORE et al., 1993, p.1354), começou-se a busca por rotas sintéticas, e hoje já é possível produzir a molécula em laboratório através de uma das diversas rotas de síntese encontradas na literatura. (SEGALIN, 2008, p. 6)

Na determinação da estrutura da Esqualamina foram empregadas as técnicas de espectroscopia de massa e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Concluiu-se que a estrutura é formada pela junção entre um esteroide (um sal biliar aniônico com estrutura semelhante ao colesterol) e espermidina. Separadamente estas duas espécies não apresentam atividade biológica significativa. A atividade antibiótica resulta do sinergismo entre estas duas espécies. (MOORE et al., 1993, p.1356)

A Esqualamina ( $3\beta$ -N-1-{N-[3-(4-aminobutil)]-1,3-diaminopropano}-7 $\alpha$ , 24R-dihidroxi-5 $\alpha$ -colestano-24 sulfato) é um aminoesteroide, derivada do colesterol e com carga total +2. Sua estrutura é representada na figura 1.

Figura 1: Molécula de Esqualamina



Fonte: SEGALIN, Jeferson, 2008.

Esta molécula apresentou forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de ser fungicida e aplicada contra protozoários. (MOORE et al., 1993, p.1354)

Um dos motivos para que a Esqualamina tenha sido escolhida para este trabalho está no fato de a molécula possuir semelhança estrutural com o colesterol. Sabe-se que o colesterol é um constituinte importante na manutenção da estabilidade da membrana celular, pois controla sua fluidez. Espera-se que pelas semelhanças estruturais a Esqualamina seja capaz de permear a membrana.

Na Tabela 1 é possível comparar a atividade antimicrobiana da Esqualamina com outras substâncias que possuem esta atividade. A mínima concentração inibidora (MIC) representa a quantidade mínima da substância que resulta na inibição visível dos micro-organismos. Como pode ser visto na tabela, a MIC de Esqualamina é um dos valores mais baixos para todos os micro-organismos tratados, assim, esta molécula pode ser vista como um potente agente antimicrobiano.

Tabela 1: Comparativo da atividade antimicrobiana de diferentes espécies.

Sample	Atividade Antimicrobiana (MIC), µg/mL							
	<i>E. coli</i> (25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Streptococcus faecalis</i> (29212)	<i>Proteus vulgaris</i> (13315)	<i>Serratia marcescens</i> (8100)	<i>Candida albicans</i> (14053)	<i>Paramecium caudatum</i>
Squalamine	1–2	4–8	1–2	1–2	4–8	>125	4–8	4–8
CHAPS	>500	>500	>500	250–500	>500	>500	>500	>260
Taurolithocholic acid 3-sulfate	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>260
Spermidine	>500	>500	>500	250–500	>500	>500	>500	>260
Melittin	8–16	16–31	8–16	4–16	16–31	>250	16–31	2–4
Magainin-II amide	31–62	31–62	>250	>250	125–250	>250	125–250	33–65
CPF-amide	8–16	8–31	8–16	31–62	62–125	>125	62–125	4–8
Conessine	>500	>500	>500	>500	>500	>500	31–62	16–33
Holothurin	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	130–260
Ampicillin	2–4	62–125	<1	<0.25	8–16	4–62	>125	>65

Fonte: MOORE, Karen et al., 1993.

### 3.2 Fosfolipídeo POPG

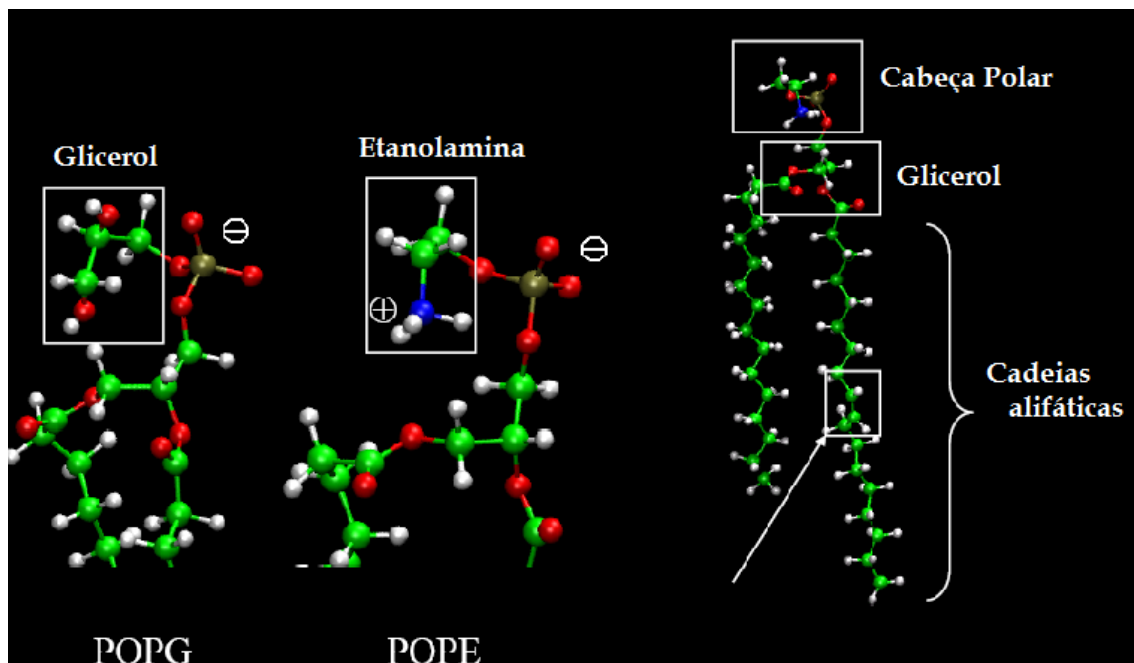
Os fosfolipídeos possuem duas cadeias longas de ácidos graxos (apolares) ligadas a um grupo glicerol. O terceiro grupo ligado ao glicerol é um grupo fosfato, e este está ligado a uma outra molécula orgânica (colina, etanolamina, glicerol ou outra). Estes dois últimos grupos constituem a cabeça polar do fosfolipídeo. (Lipídeos, 2004)

O POPG é um dos fosfolipídeos que constituem as membranas eucarióticas e procarióticas (bactérias) e caracteriza-se por ser um fosfolipídeo carregado

negativamente. Estudos experimentais já mostraram que a Esqualamina reconhece fosfolípídeos carregados negativamente. (KHABNADIDEH et al., 2000, p. 1237)

Estudos anteriores que utilizavam a Esqualamina e uma membrana mista composta por POPE (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Etanolamina) e POPG (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol), mostraram que existe uma forte interação entre a Esqualamina e as cabeças polares dos fosfolípídeos da membrana. No estudo, observou-se que a interação ocorre preferencialmente com o fosfolípídeo POPG. Na figura 2 (abaixo) é possível ver a estrutura dos fosfolípídeos POPE e POPG.

Figura 2: Estrutura dos fosfolípídeos POPE e POPG.



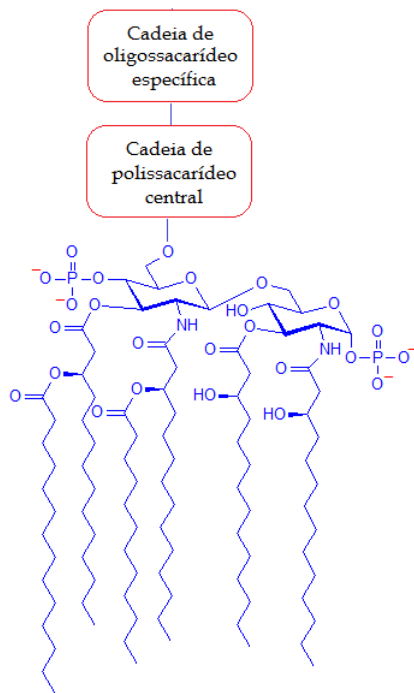
### 3.3 Lipídeo A

Os lipopolissacarídeos são macromoléculas contendo três componentes estruturais:

- Um lipídeo hidrofóbico, lipídeo A, responsável pelas propriedades tóxicas da molécula.
- Uma cadeia hidrofílica de polissacarídeo central.
- Uma cadeia lateral repetitiva de oligossacarídeo específica de cada grupo de bactérias. (CHRISTIE, 2013)



Figura 3: Representação do LPS da bactéria *E. coli*.



Legenda: lipídeo A (azul).

Fonte: CHRISTIE, 2013.

### 3.4. Membranas de células procarióticas

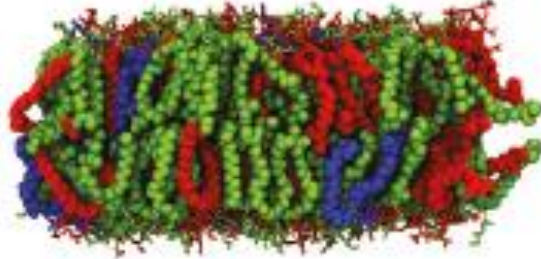
Uma característica comum a todas essas células é a presença de uma membrana lipídica que funciona como a fronteira entre os meios intra e extracelular. As moléculas lipídicas são organizadas como uma camada dupla e contínua, atuando como uma barreira relativamente impermeável à passagem de uma grande quantidade de moléculas solúveis em água. As membranas das células procarióticas diferem-se principalmente pela composição dessa barreira e essa característica é de grande importância para a permeabilidade. (PIGGOT, T. J.; HOLDBROOK, D. A.; KHALID, S., 2011, p. 13381)

#### 3.4.1. Bactérias Gram-positivas

Esse tipo de bactéria é cercada por uma bicamada composta por fosfolipídeos. A carga dos fosfolipídeos é importante, pois pode conferir algumas características interessantes à célula. No caso da bactéria *S. aureus*, a carga positiva (do

fosfolipídeos carregados positivamente Lys-PG) contribui para a resistência da célula.

Figura 4: Membrana de bactéria Gram-positiva (*S.*



*aureus*).

Legenda: lipídeos fosfatidil-glicerol (PG) são mostrados em verde, lisil-fosfatidil-glicerol (Lys-PG) é mostrado em vermelho e difosfatidil-glicerol (DPG) é mostrado em azul.

Fonte: PIGGOT, T. J.; HOLDBROOK, D. A.; KHALID, S., 2011.

### 3.4.2 Bactérias Gram-negativas

Esse tipo de bactéria possui uma estrutura mais complexa e é cercada por duas membranas, que são separadas pelo espaço periplasmático. A membrana interior é uma bicamada fosfolipídica, com composição relativamente simples. A membrana exterior (OM) é uma bicamada assimétrica, sendo a camada interna composta por fosfolipídeos enquanto a camada externa é composta por lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS agem como uma barreira protetora contra agentes xenobióticos e antibióticos hidrofóbicos.

Figura 5: Membrana exterior de bactéria Gram-negativa (*E. coli*).



Legenda: lipídeos fosfatidil-glicerol (PG) são mostrados em verde, difosfatidil-glicerol (DPG) é mostrado em azul, fosfatidil-etanolamina (PE) é mostrado em ciano, caudas lipídicas do LPS em rosa e açúcares do LPS são mostrados em amarelo.

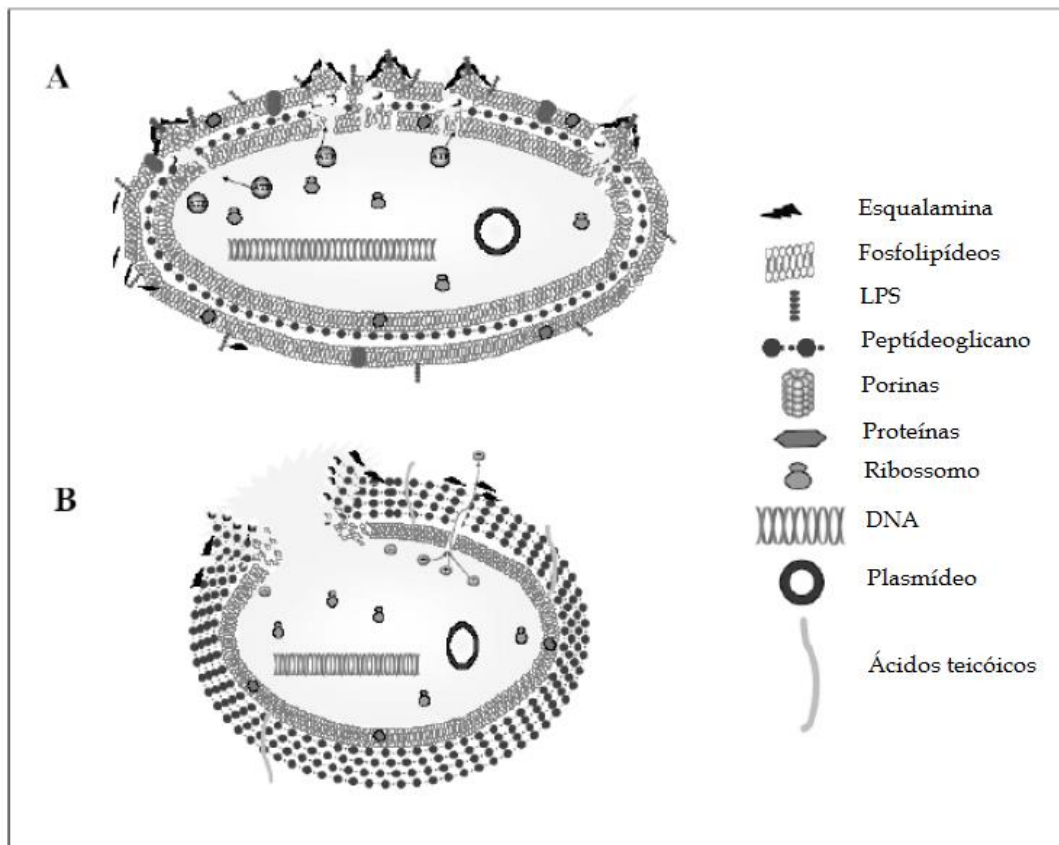
Fonte: PIGGOT, T. J.; HOLDBROOK, D. A.; KHALID, S., 2011.

### 3.5 Interação da Esqualamina com membranas

Embora o mecanismo de ação da molécula não seja bem conhecido, estudos sugerem que a ação ocorre junto a membrana. (CHEN et al., 2006, p. 1582) A Esqualamina mostrou maior afinidade com os LPS carregados negativamente do que com lipídeos eucarióticos. Esses dados sugerem que a interação ocorra entre os grupos amino da Esqualamina e os grupos fosfato do LPS, resultando no rompimento da membrana exterior e consequentemente a morte da célula.

Como as membranas Gram-positivas não possuem grupos tão negativos quanto os LPS em sua estrutura o mecanismo de ação deve ser diferente. Para esse tipo de bactéria, sugere-se que a ação da Esqualamina leva a despolarização da membrana, resultando no rompimento da membrana. Com o rompimento, material citoplasmático essencial é perdido para o meio externo e a célula acaba morrendo. (ALHANOUT, K.; ROLAIN, J. M.; BRUNEL J. M., 2010, p. 3912)

Figura 6: Mecanismo de ação sugerido para a Esqualamina.



Legenda: (A) bactérias Gram-negativas, resultando na desintegração da membrana, e (B) bactérias Gram-positivas, mostrando o efeito da despolarização, que ocasiona o rompimento da membrana.

Fonte: ALHANOUT, K.; ROLAIN, J. M.; BRUNEL J. M., 2010.

### 3.6 Dinâmica Molecular

A simulação por Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica utilizada para sistemas clássicos de N componentes. Consiste na resolução das equações do movimento de Newton, ou seja, utiliza uma metodologia de equações de mecânica clássica para descrever o movimento dos átomos. Essas equações são resolvidas simultaneamente em sucessivos e pequenos intervalos de tempo. As coordenadas das partículas são registradas nestes intervalos e resultam na trajetória do sistema. (FRENKEL, D.; SMIT, B., 1996, p. 53)

Em termos simplificados, a Dinâmica Molecular é uma técnica computacional em que se determinam os movimentos das partículas de qualquer sistema, do qual se conhecem o potencial de interação entre estas partículas e as equações que regem seu movimento. A DM permite, portanto, fazer um estudo da evolução temporal das configurações dos constituintes do sistema e, a partir das sequências de posições geradas, determinar as propriedades macroscópicas do sistema. Conhecendo as posições e velocidades de todas as partículas em um dado instante  $t_0$ , pode-se computar as forças resultantes em cada partícula, devido às interações com as demais e então determinar posições e velocidades em um instante posterior  $t_0 + \delta t$ , através das equações de movimento Newtonianas. As novas posições são utilizadas para computar as novas forças e levam a posições e velocidades em  $t_0 + 2 \cdot \delta t$ . Esse processo é realizado muitas vezes para gerar trajetórias moleculares para todo o sistema. O tempo total de simulação depende dos processos que se deseja investigar e da convergência estatística das propriedades de interesse.

Uma característica importante do método de DM é a existência de sinergia com os métodos experimentais. Os resultados das investigações experimentais geralmente motivam e guiam os estudos de DM. Já os resultados obtidos pela DM fornecem explicações detalhadas a nível microscópico dos fenômenos observados experimentalmente. Uma grande quantidade de sistemas podem ser estudados por esse método: sistemas mais simples como gases, líquidos e misturas, além de sistemas mais complexos como biomembranas, polímeros, biomoléculas e nanomateriais. (MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S., 2007, p. 414)

### 3.7 Campo de Força

O campo de força é um conjunto de potenciais (e seus parâmetros) que descrevem as interações intra e intermoleculares do sistema. A energia do campo de força é escrita como uma soma de termos, na qual cada um descreve a energia necessária para realizar um tipo de distorção da molécula. A equação 1 representa a energia do campo de força:

$$E_{CF} = E_{\beta} + E_{\theta} + E_{\omega} + E_{\varphi} + E_{vdw} + E_{el} \quad (\text{equação 1})$$

Onde,

$E_{CF}$  é a energia potencial do campo de força;

$E_{\beta}$  é a função de energia potencial para o estiramento da ligação entre dois átomos;

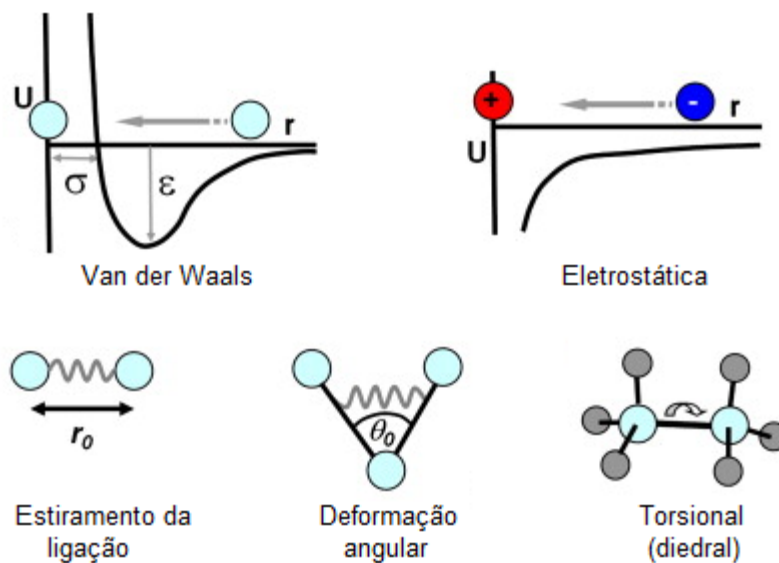
$E_{\theta}$  representa a energia necessária para deformar o ângulo formado por três átomos;

$E_{\omega}$  é o termo do potencial para alterar um ângulo entre dois planos formados por um átomo central ligado a outros três átomos (diedral impróprio);

$E_{\varphi}$  é a energia torcional para uma rotação em torno de uma ligação (diedral próprio);

$E_{vdw}$  (energia de Van der Waals) e  $E_{el}$  (energia eletrostática) descrevem as interações entre átomos que não estão diretamente ligados; (SEGALIN, 2008, p. 7)

Figura 7: Representação das componentes do campo de força.



Fonte: JOGALEKAR, Ashutosh, 2012.

Para esta metodologia, os campos de força mais comumente utilizados são: AMBER (CORNELL et al., 1995, p. 5181), CHARMM (MCKELLER et al., 1998, p. 3587) e GROMOS (LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H., 2005, p. 1401). O campo de força GROMOS sofreu diversas reparametrizações para que pudesse ser aplicado em sistemas distintos. Uma dessas reparametrizações deu origem ao campo de força GROMOS 53a6 (baseado no GROMOS 53a5) e este é recomendado para simulações de biomoléculas na presença de água. Na figura 8 são mostradas as equações desse campo de força.

Figura 8: Campo de força GROMOS 53a6.

$$U^{Gromos} = U_{bonded}^{Gromos} + U_{nonbonded}^{Gromos}$$

$$U_{bonded}^{Gromos} = \sum_{bonds} K_r (r_{ij} - r_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta (\cos \theta_{ijk} - \cos \theta_0)^2 + U_{dihedrals}^{Gromos}$$

$$U_{dihedrals}^{Gromos} = \sum_{improper} \frac{V_n}{2} (\phi_{ijkl} - \phi_0)^2 + \sum_{proper} V_m (1 + \cos(n\phi))$$

$$U_{nonbonded}^{Gromos} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \left[ \alpha_{LJ} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \left[ \alpha_{el} \left( \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \right]$$

$$A_{ij} = 4\epsilon_{ij} \sigma_{ij}^{12} \qquad B_{ij} = 4\epsilon_{ij} \sigma_{ij}^6$$

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_{ij} \cdot \epsilon_{jj}} \qquad \sigma_{ij} = \frac{\sigma_{ii} + \sigma_{jj}}{2}$$

Fonte: LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H., 2005.

## **4 METODOLOGIA**

Para todos os sistemas foram desenvolvidas simulações por Dinâmica Molecular utilizando o software Gromacs e suas ferramentas. Além disso, o algoritmo de Berendsen foi utilizado para manter a temperatura em 310 K e a pressão em 1 bar. Todas as imagens das configurações iniciais (ou em 5ns, no caso do sistema 1) dos sistemas foram obtidas pelo programa PyMOL, no qual em vermelho são representadas as moléculas de Esqualaminas, em azul e ciano são mostrados os constituintes da membrana.

### **4.1 Modelos de bactérias Gram-positivas**

Para essas simulações buscou-se a membrana no banco de dados lipidbook (banco de dados de parâmetros de campo de força). A membrana escolhida foi descrita por Kukol (2009), é uma membrana pura composta por fosfolípídeos do tipo POPG e utiliza o campo de força GROMOS53a6. Foi criada uma caixa onde a membrana foi colocada e em seguida foi solvatada utilizando o modelo spc (do inglês, simple point charge) para a água.

Em seguida foram adicionadas 5 moléculas de Esqualamina somente de um lado da membrana, a fim de verificar a despolarização da membrana, e o sistema foi simulado por 5 nanosegundos (ns). Após essa simulação uma das moléculas de Esqualamina migrou para o outro lado da membrana e esta foi eliminada. A



simulação seguiu com 4 Esqualaminas até o tempo final de 200 ns e a estrutura do sistema pode ser vista nas figuras 9 e 10.

Figura 9: Configuração em 5 ns do sistema contendo 4 Esqualaminas (Sistema 1) – visão lateral.

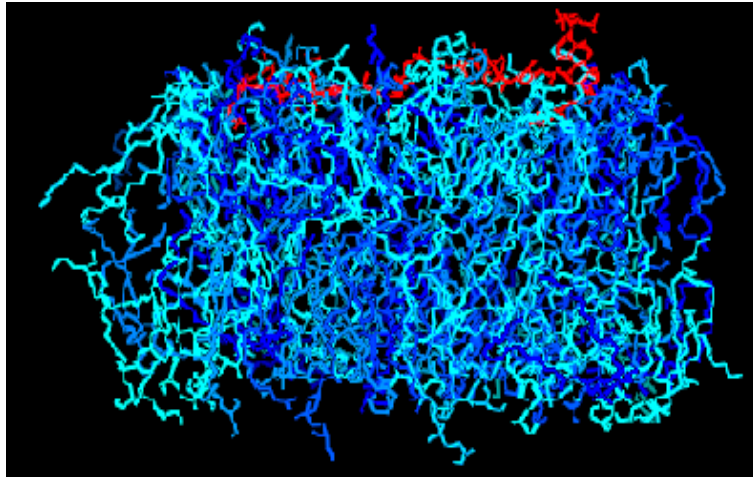
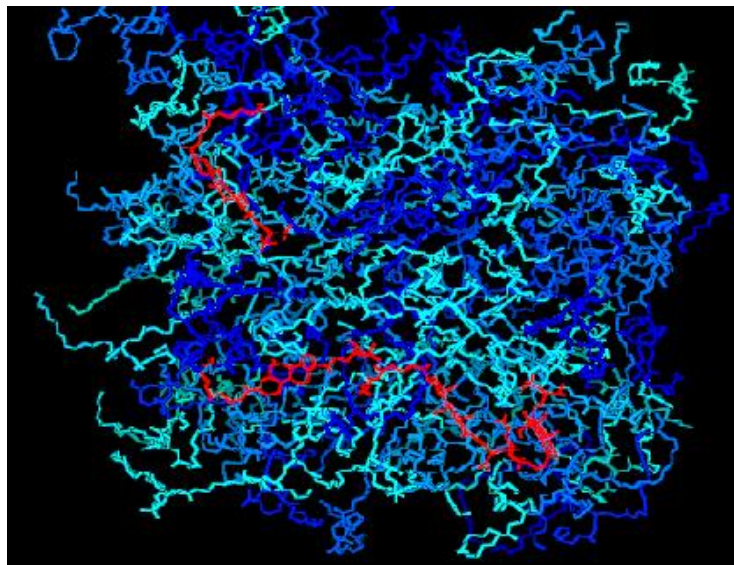


Figura 10: Configuração em 5 ns do sistema contendo 4 Esqualaminas (Sistema 1) – visão superior.



A fim de verificar se a quantidade de Esqualaminas possuía influência nos resultados da simulação, criou-se outro sistema contendo 8 moléculas de Esqualamina (novamente inseridas apenas de um lado da membrana) e construído a partir do sistema anterior. Esse sistema foi simulado até o tempo final de 150 ns e sua estrutura inicial pode ser vista nas figuras 11 e 12. A composição desses dois sistemas pode ser vista na tabela 2.

Figura 11: Configuração inicial do sistema contendo 8 Esqualaminas (Sistema 2) – visão lateral.



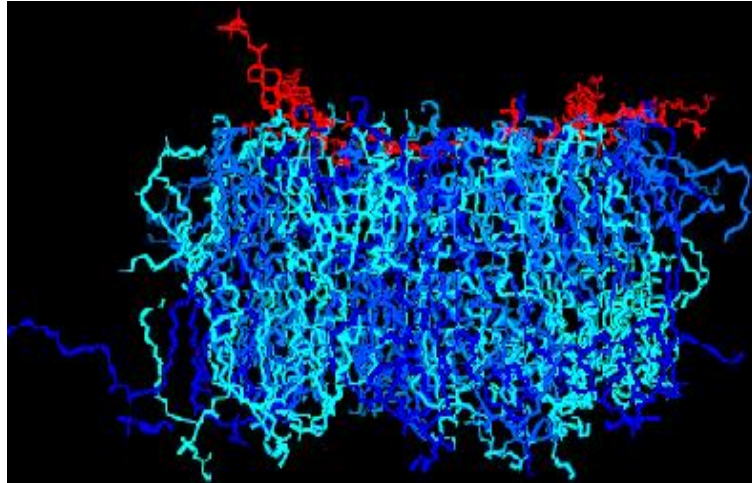


Figura 12: Configuração inicial do sistema contendo 8 Esqualaminas (Sistema 2) – visão superior.

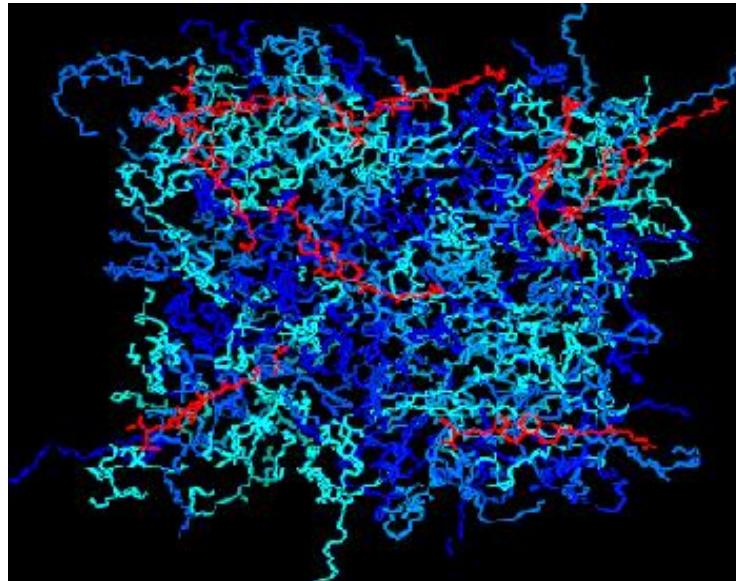


Tabela 2: Composição dos sistemas 1 e 2.

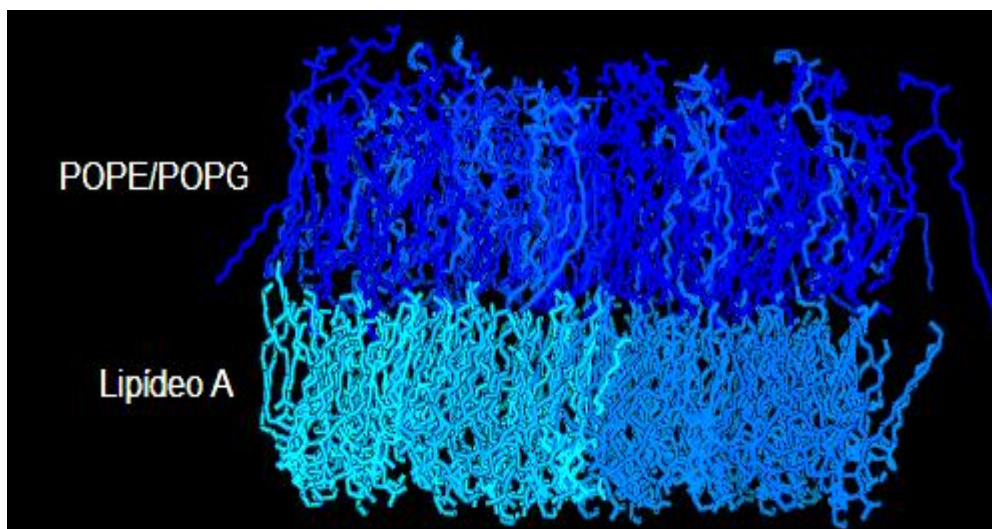
	<b>Sistema 1</b>	<b>Sistema 2</b>
Molécula	Quantidade	Quantidade
POPG	123	123
Água	6149	6149
Cl <sup>-</sup>	13	13
Na <sup>+</sup>	128	120

Esqualamina	4	8
-------------	---	---

## 4.2 Modelos de bactérias Gram-negativas

Para construir esse sistema buscou-se os LPS no banco de dados lipidbook. Foi encontrado o lipídeo A (*E. coli*) unitário e o campo de força associado era o GROMOS53a6. Para essa simulação a membrana precisou ser construída, e seguiu-se o modelo descrito por Piggot (2011), como segue: a molécula única de lipídeo A foi copiada nos eixos X e Y para produzir uma monocamada de 16 moléculas. O processo foi repetido para produzir a bicamada contendo as 32 moléculas de lipídeo A (camada externa da membrana). Foi então construída uma membrana mista de POPE/POPG, na proporção 4:1 para compor a camada interna da membrana. Assim obteve-se uma bicamada assimétrica com 2 lipídeos A para cada 5 fosfolipídeos (POPE/POPG), como pode ser visto na tabela 3. A membrana foi então solvatada e simulada para garantir sua estabilidade. As configurações iniciais dos sistemas 3 e 4 podem ser vistas nas figuras 13, 14 e 15.

Figura 13: Membrana exterior de bactéria Gram-negativa contendo lipídeo A (sistema 3).



Visto que a membrana era estável, construiu-se um novo sistema, a partir do anterior, onde foram inseridas as Esqualaminas (Tabela 3). Foram adicionadas 4 moléculas de Esqualamina e esse sistema foi simulado até o tempo final de 100 ns.

Figura 14: Configuração inicial do sistema contendo 4 Esqualaminas (Sistema 4) – visão lateral.

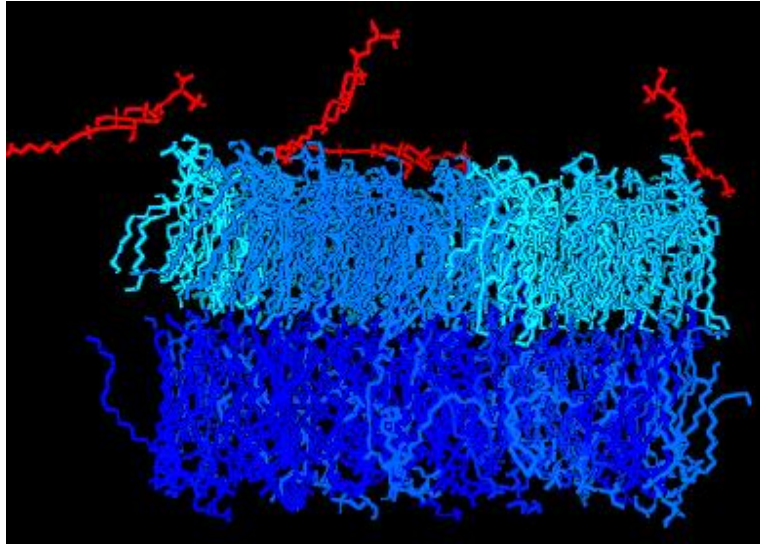


Figura 15: Configuração inicial do sistema contendo 4 Esqualaminas (Sistema 4) – visão superior.

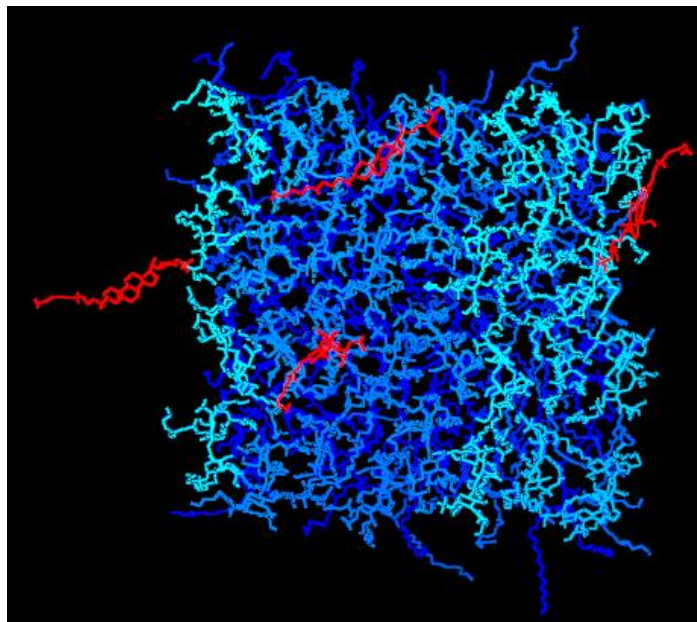


Tabela 3: Composição dos sistemas 3 e 4.

	Sistema 3	Sistema 4
<i>Molécula</i>	Quantidade	Quantidade
POPE	64	64

POPG	16	16
Lipídeo A	32	32
Água	12432	12320
Na <sup>+</sup>	176	172
Cl <sup>-</sup>	32	36
Esqualamina	-	4

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para executar os resultados foram utilizadas as análises de Perfil de Densidade (PD) e Função de Distribuição Radial (RDF). O Perfil de Densidade é uma medida que leva em conta a densidade ( $\text{kg}/\text{nm}^3$ ) em função da altura (eixo Z) da caixa onde o sistema é simulado. Já a RDF é uma medida de probabilidade de encontrar uma partícula a uma distância  $r$  de outra partícula.

Além disso, foram analisadas a altura (espessura) da membrana e a área por fosfolipídeo para que fossem comparadas com os valores da literatura.

### 5.1 Bactérias Gram-positivas

#### 5.1.1 Resultados do Sistema 1

As análises para esse sistema foram feitas a cada 50 ns (50 ns, 100 ns, 150 ns e 200 ns). Primeiramente avaliou-se o Perfil de Densidade do sistema (figuras 16, 17, 18 e 19) e foi possível fazer uma análise da posição das Esqualaminas em relação a membrana.

Figura 16: Perfil de Densidade do Sistema 1 em 50 nanosegundos.

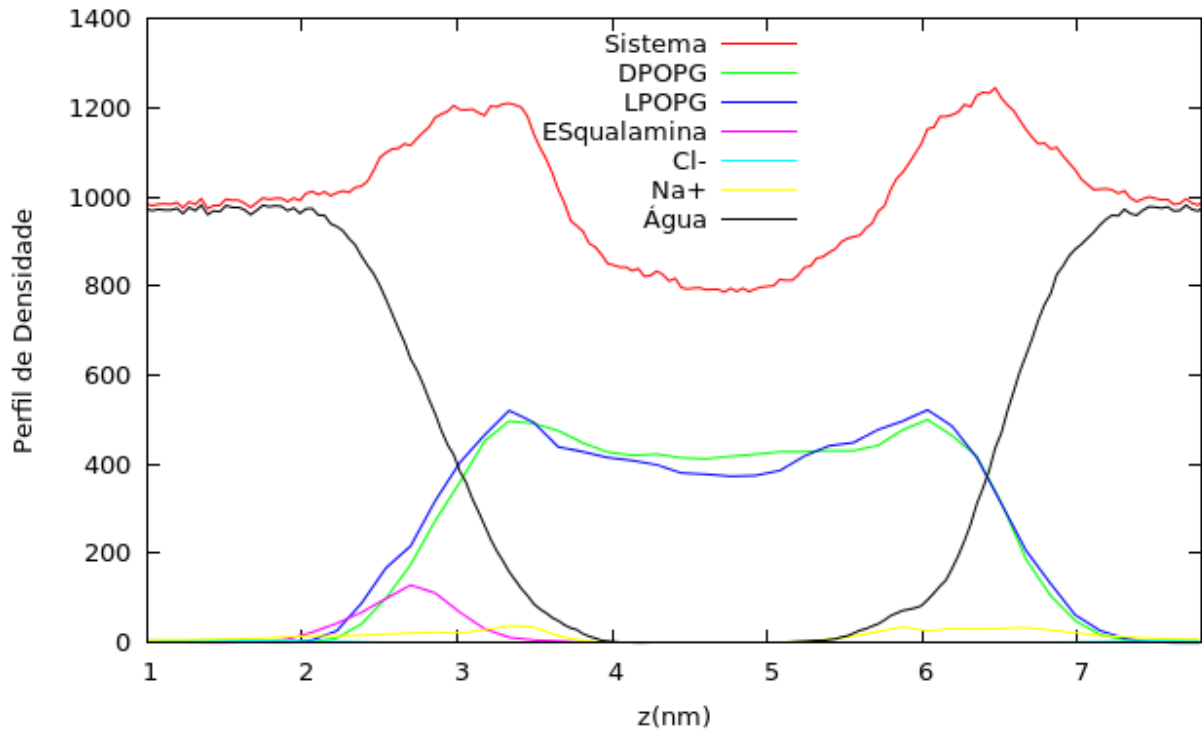


Figura 17: Perfil de Densidade do Sistema 1 em 100 nanosegundos.

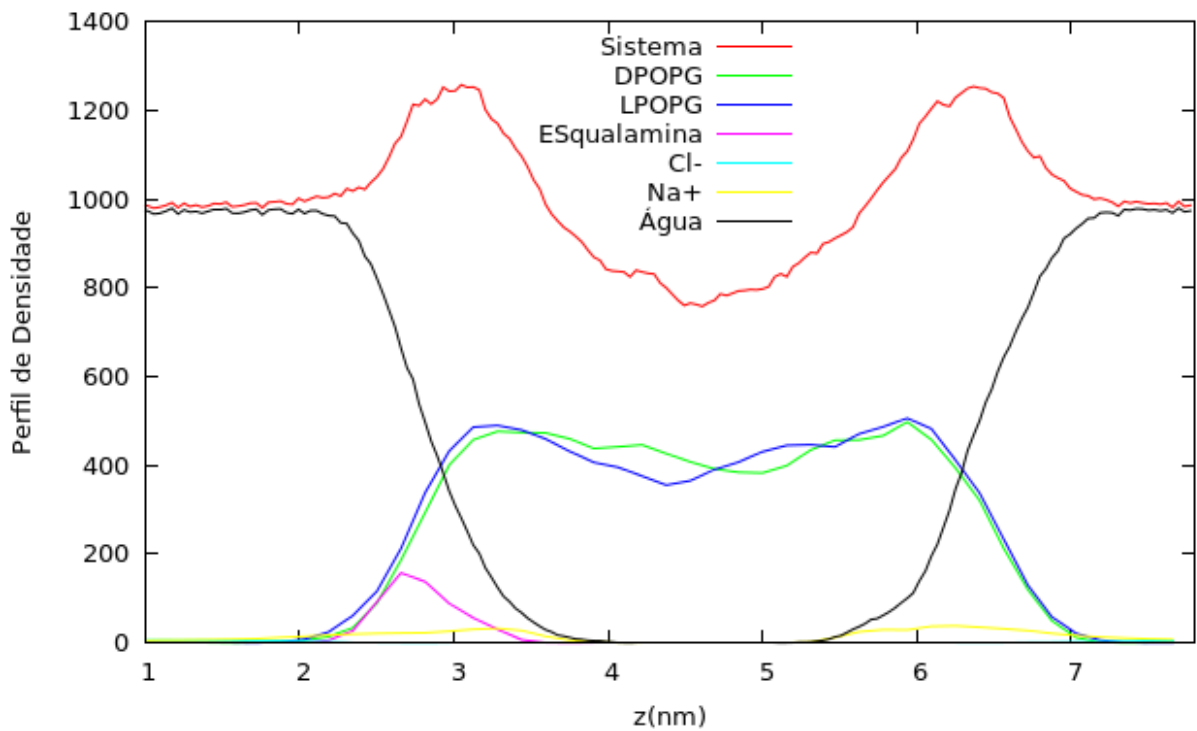


Figura 18: Perfil de Densidade do Sistema 1 em 150 nanosegundos.

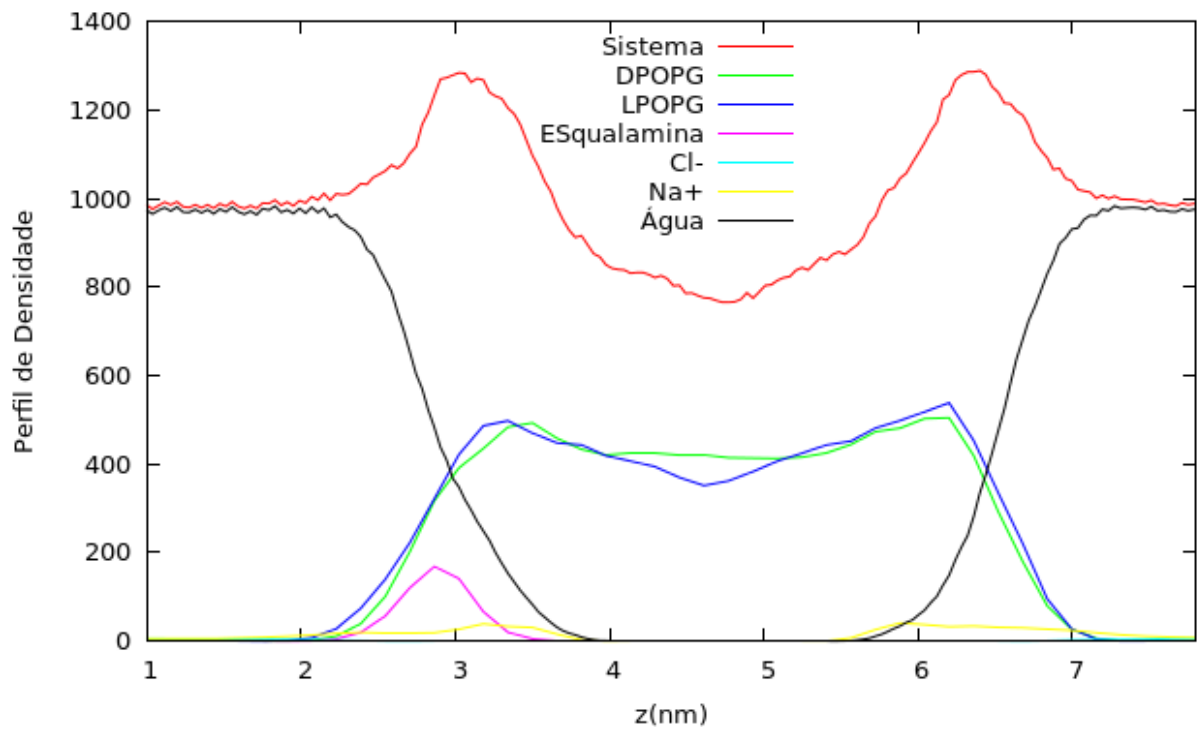
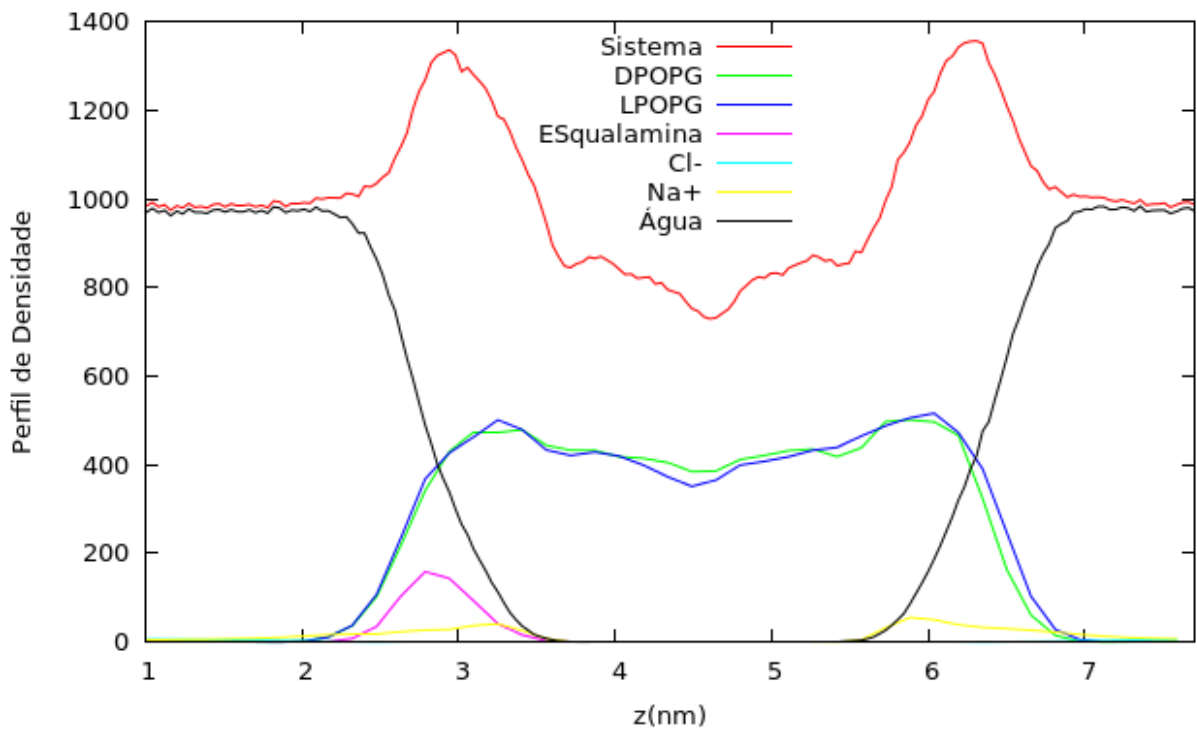


Figura 19: Perfil de Densidade do Sistema 1 em 200 ns.





Nota-se nas figuras acima que são apresentadas duas formas do fosfolípídeo POPG ( formas D e L), sendo estes apenas isômeros ópticos do POPG.

Pode-se perceber que ao longo da simulação a Esqualamina foi adentrando a membrana, e conseqüentemente, interagindo com porções mais internas das moléculas de POPG, mas não foi percebida a desestabilização da membrana. Através dos gráficos do Perfil de Densidade pode-se extrair outra informação importante: a espessura da membrana (obtida pela medida dos máximos do sistema no PD). Estes valores são mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Espessura da membrana.

<b>Tempo de simulação (nanossegundos)</b>	<b>Espessura da membrana (nm)</b>
50	3,3
100	3,4
150	3,3
200	3,3

A seguir, foi calculada a razão entre a área da membrana e a quantidade de fosfolípídeos e obteve-se os resultados apresentados na tabela 5. O cálculo é mostrado na equação 2.

$$A/F = \frac{(\text{dimensão da caixa no eixo X})(\text{dimensão da caixa no eixo Y})}{(\text{número total de fosfolípídeos})} \times 2 \quad (\text{equação 2})$$

2)

Tabela 5: Cálculo da área por fosfolípídeo (A/F).

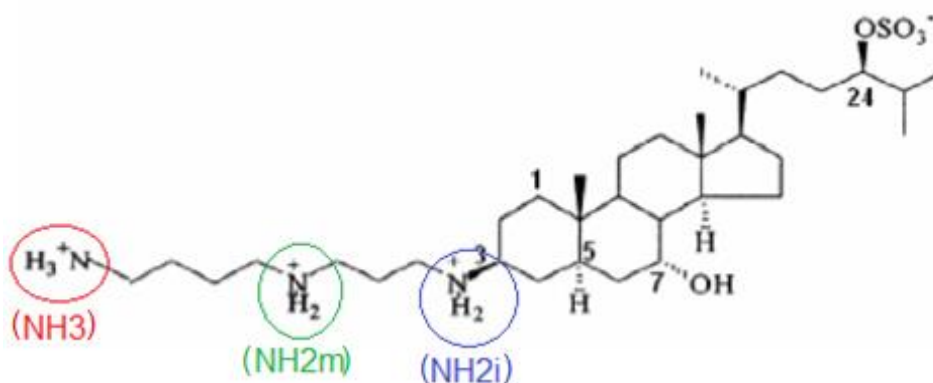
<b>Tempo de simulação (ns)</b>	<b>Produto dos eixos X e Y</b>	<b>Quantidade de fosfolípídeos</b>	<b>Área por fosfolípídeo (nm<sup>2</sup>)</b>
50	43,90	123	0,71
100	43,23	123	0,70
150	43,71	123	0,71
200	43,86	123	0,71

Na tabela 5 é mostrado o número total de fosfolipídeos, mas visto que a membrana é uma bicamada, multiplica-se o valor por 2 para obter o valor da área por fosfolipídeo (equação 2). Os dados da literatura para esse tipo de medida não são muito uniformes, mas acredita-se que essa espessura seja de aproximadamente 3,5 nm. (Introdução à Biologia)

Segundo Kukol (2009), não se tem conhecimento de dados experimentais para área por fosfolipídeo de uma bicamada composta somente por POPG. Por comparação com outras membranas (que contenham POPG em sua composição), chegou-se que o valor de 0,700 nm<sup>2</sup> é uma boa aproximação do valor experimental. Sendo assim, os valores encontrados estão de acordo com os dados encontrados na literatura.

Por fim, foram analisadas as Funções de Distribuição Radial (RDF) para detectar possíveis interações intermoleculares, preferencialmente do tipo ligação de hidrogênio. Para os sistemas 1 e 2 foram considerados os átomos de hidrogênio ligados aos três átomos de nitrogênio presentes na Esqualamina (figura 20) e os átomos de oxigênio dos grupos glicerol e fosfato (constituintes do fosfolipídeo POPG), mostrados na figura 21.

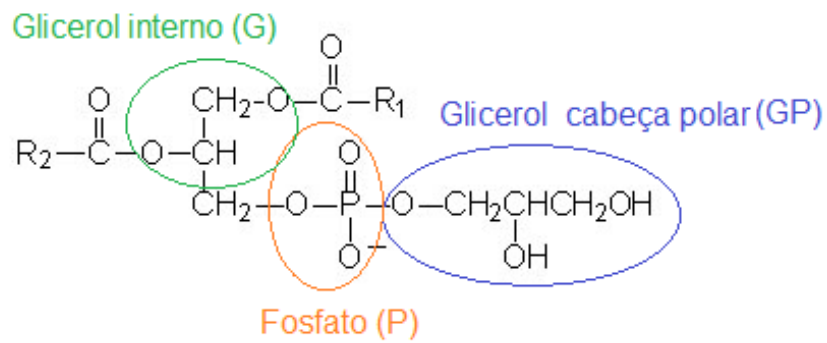
Figura 20: Estrutura da Esqualamina – grupos analisados na RDF.



Fonte: SEGALIN, 2008.

Figura 21: Estrutura do fosfolipídeo POPG – grupos analisados na RDF.





Fonte: KING, M. W.

As letras entre parênteses (nas figuras 20 e 21) são usadas para a denominação desses grupos nas figuras de RDF. O primeiro grupo de RDF que serão analisadas para esse sistema são as que envolvem o grupo glicerol da cabeça polar do fosfolípido (figuras 22, 23, 24 e 25).

Figura 22: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

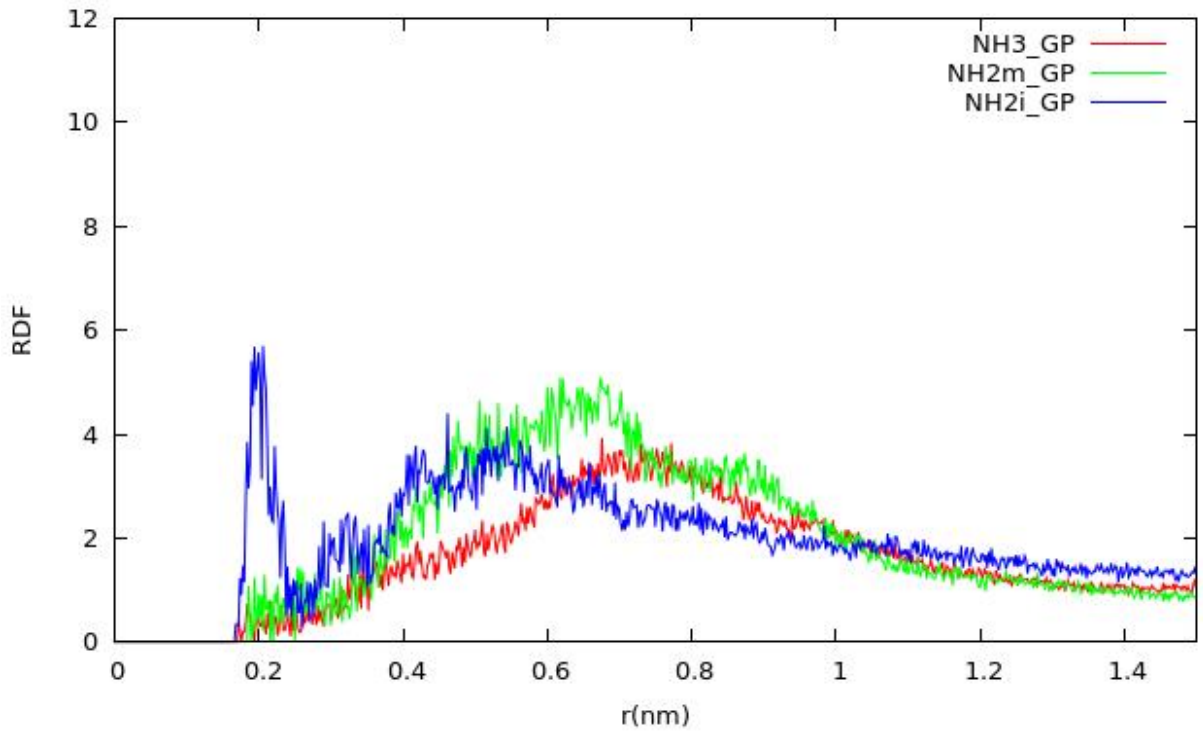


Figura 23: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.

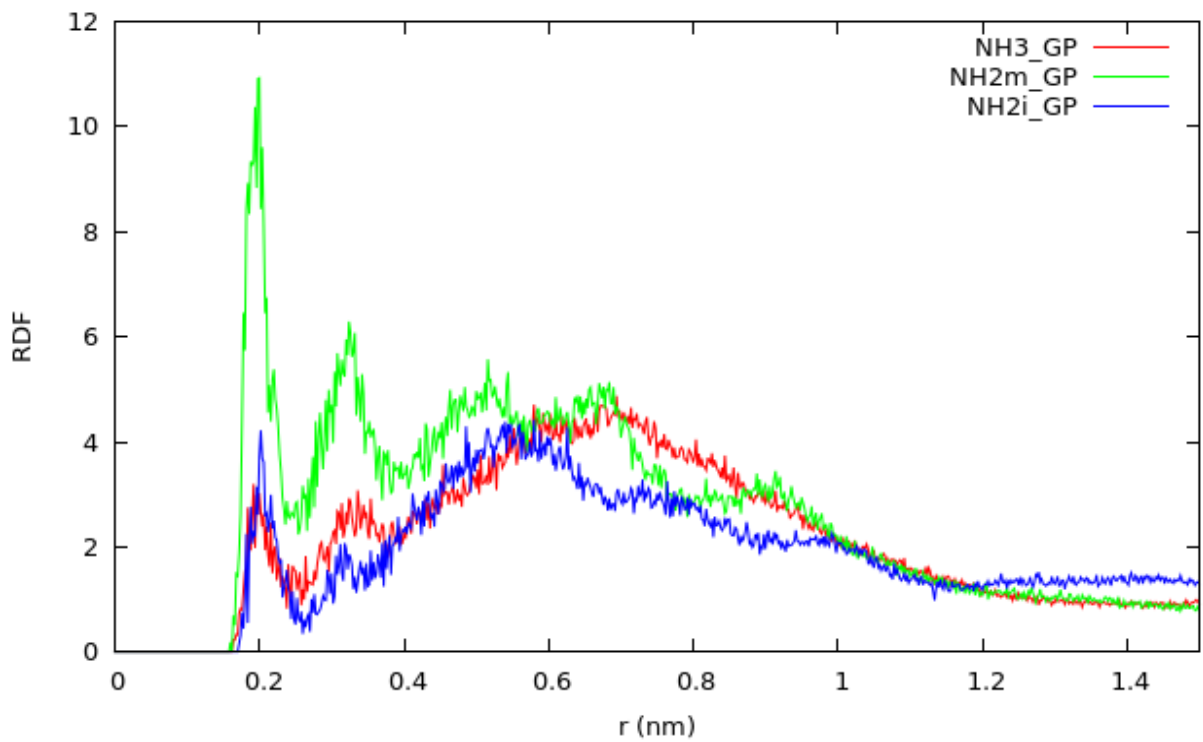


Figura 24: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.

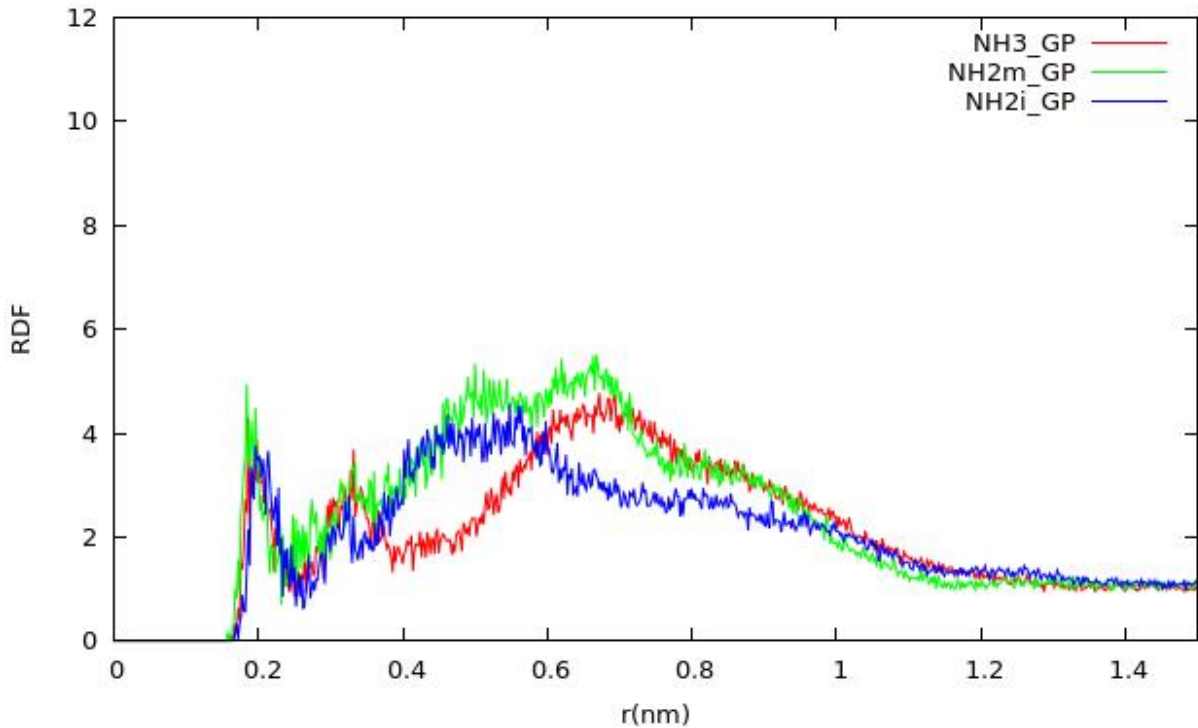
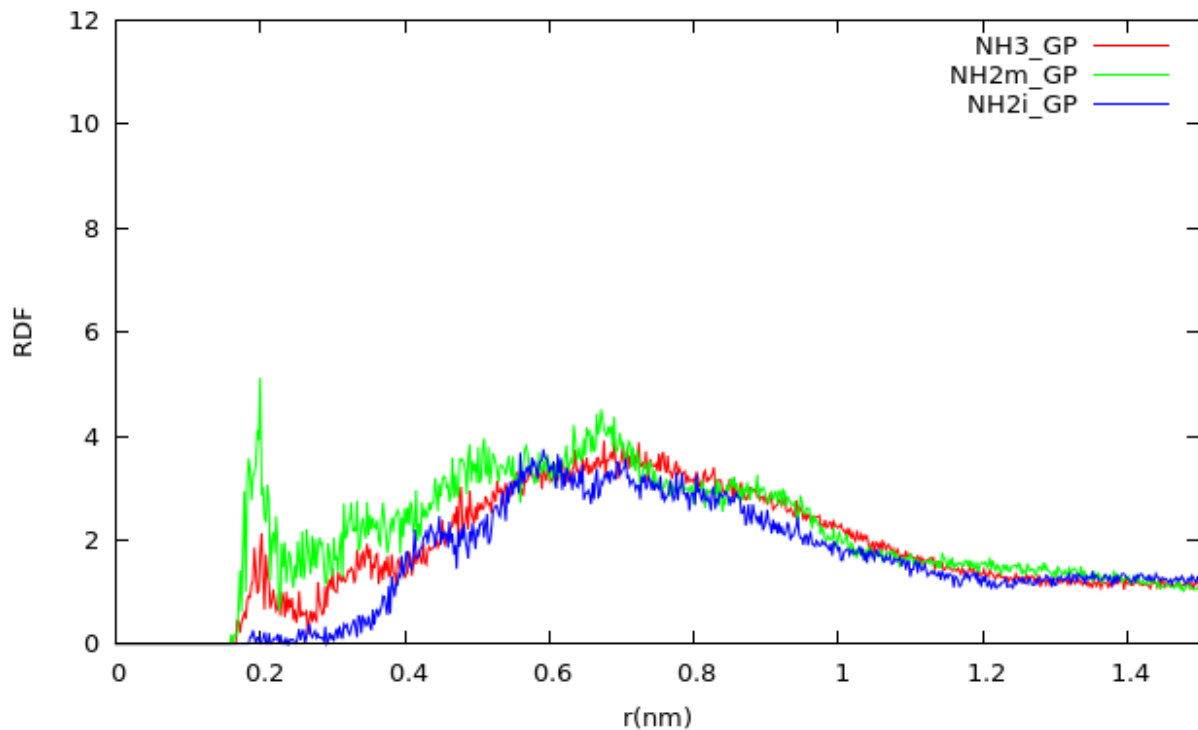


Figura 25: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 200ns.



Embora na primeira análise (50 ns) exista uma maior proximidade dos hidrogênios do grupo NH2i, a partir da segunda análise o grupo NH2m possui uma probabilidade

maior de ser encontrado a distâncias menores (em relação ao glicerol da cabeça polar). Além disso, percebe-se que o grupo NH<sub>2</sub>i praticamente desaparece em pequenas distâncias (aproximadamente 0,2 nm) na análise em 200 ns. Este é um indício de que o sistema ainda está sofrendo mudanças, ou seja, 200 ns não é tempo suficiente para chegar a resultados precisos.

O segundo grupo de RDF que serão analisadas envolve o grupo fosfato do fosfolípido POPG (figuras 26, 27, 28 e 29).

Figura 26: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

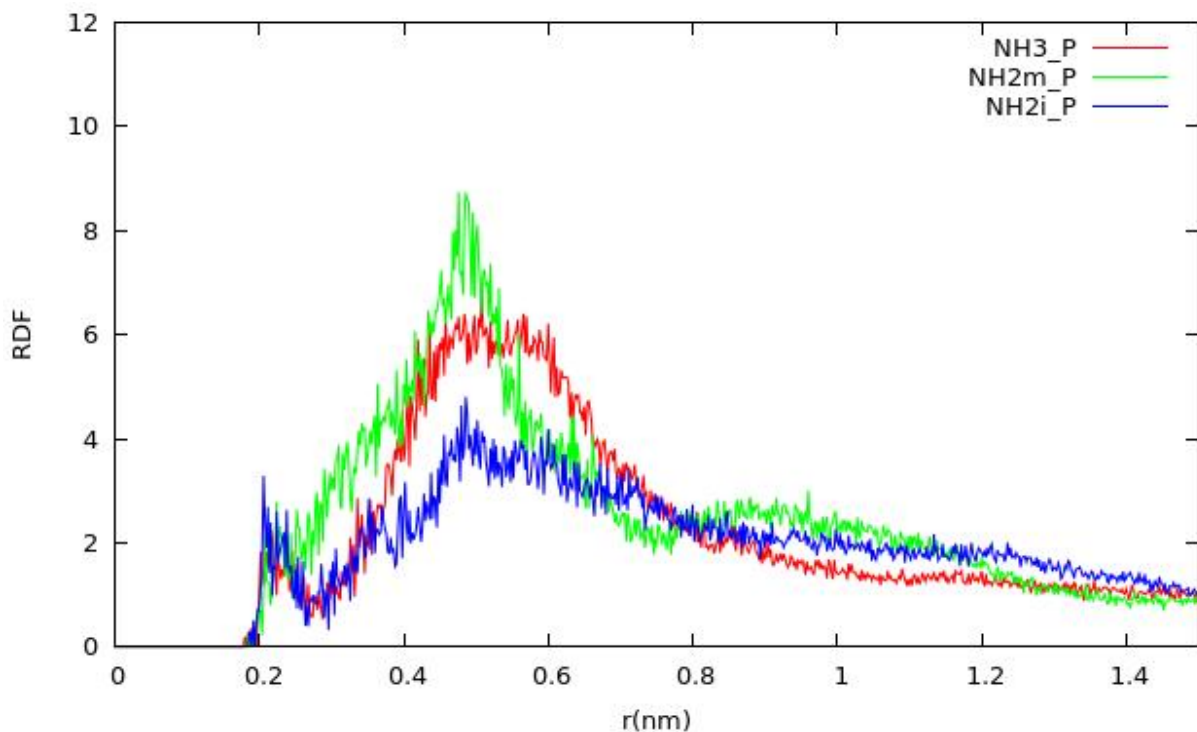


Figura 27: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.

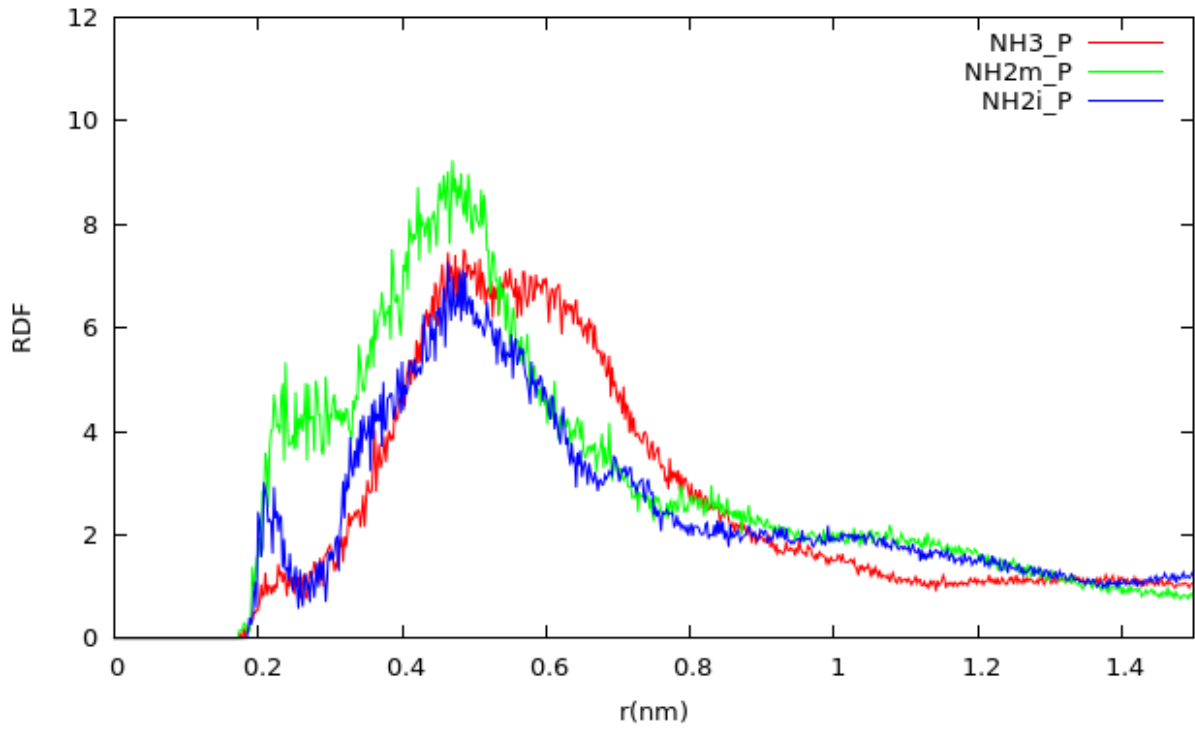


Figura 28: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.

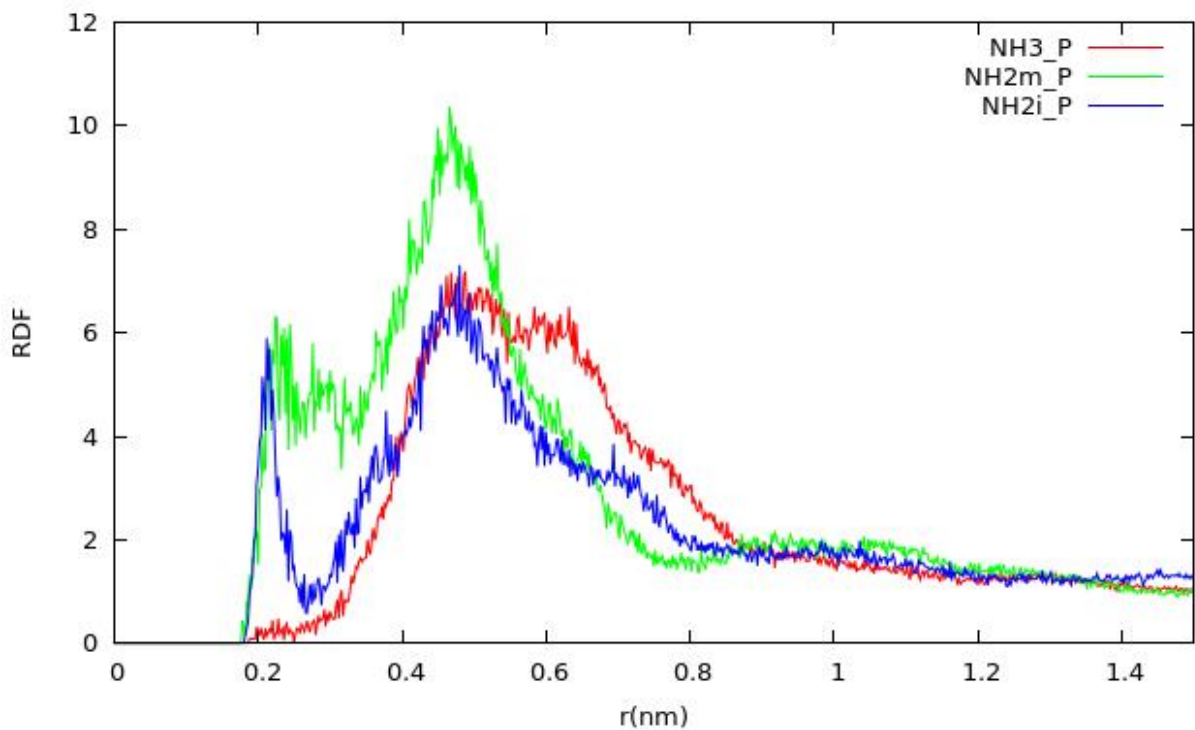
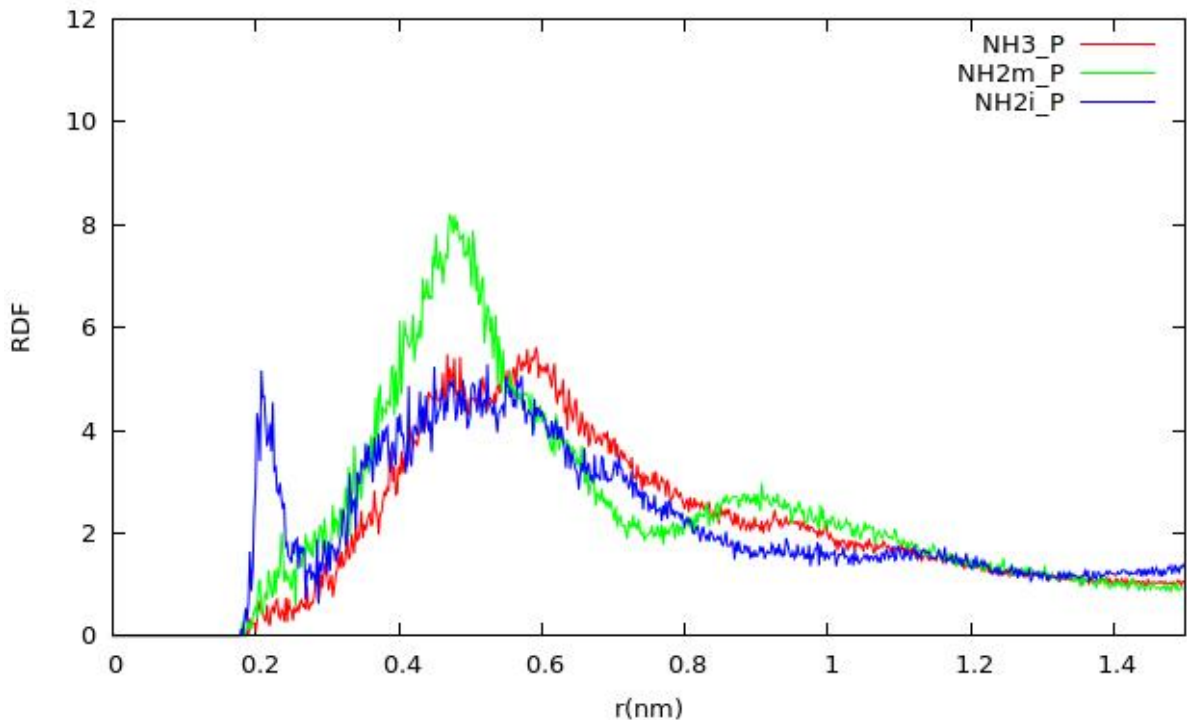


Figura 29: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 200ns.



É possível ver pelas figuras acima que os hidrogênios que estão mais próximos do grupo fosfato são aqueles localizados mais próximos dos ciclos da Esqualamina. Nas análises em 100 ns e 150 ns percebe-se que o grupo NH2m torna-se bastante próximo ao grupo fosfato, mas tende a se afastar na última análise. Um fato parecido foi observado no primeiro grupo de RDF (oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar). O pico não tão intenso de NH2i na última análise pode ser interpretado como uma fraca ligação de hidrogênio.

O último conjunto de RDF analisadas para esse sistema envolve o grupo glicerol mais interno do POPG, como pode ser visto nas figuras 30, 31, 32 e 33.

Figura 30: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

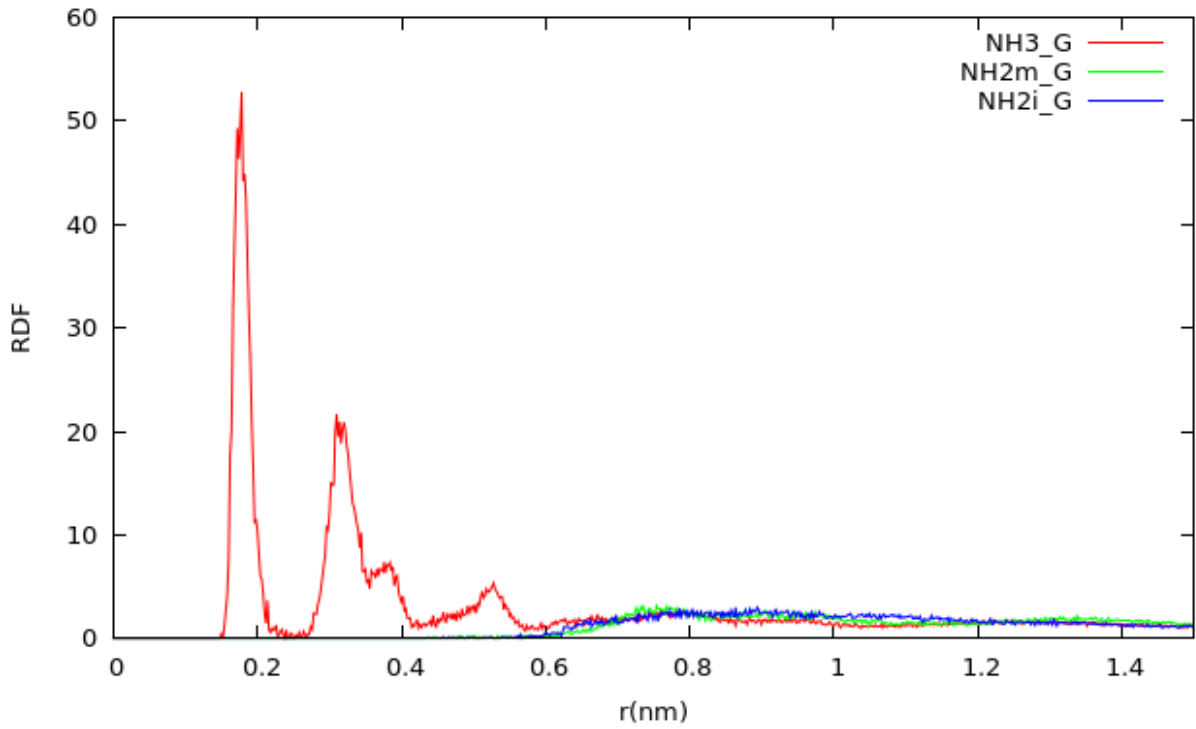


Figura 31: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.

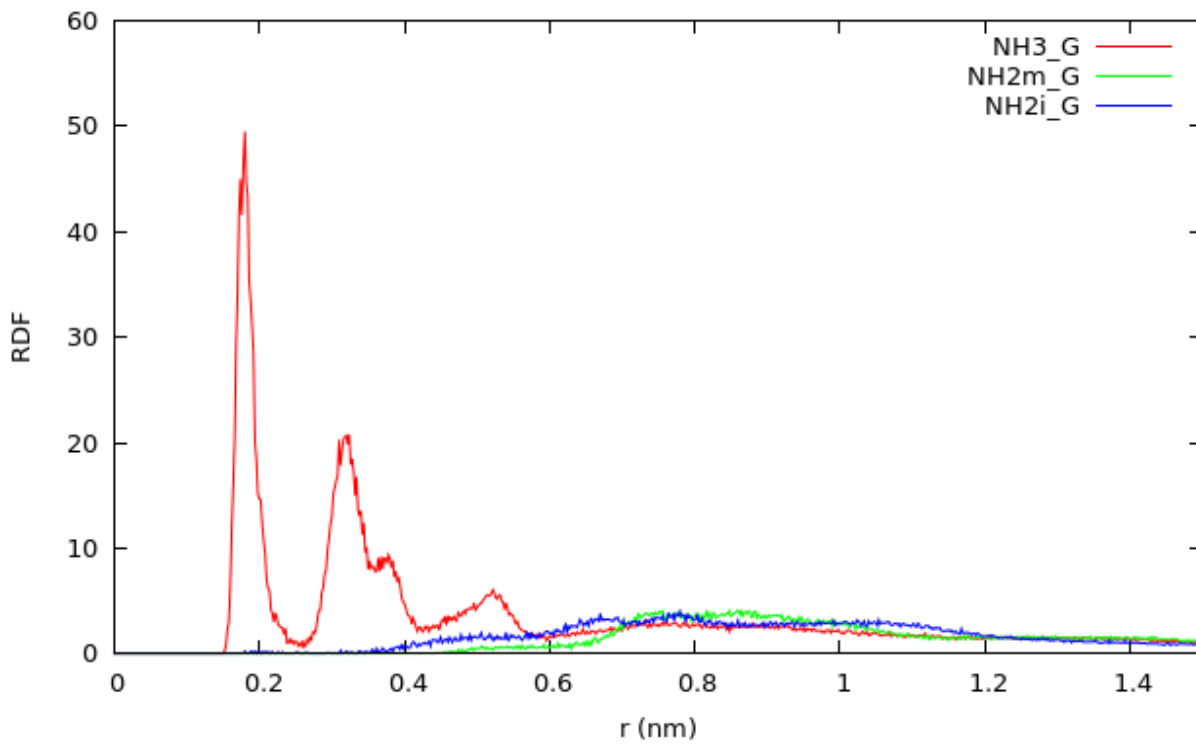


Figura 32: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.

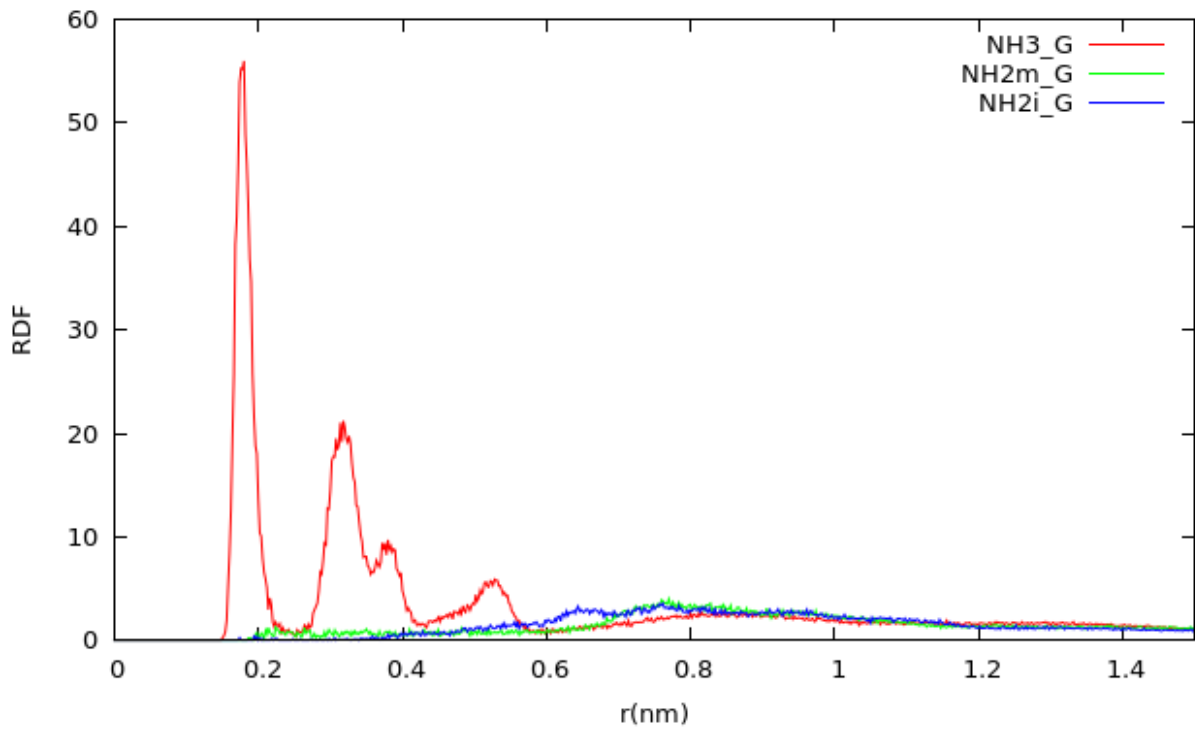
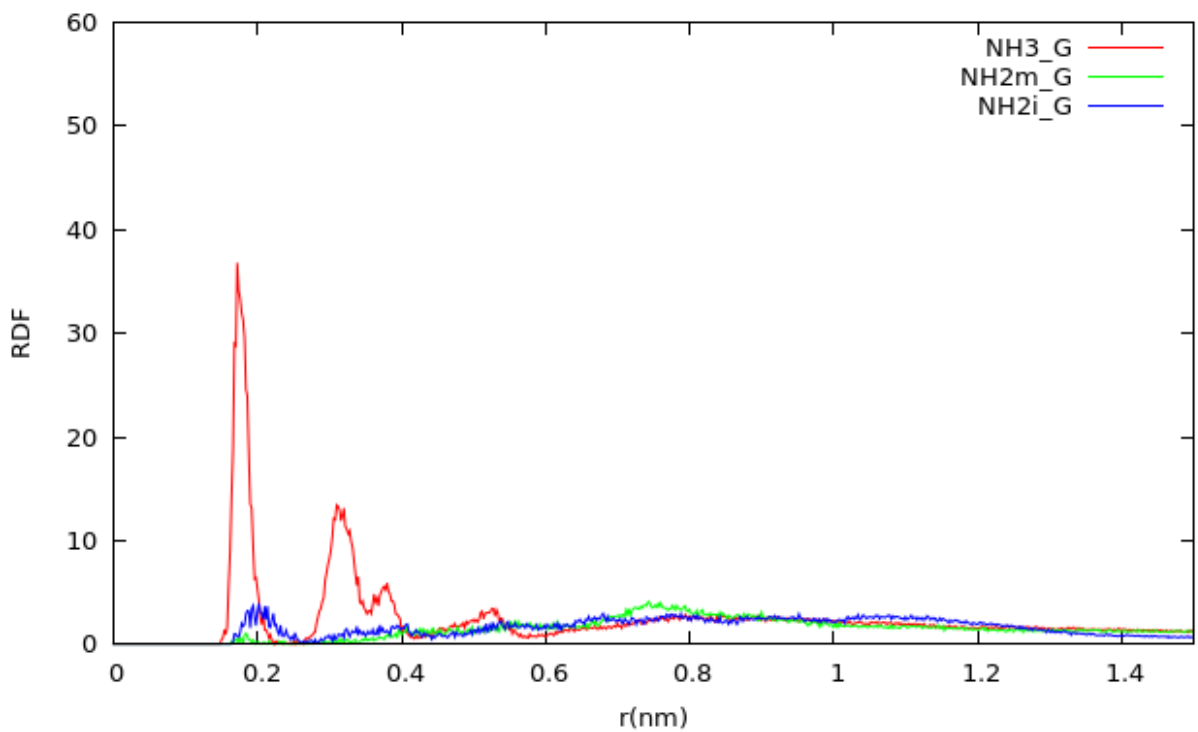


Figura 33: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 200ns.



Nas figuras acima é possível ver que a interação é preferencial com os hidrogênios ligados aos nitrogênios que estão na ponta da cadeia da Esqualamina (figura 1). Os



outros hidrogênios só começam a aparecer em distâncias menores (0,2 nm) entre 150 ns e 200 ns.

O pico intenso em cerca de 0,2 nm indica forte ligação de hidrogênio entre os hidrogênios do grupo NH<sub>3</sub> e os oxigênios do grupo glicerol.

### 5.1.2 Resultados do Sistema 2

As análises para esse sistema também foram feitas a cada 50 ns (50, 100, 150) para que fosse possível fazer comparações em tempos iguais com o sistema 1.

Primeiramente avaliou-se o PD do sistema 2 (figuras 34, 35 e 36) e foi possível fazer uma análise da localização dos componentes ao longo do eixo Z da caixa.

Figura 34: Perfil de Densidade do sistema 2 em 50 ns.

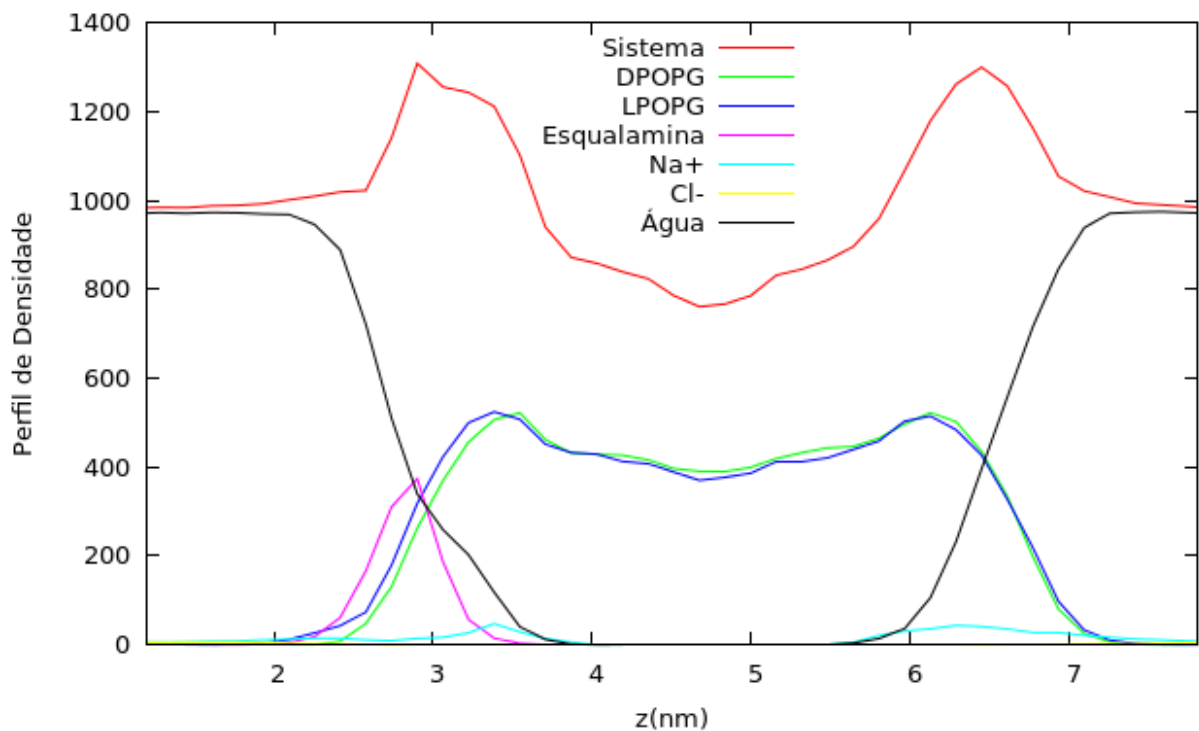


Figura 35: Perfil de Densidade do sistema 2 em 100 ns.

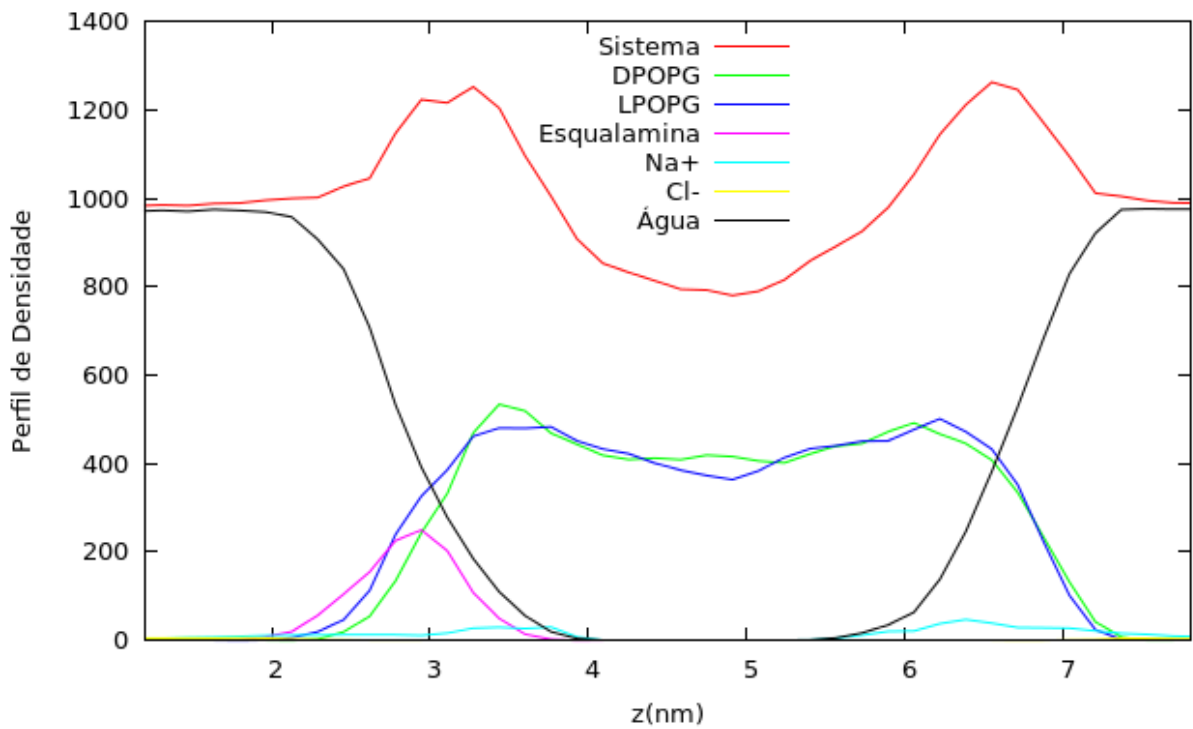
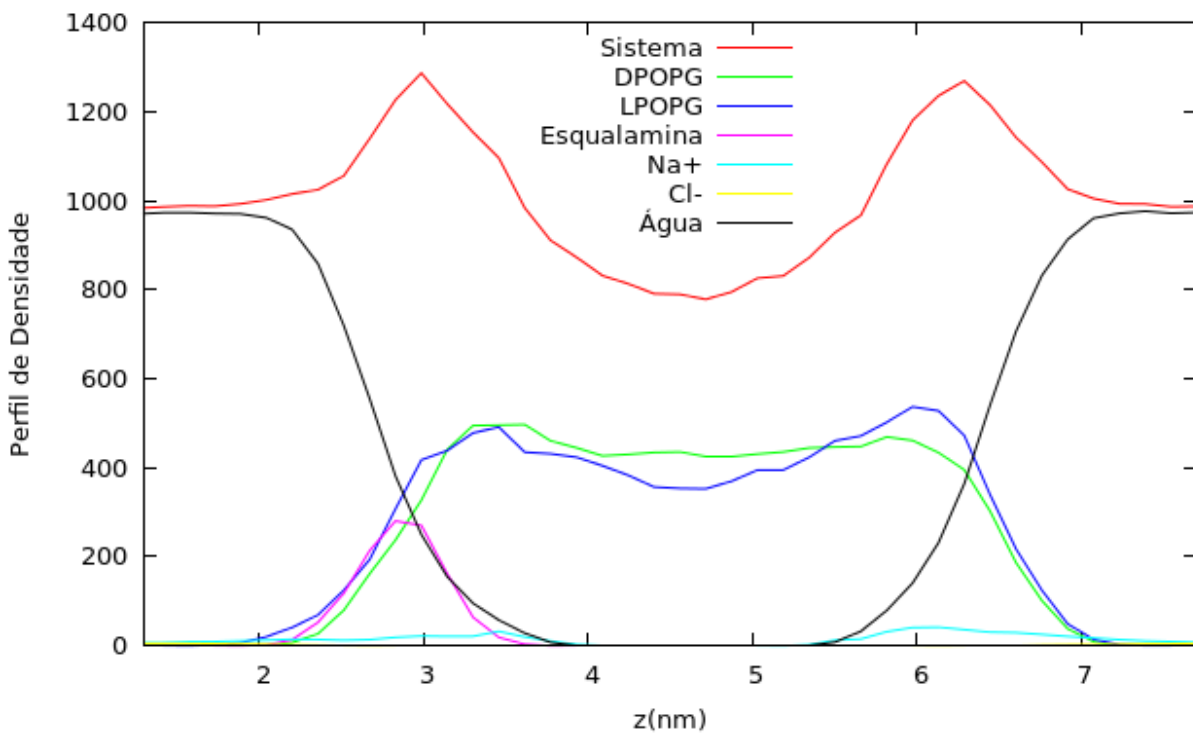


Figura 36: Perfil de Densidade do sistema 2 em 150 ns.



Novamente, enxerga-se que ao longo da simulação as moléculas de Esqualamina vão penetrando na membrana sem que houvesse a despolarização da mesma.

Foram feitas então as medidas de espessura da membrana que podem ser vistas na tabela 6.

Tabela 6: Espessura da membrana.

<b>Tempo de simulação (nanosegundos)</b>	<b>Espessura da membrana (nm)</b>
50	3,5
100	3,3
150	3,3

Seguindo a referência da literatura já citada no sistema 1, verifica-se que os valores encontrados para essa simulação são compatíveis com valores experimentais.

Na tabela 7 são apresentados os valores calculados para a área por fosfolípídeo e pode-se inferir que eles estão suficiente próximos para os valores calculados por Kukol.

Tabela 7: Cálculo da área por fosfolípídeo

<b>Tempo de simulação (ns)</b>	<b>Produto dos eixos X e Y</b>	<b>Quantidade de fosfolípídeos</b>	<b>Área por fosfolípídeo (nm<sup>2</sup>)</b>
50	42,70	123	0,69
100	42,24	123	0,69
150	44,07	123	0,72

As primeiras RDF analisadas foram aquelas que continham o grupo glicerol da cabeça polar (figuras 37, 38 e 39).

Figura 37: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

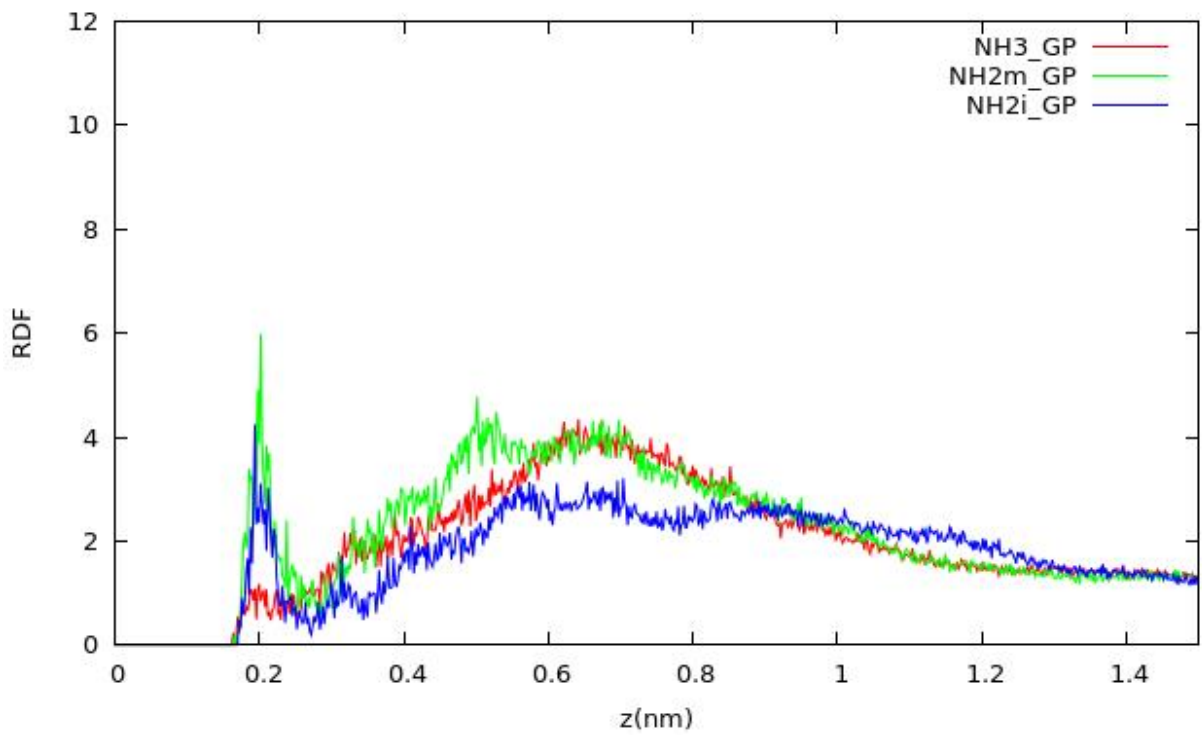


Figura 38: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.

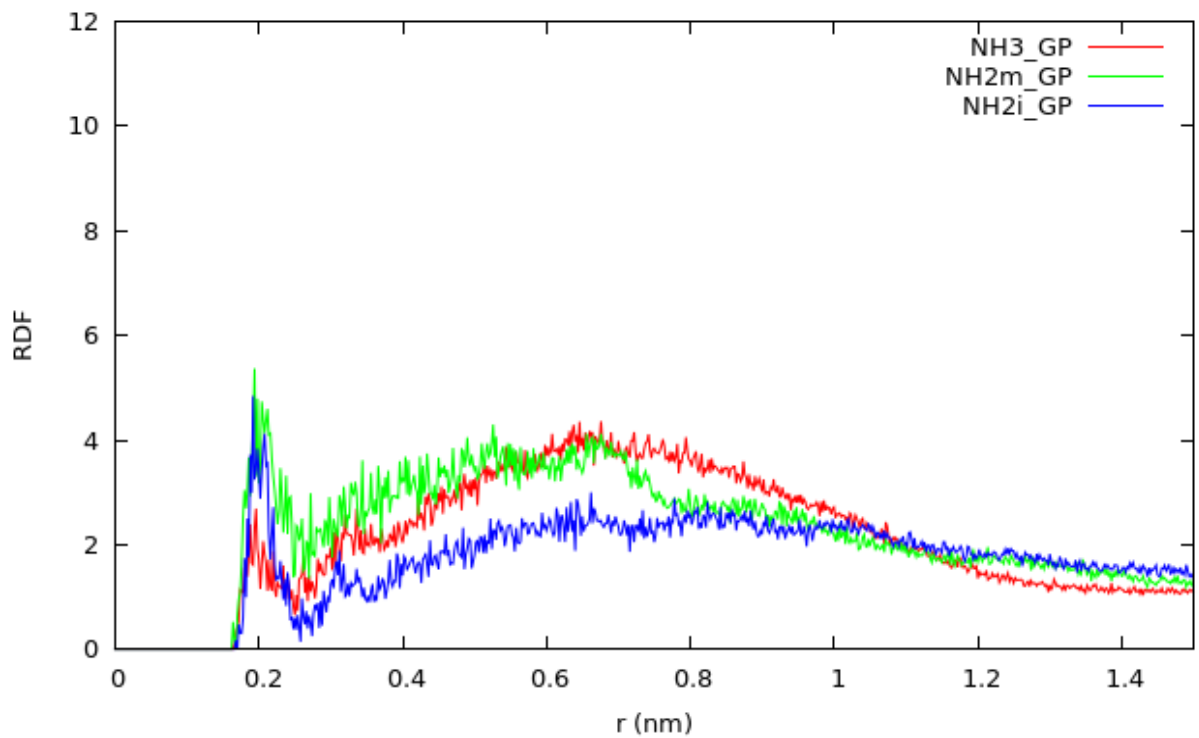
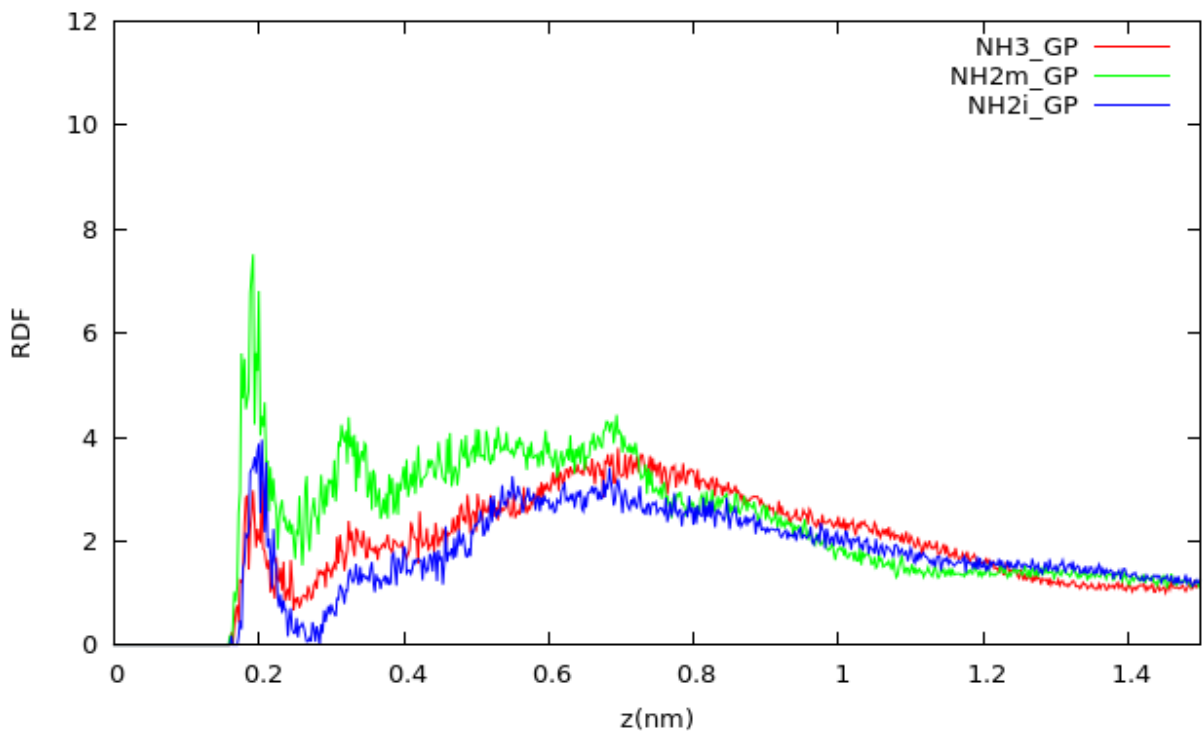


Figura 39: RDF dos oxigênios do grupo glicerol da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.



Os hidrogênios dos grupos NH2m e NH2i aparecem com aproximadamente a mesma intensidade em 0,2 nm e ao longo da simulação o grupo NH2m aparece um pouco mais intenso. Além disso, a figura do sistema 2 em 100 ns é parecida com a figura do sistema 1 em 150 ns (análise dos mesmos grupos). Esse pode ser um indicativo de que o aumento no número de Esqualaminas interfira na velocidade com que certas interações são alcançadas.

Seguindo a mesma sequência apresentada no sistema 1, analisou-se as RDF que continham o grupo fosfato do POPG (figuras 40, 41 e 42).

Figura 40: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

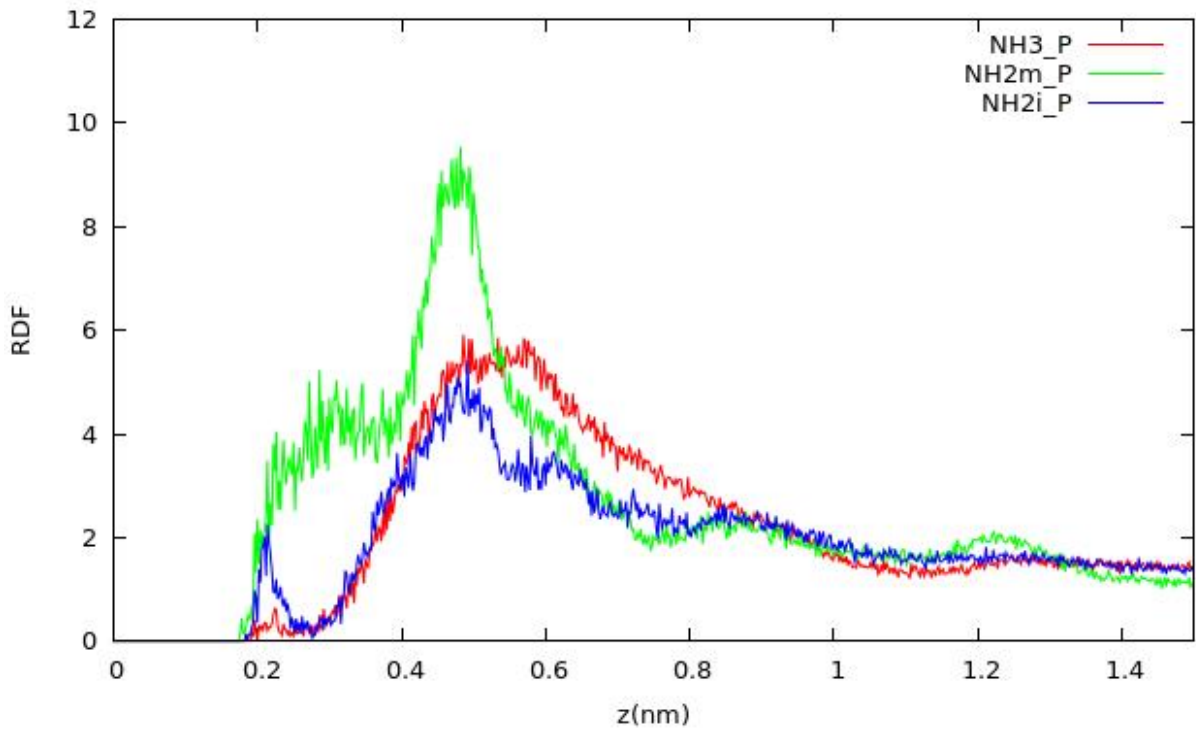


Figura 41: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.

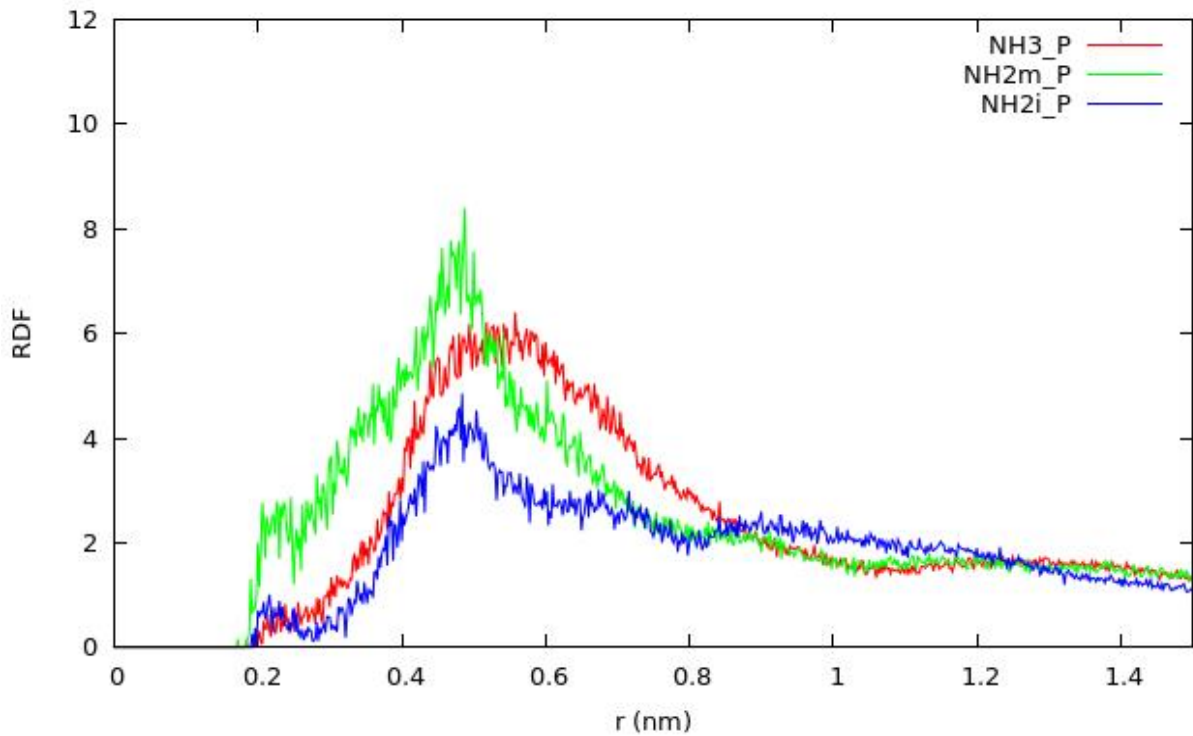
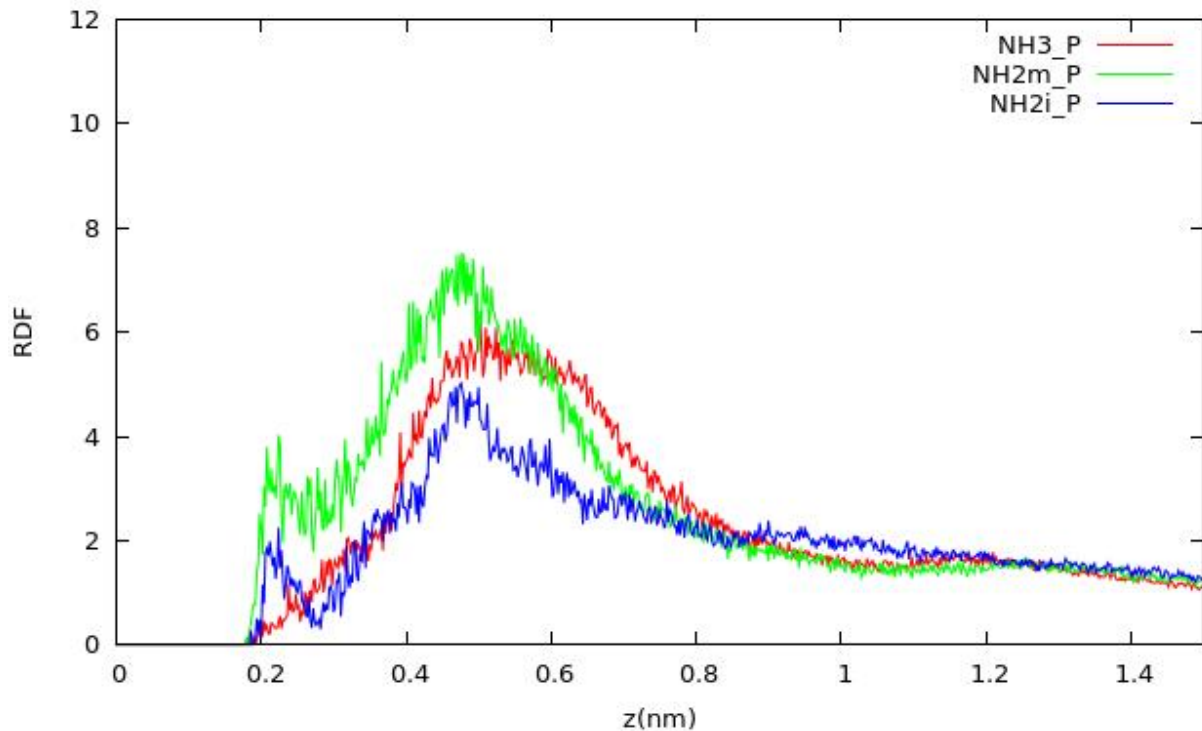


Figura 42: RDF dos oxigênios do grupo fosfato da cabeça polar do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.



Comparando-se estas figuras obtidas para o sistema 2 com as obtidas para o grupo fosfato no sistema 1, enxerga-se que existe semelhança na estrutura da análise, especialmente para os grupos NH2m e NH3. Também pode ser observado que estas configurações são alcançadas em tempos menores no sistema 2.

Enquanto no sistema 1 o grupo que possuía maior probabilidade de interação era o grupo NH2i, no sistema 2 o grupo que se destaca é o NH2m. É estranho que exista essa troca visto que para as outras análises os resultados são mais semelhantes. Como os dois sistemas ainda não atingiram um ponto final pode ser que com um maior tempo de simulação seja atingido um ponto em que ocorra maior semelhança entre os dois sistemas.

Para a última análise de RDF desse sistema serão analisadas as funções que envolvem o glicerol mais interno do fosfolípido. As figuras 43, 44 e 45 ilustram essa análise.

Figura 43: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

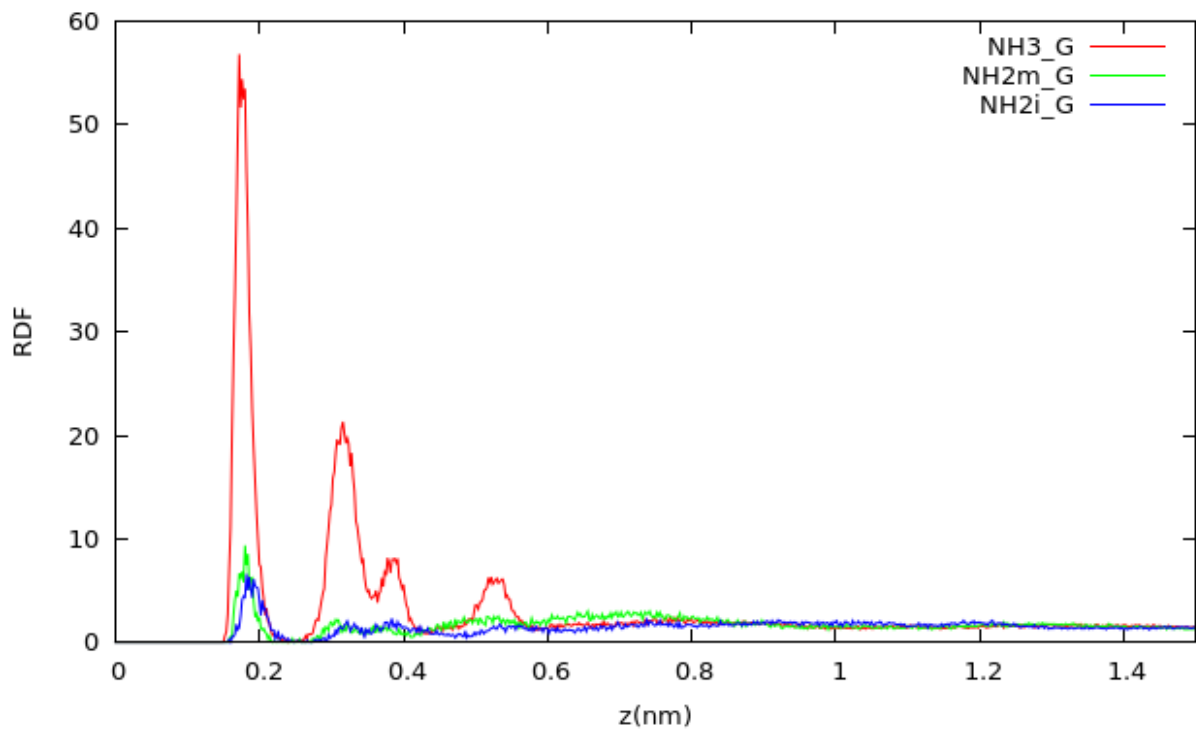


Figura 44: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.

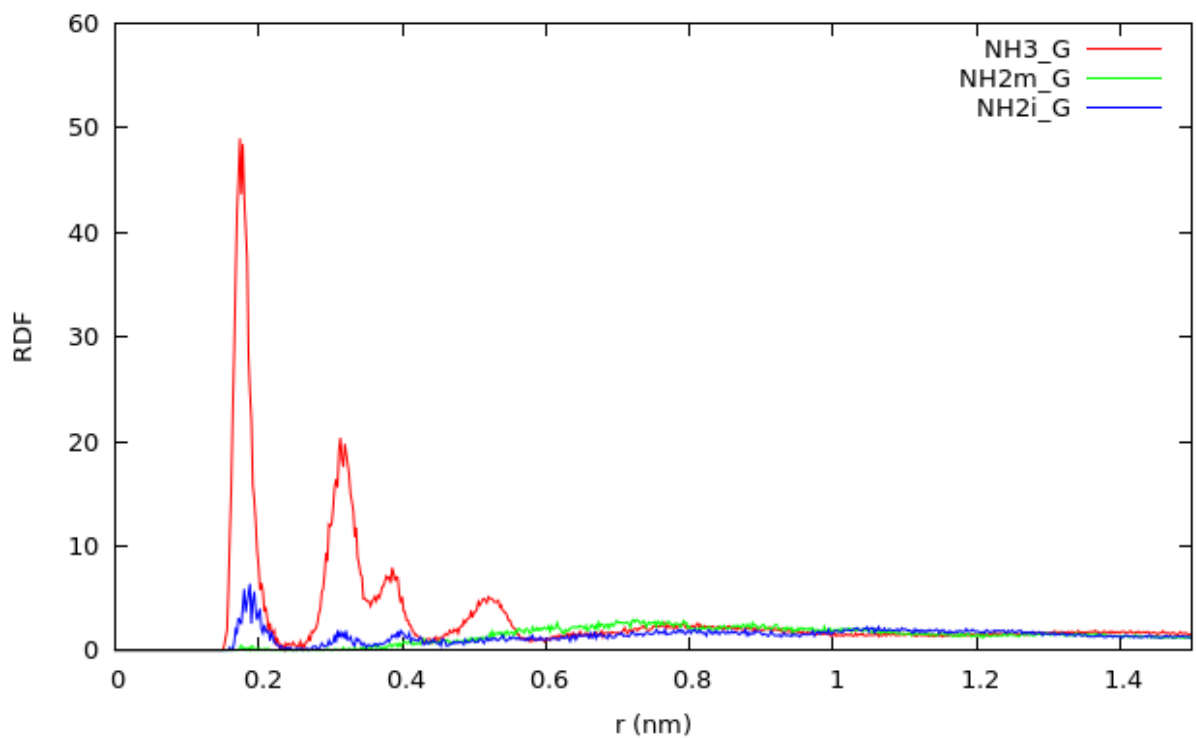
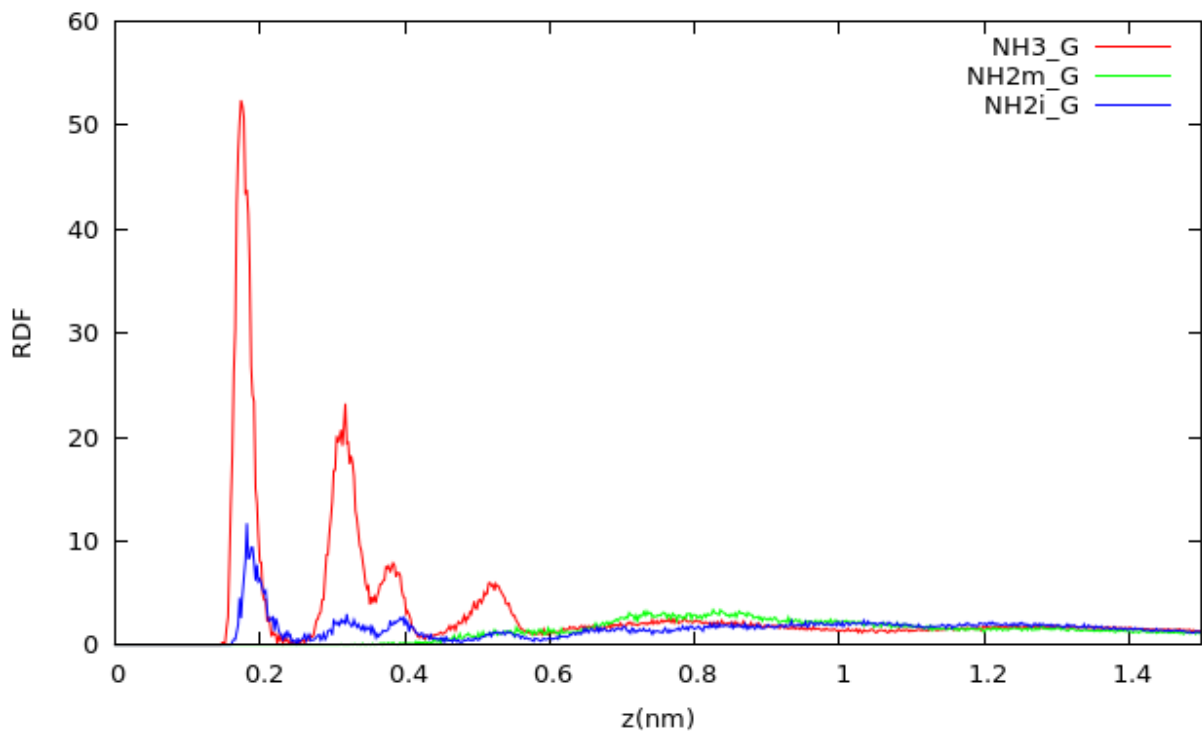


Figura 45: RDF dos oxigênios do grupo glicerol interno do POPG com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 150ns.





Novamente existe a preferência dos hidrogênios do grupo NH3 de interagirem com o grupo glicerol mais interno dos fosfolípidos. Mais uma vez tem-se o indício de que existe uma forte ligação de hidrogênio entre esses grupos. A grande diferença entre o sistema 1 e 2 nesta análise é o fato de que desde a primeira análise (50 ns) os três grupos da Esqualamina aparecem em distâncias pequenas. Um fato curioso é que ao longo da simulação o grupo NH2m deixa de aparecer em 0,2 nm e começa a aparecer somente em torno de 0,4 nm. Esse fato provavelmente é explicado devido a esse grupo estar interagindo mais fortemente tanto com o grupo fosfato quanto com o grupo glicerol da cabeça polar.

## 5.2 Bactérias Gram-negativas

### 5.2.1 Resultados do sistema 3

Construiu-se a membrana contendo lipídeo A e somente foram feitas as análises referentes ao Perfil de Densidade (figuras 46 e 47), uma vez que o sistema 3 não apresenta moléculas de Esqualamina em sua composição. As análises foram feitas em 50 ns e 90 ns. A análise de espessura da membrana (tabela 8) também foi

realiza, mas infelizmente não encontrou-se dados na literatura para que fossem feitas as comparações.

Figura 46: Perfil de Densidade do sistema 3 em 50 ns.

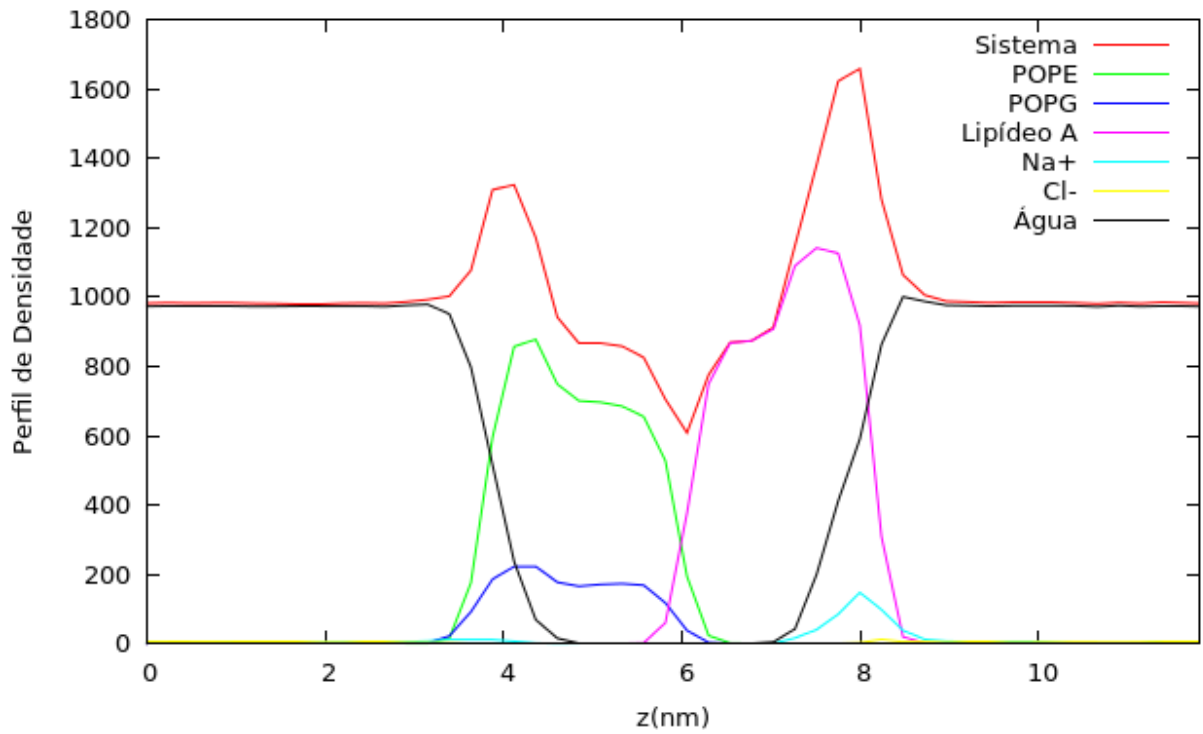
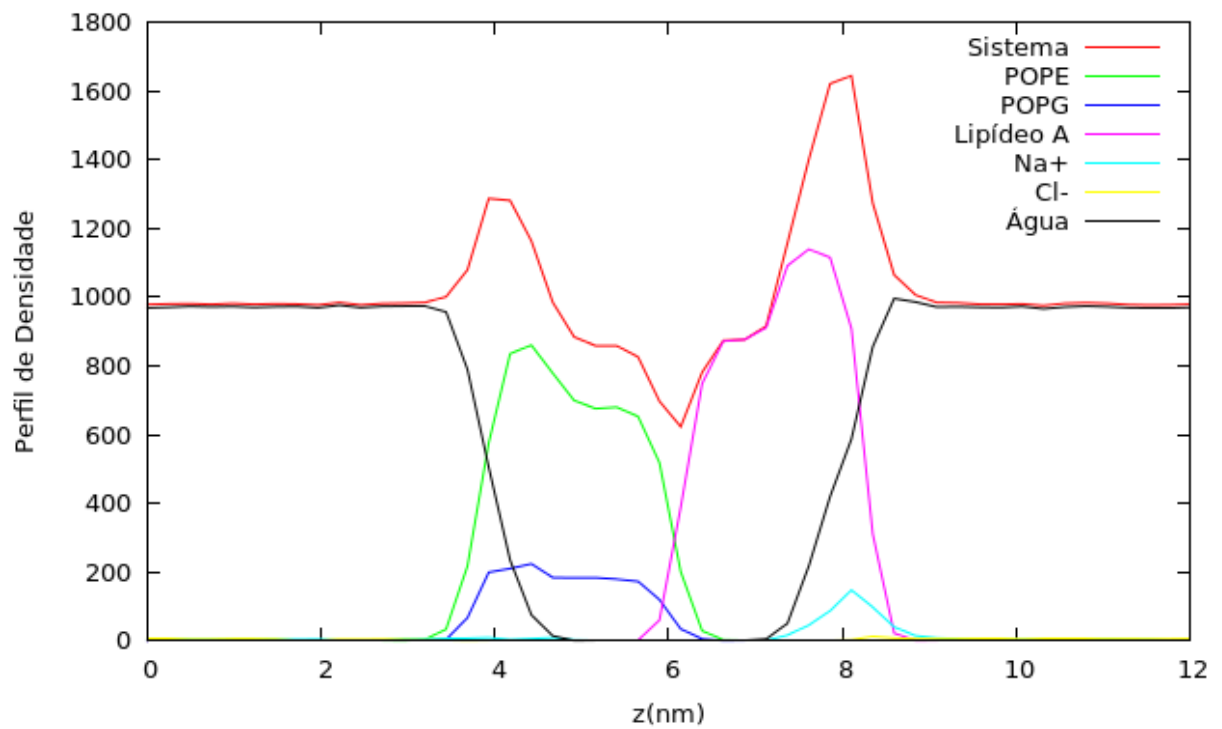


Figura 47: Perfil de Densidade do sistema 3 em 90 ns.



Não são percebidas mudanças significativas na estrutura da membrana ao longo da simulação. Isso demonstra que a membrana está bem equilibrada e pode-se utilizá-la em uma simulação computacional de um sistema que contenha Esqualamina. Também percebe-se que os íons  $\text{Na}^+$  estão concentrados somente de um dos lados da membrana (o lado que contém o lipídeo A). Esse fato demonstra que existe uma interação eletrostática mais forte entre essas duas espécies do que entre o  $\text{Na}^+$  e o POPG.

Tabela 7: Espessura da membrana.

<i>Tempo de simulação (nanossegundos)</i>	<i>Espessura da membrana (nm)</i>
50	3,9
90	3,9

### 5.2.2 Resultados do sistema 4

Novamente as análises foram feitas a cada 50 ns (resultando em duas análises, a primeira em 50ns e a segunda em 100 ns) tanto para o Perfil de Densidade (figuras 48 e 49) quanto as RDF. Como foi mudada a estrutura da membrana que interage com a Esqualamina, novos grupos serão considerados. Portanto, na figura 50 podem ser vistos os grupos da molécula de lipídeo A que serão analisadas nas RDF, sendo que a denominação para os grupos na figura é a mesma utilizada nas análises.

Figura 48: Perfil de Densidade do sistema 4 em 50 ns.

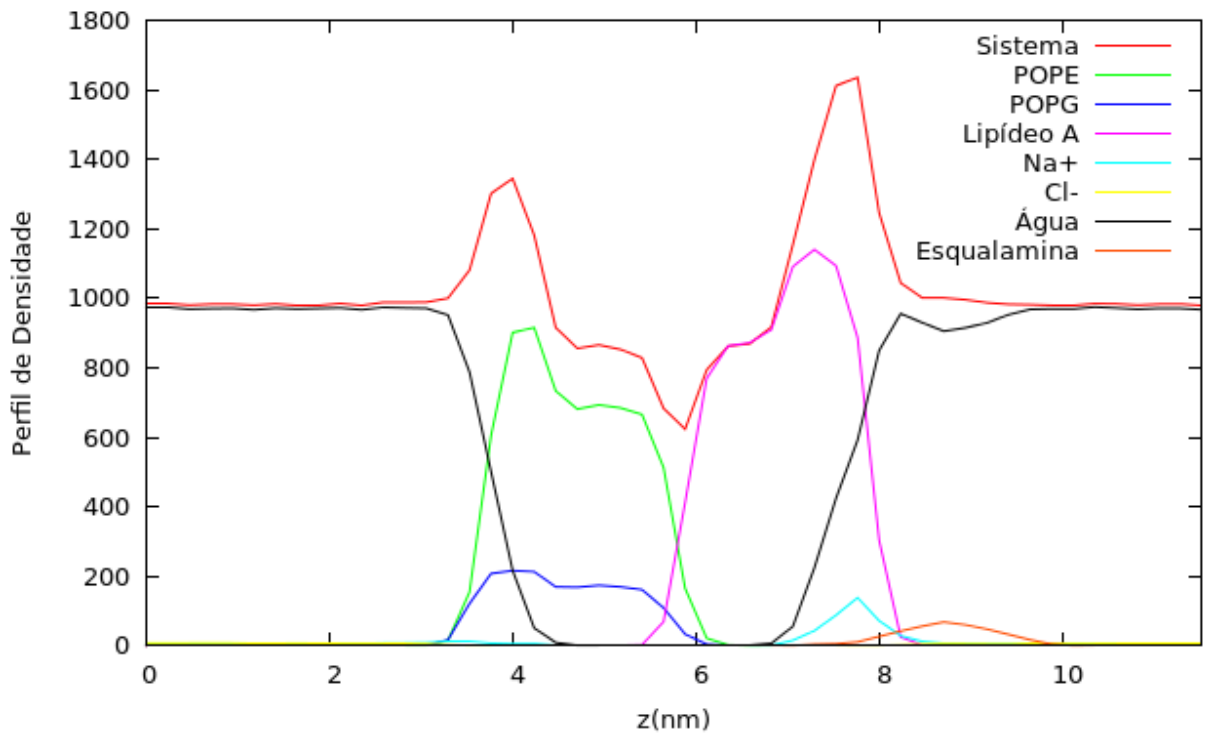
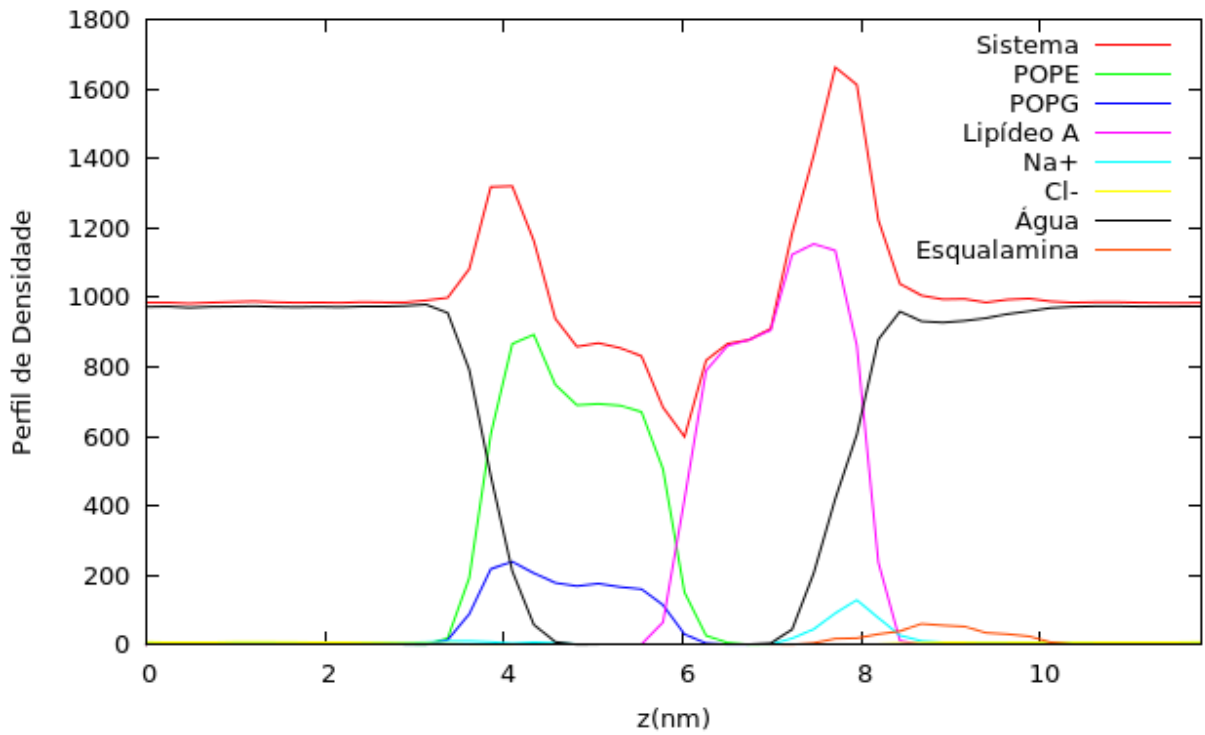


Figura 49: Perfil de Densidade do sistema 4 em 100 ns.

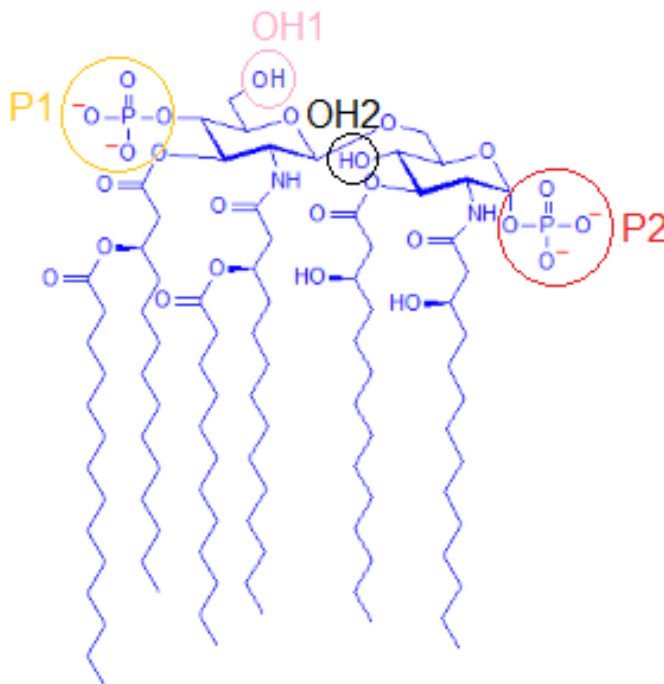


Fazendo uma comparação das figuras de Perfil de Densidade dos sistemas 3 e 4 não são observadas mudanças significativas. Então pode-se concluir que a inserção das moléculas de Esqualamina não causou mudanças estruturais perceptíveis na membrana. Quanto à posição das Esqualaminas em relação à membrana, não é percebida mudança de posição considerável na análise 2 em relação à análise 1. No entanto, é observada uma pequena diminuição da espessura da membrana (tabela 9) em comparação com o sistema 3 (tabela 8).

Tabela 9: Espessura da membrana.

<i>Tempo de simulação</i> (nanosegundos)	<i>Espessura da</i> <i>membrana (nm)</i>
50	3,7
100	3,8

Figura 50: Molécula de lipídeo A – grupos analisados nas RDF.



Agora serão quatro grupos do lipídeo A a serem analisados por RDF, mas devido ao curto tempo de simulação tem-se apenas duas análises. O primeiro grupo a ser analisado foi o OH1 (figuras 51 e 52).

Figura 51: RDF do oxigênio do grupo OH1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

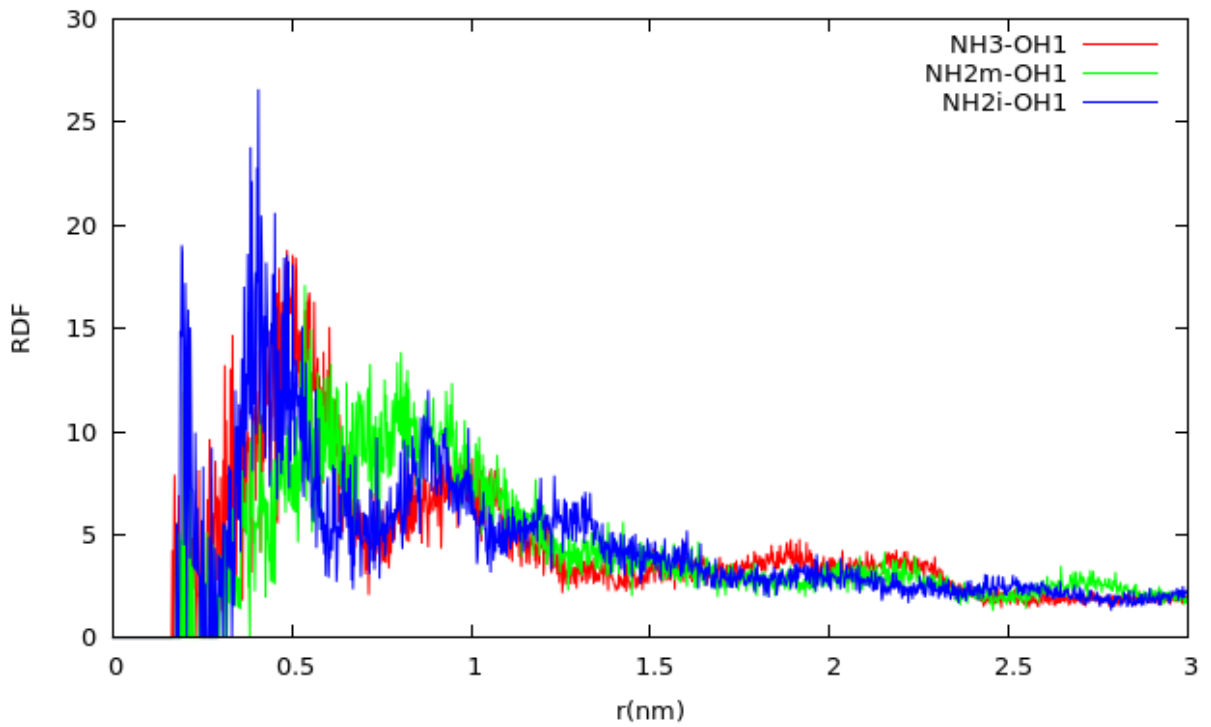
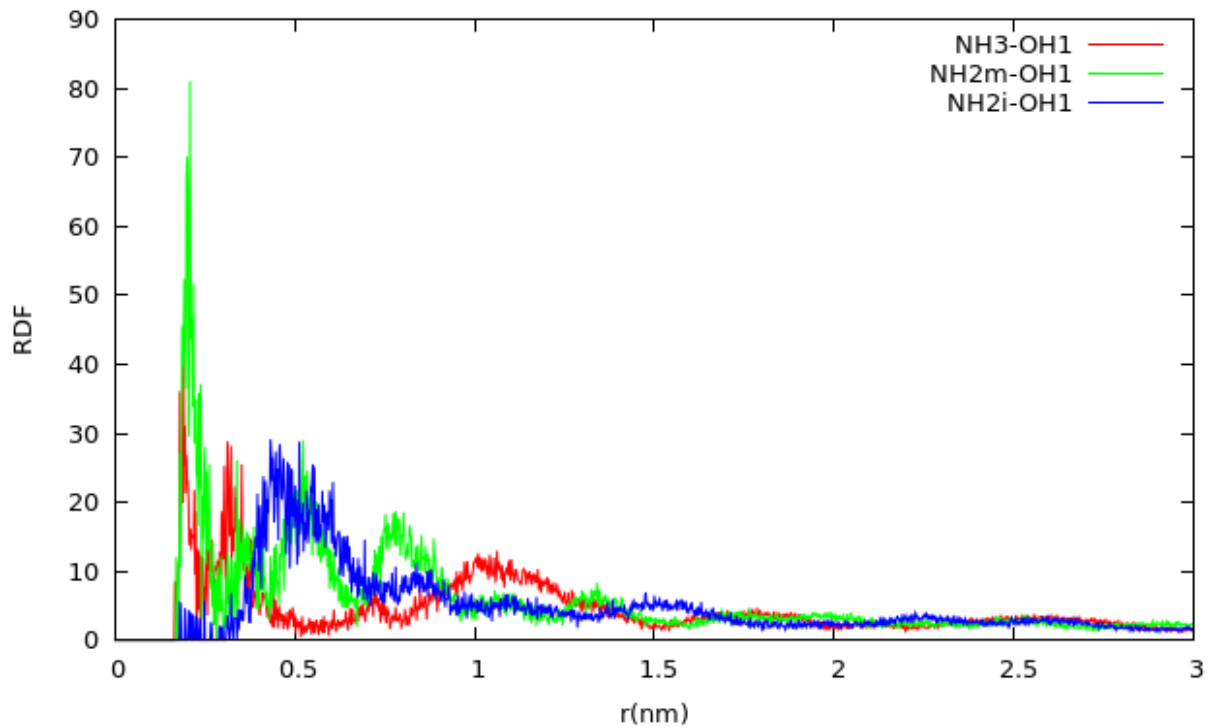


Figura 52: RDF do oxigênio do grupo OH1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.



Nas análises com o grupo OH1 do lipídeo A nota-se que em 50 ns o grupo da Esqualamina mais próximo é o grupo NH2i, enquanto que em 100 ns o grupo mais próximo passa a ser o NH2m. Pelo fato deste grupo OH estar voltado mais externamente na molécula de lipídeo A espera-se que os grupos (da Esqualamina) que contenham porções volumosas próximas façam a interação. Deve-se também prestar bastante atenção à intensidade do pico atingido em 50 ns e 100 ns, visto que este último é cerca de três vezes maior.

Tendo feito a análise com o grupo OH1, deseja-se na sequência realizar a RDF para o grupo OH2 (figuras 53 e 54) a fim de entender se era necessário diferenciá-los.

Figura 53: RDF do oxigênio do grupo OH2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

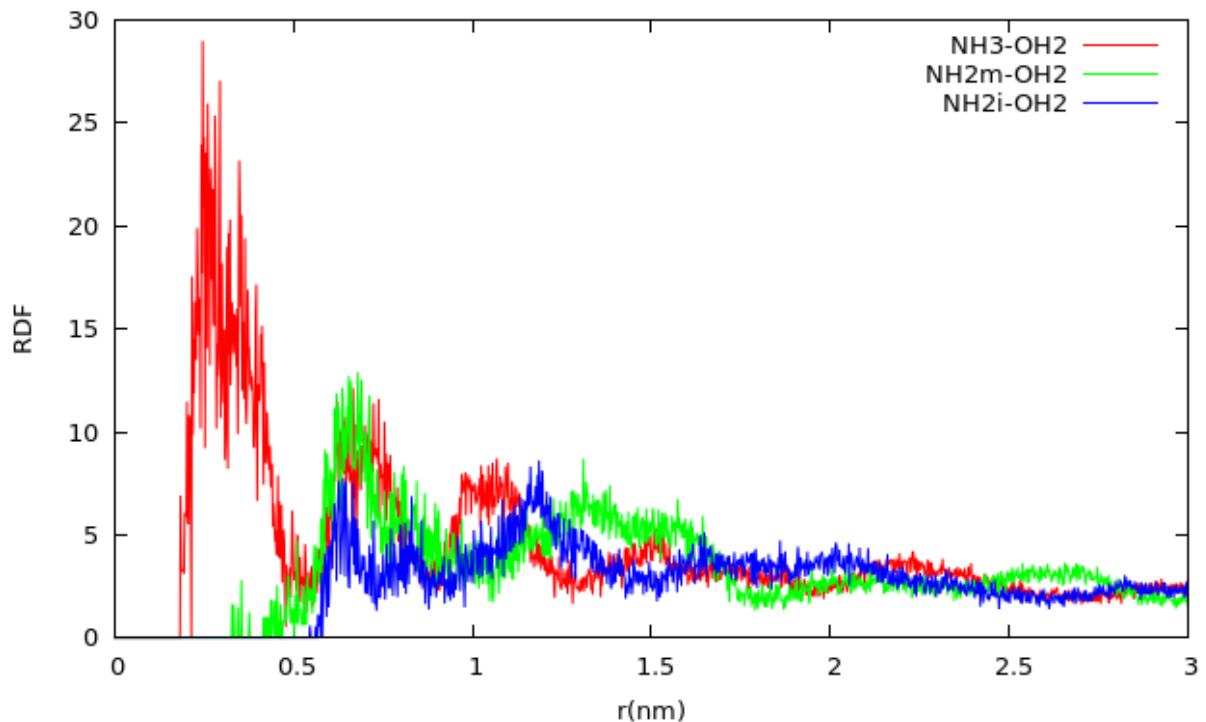
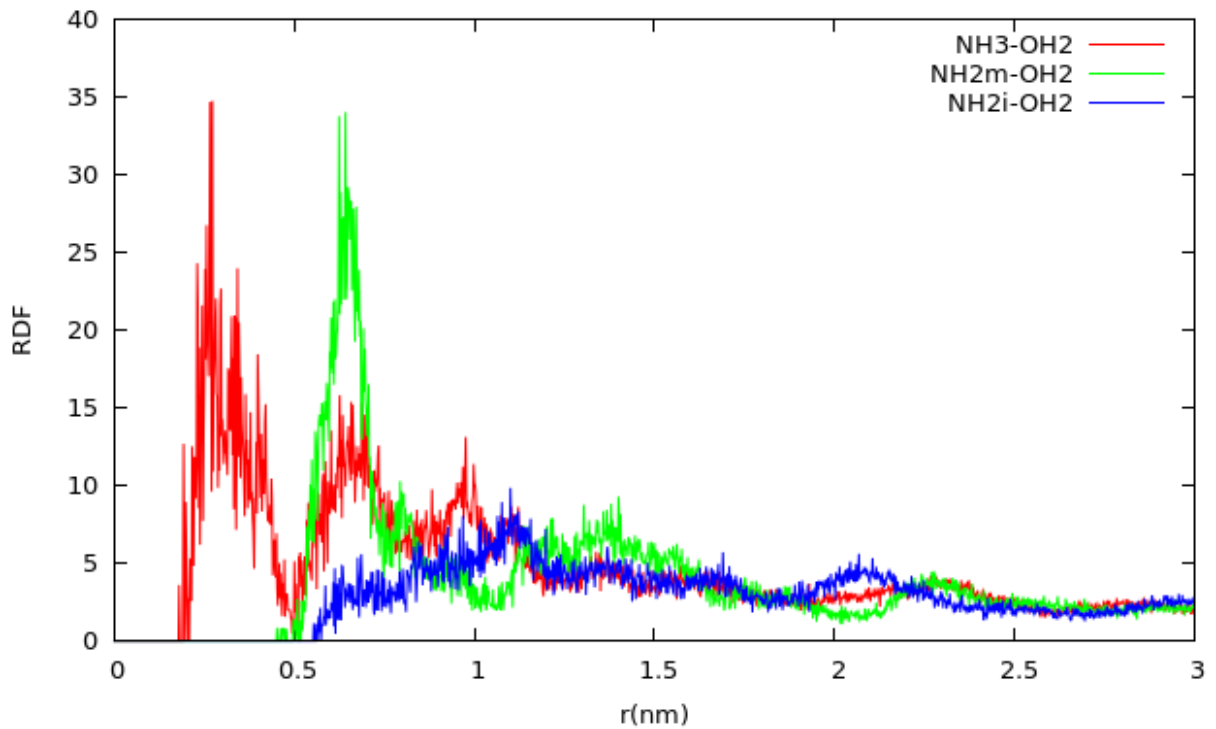


Figura 54: RDF do oxigênio do grupo OH2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.



Na figura 53 e 54 vemos uma grande preferência do grupo NH3 em estar próximo do grupo OH2. Possivelmente isso ocorre devido ao grupo OH2 estar impedido estericamente. Assim, a interação deve ocorrer com grupos menores e que não tenham grupos volumosos muito próximos. Devido à proximidade dos grupos OH2 e P2, e visto que o grupo NH2m possui um pico intenso em cerca de 0,6 nm na figura 54, espera-se que ele seja o grupo mais intenso nas análises do grupo P2 (figuras 55 e 56).



Figura 55: RDF do oxigênio do grupo P2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

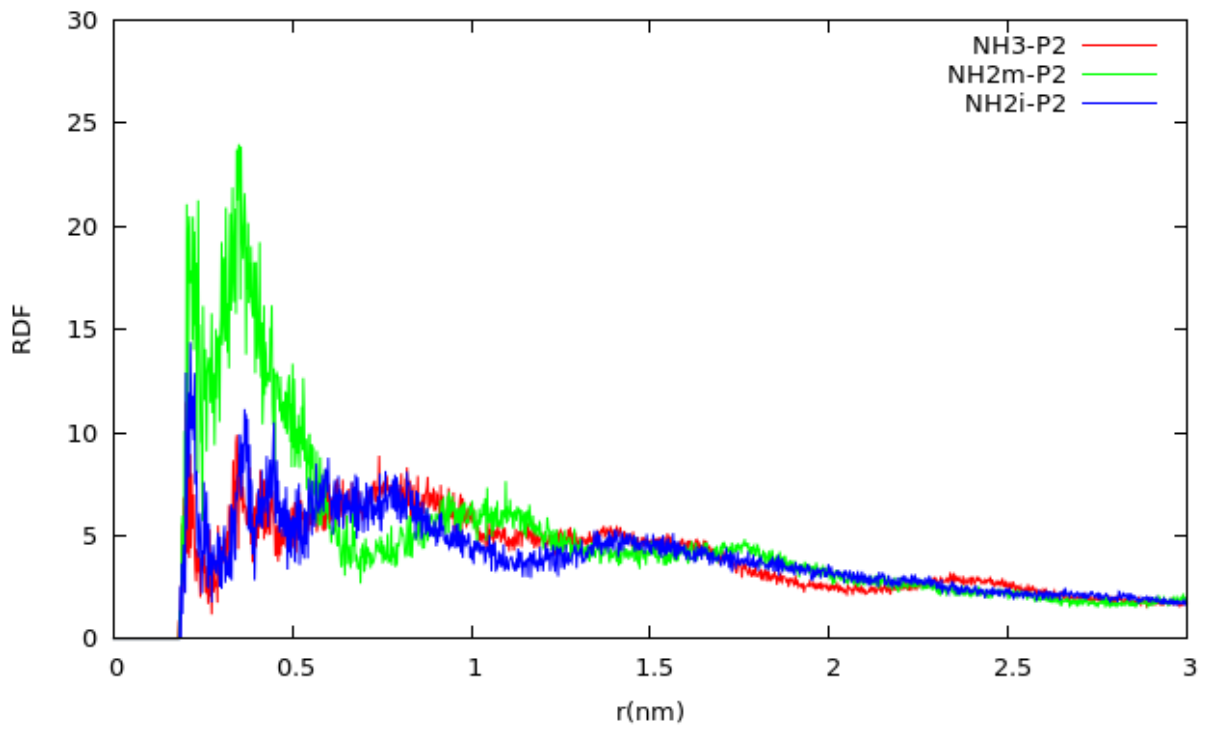
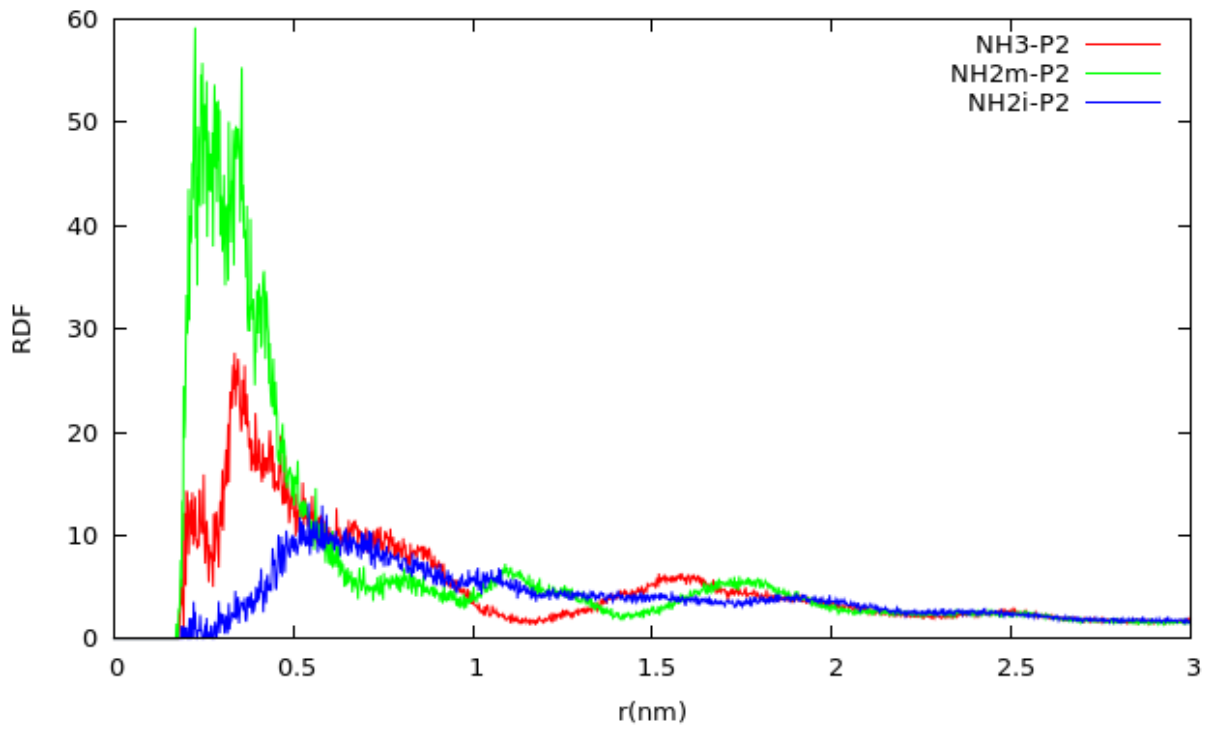


Figura 56: RDF do oxigênio do grupo P2 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.



Como discutido na análise do grupo OH2, percebe-se que o grupo NH2m possui um pico bastante intenso na região em que a distância é menos que 0,5 nm. Deve ser observado que a intensidade do pico em 100 ns duplica, em comparação com a figura em 50 ns.

E para finalizar essa simulação, foram analisadas as RDF do grupo P1 (figuras 57 e 58).

Figura 57: RDF do oxigênio do grupo P1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 50ns.

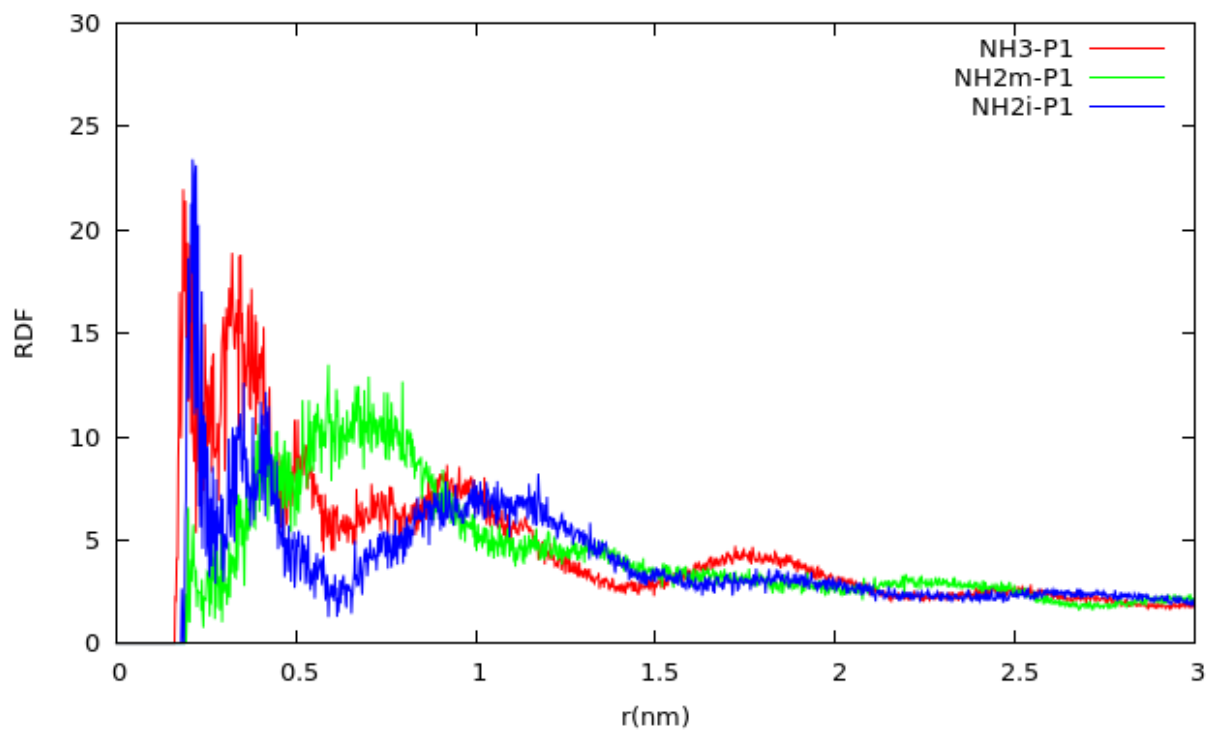
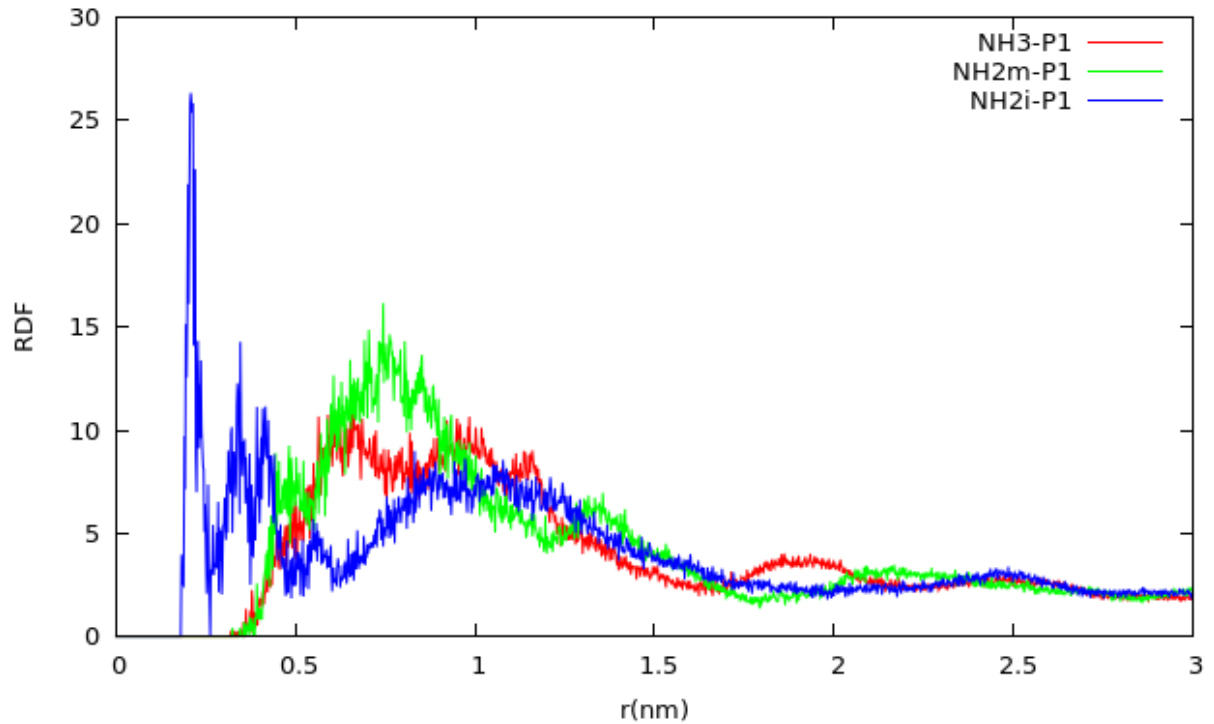


Figura 58: RDF do oxigênio do grupo P1 do lipídeo A com hidrogênios (ligados aos nitrogênios da Esqualamina) – 100ns.



Devido à proximidade entre os grupos OH1 e P1, espera-se que os resultados obtidos para o grupo OH1 influenciem o resultados do grupo P1. Realmente existe uma certa semelhança entre as figuras dos dois em 50 ns, mas em 100 ns não é o mesmo grupo que apresenta o pico mais intenso. Esse sistema foi simulado por apenas 100 ns e gerou apenas 2 análises, portanto seus resultados ainda podem sofrer mudanças.

## 6 CONCLUSÕES

Com este estudo foi possível constatar uma forte interação das moléculas de Esqualamina com grupos mais internos do fosfolípídeo POPG para os sistemas 1 e 2, e para o sistema 4 foram observadas interações com os grupos propostos do lipídeo A.

Foi visto através das Funções de Distribuição Radial que os sistemas 1 e 2 continuam sofrendo mudanças, ou seja, o tempo pelo qual os sistemas foram simulados não foi suficiente. Para o sistema 4 já era imaginado que o tempo de simulação era muito curto pois foram obtidas apenas duas análises, e estas não fornecem resultados definitivos, apenas preliminares.

Um dos principais objetivos deste estudo era observar a despolarização da membrana, mas provavelmente o tempo pelo qual os sistemas foram simulados foi muito curto para observar este fenômeno.

É sugerido que os sistemas sejam simulados por um tempo maior na expectativa de observar fenômenos como a despolarização da membrana, além de resultados mais concretos para as análises de RDF. Outra modificação que pode ser feita é o aumento do número de moléculas de Esqualamina no sistema, a fim de verificar a tendência observada nos sistemas 1 e 2.

## REFERÊNCIAS

- ALHANOUT, K.; ROLAIN, J. M.; BRUNEL, J. M. Squalamine as an Example of a New Potent Antimicrobial Agent Class: A Critical Review. **Current Medicinal Chemistry**. v.17, p. 3909-3917, Nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2010/00000017/00000032/art00007>>. Acesso em: 03 de novembro de 2013.
- CHEN, WH. et al. A Bioconjugate Approach toward Squalamine Mimics: Insight into the Mechanism of Biological Action. **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, p. 1582-1591, Oct. 2006. Disponível em: <[pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc060220n](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc060220n)>. Acesso em: 04 de novembro de 2013.
- CHRISTIE, William W. THE AOCS Lipid Library: site. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/lipidA/index.htm>>. Acesso em: 11 de novembro de 2013.
- CORNELL, W. D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulations of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **Journal American Chemical Society**, v. 117, p. 5179-5197, May 1995. Disponível em: <[pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00124a002](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00124a002)>. Acesso em: 01 de dezembro de 2013.
- FRENKEL, D.; SMIT, B. Molecular Dynamics Simulations. In: Frenkel, D.; Smit, B. **Understanding Molecular Simulations: from algorithms to applications**. 1<sup>st</sup> edition. San Diego: Academic Press, 1996. Cap. 4, p. 53-95.
- Gromacs: programa. Disponível em: <[www.gromacs.org](http://www.gromacs.org)>. Acesso em: 10 de dezembro de 2012.
- Introdução à Biologia: site (aula - MIT). Disponível em: <<http://mit.universia.com.br/7/7012/pdf/cellmembrane.pdf>>. Acesso em: 27 de novembro de 2013.
- JOGALEKAR, A. Scientific American: site. Disponível em: <[blogs.scientificamerican.com/the-curious-wavefunction/2012/08/28/synthesis-enzymes-and-force-fields-defining-chemical-elegance/](http://blogs.scientificamerican.com/the-curious-wavefunction/2012/08/28/synthesis-enzymes-and-force-fields-defining-chemical-elegance/)>. Acesso em: 30 de novembro de 2013.
- KHABNADIDEH, S. et al. Squalamine analogues as potential anti-trypanosomal and anti-leishmanial compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p 1237-1239, June 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X00001967>>. Acesso em: 04 de novembro de 2013.
- KING, M. W. The Medical Biochemistry Page: site. Disponível em: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/lipid-synthesis.php#structures>>

KUKOL, A. Lipid models for United-atoms molecular dynamics simulations of protein. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, p. 615-626, Mar. 2009. Disponível em: <[precedings.nature.com/documents/5977/version/1](http://precedings.nature.com/documents/5977/version/1)>. Acesso em: 20 de novembro de 2013.

LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1400-1412, Oct. 2005.

Lipidbook: banco de dados. Disponível em: <[lipidbook.bioch.ox.ac.uk/](http://lipidbook.bioch.ox.ac.uk/)>. Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

Lipídeos: site. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/Trabalhos\\_pos2004/constituintes\\_microorg/lipideos.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/Trabalhos_pos2004/constituintes_microorg/lipideos.htm)>. Acesso em: 09 de novembro de 2013.

MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. In: Morgon, N. H.; Coutinho, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1ª edição. São Paulo: Livraria da Física, 2007. Cap. 12, p. 413-452.

MCKELLER Jr.; A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, p. 3586-3616. Apr. 1998.

MOORE, K. S. et al. Squalamine: An aminosterol antibiotic from the shark. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 1354-1358, Feb. 1993. Disponível em: <<http://pnas.org/content/90/4/1354.long>>. Acesso em: 30 de outubro de 2013.

PIGGOT, T. J.; HOLDBROOK, D. A.; KHALID, S. Electroporation of the *E coli* and *S. aureus* Membranes: Molecular Dynamics Simulations of Complex Bacterial Membranes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.115, p. 12381-13388, Oct. 2011. Disponível em: <[pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp207013v](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp207013v)>. Acesso em: 03 de novembro de 2013.

PyMol: programa. Disponível em: <[www.pymol.org](http://www.pymol.org)>. Acesso em: 22 de outubro de 2013.

SEGALIN, J. **Parâmetros de Carga para o Campo de Força e Análise Estrutural do Aminoesteróide Esqualamina**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.