

Interação do Peptídeo MP-I com micela de SDS em
Solução Aquosa: Um Estudo por Dinâmica
Molecular

Tamára Rodrigues Valder

Orientador: Prof Dr José Roberto Ruggiero

São José do Rio Preto

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tamára Rodrigues Valder

Interação do Peptídeo MP-I com micela de SDS em Solução Aquosa: Um
Estudo por Dinâmica Molecular

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de 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.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

Professor Assistente Doutor

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Mário Sérgio Palma

Professor Doutor

UNESP – Rio Claro

Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas

Professor Doutor

Universidade Federal de São Carlos

São José do Rio Preto, 04 de maio de 2010

Valder, Tamára Rodrigues.

Interação do peptídeo MP-I com micela de SDS em solução aquosa: um estudo por dinâmica molecular / Tamára Rodrigues Valder. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

76 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Roberto Ruggiero

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Dinâmica molecular. 3. Peptídios antimicrobianos. I. Ruggiero, José Roberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

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

À Minha família.

Resumo

Moléculas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) em solução aquosa podem formar aglomerados micelares em condições adequadas de concentrações, pH, temperatura e força iônica, devido às características polar/apolar de suas cabeças/caudas. Essas micelas, aniônicas, mimetizam o ambiente da membrana de células procariontes e são usados como modelo no estudo da interação de peptídeos antimicrobianos com membranas das bactérias. Neste trabalho usamos simulações por dinâmica molecular de equilíbrio para estudar a interação do peptídeo Polybia MP-I com micela de SDS em solução aquosa, considerando tanto a situação em que a micela está pré-formada como a de automontagem da micela na presença do peptídeo. Mostramos que em ambos os casos o peptídeo se insere na micela de forma aproximadamente paralela à membrana, com a cadeia principal enterrada na região de interface entre as caudas e as cabeças polares das moléculas de SDS e os grupos carregados localizados na interface das cabeças polares com a solução. Estes dados confirmam modelos de inserção de peptídeos antimicrobianos em membranas existentes na literatura. Discutimos também a estabilidade da estrutura helicoidal anfipática do peptídeo em função da solvatação de sua cadeia principal, que proporciona a manutenção de uma rede de ligações de hidrogênio do tipo NH --- O entre resíduos do tipo n-(n+4) da cadeia principal, típicos de estruturas em α - hélice. Além disso, os resultados indicam que pontes salinas formadas entre os grupos negativos dos resíduos do ácido aspártico (Asp) 2 e 8 com resíduos de lisinas 5 e 11 são importantes para a manutenção da estrutura do peptídeo. Os resultados indicam também que a estrutura micelar mantém-se aproximadamente esférica com ou sem o peptídeo independente do processo para acomodar o peptídeo e, no caso da automontagem, um maior número de moléculas de SDS. Apresentamos também um estudo da estabilidade de micelas pré-formadas com a temperatura.

Abstract

The Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) molecules can form micellar aggregates in aqueous solution under appropriate concentration, pH, temperature and ionic strength conditions due to the polar/apolar features of its head and tail. The anionic micelles formed mimic the environment of the prokaryotic cells membrane of bacteria. In this work we use equilibrium molecular dynamics simulation to study the interaction of the peptide Polybia MP-I with SDS micelles in aqueous solution considering both a preformed micelle and a micelle obtained by self-assembling the SDS molecules in the presence of the peptide. We show that in both cases the peptide inserts in an almost parallel way relative to the micelle surface, with the main chain buried in the interface region between the tails and polar heads of SDS molecules and the charged groups of the peptide located at the interface with the polar heads the solution. These data support models of insertion of antimicrobial peptides in membranes in the literature. We also discuss the stability of the amphipathic helical structure of the peptide as a function of solvation of the main chain, which contributes to the maintenance of the network of hydrogen bonds in the main chain of type NH --- O between residues n and $n+4$ that are typical of structures in α -helix. Furthermore, the results indicate that salt bridges formed between the negative groups of aspartic acid residues (Asp) 2 and 8 with lysine residues 5 and 11 are importance in maintaining the structure of the peptide. The results also indicate that the micellar structure remains approximately spherical with and without the peptide, independent of the process as it is obtained, whether preformed or self-assembled. The micellar radius increases to accommodate the peptide and in the case of self-assembled micelle also a large number of molecules of SDS. We also present a study of the stability of preformed micelles with temperature.

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

Ala – Alanina

AMBER – “Assisted Model Building with Energy Refinement”

AMSDbase – “Antimicrobial Sequence Database”

AMPs – peptídeos antimicrobianos

AOT – di-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido Aspártico

CD – Dicroísmo Circular

CHARMM – “Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics”

Cl – Cloro

CPC – Condições Periódicas de Contorno

COM – Centro de massa da micela

Cys – Cisteína

DM – Dinâmica Molecular

DPC – Dodecil Fosfocolina

DS – Dodecil Sulfato

DSSP – “Database of Secondary Structure in Proteins”

G10 – “Ovispirin-1” com o resíduo 10, que é uma Isoleucina, trocado por uma Glicina

G83A – mutante da “GpA” Gln – Glutamina

Glu – Ácido Glutâmico

Gly – Glicina

GpA – “Glycophorin A”

GROMACS – “GRONingen MACHine for Chemical Simulation”

GROMOS – “GRONingen Molecular Simulation”

His – Histidina

Ile – Isoleucina

Leu – Leucina

LINCS – “LINear Constraint Solver”

Lys – Lisina

Met – Metionina

MP – Mastoparano
MP-I – Polybia MP-I
MP-X – Mastoparano X
OVIS – “Ovispirin-1”
PEO – “Poly (Etylene Oxido)”
PDB – “Protein Data Banck”
Phe – Fenilalanina
PME – “Particle Mesh Ewald”
Pro – Prolina
RIN – “Run Integration Number”
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMSD – “Root Mean Square Desviation”
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
Ser – Serina
SPC – “Simple Point Charge”
SETTLE – Algoritmo para modelos de água rígidas
T7 – “Ovispirin-1” com o resíduo 7, que é uma Isoleucina, trocado por uma Treonina
TFE – Trifluoretanol
Thr – Treonina
Trp – Triptofano
Tyr – Tirosina
Val – Valina

Lista de Figuras

Figura 1.1: Modelos de inserção de peptídeos em membranas.	02
Esquema 1.1: Sequência primária dos mastoparanos: MP-I e MP-X.	04
Figura 2.1: Representação das distâncias do Potencial Linear para qualquer par de átomos.	09
Figura 2.2: Representação dos ângulos do Potencial Angular para qualquer trio de átomos.	09
Figura 2.3: Representação da estrutura tetraédrica do C_α , ξ é o ângulo entre os planos j-k-l e i-j-k.	10
Figura 2.4: Representação do ângulo diedral próprio.	11
Figura 2.5: Condições periódicas de contorno para um sistema quadrado.	17
Figura 2.6: Raio de corte num sistema quadrado bidimensional.	18
Figura 2.7: Ligação pelo Hidrogênio.	19
Figura 2.8: Ângulos Φ e Ψ da ligação peptídica de dois aminoácidos consecutivos. ...	20
Figura 3.1: Estrutura do DS (Dodecil Sulfato).	24
Figura 3.2: Gráfico da energia potencial total do sistema em função do tempo de simulação para as temperaturas de 307, 313, 320 e 325K.	26
Figura 3.3: a) Número médio de monômeros, DS, na micela com seus desvios padrão, b) Número médio de DS isolados e de Clusters com seus desvios padrão.	27
Figura 3.4: Excentricidade para os DS pertencentes à micela com respectivos desvios padrão em função da temperatura.	29
Figura 3.5: Raio micelar médio com desvios padrão em função das temperaturas.	30
Figura 3.6: Área acessível ao solvente total com desvios padrão em função da temperatura.	31
Figura 3.7: a) Número de coordenação de cada átomo de carbono da cadeia alifática do DS em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água (OW) numa distância de 0,35 nm; b) Função de distribuição radial de pares $g(r)$ dos íons de sódio (Na^+) ao redor dos átomos de enxofre (S) das cabeças polares do SDS.	32
Figura 3.8: Função de distribuição radial de pares $g(r)$ entre os átomos de enxofre (S) das cabeças polares do DS e os íons de sódio (Na^+) em relação ao grupo OH^- das moléculas de água.	34
Esquema 4.1: Sequência primária do mastoparano MP-I.	35

Figura 4.1: Configuração inicial dos monômeros de SDS e do peptídeo.	36
Figura 4.2: Evolução temporal dos termos de energia para a simulação 1.	38
Figura 4.3: Evolução temporal dos termos de energia para a simulação 2.	40
Figura 4.4: Evolução temporal dos termos de energia de longo alcance entre as moléculas de surfactante, e entre estas e as moléculas de solvente.	41
Figura 4.5: Número de monômeros de SDS no maior cluster.	43
Figura 4.6: Distribuição dos monômeros de SDS e do peptídeo e configuração do peptídeo em interação com as micelas para a simulação 2.	46
Figura 4.7: Distribuição Radial de Pares para os átomos de enxofre em relação aos em relação aos íons de sódio (a) e para os átomos de enxofre (b) e para os íons de sódio (c) e em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água.	47
Figura 4.8: Número de coordenação de cada átomo de carbono da cadeia alifática do DS em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água (OW) numa distância de 0.35 nm.	48
Figura 4.9: Padrões de estrutura secundária por resíduo ao longo da simulação para o MP-I.	50
Figura 4.10: RMSD e RMSF para a cadeia principal do peptídeo.	52
Figura 4.11: Número médio de moléculas de água (átomos de oxigênio) contidos numa esfera de 0.5 nm centrada em cada carbono α	54
Figura 4.12: Distribuição dos monômeros de SDS e do peptídeo para o último instante das simulações.	54
Figura 4.13: Estrutura no instante de 50 ns para a simulação 1.	57
Figura 4.14: Distância média entre o centro de massa da micela e o centro de massa do peptídeo em função do tempo de simulação.	58
Figura 4.15: Evolução temporal dos termos de energia de longo alcance entre as moléculas de surfactante e o peptídeo, e entre este e as moléculas de solvente.	58
Figura 4.16: Distribuição radial de pares de algumas moléculas ao redor dos carbonos α dos resíduos do peptídeo.	62
Figura 4.17: Distribuição radial de pares de algumas moléculas ao redor da cadeia lateral do Trp3.	64
Figura 4.18: Evolução temporal de várias distâncias que caracterizam o sistema micela-peptídeo.	65

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Médias dos parâmetros estruturais e de forma da micela com respectivos desvios para as simulações na ausência e na presença do peptídeo.	43
Tabela 4.2: Porcentagem de permanência temporal das ligações pelo hidrogênio do tipo n-n+4 para a cadeia principal dos resíduos.	51
Tabela 4.3: Tabela com as distâncias médias entre os grupos de cargas e grupos polares das cadeias laterais do MP-I para as duas simulações.	55
Tabela 4.4: Distâncias para a análise da interação peptídeo-micela.	59
Tabela 4.5: Distâncias médias dos C α do peptídeo ao COM.	63
Tabela 4.6: Distâncias médias dos centros de massa dos grupos carregados das cadeias laterais do peptídeo ao COM.	63

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Capítulo 1 – Introdução	01
1.1 - Peptídeos antimicrobianos e ambientes membranares	01
1.2 - Peptídeos antimicrobianos extraídos do veneno de vespas	03
1.3 - Simulações por dinâmica molecular em ambientes que mimetizam membranas	06
1.4 - Objetivos	07
Capítulo 2 – Simulação por Dinâmica Molecular e Análises	08
2.1– O Campo de Forças	08
2.1.1-Potenciais Harmônicos	08
2.1.2-Potencial Torcional	10
2.1.3-Potencial de Lennard – Jones	11
2.1.4-Energia Potencial de Coulomb	12
2.2- Algoritmos de Otimização	12
2.2.1-O algoritmo <i>Steepest Descent</i>	12
2.3 - Dinâmica Molecular	13
2.3.1-O algoritmo "Summed Verlet" ou "Leapfrog"	15
2.3.2-Condições Periódicas de Contorno	16
2.3.3-Raio de Corte	17
2.4 - Análises das trajetórias	18
2.4.1-Desvio da raiz média quadrática (RMSD)	18
2.4.3-Ligações pelo Hidrogênio	19
2.4.4-Função de Distribuição Radial de Pares	19
2.4.5-Estruturas Secundárias	20
2.4.6-Flutuação média ou Desvio padrão (RMSF)	21

Capítulo 3 – Estabilidade de Micelas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) pré-formadas em Solução Aquosa como Função da Temperatura	22
3.1-Introdução	22
3.2-Objetivos	24
3.3-Métodos	24
3.4-Resultados e Discussões	25
3.5-Conclusões	34
Capítulo 4 – Análise Conformacional do peptídeo Polibia MP-I na Presença de uma Micela de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) em Solução Aquosa	35
4.1-Objetivos	35
4.2-Métodos	35
4.3-Resultados e Discussões	37
4.3.1-Análises dos Aglomerados Micelares	37
4.3.1.1-Análise de energias	37
4.3.1.2-Análise estrutural	41
4.3.2-Análise estrutural do peptídeo	48
4.3.3-Análise da interação peptídeo-aglomerado	57
4.4-Conclusões	66
Bibliografia	68

Capítulo 1- Introdução

1.1-Peptídeos antimicrobianos e ambientes membranares

Peptídeos antimicrobianos formam um grupo abundante e diversificado de moléculas produzidas em muitos tecidos e tipos de células de uma grande variedade de espécies de invertebrados, plantas e animais. Existem mais de 900 diferentes tipos de peptídeos antimicrobianos com seqüências depositadas no AMSDBase (AntiMicrobial Sequence Data base) (<http://www.bbcm.univ.triest.it/~tossi/pag5.html>). Eles são divididos em famílias com base na seqüência de resíduos de aminoácidos e na estrutura. (Para divisão e classificação dos grupos ver: Brodgen, 2005; Dathe et al, 1999; Zasloff, 2002; Boman, 1995; Tossi et al., 2000; Oren et al, 1998 e Davis et al., 2007).

Os mecanismos de ação dos peptídeos vêm sendo estudados usando membranas modelo, soluções contendo co-solventes com propriedades hidrofóbico/hidrofílica como, por exemplo, soluções água – TFE (trifluoretanol) e micelas de SDS (dodecil sulfato de sódio). Diferentes técnicas experimentais, tais como: microscopia, difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopias de infravermelho, Raman, de fluorescência e de dicroísmo circular, permitem acessar diferentes aspectos dos mecanismos de ação. No conjunto, elas evidenciam que composição e estrutura são fundamentais para a atividade e especificidade da ação biológica dos peptídeos.

O mecanismo de inserção de peptídeos antimicrobianos em bicamadas lipídicas, micelas e vesículas ainda não é completamente conhecido. Estudos com diferentes peptídeos na presença de alguns desses ambientes conduziram a elaboração de três modelos principais para explicar esse mecanismo: Barril, Poro Toroidal e Carpete (Bocchinfuso et al., 2009, Mátyus et al., 2007, Bechinger et al., 2006 e Sato et al, 2006). Uma descrição simplificada destes modelos é feita a seguir.

No modelo do barril os peptídeos estruturados numa α -hélice anfipática formam um canal transmembrânico com a face hidrofóbica interagindo com as caudas apolares dos fosfolipídeos, na região central da membrana, e sua face hidrofílica voltada para o centro do canal onde a entrada de água e outras moléculas e/ou íons pode ocorrer (figura 1.1 (c)). Neste modelo, as cabeças dos fosfolipídios da membrana permanecem localizadas na interface água-membrana. Uma condição necessária deste mecanismo é que os peptídeos sejam suficientemente longos para que eles possam atravessar o núcleo hidrofóbico da membrana (Yang et al., 2001).

No modelo do poro toroidal os peptídeos em estrutura helicoidal anfipática agregam à bicamada e interagem com as cabeças dos fosfolipídios da membrana produzindo um afinamento e encurvamento da membrana que dá origem à cavidade chamada de poro toroidal, figura 1.1(d). Este modelo foi proposto a partir de estudos com o peptídeo magainina (Ludtke et al., 1996 e Matsuzaki et al, 1995).

De acordo com o modelo do carpete, proposto por Matsuzaki, Huang e colaboradores (Gazit et al, 1996; Matsuzaki et al, 1994 e Ludtke et al, 1996 inicialmente os peptídeos se ligam paralelamente à superfície da membrana, cobrindo-a como se fossem um carpete e produzindo uma desorganização de seu interior. Quando a concentração local de peptídeos na superfície atinge um limiar ocorre a ruptura da membrana (figura 1.1(e)). Este é um mecanismo que ocorre apenas para altas concentrações de peptídeo e não necessita que o peptídeo apresente uma estrutura específica.

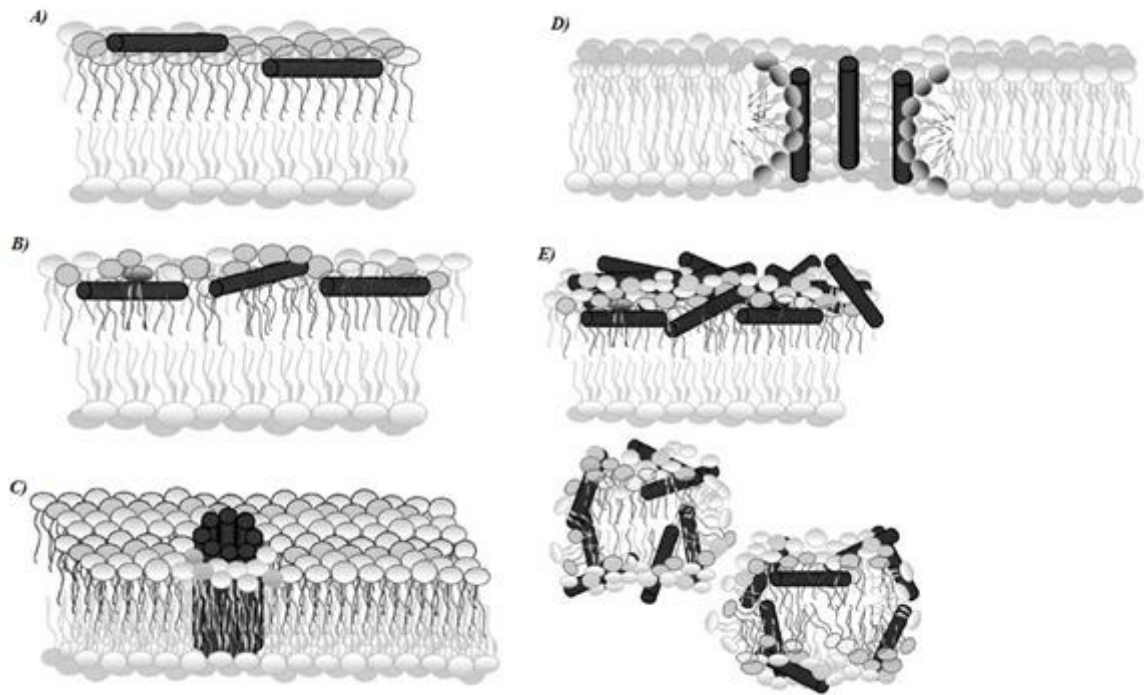


Figura 1.1: A) e B) Organização dos peptídeos antes de permeabilizarem a membrana, C) modelo do Barril, D) modelo do Poro Toroidal e E) modelo do Carpete. Em cinza, fosfolipídeos e em preto, peptídeos.

1.2-Peptídeos Antimicrobianos extraídos do veneno de vespas

A ordem *Hymenoptera*, uma das mais importantes entre os artrópodes venenosos, é constituída por espécies de abelhas, vespas e formigas. Os Heminópteros podem ser de vida social ou solitária. Os de vida social usam seu veneno para defesa e seus constituintes são agentes que possuem capacidade hemolítica, antimicrobiana e de desgranulação de mastócitos. Os Heminópteros de vida solitária, por outro lado, usam seu veneno para a captura de presas e seus constituintes apresentam atividades neurotóxicas (Argiolas et al, 1983).

Diversos peptídeos antimicrobianos foram isolados de veneno de vespas. Tais peptídeos são classificados em famílias segundo suas atividades biológicas e estruturas moleculares. Uma dessas famílias é a dos mastoparanos (Nakajima et al., 1985; Nakajima et al., 1986 e Dohtsu et al., 1993).

Os peptídeos da família dos mastoparanos são catiônicos, formados de 10 a 14 resíduos de aminoácidos, ricos em resíduos hidrofóbicos e básicos, têm o C-terminal amidado e lisinas nas posições 4, 11 e 12, e conformação anfipática (Murata et al., 2009). Estes peptídeos possuem uma variedade de atividades biológicas como a ativação da fosfolipase A₂ (Argiolas et al, 1983) e fosfolipase C (Argiolas et al, 1983; van Himbergen et al., 1999); a liberação de histamina através da degranulação de mastócitos (Konno et al.,2001 e Argiolas et al, 1983); realização de atividades hemolítica e antimicrobiana, através de interações com biomembranas (dos Santos Cabrera et al., 2004 e dos Santos Cabrera, 2008).

Em geral, estas atividades biológicas estão associadas à forma de interação com as biomembranas provocando aumento da permeabilidade das mesmas, através da liberação de fosfolipídios (Park et al., 1995 e Whiles et al., 2001). Na presença da membrana, estes peptídeos assumem a conformação em α -hélice anfipática (Wakamatsu et al., 1992).

Características como o tamanho, a seqüência, a carga, a conformação estrutural, a hidrofobicidade, a anfipaticidade e a amidação do C terminal, estão diretamente relacionadas à atividade e especificidade dos peptídeos antimicrobianos e têm sido utilizadas para caracterizar a susceptibilidade de microorganismos simples a estes peptídeos (dos Santos Cabrera et al., 2008). A presença de estrutura anfipática é uma característica importante para a adsorção, inserção e a translocação destes peptídeos através da bicamada lipídica das membranas (Hori et al., 2001). A cationicidade dos

peptídeos contribui principalmente para seletividade celular, devido ao fato das superfícies de membranas apresentarem diferentes composições lipídicas. As membranas bacterianas apresentam bicamadas aniônicas enquanto que as bicamadas de eritrócitos são zwitteriônicas, alguns estudos mostram que peptídeos catiônicos com alta carga líquida são pouco seletivos. (Broggio Costa S. T., 2006; Matsuzaki K, 2009).

O Polybia MP-I é um peptídeo extraído do veneno da vespa social *Polybia Paulista* (Souza et al., 2005) pertencente à família dos mastoparanos e constituído por 14 resíduos de aminoácidos (a estrutura primária é mostrada no esquema 1.1). Os resíduos de aminoácidos encontrados nas posições 4, 5 e 11 são lisinas e possuem cargas positivas, assim como o N-terminal, enquanto os resíduos de aminoácidos das posições 2 e 8 são resíduos de ácido aspártico, que possuem carga negativa atribuindo ao peptídeo uma carga líquida igual a +2. O MP-I tem o C-terminal amidado. Ele apresenta potente atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, é degranulador de mastócitos (Souza et al., 2005) e não apresenta atividade hemolítica em eritrócitos de ratos, sendo, portanto, seletivo às membranas de bactérias. Além disso, recentemente foi mostrado que ele apresenta significativa eficiência contra alguns tipos de células tumorais (Wang, et al., 2008).

MP-I	Ile-	Asp-	Trp-	Lys-	Lys-	Leu-	Leu-	Asp-	Ala-	Ala-	Lys-	Gln-	Ile-	Leu-	NH ₂
MP-X	Ile-	Asn-	Trp-	Lys-	Gly-	Ile-	Ala-	Ala-	Met-	Ala-	Lys-	Lys-	Leu-	Leu-	NH ₂

Esquema 1.1: Seqüência primária dos mastoparanos MP-I e MP-X. Em azul, são representados os resíduos carregados positivamente. Em vermelho, os resíduos carregados negativamente. Em preto, os resíduos hidrofóbicos. Em verde, os resíduos polares.

O peptídeo MP-I não possui dados estruturais de raios-X ou de RMN, portanto sua estrutura secundária não é conhecida. Dados experimentais indicam que ele apresenta 74% de estrutura em α -hélice quando em solução de 30 mM de SDS (Wang et al., 2008) e 43% de estrutura em α -hélice quando em solução de 8 mM de SDS (dos Santos Cabrera et al., 2008).

Broggio Costa (Broggio Costa, 2006 e dos Santos Cabrera et al., 2008) realizou um estudo comparativo entre os peptídeos MP-I e MP-X, outro membro da família dos mastoparanos e cuja seqüência está também mostrada no esquema 1.1, usando simulação por dinâmica molecular em solução água-TFE. O MP-X é um peptídeo catiônico, carga + 4, tem hidrofobicidade média igual a 0.009 (obtido utilizando a tabela

de consensus proposta por Eisenberg (Eisenberg et al, 1984) e forma estrutura secundária em hélice anfipática em misturas TFE-água. Ele apresenta atividade antimicrobiana e hemolítica. O MP-I é menos catiônico (carga +2), não hidrofóbico pois tem hidrofobicidade média -0.108 e só apresenta atividade antimicrobiana. Broggio Costa propôs uma estrutura helicoidal anfipática para o MP-I baseada na homologia deste com o MP-X, cuja estrutura está depositada no PDB com o código 1A13. A análise da solvatação da cadeia principal do MP-X mostra que ela é solvatada preferencialmente por moléculas de TFE, preservando-a do contato com as moléculas de água. Este fato favorece a manutenção de sua estrutura helicoidal, por proteger as ligações de hidrogênio intra-cadeia. Aplicada ao MP-I essa análise mostra que ele é solvatado tanto por moléculas de TFE quanto por moléculas de água, devido à presença dos resíduos de ácido aspártico. Com base nestes resultados, os autores consideram que as moléculas de TFE proporcionam ao MP-X um ambiente organizado sugerindo uma possível explicação para a interação com bicamadas zwitteriônicas. O MP-I não apresenta este tipo de interação tendo apenas ação antimicrobiana, e isso é relacionado com a ausência de organização do solvente em torno da cadeia peptídica e com a diminuição de sua carga líquida (dos Santos Cabrera et al., 2008).

A presença de moléculas de água na vizinhança da cadeia principal poderia levar à quebra das ligações de hidrogênio que mantêm a estrutura helicoidal anfipática. Broggio Costa conjectura que a estabilidade dessa estrutura para o MP-I se deve, em parte, ao balanço eletrostático, proporcionado por dois conjuntos de pontes salinas entre as cargas positivas das lisinas 4, 5 e do N-terminal com o ácido aspártico 2 e das lisinas 4, 5 e 11 com o ácido aspártico 8. Marquese e Baldwin (Marquese et al, 1987) e Mayne (Mayne, et al., 1998) discutiram no contexto de peptídeos sintéticos de alanina, contendo uma distribuição de resíduos de lisinas e ácidos glutâmicos da forma $n, n\pm 3$, a importância de pontes salinas para a estabilidade das ligações de hidrogênio da cadeia principal e para a estabilização de estruturas helicoidais. Recentemente, Ghosh e colaboradores (Ghosh et al., 2003) trataram esse problema usando simulação por dinâmica molecular. Eles, diferentemente dos demais, argumentam que o papel das pontes salinas é pouco relevante e que a estabilidade das hélices deve ser atribuída à proteção das ligações pelo hidrogênio de grupos do esqueleto do peptídeo contra moléculas de água, proporcionados pelas cadeias laterais das lisinas

1.3 - Simulações por dinâmica molecular de peptídeos em ambientes que mimetizam membranas

A despeito dos modelos existentes e apresentados acima, os detalhes moleculares da interação de peptídeos antimicrobianos com membranas biológicas ainda permanecem um desafio. Isso ocorre devido à falta de dados estruturais em nível molecular. As simulações por dinâmica molecular associadas aos dados experimentais têm se tornado uma ferramenta importante nessa análise por permitir acesso aos detalhes atômicos da estrutura dos peptídeos, dos sistemas modelos e das perturbações produzidas em ambos quando eles são colocados em contato.

Um grande esforço da comunidade tem sido empregado no estudo da interação de peptídeos antimicrobianos, principalmente aqueles com estrutura helicoidal anfipática, com diversos sistemas modelos. Nos trabalhos de Matyus e colaboradores e de Khandelia e colaboradores estes peptídeos são estudados interagindo com bicamadas lipídicas (Matyus et al., 2007 e Khandelia et al., 2008) e nos trabalhos de Broggio Costa e Roccatano e colaboradores (Broggio Costa, 2006 e Roccatano et al, 2002) eles se encontram interagindo com uma solução de TFE-água.

Vários estudos da estabilidade estrutural de peptídeos interagindo com micelas formadas por surfactantes, usando dinâmica molecular, foram publicados recentemente. Tian e Garcia (Tian et al, 2009) estudaram a estabilidade do peptídeo AK4 na presença de micelas de AOT formadas através de um processo de automontagem durante a simulação. Na presença de micelas de monômeros de SDS pré-montadas foram estudadas a estabilidade estrutural de neuropeptídios por Wymore e Wong (Wymore et al, 1999), de três peptídeos antimicrobianos (OVIS, T7 e G10) por Khandelia e Kaznessis (Khandelia et al, 2004), de dois dímeros (GpA e G83A) por Braun e colaboradores (Braun et al, 2004) e de um polímero, PEO, por Shang e colaboradores (Shang et al., 2008).

1.4 Objetivos

O objetivo principal desse trabalho é estudar a interação entre o Polybia MP-I e uma micela de SDS, que mimetiza o ambiente de uma membrana procarionte. Características como a forma de inserção do peptídeo na micela, a estabilidade da estrutura helicoidal proposta para ele e a solvatação de sua cadeia principal serão analisados. Simultaneamente, pretende-se analisar as perturbações causadas na estrutura da micela devido à inserção do peptídeo.

Para alcançar esse objetivo principal o trabalho foi dividido numa seqüência de partes com objetivos distintos e que se complementam. A primeira delas foi estabelecer um protocolo para simulações de soluções aquosas contendo micelas de SDS. Para isso foi estudado a estabilidade de micelas de SDS pré-formadas em função da temperatura na região de 278 a 325 K. A interação do peptídeo MP-I com a micela de SDS foi estudada a partir de duas aproximações: uma considerando a micela de SDS pré-montada e a outra com a micela sendo obtida num processo de automontagem. A questão obviamente é responder se o processo de obtenção da micela implica em alterações significativas na estrutura do peptídeo ou da própria micela e nas características da interação peptídeo-micela.

Capítulo 2 – Simulação por Dinâmica Molecular

2.1– O Campo de Forças

Alguns sistemas simulados por Dinâmica Molecular são tão complexos que se torna inviável o tratamento das interações moleculares por Mecânica Quântica, nestes casos estas interações são representadas por funções potenciais clássicas. Essas funções potenciais clássicas mimetizam a distribuição eletrônica e permitem calcular a energia do sistema considerando apenas as posições dos núcleos atômicos.

Existem várias funções de energia potencial para descrever as diversas interações entre os átomos num campo de forças. Nas simulações descritas nos próximos capítulos foi usado o campo de forças GROMOS (van Gunsteren et al, 1987) com as funções potenciais mostradas na equação 2.1.

$$V(\vec{x}_i) = \sum_{n=1}^{N_B} \frac{K_{b_n}(b_n - b_0)^2}{2} + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{K_{\theta_n}(\theta_n - \theta_0)^2}{2} + \sum_{n=1}^{N_\xi} \frac{K_{\xi_n}(\xi_n - \xi_0)^2}{2} \\ + \sum_{n=1}^{N_\varphi} \frac{K_{\varphi_n}[1 + \cos(n_n\varphi_n - \delta_n)]}{2} + \sum_{i<j}^N \left\{ 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} + \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon\varepsilon_0 r_{ij}} \right\} \quad [2.1]$$

2.1.1-Potenciais Harmônicos

Os três potenciais harmônicos da equação 2.1 estão relacionados à interação entre átomos ligados covalentemente e com os ângulos das ligações próximas.

A maior parte das ligações químicas covalentes entre dois átomos não assume valores de comprimento muito diferentes do valor de comprimento de ligação de equilíbrio b_0 . Por isso, seu potencial de ligação tem a forma similar ao potencial de Hooke para um sistema massa-mola.

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 \quad [2.2]$$

onde b é a distância entre dois átomos em qualquer instante e K_b é a constante elástica (figura 2.1). O valor de K_b pode ser obtido observando-se a transição de estado de uma molécula do estado fundamental para o primeiro estado excitado devido, à absorção de

radiação e comparando a variação de energia entre esses dois estados com a energia do fóton absorvido.

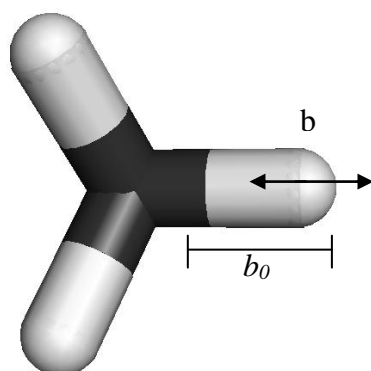


Figura 2.1: Representação das distâncias do potencial de ligação para qualquer par de átomos. Esta figura e outras desta tese foram feitas usando o software Pymol (Delano et al, 2002)

Quando tratamos de ligações entre três átomos o uso de outro potencial se faz necessário, o uso do potencial angular, que representa o potencial dado pela variação dos ângulos θ em torno de um ângulo de equilíbrio θ_0 .

$$V_{\theta} = \frac{1}{2}K_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad [2.3]$$

onde θ é o ângulo entre duas ligações químicas envolvendo três átomos, sendo um deles comum às duas ligações e K_{θ} é a constante elástica (figura 2.2).

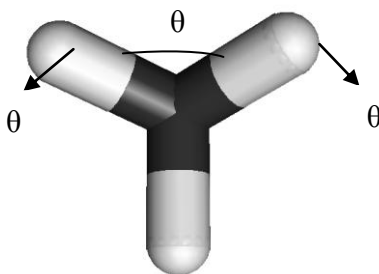


Figura 2.2: Representação dos ângulos do potencial angular para qualquer trio de átomos.

O GROMOS trabalha com o conceito de átomo unido, ou seja, não representa explicitamente os hidrogênios pouco reativos somente os que estão ligados a átomos eletronegativos. Por esse motivo se inclui um termo de potencial para a manutenção da estrutura tridimensional destes átomos, o chamado potencial torcional impróprio ou potencial diedral impróprio.

A equação que descreve este potencial é dada por:

$$V_{\xi} = \frac{1}{2} K_{\xi} (\xi - \xi_0)^2 \quad [2.4]$$

onde ξ é o ângulo formado entre os planos $i-j-k$ e $j-k-l$ e K_{ξ} é a constante de reconstituição ao ângulo de equilíbrio ξ_0 entre esses planos. Nas proteínas o plano $j-k-l$ é formado pelos átomos $N-C-C_{\beta}$ e o plano $i-j-k$ por $C_{\alpha}-N-C$ (figura 2.3).

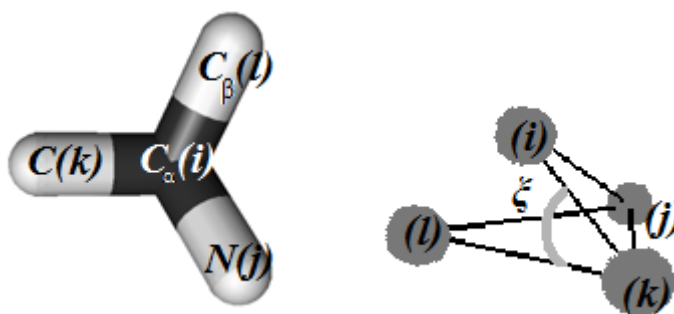


Figura 2.3: Representação da estrutura tetraédrica do C_{α} , ξ é o ângulo entre os planos $j-k-l$ e $i-j-k$.

2.1.2- Potencial Torcional

As rotações das ligações químicas diante de barreiras e mínimos de energia é descrita pelo potencial torcional próprio ou potencial diedral próprio, que também é um potencial de átomos ligados, sendo que dois átomos são considerados ligados se entre eles existirem três ou menos ligações químicas. Este é escrito na forma de uma expansão em série de cossenos truncada no segundo termo:

$$V_{\varphi} = K_{\varphi} [1 + \cos (n\varphi - \delta)] \quad [2.5]$$

onde 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, δ é a defasagem do ângulo diedral ou de torção φ , que define os máximos e os mínimos da função (figura 2.4).

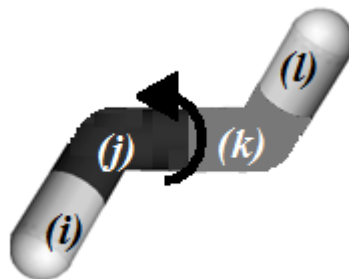


Figura 2.4: Representação do ângulo diedral próprio.

2.1.3- Potencial de Lennard Jones

As flutuações na densidade eletrônica em torno do núcleo podem produzir um momento de dipolo instantâneo. Esse dipolo instantâneo induz um momento de dipolo num outro átomo distante. A interação entre estes dois momentos de dipolo, portanto átomos, é atrativa e conhecida como interação de van der Waals. À medida que a distância entre os átomos diminui a ponto das nuvens eletrônicas se interpenetrarem a interação entre eles se torna fortemente repulsiva. Esta é uma manifestação do princípio de exclusão de Pauli.

Uma função potencial que tem as características de ser atrativa a curto alcance e repulsiva a curtíssimo alcance foi proposta por Lennard Jones para representar este comportamento:

$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad [2.6]$$

onde ε é a profundidade do poço de potencial, σ é o diâmetro de Lennard Jones e r é a distância entre os átomos. O termo de curto alcance $\left(\frac{\sigma}{r} \right)^6$ provém de três tipos de interações (Israelachvili, 1991), sendo um deles a interação de um dipolo elétrico (equação 2.7) e uma distribuição de carga polarizável e o termo de curtíssimo alcance $\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12}$ é conseguido empiricamente.

$$V(r) = \left[\frac{-\alpha}{4\pi\epsilon_0} \left(1 + 3\cos^2\theta \right) \right] \frac{p_1}{r^6} = \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \quad [2.7]$$

2.1.4- Energia Potencial de Coloumb

A interação eletrostática de longo alcance, entre duas cargas pontuais q_i e q_j , é dada pela Lei de Coulomb:

$$V(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r} \quad [2.8]$$

onde r é a distância entre as cargas, ϵ_0 é a permissividade do espaço livre e vale $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2/\text{Nm}^2$ e ϵ é a constante dielétrica do meio. O valor de ϵ usado nas simulações deste trabalho foi 1 e as correções para a energia potencial de Coulomb foram feitas através do PME (Darden et al., 1993) para interações distantes.

As interações eletrostáticas são importantes em simulações por Dinâmica Molecular, porque originam as pontes salinas e de hidrogênio que estabilizam as estruturas secundárias do peptídeo e influenciam em sua atividade biológica.

2.2- Algoritmos de Otimização

Os sistemas de macromoléculas biológicas possuem muitos graus de liberdade o que torna praticamente impossível uma busca do um mínimo global de energia potencial. Para a Dinâmica Molecular, no entanto, é conveniente fazer, ao menos, uma busca local. Essa busca ajusta as posições atômicas relaxando as distorções nas ligações químicas, nas interações de van der Waals e nos ângulos entre as ligações liberando a estrutura de possíveis conflitos estéricos artificiais.

Existem vários métodos de otimização o “Steepest Descent” foi usado neste trabalho e será descrito em detalhes.

2.2.1- O algoritmo Steepest Descent

O algoritmo “Steepest Descent” é um algoritmo de primeira derivada eficiente para encontrar mínimos de energia a partir de pontos muito distantes, mas pouco eficiente para pontos muito próximos do mínimo.

Neste método o passo $\Delta\vec{x}_t$ (equação 2.9) no instante t é dado na direção e sentido da força resultante \vec{F}_t (equação 2.10) nesse mesmo instante.

$$\Delta\vec{x}_t = k_t \frac{\vec{F}_t}{|\vec{F}_t|} \quad [2.9]$$

$$\vec{F}_t = -\nabla V(\vec{r}_t) \quad [2.10]$$

onde k_t é uma constante de ajuste e $\frac{\vec{F}_t}{|\vec{F}_t|}$ é o vetor unitário na direção e sentido da força resultante. A partir desses dados pode-se escrever a equação 2.11 para a minimização de energia

$$\vec{x}_{t+1} = \vec{x}_t + k_t \frac{\vec{F}_t}{|\vec{F}_t|} \quad [2.11]$$

tal que k_t é ajustado para acelerar a minimização. Atribui-se um valor inicial para k_t e verifica-se o valor de $V(\vec{r}_t)$ no passo seguinte, se seu valor for maior do que o valor obtido no passo anterior, o valor de k_t é diminuído, e se o valor de $V(\vec{r}_t)$ for menor do que o valor obtido no passo anterior, o valor de k_t é aumentado. Esse processo só se encerra quando a variação de $V(\vec{r}_t)$, ΔV , assume um valor previamente determinado, que neste trabalho é de 10^{-2} Kcal/mol, valor suficiente para eliminar as deformações em ângulos, ligações e esferas de van der Waals.

2.3 Dinâmica Molecular

Através da Dinâmica Molecular estuda-se um sistema constituído por vários átomos acompanhando seu desenvolvimento ao longo do tempo por equações clássicas de movimento. Essas equações descrevem a energia potencial V e a energia cinética T do sistema em função dos momentos lineares e das posições desses átomos.

Num sistema com N átomos escreve-se a energia cinética como:

$$T = \sum_{i=1}^N \frac{\vec{p}_i^2}{2m_i} \quad [2.12]$$

onde \vec{p}_i é o momento linear de um dado átomo i e m_i é sua massa. A Hamiltoniana do sistema é dada por :

$$H = T + V \quad [2.13]$$

onde V é a função energia potencial total. Através da Hamiltoniana escrevem-se as equações de movimento dos átomos que constituem o sistema e sua evolução temporal:

$$\frac{\partial H}{\partial \vec{p}_i} = \frac{\vec{p}_i}{m_i} = \frac{m_i \vec{v}_i}{m_i} = \vec{v}_i = \frac{d\vec{x}_i}{dt} \quad [2.14]$$

$$-\frac{\partial H}{\partial \vec{x}_i} = \frac{d\vec{p}_i}{dt} = m_i \frac{d^2 \vec{x}_i}{dt^2} = m_i \vec{a}_i = \vec{F}_i \quad [2.15]$$

onde t é o tempo, \vec{F}_i é a força sobre o átomo i , \vec{v}_i sua velocidade e \vec{x}_i sua posição.

Portanto a Dinâmica Molecular consiste em resolver numericamente as equações de movimento integrando-as no tempo. Para integrá-las numericamente as equações diferenciais são transformadas em equações diferenciais finitas, ou seja, $d\vec{x} \rightarrow \Delta \vec{x}$ e $dt \rightarrow \Delta t$. Essa aproximação exige que adotemos pequenos valores de Δt para que os resultados da simulação sejam compatíveis com dados experimentais o que pode tornar o custo computacional muito alto. Podemos contornar essa limitação e usar valores maiores de Δt com o auxílio de subrotinas como o LINCS (Hess, 2008).

A função do algoritmo LINCS é garantir que a estrutura das moléculas não sofra distorções irreais durante a simulação por causa de erros de aproximação numérica.

2.3.1- O algoritmo "Summed Verlet" ou "Leapfrog"

O "Summed Verlet" ou "Leapfrog" (Allen et al Tidesley, 1987; van Gusteren et al Berendsen, 1987) é um método de integração numérica das equações de movimento baseado no algoritmo de Verlet (Verlet, 1967). Nesse método as velocidades são obtidas na metade do passo de integração por uma expansão em série de Taylor até a segunda ordem em torno de $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$ e de $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$:

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t\right) + \frac{d\vec{v}_i}{dt}\left(\frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{d^2\vec{v}_i}{dt^2}\left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2 \frac{1}{2!} \quad [2.16]$$

$$\vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t\right) - \frac{d\vec{v}_i}{dt}\left(\frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{d^2\vec{v}_i}{dt^2}\left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2 \frac{1}{2!} \quad [2.17]$$

Subtraindo as 2 equações (2.16, 2.17) obtêm-se:

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) - \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{d\vec{v}_i}{dt}\left(\Delta t\right) \quad [2.18]$$

Considerando a 2ª Lei de Newton

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d\vec{v}_i}{dt} = m_i \frac{d^2\vec{x}_i(t)}{dt^2} \quad [2.19]$$

Pode-se escrever que:

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}_i(\vec{x}_i)}{m_i} \Delta t \quad [2.20]$$

Através das velocidades definem-se as novas posições, para isso basta expandir o vetor posição $\vec{x}_i(t)$ em torno do ponto $(t + \Delta t)$ até a segunda ordem e substituir $\frac{d\vec{x}_i(t)}{dt}$ pela velocidade obtida na equação (2.16):

$$\bar{x}_i(t + \Delta t) = \bar{x}_i(t) + \frac{d\bar{x}_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{d^2\bar{x}_i(t)}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2!} \quad [2.21]$$

$$\bar{x}_i(t + \Delta t) = \bar{x}_i(t) + \bar{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t - \frac{d\bar{v}_i(t)}{dt} \frac{\Delta t^2}{2} - \frac{d^2\bar{v}_i(t)}{dt^2} \left(\frac{\Delta t^3}{4}\right) \frac{1}{2!} + \frac{d^2\bar{x}_i(t)}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2!} \quad [2.22]$$

No entanto, como o termo $\frac{d\bar{v}_i(t)}{dt} \frac{\Delta t^2}{2}$ é igual ao termo $\frac{d^2\bar{x}_i(t)}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2!}$ eles se anulam e o termo $\frac{d^2\bar{v}_i(t)}{dt^2} \left(\frac{\Delta t^3}{4}\right) \frac{1}{2!}$ por ser pequeno é desconsiderado, e a nova equação é escrita na forma:

$$\bar{x}_i(t + \Delta t) = \bar{x}_i(t) + \bar{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad [2.23]$$

Pela equação 2.20 percebe-se que para a velocidade no tempo $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$ ser determinada é necessário que a velocidade no tempo $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$ seja conhecida, por isso o método de Verlet é usado no passo inicial da dinâmica.

2.3.2- Condições Periódicas de Contorno

Nos sistemas reais o número de moléculas envolvidas é da ordem do número de Avogadro. Por essa razão parte significativa das moléculas não interage com as paredes do tubo de ensaio. Simular um sistema com esse número de partículas é inviável, portanto o sistema precisa ser drasticamente reduzido e por isso as interações das moléculas com as paredes tornam-se importante e, nesse sentido, não refletem a situação no tubo de ensaio.

Para evitar esse problema usam-se condições periódicas de contorno de modo que ao invés da molécula interagir com as paredes da caixa ela interage com outras moléculas formadas pela imagem da própria caixa. Condições periódicas de contorno consistem, portanto, em criar réplicas da caixa do sistema trabalhado em todas as direções espaciais possíveis não deixando espaço entre uma caixa e outra. Dessa forma durante a simulação quando uma partícula sai da caixa central, uma de suas imagens

entra pelo lado oposto na caixa central, e o mesmo ocorre com as caixas réplicas, assim o número de partículas dentro de cada caixa se mantém constante e o número de partículas total também.

Na figura 2.5 tem-se uma versão em duas dimensões para um sistema quadrado.

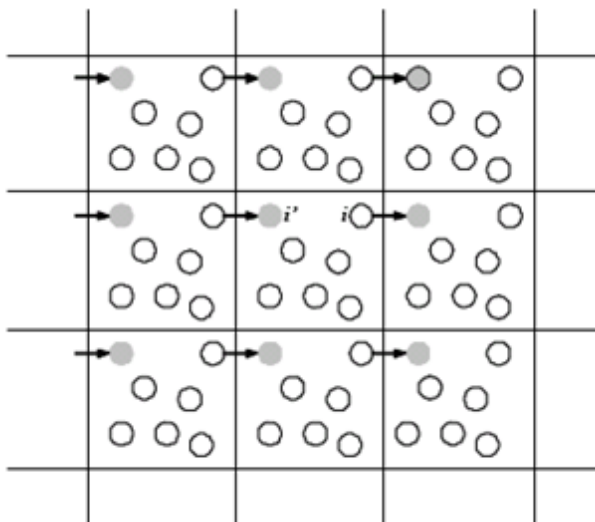


Figura 2.5: Condições periódicas de contorno para um sistema quadrado, onde o átomo i sai da caixa central por um lado e sua imagem i' entra no lado oposto, assim como todas as suas outras imagens nas outras caixas.

2.3.3- Raio de Corte

A fim de impedir que uma partícula interaja com sua imagem ou ao mesmo tempo com outra partícula e com a imagem desta é definida uma esfera de raio R_c chamado de raio de corte que abrange a região onde estão as partículas com as quais essa determinada partícula pode interagir. Essa condição é aplicada de forma direta para as interações tipo Lennard Jones do potencial (equação 2.6). As interações eletrostáticas que são de longo alcance têm que ser corrigidas para "suavizar" a descontinuidade causada por esse procedimento. Existem várias propostas para se obter essa suavização. Neste trabalho foi usada a correção conhecida como PME (Particle Mesh Ewald – Darden et al., 1993) que é derivada da soma de Ewald aplicada para corrigir a interação coulombiana (equação 2.8) pelo efeito das imagens de todas as partículas. A idéia principal do PME é converter uma soma simples que converge vagarosamente em uma expressão de três termos: duas somas que convergem rapidamente e uma constante.

O raio de corte pode ser definido de duas maneiras: $2d \leq R_c$ ou $2R_c \leq L$, onde d é a menor distância entre o soluto e a parede da caixa e L é o menor comprimento de uma caixa retangular. Na figura 2.6 tem-se uma representação em duas dimensões.

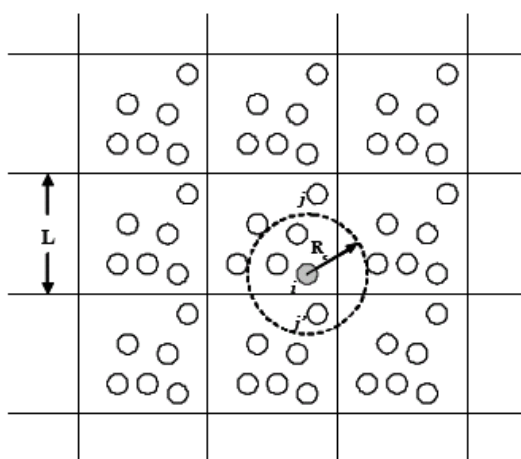


Figura 2.6: Raio de corte num sistema quadrado bidimensional, onde j é um átomo, j' , sua imagem e i é o átomo a partir do qual se traçou o raio. O átomo i como se observa não interage com j e com j' no mesmo instante considerando o raio.

2.4- Análises das trajetórias

Nesta seção apresentam-se os tipos de análises feitas a partir das coordenadas dos átomos que constituem as partículas do sistema e suas velocidades ao longo do tempo. Com estes dados, é possível obter os valores das energias, a temperatura, a pressão, a força e outras propriedades físicas macroscópicas do sistema.

2.4.1- Desvio da raiz média quadrática (RMSD)

No decorrer da Dinâmica Molecular o peptídeo assume várias conformações. Para avaliar as variações dessas conformações ao longo da dinâmica, calcula-se o desvio médio quadrático (RMSD) da conformação instantânea em relação a uma conformação de referência. O RMSD é o valor médio da soma dos desvios ao quadrado de um conjunto de átomos que definem a conformação, por exemplo, os átomos da cadeia principal, em relação aos mesmos átomos da conformação de referência, e é dado pela expressão:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}_i^0 \right)^2} \quad [2.24]$$

2.4.2 Ligações pelo Hidrogênio

As ligações pelo hidrogênio são de origem eletrostática, orientadas, intermoleculares e intramoleculares. Essas ligações ocorrem entre um átomo eletronegativo (O, N, F, Cl) chamado de aceitador (A), e outro átomo eletronegativo ligado covalentemente ao hidrogênio chamado de doador (D). O átomo eletronegativo ligado ao hidrogênio (H) forma um dipolo elétrico.

Existem várias formas de verificar a existência de uma ligação pelo hidrogênio, a usada neste trabalho é baseada no ângulo α , $\alpha \leq 30^\circ$, entre o aceitador (A) e o hidrogênio (H) do doador, e na distância r , $r \leq 0,35$ nm, entre o doador (D) e o aceitador (A) (figura 2.7).

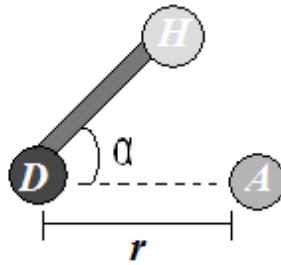


Figura 2.7: Ligação pelo hidrogênio. Onde r é a distância entre o A e o D e α é o ângulo entre o H, o D e o A.

2.4.3- Função de Distribuição Radial de Pares

A função de distribuição radial de pares ou função de correlação de pares $g_{AB}(r)$ (Allen et al Tildesley, 1987) fornece a distribuição de átomos do tipo B em torno de um dado átomo do tipo A. Essa distribuição de átomos do tipo B está contida numa esfera de raio r que varia de $r = 0$, até $r = r_{\text{máx}}$, que equivale a metade do comprimento da caixa onde se encontra o sistema (equação 2.25).

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad [2.25]$$

onde $\langle \rho_B(r) \rangle$ é a densidade de átomos do tipo B ao redor de átomos do tipo A na distância “ r ”, $\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}$ é a densidade média da distribuição de átomos do tipo B em torno dos átomos do tipo A considerando todas as esferas.

Para se obter o número de átomos do tipo B em torno do átomo A, n_{AB} , contidos numa esfera de raio R centrada em A integra-se a função $g_{AB}(r)$ (“Running Integration Number” - RIN) (equação 2.26).

$$n_{AB} = 4\pi \langle \rho_B \rangle_{local} \int_0^R g_{AB}(r) r^2 dr \quad [2.26]$$

2.4.4 Estruturas Secundárias

Há várias estruturas secundárias: α -hélice, aleatória, volta, folha β ; e todas podem ser classificadas de acordo com dois parâmetros: os tipos de ligações pelo hidrogênio entre os átomos de nitrogênio (N) e átomos de oxigênio (O) dos resíduos de aminoácidos da cadeia principal do peptídeo, e os valores dos ângulos Φ e Ψ dos diedrais, (figura 2.8).

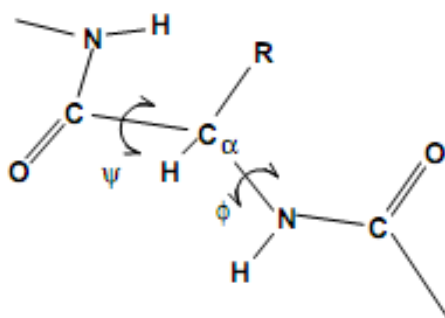


Figura 2.8: Ângulos Φ e Ψ da ligação peptídica de dois resíduos de aminoácidos consecutivos.

Em uma α -hélice ideal normalmente as ligações pelo hidrogênio ocorrem entre os resíduos n e $n+4$, e os ângulos Φ e Ψ assumem os valores -57° e -47° respectivamente.

Durante a Dinâmica Molecular as conformações assumidas pelo peptídeo foram classificadas de acordo com os parâmetros descritos anteriormente pelo programa DSSP (“Database of Structure in Proteins” – Kabsch et al, 1983) implementado no GROMACS. No gráfico de estruturas secundárias fornecido pelo DSSP cada estrutura secundária é denotada por uma cor, e essas estruturas são fornecidas para os resíduos do peptídeo ao longo do tempo de simulação.

2.4.5- Flutuação Média ou Desvio Padrão (RMSF)

O RMSF mostra quanto um determinado aminoácido flutua em relação à sua conformação média num determinado intervalo da dinâmica. Dá, portanto, uma idéia da estabilidade do aminoácido na conformação no período observado. Ele é obtido da média temporal da soma dos desvios quadráticos dos átomos do aminoácido relativamente à conformação média.

Capítulo 3 – Estabilidade de Micelas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) pré-formadas em Solução Aquosa como Função da Temperatura

3.1- Introdução

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um composto químico usado como tensoativo nos produtos de limpeza domésticos. Por apresentar características polar e apolar simultaneamente eles podem formar aglomerados globulares denominados de micelas em concentrações acima da concentração micelar crítica (cmc), cerca de 8 mM (Chatterjee et al., 2001, Joshi et al., 2005 e Romani et al., 2009) com condições apropriadas de temperatura, pH e força iônica (Mazer et al., 1976 e Vautier-Giongo et al., 2003). Resultados experimentais indicam que para concentrações próximas à cmc, o número de moléculas do surfactante aglomeradas formando micelas varia entre 57 e 77 (Jusufi et al., 2008, Quina et al., 1995 e Zana, 2005) e a sua forma é aproximadamente esférica. Com o aumento da concentração de surfactantes as micelas formadas tendem a fugir da forma esférica (Bales et al., 1998, Bockstahl et al., 2000 e Gao et al., 2005).

Como a cabeça polar do SDS tem uma carga negativa, micelas de SDS são usadas para mimetizar o ambiente membranal de procariontes, enquanto micelas de dodecil fosfocolina (DPC), que é zwitteriônico, são usadas para mimetizar membranas de células eucariontes.

Com relação ao estudo de micelas nas duas últimas décadas, duas correntes de investigação vêm sendo desenvolvidas usando simulação por dinâmica molecular: (1) estudo da estabilidade e propriedades de aglomerados pré-formados (Bruce et al., 2002, MacKerell, 1995, Rakitin et al., 2004, Tieleman et al., 2000 e Wymore et al., 1999) e (2) a automontagem de aglomerados a partir de distribuição aleatória das moléculas do surfactante (Marrink et al., 2000 e Sammalkorpi et al., 2007).

Bruce e colaboradores (Bruce et al., 2002) e MacKerell (MacKerell, 1995) estudaram a estabilidade de micelas de SDS pré-formadas, usando como parâmetros de estudo a excentricidade, o raio micelar, a área acessível ao solvente e a solvatação, enquanto Rakitin e Pack (Rakitin et al., 2004) estudaram também os efeitos de trocas de contra-íons (Li^+ , Na^+ e NH_4^+) sobre a estrutura micelar. Nos três trabalhos as micelas foram pré-formadas com 60 surfactantes posicionando-se os carbonos 12, C12, nos vértices de uma buckyball. As simulações foram feitas na temperatura ambiente, com o campo de forças CHARMM22 (Brooks et al., 1983), no trabalho de MacKerell (MacKerell, 1995) e o AMBER6 (Weiner et al., 1986) nos outros dois, com

modificações diversas em cada um. As análises foram feitas com os 5000, 100 e 2000 ps finais de simulação, respectivamente.

Yoshii e colaboradores (Yoshii et al; 2006) usaram o método de integração termodinâmica combinado com dinâmica molecular para estudar a energia livre de formação e a estrutura de micelas de SDS em função da distribuição de tamanhos das micelas (15 micelas de tamanhos diferentes). Em especial mostraram que a estabilidade da micela aumenta em função da diminuição da superfície acessível ao solvente e que o máximo de estabilidade ocorre para o número de surfactantes, N , igual a 57. Tieleman e colaboradores (Tieleman et al., 2000) usaram simulação por dinâmica molecular para analisar a forma e estabilidade de micelas de DPC compostas de $N = 40, 54$ e 65 monômeros. Analisando as razões entre as componentes dos momentos de inércia eles mostraram que a micela com $N = 40$ era a menos esférica.

Nos últimos anos têm-se estudado a cinética de formação de micelas de DPC (Marrink et al., 2000) e SDS (Sammalkorpi et al., 2007). Nestes estudos parte-se de uma distribuição uniforme de surfactantes na caixa de simulação, com uma distribuição aleatória de orientações. Sammalkorpi e colaboradores (Sammalkorpi et al., 2007) usaram 200 monômeros de SDS, 7902 moléculas de água em uma caixa cúbica. Oito simulações, com duração de 200 ns, com temperaturas diferindo por 10 K foram realizadas no intervalo de temperatura de 253 a 323 K. Os resultados obtidos mostram que no intervalo de 253 a 273K as estruturas são predominantemente cristais, entre 283K e 293K coexistiam estruturas na forma de cristais e de micelas e somente em 323K havia somente estruturas micelares. Estes resultados comprovam qualitativamente dados experimentais que indicam que há uma temperatura de Krafft (Shinoda, 1980, Rico et al., 1986 e Vautier-Giongo et al, 2003), no intervalo de 281 a 289 K, onde os três tipos estruturais – monômeros isolados, estruturas cristalinas e micelas – coexistem.

3.2-Objetivos

Considerando que os dados existentes com micelas pré-formadas são de dinâmicas relativamente curtas e que as variações de temperatura são muito pequenas, o objetivo neste capítulo é estudar a estabilidade de micelas pré-formadas em função da temperatura usando simulações por dinâmica molecular de longa duração e comparar os dados obtidos com resultados experimentais e de outras simulações.

3.3-Métodos

Inicialmente uma caixa cúbica com aproximadamente 6 nm de aresta, contendo 65 íons de sódio, 6188 moléculas de água e uma micela com 65 moléculas de DS (para numeração dos átomos veja figura 3.1) foi construída. A micela foi obtida de uma micela de DPC com 65 monômeros (Tieleman et al., 2000) alterando a cabeça polar pela troca do átomo de fósforo pelo átomo de enxofre e eliminando o grupo colina.

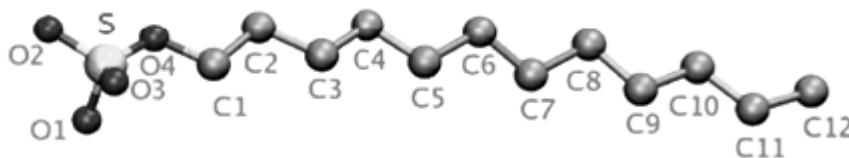


Figura 3.1: Estrutura do DS (Dodecil Sulfato)

As simulações foram processadas em onze temperaturas diferentes: 278, 283, 287, 290, 293, 300, 307, 313, 316, 320 e 325 K usando o pacote computacional GROMACS 4.0 (Berendsen et al., 1995 e Hess et al., 2008) e o campo de forças GROMOS 87 (van Gunsteren et al., 1987) com modificações propostas por (Sammalkorpi et al., 2007).

As caixas de simulação foram acopladas a banhos termostáticos e de pressão de Berendsen (Berendsen et al., 1984), utilizando como temperaturas de referência as temperaturas acima e com acoplamento a cada 0.1 ps, para a temperatura, e 1.0 atm de pressão de referência, com acoplamento a cada 1.0 ps e compressibilidade igual a $5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ para a pressão. Cada componente do sistema: micela, íons e solvente foi controlada separadamente.

O algoritmo SETTLE (Miyamoto et al., 1992) foi usado para garantir a geometria da água no modelo SPC (Berendsen et al., 1981), e o LINCS (Hess, 2008) foi usado para manter os comprimentos de ligações próximos dos comprimentos de equilíbrio. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo PME

(Darden et al., 1993). O passo de integração usado nas simulações foi de 2 fs sendo a lista de vizinhos atualizada a cada 10 passos.

A minimização de energia foi realizada usando o algoritmo Steepest Descent com o critério de convergência de 10^{-2} kJ/mol, ou 30000 passos de integração.

Uma dinâmica com restrição de posição da micela de 1 ns foi realizada em todas as simulações fixando a posição da micela com um potencial elástico e deixando as moléculas do solvente relaxarem em torno dela.

As análises foram feitas com o tempo total das simulações, 100 ns.

3.4-Resultados e Discussões

Primeiramente verificou-se se as simulações estavam equilibradas através dos gráficos da energia potencial total em função do tempo de simulação para todas as temperaturas simuladas. Em todos os gráficos foi feito o ajuste linear (figura 3.2) cujo coeficiente angular mostra o quanto a energia desvia de um valor de equilíbrio. A simulação perfeitamente equilibrada deve apresentar um coeficiente angular igual a zero. Na figura 3.2 está a situação típica de uma das simulações na temperatura $T = 320$ K e na tabela ao lado os valores das energias e os valores do coeficiente angular do ajuste linear “b”. Os valores absolutos obtidos para “b” nas onze temperaturas simuladas podem ser considerados baixos e todos os sistemas equilibrados em cada uma das temperaturas consideradas, o que implica que as médias das grandezas físicas para caracterizar o sistema podem ser obtidas destas simulações.

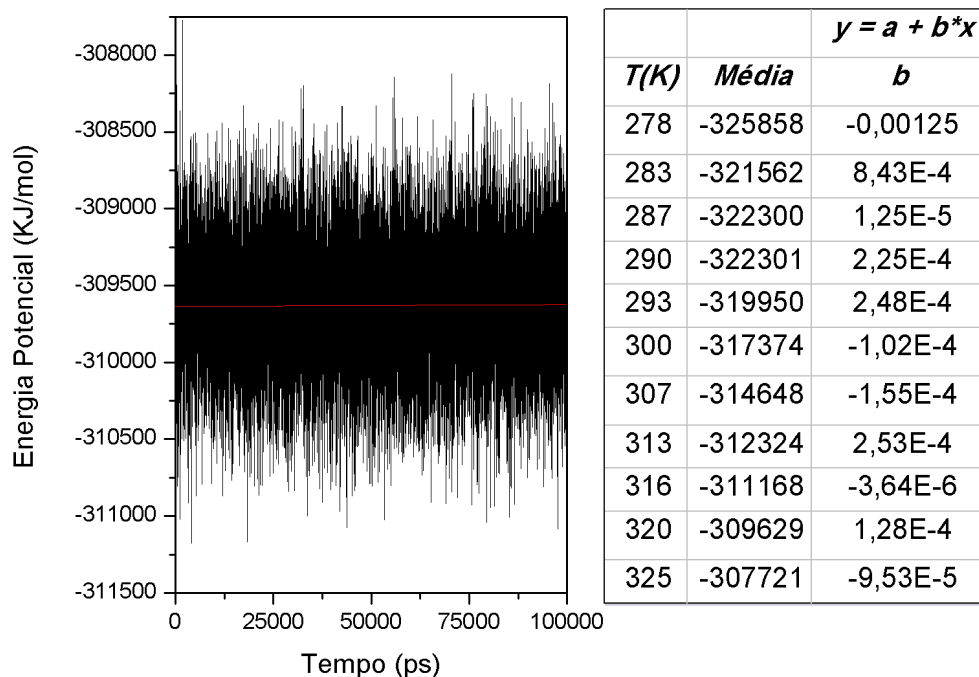


Figura 3.2: Gráfico da energia potencial total do sistema em função do tempo de simulação para a temperatura de 320K. Ao lado está a tabela com os valores médios das energias e respectivos coeficientes angulares do ajuste linear das curvas para cada temperatura simulada.

A análise das características estruturais da micela foi realizada considerando a excentricidade, o raio, a área acessível ao solvente, a função de distribuição radial de pares para grupos e íons e o tamanho (número de moléculas do surfactante) dos “clusters” formados. A última análise foi realizada para testar os critérios propostos por Sammalkorpi e colaboradores (Sammalkorpi et al., 2007) para simulações com automontagem das micelas porque para as temperaturas mais elevadas a variação na excentricidade fogia do padrão de acréscimo com a temperatura.

Para a definição de “cluster” (ou aglomerado) usou-se os critérios propostos no trabalho de Sammalkorpi e colaboradores baseados nas distâncias entre: (1) os átomos de carbonos 12 de cada surfactante, C12, (2) os átomos de carbonos 5, C5 e (3) entre os centros de massa dos surfactantes (para numeração e visualização relativa das posições dos átomos numa molécula do surfactante, veja a figura 3.1). O critério para uma molécula de DS pertencer a um “cluster” é qualquer destas distâncias, calculadas com relação a alguma outra molécula que pertença ao “cluster”, ser menor do que 0.45 nm, ou duas delas serem simultaneamente menores do que 0.5 nm, ou se as três forem simultaneamente menores do que 0.6 nm. Estes critérios revelaram-se excessivamente

restritivos, fornecendo um número de moléculas de surfactante no “cluster” que tinha pouca correlação com a visualização da trajetória da dinâmica. Por esse motivo e por outros que serão discutidos no capítulo seguinte, optamos por usar as distâncias de 0.55 nm e de 0.60 nm para os dois primeiros critérios, e não usarmos uma terceira distância. Todas as análises do aglomerado maior (micela) dadas a seguir foram feitas com estas distâncias.

Na figura 3.3 estão apresentados os valores médios obtidos para o número de monômeros de SDS do maior “cluster”, considerado como sendo a micela e o número de “cluster” (por definição um “cluster” tem mais do que uma molécula de SDS) como função da temperatura. As barras de erro fornecem uma idéia dos desvios padrão de cada uma destas grandezas.

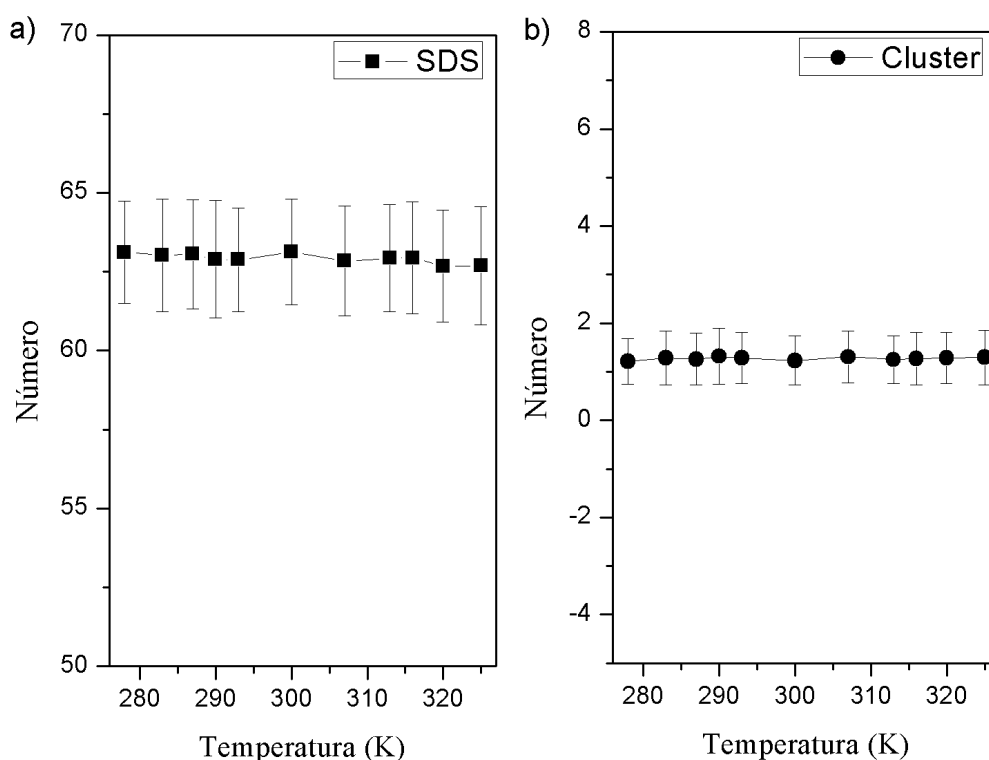


Figura 3.3: a) Número médio de monômeros, SDS, na micela com seus desvios padrão e b) número médio de “clusters” com seus desvios padrão como função da temperatura.

Da figura 3.3(a) verifica-se que o número de monômeros de SDS pertencente à micela permanece, em média, constante e que as flutuações observadas nas diversas temperaturas são devidas aos critérios utilizados na classificação dos “clusters” já que após a minimização de energia a micela não era formada por 65 monômeros de DS na maioria das simulações. Obviamente se aumentarmos as distâncias envolvidas na definição do “cluster” esse número tende a crescer para o número total de moléculas do

surfactante. Com exceção das temperaturas acima de 316 K em que algumas moléculas de SDS se destacam temporariamente do “cluster” mas lhe permanecem vizinhas, ou seja, a variação no número de moléculas pertencentes ao cluster é uma flutuação devido aos critérios utilizados. Para as temperaturas mais altas, no entanto, as simulações mostram que ao menos uma molécula de SDS se afasta de fato do cluster e não mais retorna para ele.

Os resultados apresentados na figura 3.3(a) mostram uma tênue tendência de diminuição no número de moléculas de SDS na micela com o aumento da temperatura, comportamento também reportado por Croonen e colaboradores (Croonen et al., 1983) utilizando experimentos de fluorescência.

A forma da micela pode ser analisada pela sua esfericidade. Para isso calcula-se a excentricidade da micela, definida pela expressão (Salaniwal et al., 2001):

$$e = \left| 1 - \frac{I_{min}}{I_{avg}} \right|, \quad [3.1]$$

onde e é a excentricidade, I_{min} é o momento de inércia de menor magnitude entre os momentos de inércia ao longo dos eixos X, Y, Z e I_{avg} é a média dos três momentos de inércia. Quanto mais próximo de zero for o valor de e mais esférica será a micela. Os valores obtidos para a excentricidade da micela como função da temperatura estão dispostos na Figura 3.4. No intervalo de temperaturas analisado não há variação significativa na esfericidade da micela, o valor médio da excentricidade para cada temperatura está em torno de 0.06, indicando micelas razoavelmente esféricas. Esse valor é coerente com resultados obtidos em outras simulações de micelas pré-formadas (Bruce et al., 2002, MacKerell, 1995 e Rakitin et al, 2004): 0.05, 0.02 e 0.09. A barra de erro encontrada compreende esse intervalo da literatura.

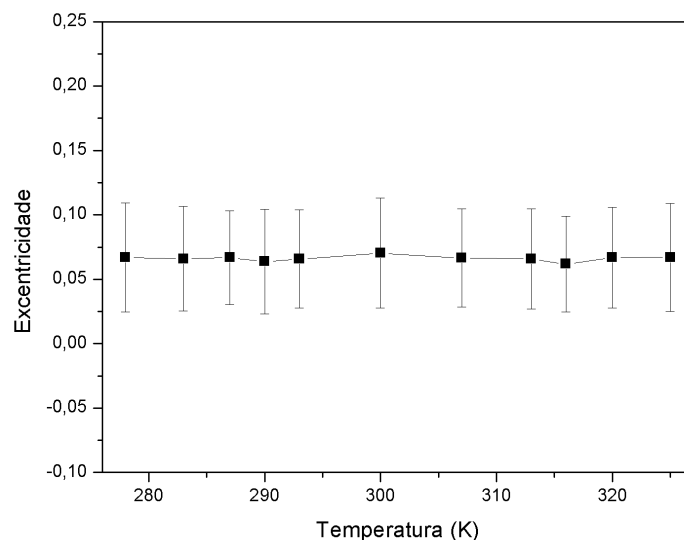


Figura 3.4: Valor médio da excentricidade para a micela com o respectivo desvio padrão como função da temperatura.

A dimensão geométrica da micela foi estudada por meio do raio micelar, obtido de duas formas: (1) através da relação entre o raio de uma esfera sólida de densidade uniforme e o raio de giro médio, segundo (Bogusz et al., 2000)

$$R_s = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g, \quad [3.2]$$

onde R_s é o raio micelar e R_g é o raio de giro médio, e (2) através da distância média entre o centro de massa da micela e os átomos de enxofre da cabeça polar, R_{avg} . Estes resultados estão dispostos na Figura 3.5. Eles mostram que há um aumento gradual no valor dos raios micelares em função da temperatura. O comportamento obtido era esperado, pois quanto mais alta a temperatura maiores são as oscilações nos sistemas devido à agitação térmica conseqüentemente maiores serão os valores obtidos para os raios micelares independentemente da forma como são obtidos.

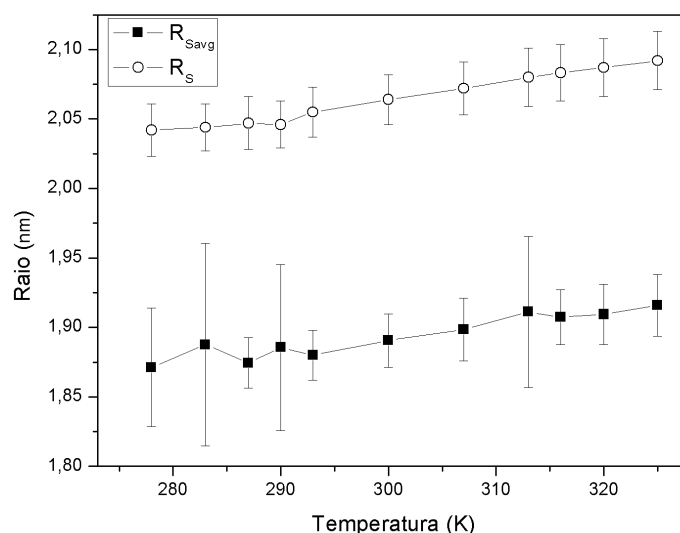


Figura 3.5: Raios micelares médios R_s e R_{savg} com desvios padrão em função das temperaturas.

Os valores obtidos para o raio micelar, R_s , são comparáveis àqueles obtidos nas simulações por dinâmica molecular de Bruce e colaboradores (Bruce et al., 2002) e MacKerell (MacKerell, 1995) (2.090 e 2.068 nm respectivamente, à 298K) e ao valor experimental de 2.020 nm (Jusufi et al., 2008). Os valores de R_{savg} , para os monômeros de SDS contidos no maior “cluster”, são comparáveis ao valor obtido experimentalmente de 1.89 nm a 298K para os monômeros de LDS (Benedouch et al., 1983) e aos valores obtidos de simulações por dinâmica molecular (Gao et al., 2005 e Shang et al., 2008); de 1.88 nm a 298K e 1.90 nm a 300K, respectivamente.

Outro dado relevante para a análise da micela é a sua solvatação, que está relacionada à área acessível ao solvente. Usando o algoritmo proposto no trabalho de Lee & Richards (Lee et al, 1971) obteve-se os valores da área acessível mostrados na figura 3.6.

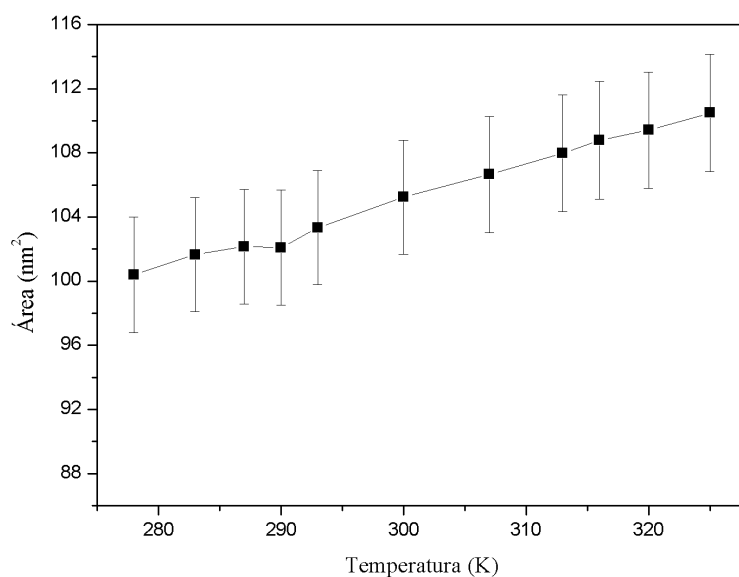


Figura 3.6: Área acessível ao solvente total com desvios padrão em função da temperatura.

Da figura 3.6 observa-se um crescimento no valor da área acessível ao solvente em função da temperatura. No trabalho de Bruce e colaboradores (Bruce et al., 2002) a área total obtida para uma micela com 60 monômeros de DS foi 105.48 nm^2 e no trabalho de Shang e colaboradores (Shang et al., 2008) para a mesma configuração micelar foi 104.69 nm^2 , valores comparáveis aos obtidos nesse trabalho.

Um pequeno crescimento na área acessível ao solvente com o aumento da temperatura é esperado, pois com o aumento da agitação térmica, tanto as cabeças polares quanto as caudas hidrofóbicas tendem a se afastar umas das outras.

As micelas desse tipo são compactas. Isso pode ser visualizado pelo número médio de moléculas de água na vizinhança de cada carbono da cadeia acíclica das moléculas de SDS, denominado número de coordenação. Tomando como vizinhança de cada carbono uma esfera de raio $0,35 \text{ nm}$, obtêm-se os dados mostrados na Figura 3.7a para o conjunto de temperaturas estudado. Vê-se que há um decréscimo rápido no número de coordenação do C1 ao C3 e um aumento no número de coordenação no grupo metil C12, consistente com o dobramento de algumas caudas acilicas deixando o C12 mais exposto as moléculas de água que seus vizinhos imediatos. Os resultados de todas as simulações mostram o mesmo comportamento e são equivalentes às curvas obtidas nos trabalhos (MacKerell, 1995 e Rakitin et al, 2004 e Shang et al., 2008).

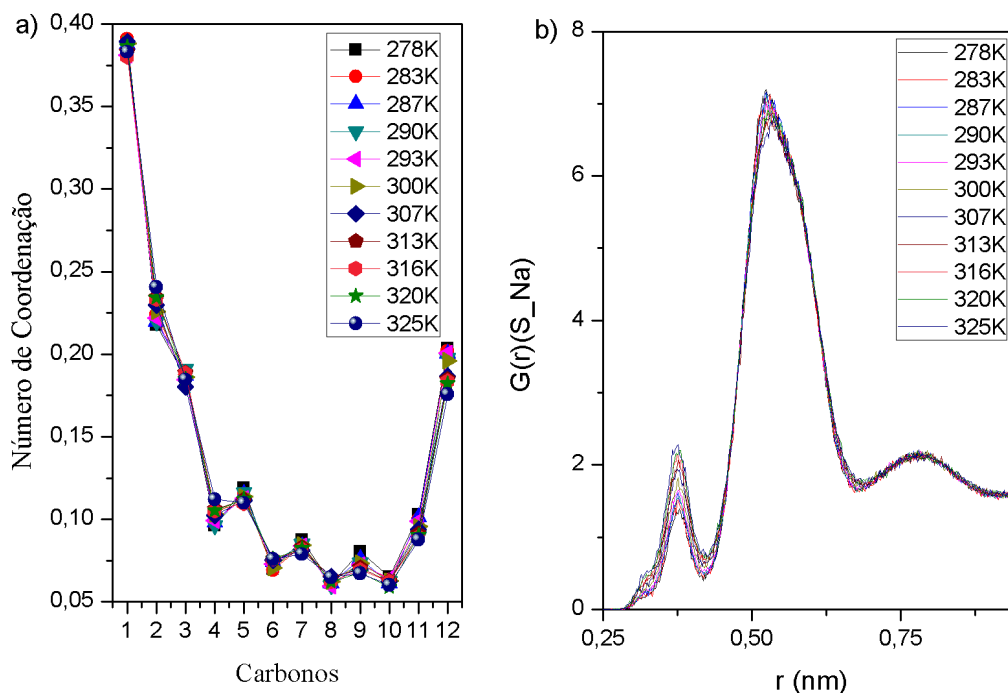


Figura 3.7: **a)** Número de coordenação de cada átomo de carbono da cadeia alifática do DS em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água (OW) numa distância de 0.35 nm; **b)** Função de distribuição radial de pares $g(r)$ dos íons de sódio (Na^+) ao redor dos átomos de enxofre (S) das cabeças polares do SDS.

Outro dado interessante para a análise do sistema é a distribuição dos contra-íons sódio ao redor das cabeças polares, uma vez que eles têm a importante função de blindar a repulsão eletrostática entre os grupos sulfatos existentes. Isso pode ser obtido da função de distribuição radial de pares de íons sódio em relação ao centro de massa do grupo sulfato (SO_4), que, na prática, pode ser tomado como o átomo de enxofre. Na Figura 3.7 (b) está mostrada a função de distribuição para o par $S - Na^+$. Nela r varia entre 0 e 0.9 nm por ser esse o intervalo em que a função difere significativamente da unidade, mas a distribuição vai até r igual a 3 nm.

As posições do primeiro e segundo picos de solvatação obtidos reproduzem os valores encontrados nos trabalhos de Bruce et al., 2002, Rakitin et al, 2004 e Sammalkorpi et al., 2007, mas não apresentam as mesmas intensidades. Os dados da Figura 3.7(b) reproduzem os dados de Sammalkorpi e colaboradores embora esses autores tenham trabalhado com procedimentos diferentes, um de micela pré-montada (Bruce e Rakitin et al) e os outros obtendo a micela num processo de automontagem (Sammalkorpi e colaboradores). Essa diferença de procedimento é a única diferença existente entre o nosso trabalho e o de Sammalkorpi e colaboradores, uma vez que os campos de força e o modelo de água utilizado são essencialmente os mesmos. Em

ambos os resultados a quantidade de íons sódio na primeira camada de solvatação é significativamente menor do que aquele da segunda camada. Estes resultados diferem dos resultados apresentados por Bruce e colaboradores e por Rakitin & Pack, para os quais parte significativa (~ 25 % ou mais) da blindagem da repulsão entre as cargas dos grupos sulfato se dá pelos íons sódio na primeira camada de solvatação. Sammalkorpi e colaboradores atribuem essa diferença a diferenças nos procedimentos de simulação, leia-se campos de força ou modelos para as moléculas de água, ao tempo de simulação e à diferença nos tamanhos e procedimentos de obtenção das micelas pré-montadas contra automontadas. Esse último fator desaparece quando comparamos com os nossos resultados. Por outro lado, Patra e Karttunen (Patra et al, 2004) realizaram várias simulações por dinâmica molecular de cloreto de sódio em meio aquoso usando diferentes campos de força e diferentes modelos de água. Como resultado eles observaram que a posição do primeiro pico de solvatação do sódio em relação ao cloro depende tanto do modelo de água como do campo de força utilizado. Como não existem evidências experimentais diretas dessas distâncias é preciso cuidado com as conclusões a serem tomadas. Sammalkorpi e colaboradores acrescentam que 70 % dos contra-íons estão contidos na primeira e segunda camada de solvatação, e nossos resultados confirmam esse dado, em concordância com o parâmetro $\beta = 0.72$ que mede a quantidade de contra-íons ligados à micela a partir de dados de condutividade (Shanks et al, 1992) e de dados de dissociação de contra-íons α , que varia entre $0,26 \pm 0,02$ até $0,36 \pm 0,02$, dependendo do método utilizado (Vautier-Giongo e Bales, 2003, Bales, 2001 e Aswal e Goyal, 2003).

No trabalho de Patra & Karttunen citado acima, os autores concluem que os efeitos físicos governados por hidratação são bem descritos pelos campos de força existentes na literatura e também pelos modelos de água, pois o primeiro pico da função de distribuição radial de pares de íons sódio e cloro com o oxigênio das moléculas de água ocorre, aproximadamente, na mesma distância para todos os campos de força e modelos de água testados. Para o nosso trabalho os pares de interesse são os íons sódio e o grupo sulfato (átomo de enxofre) com as moléculas de água (oxigênio), $\text{Na}^+ - \text{OW}$ e $\text{S} - \text{OW}$, respectivamente. A função distribuição radial de pares para esses pares está mostrada na figura 3.8, para valores de r diferentes da unidade, pois r varia de 0 a 3 nm. A posição do primeiro pico das funções para o íon sódio e grupo sulfato com a água são típicas e estão de acordo com resultados obtidos em outras simulações. (Mackerell, 1995, Bruce et al. 2002, Gao et al. 2005, Sammalkorpi et al., 2007, Shang et al., 2008).

As intensidades, contudo, variam entre os diferentes trabalhos e refletem os campos de força ou procedimentos utilizados.

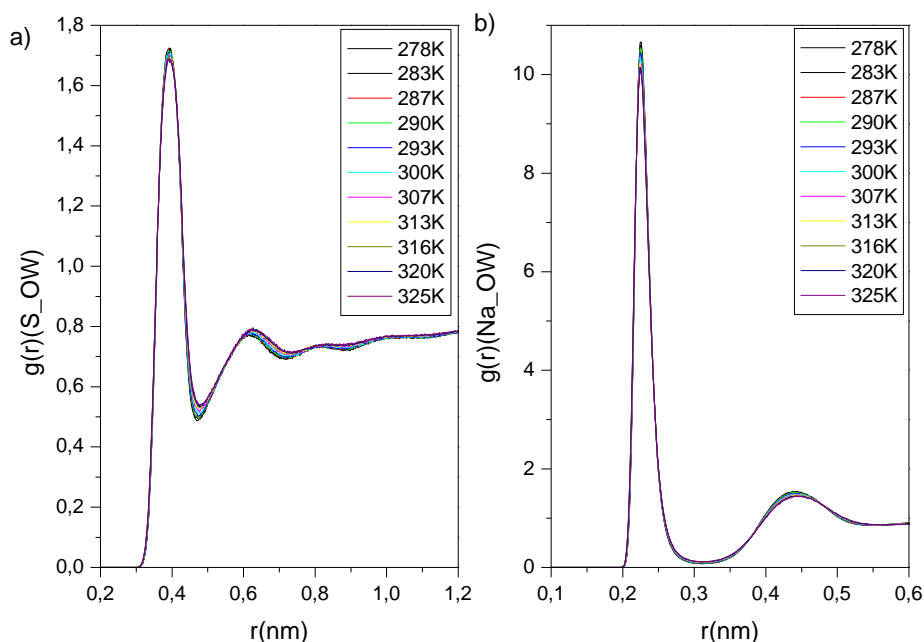


Figura 3.8: Função de distribuição radial de pares $g(r)$: a) entre os átomos de enxofre (S) e o grupo OH⁻ das moléculas de água, b) entre os íons de sódio (Na) e o grupo OH⁻ das moléculas de água.

3.5 - Conclusões

Os resultados obtidos conduzem a duas conclusões principais: (1) o protocolo proposto, campo de forças, modelo de molécula de água e tratamento das interações de longo alcance, permitem reproduzir as principais características da micela em solução aquosa e são coerentes em sua maior parte com dados de outras simulações e qualitativamente com dados experimentais. Além disso, os resultados mostram que o conjunto de parâmetros do campo de força, otimizados para a simulação na temperatura ambiente, são robustos e não produzem diferenças significativas no intervalo de temperatura estudado, mantendo-se a micela aproximadamente esférica e com características físicas essencialmente iguais àquela da temperatura ambiente. Não nos surpreende a insensibilidade do sistema estudado ao intervalo de temperatura contendo a temperatura de Krafft, pois a estrutura inicial da micela é de um aglomerado esférico. Os resultados de Sammalkorpi e colaboradores, cujo protocolo de simulação é essencialmente igual ao deste trabalho, mas simula um processo de automontagem, reproduzem ao menos qualitativamente, as observações experimentais com relação a essa temperatura.

Capítulo 4 – Análise Conformacional do peptídeo Polybia MP-I na Presença de uma Micela de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) em Solução Aquosa

4.1- Objetivos

Neste capítulo será discutida a interação do peptídeo Polybia MP-I com a micela de SDS em solução aquosa. O objetivo é verificar as consequências dessa interação sobre as estruturas do peptídeo, da micela e a forma como o peptídeo se insere na micela. Essa discussão será feita a partir de duas situações experimentais (simulações): uma na qual o peptídeo é colocado nas vizinhanças de uma micela pré-formada, aproximadamente esférica, (simulação 1) e outra na qual o peptídeo é colocado no centro de uma caixa contendo moléculas de SDS aleatoriamente distribuídas, ou seja, a micela se forma na presença do peptídeo num processo de automontagem (simulação 2).

4.2- Métodos

A estrutura secundária helicoidal do peptídeo Polybia MP-I (a estrutura primária está no esquema 4.1) foi gerada como proposto no trabalho de Broggio Costa (Broggio Costa, 2006).

MP-I Ile-Asp-Trp-Lys-Lys-Leu-Leu-Asp-Ala-Ala-Lys-Gln-Ile-Leu-NH₂

Esquema 4.1: Seqüência primária do mastoparano MP-I. Em azul, são representados os resíduos carregados positivamente. Em vermelho, os resíduos carregados negativamente. Em preto, os resíduos hidrofóbicos. Em verde, os resíduos polares.

Como comentado acima a inserção do peptídeo na micela de SDS foi estudada por meio de duas simulações distintas; na primeira o peptídeo foi colocado próximo de uma micela pré-formada (simulação 1) e na segunda o peptídeo foi colocado no centro de uma caixa de simulação contendo monômeros de SDS distribuídos aleatoriamente (simulação 2). Na simulação 1 uma caixa de simulação cúbica de aproximadamente 6 nm de aresta contendo o peptídeo, dois átomos de cloro para neutralizar a carga do peptídeo, 65 moléculas do surfactante – dodecil sulfato, 65 contra-íons Na⁺ e 8080 moléculas de água. Na simulação 2 uma caixa retangular de arestas 8, 8 e 7 nm, aproximadamente, nos eixos x, y e z respectivamente contendo o peptídeo, dois átomos de cloro, 144 moléculas de surfactante DS e 144 contra-íons de sódio dispostos

aleatoriamente ao longo da caixa e 12399 moléculas de água. Na figura 4.1 mostramos as configurações iniciais das simulações, das quais as moléculas de água e os íons foram omitidos para facilitar a visualização. Denominaremos de simulação 3 à simulação da solução aquosa com a micela sem o peptídeo, dados relatados no capítulo anterior. Eles serão utilizados para comparações quando conveniente.

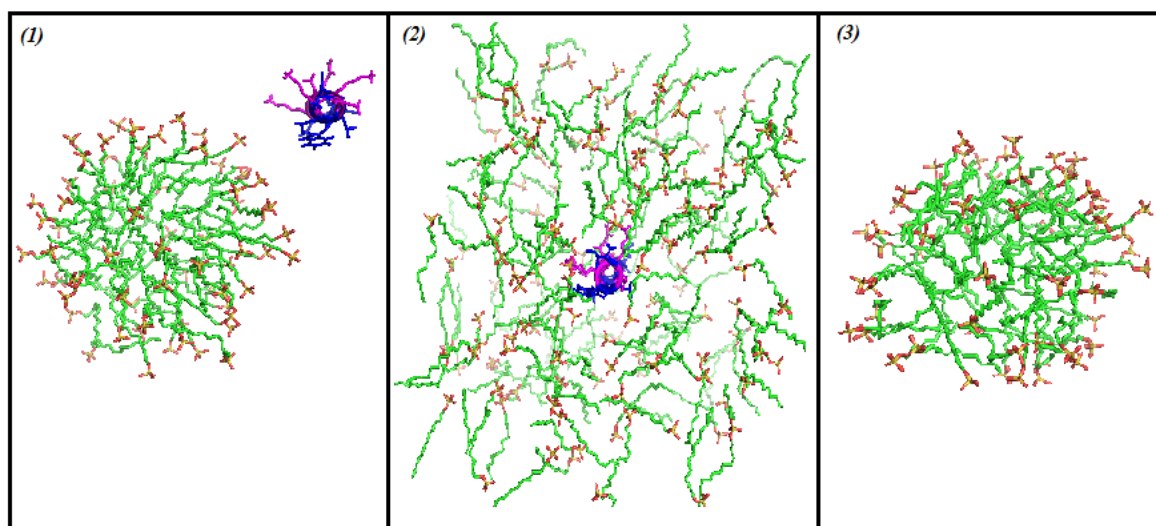


Figura 4.1: Configuração inicial dos monômeros de SDS e do peptídeo. Em (1), simulação 1; em (2), simulação 2 e em (3) simulação 3. Em azul e rosa, resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente, do peptídeo e em verde, cadeias alifáticas dos monômeros de SDS. Da cabeça polar dos monômeros de SDS destacam-se em vermelho, os átomos de oxigênio e em amarelo, os átomos de enxofre.

Para as duas simulações realizou-se uma minimização de energia com o auxílio do algoritmo Steepest Descent com o critério de convergência de 30000 passos de integração ou a energia entre dois passos igual a 10^{-2} kJ/mol para evitar possíveis conflitos estéricos introduzidos no processo de construção das caixas de simulação. Em seguida, fez-se uma dinâmica de restrição de posição de 1 ns, mantendo o peptídeo e as moléculas de DS fixas nas suas posições na caixa de simulação por meio de um potencial quadrático com constante elástica de 1000 kJ/mol, para permitir a reorganização do solvente e contra-íons. Por último, realizaram-se as simulações com o sistema sem qualquer tipo de vínculo. A duração da simulação 1 foi de 100 ns e para a simulação 2 de 200 ns.

Banhos de Berendsen (Berendsen et al., 1984) independentes foram utilizados para o controle da temperatura do peptídeo, dos surfactantes e do solvente - moléculas de água e íons - em 300K, com constante de acoplamento de 0.1 ps, e para o controle da

pressão em 1 atm, com constante de acoplamento de 1 ps e compressibilidade igual a $5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$.

As simulações foram realizadas utilizando o pacote computacional GROMACS 4.0 e o campo de forças GROMOS 87 (van Gunsteren et al, 1987) com modificações propostas por Sammalkorpi e colaboradores para as moléculas de SDS (Sammalkorpi et al., 2007) e sem modificações para os resíduos do peptídeo. O modelo de molécula de água utilizado nas simulações foi o SPC (Simple Point Charge - Berendsen et al., 1981), sendo a geometria dessas moléculas mantida pelo algoritmo SETTLE (Miyamoto et al., 1992).

O algoritmo LINCS (Hess, 2008) foi usado para manter os comprimentos de ligação próximos dos valores de equilíbrio. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo PME (Particle Mesh Ewald - Darden et al., 1993), sendo o raio de Coulomb e o raio de Van der Walls iguais a 1 nm. A lista de vizinhos foi atualizada a cada 10 passos e o passo de integração utilizado foi de 2 fs.

4.3- Resultados e Discussões

4.3.1- Análise dos Aglomerados Micelares

4.3.1.1- Análise de Energias

Na Figura 4.2 estão apresentadas as evoluções temporais das energias potencial total do sistema (a) e dos termos de longo alcance (Coulomb e Lennard-Jones) entre as moléculas do surfactante e entre estas e o solvente (b), destacando que o termo solvente designa nas simulações as moléculas de água e os contra-íons de sódio. A terceira curva dessa figura refere-se à soma dos dois termos citados.

Da figura 4.2(a) notamos que a energia potencial total apresenta um comportamento típico de uma dinâmica de equilíbrio, ou seja, a energia flutua em torno de um valor médio. O ajuste linear dessa curva (em destaque na figura) mostra que o coeficiente angular da reta é da ordem $10^{-4} \text{ kJ}/(\text{mol.ps})$ para uma energia da ordem de $-4.0 \times 10^5 \text{ kJ/mol}$. As flutuações de energia apresentam um desvio quadrático médio em torno de 450 kJ/mol , que pode ser considerado razoável para um sistema desse tamanho. O mesmo comportamento pode ser observado para as curvas de energias da figura 4.2 (b). É interessante destacar que as energias envolvidas na interação do surfactante (com ele próprio e com o solvente) têm valor uma ordem de grandeza menor do que a energia potencial total, embora as flutuações dessas energias sejam da mesma ordem de

grandeza. Essa dinâmica em equilíbrio desde o início poderia ser esperada uma vez que se partiu de uma micela de SDS previamente equilibrada.

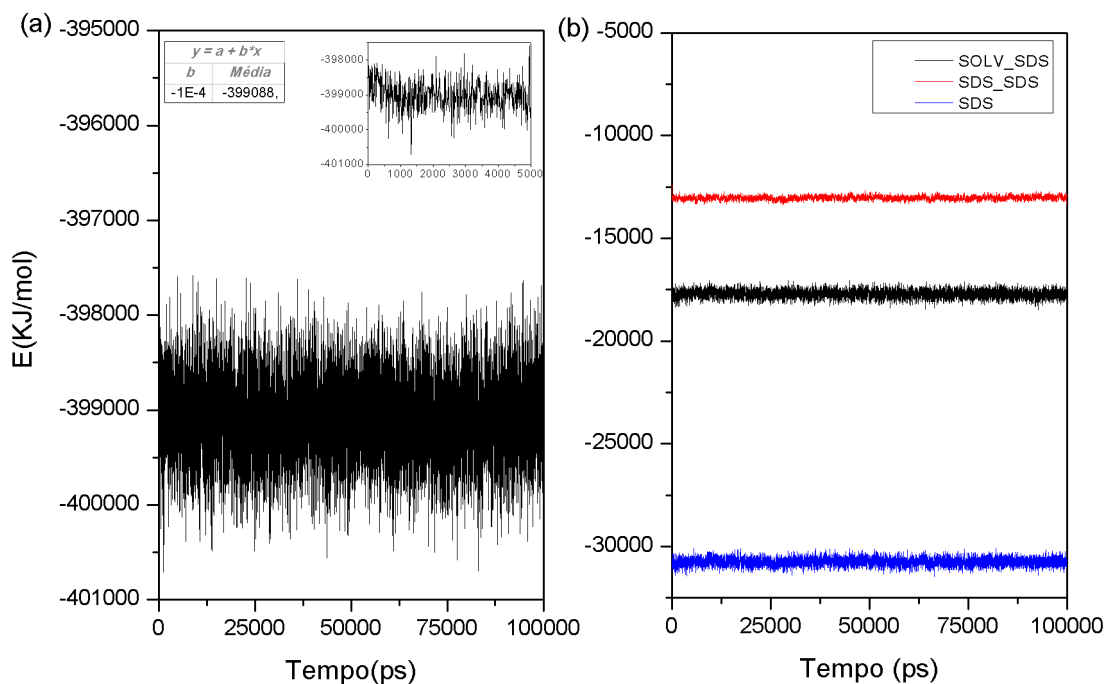


Figura 4.2: Evolução temporal de termos de energia para a simulação 1: a) energia potencial total incluindo tabela com resultados obtidos da análise linear, onde “b” é o coeficiente angular da reta; b) energia de longo alcance (Coulomb mais Lennard-Jones) entre moléculas do surfactante, em vermelho, entre estas e as moléculas do solvente, em preto, e a soma destes dois termos, em azul.

Para a simulação 2, ou seja, o processo de automontagem, o esperado é que as energias potenciais apresentem um comportamento diferente daquele obtido e discutido acima (simulação 1), ao menos no período inicial da simulação.

De fato, da figura 4.3 (a) pode-se visualizar que do início da simulação e até, cerca de, 50 ns há uma queda pronunciada no valor da energia potencial total. No intervalo aproximado de 50 ns até 120 ns a energia sofre um pequeno acréscimo, estabilizando-se em torno de um valor médio até o final da simulação (120 – 200 ns). O ajuste linear para o intervalo final mostra um valor médio de aproximadamente $-6,5 \times 10^5$ kJ/mol com um coeficiente angular de $1,0 \times 10^{-2}$ kJ/(mol.ps). Isso indica que nesse intervalo a dinâmica pode ser considerada equilibrada. Por essa razão os valores médios de qualquer grandeza referente à simulação 2 têm como base esse intervalo.

Na Figura 4.3 (b) estão mostradas as curvas da evolução temporal das energias de longo alcance (Coulomb mais Lennard-Jones) para as interações entre: moléculas do surfactante com as moléculas do solvente (SOLV-SDS), entre as moléculas do surfactante (SDS – SDS) e a soma destas duas contribuições. Estes dados sugerem que o

equilíbrio ocorreria de forma muito mais rápida, diferentemente do que obtemos da análise da energia total (Figura 4.3(a)). Por essa razão é interessante detalharmos esses dados. Na Figura 4.4 estão graficadas as energias das interações eletrostáticas (CL) e de Lennard-Jones (LJ) entre as moléculas do surfactante, SDS-SDS (Figura 4.4 (a) e (b)), respectivamente e entre estas e o solvente, SOLV-SDS (Figura 4.4 (c) e (d)). Da Figura 4.4 (b) fica evidente que a formação inicial de um conjunto de aglomerados ocorre nos primeiros nano segundos de simulação e é controlada pelas interações de Lennard-Jones entre as moléculas do surfactante, num processo descrito por outros autores como um colapso hidrofóbico. O crescimento desse termo de energia, entre 50 e 120 ns corresponde como veremos na seção de análise estrutural dos aglomerados, a junção de dois ou mais aglomerados num aglomerado maior. A contribuição eletrostática SDS-SDS (Figura 4.4 (a)), como esperado, torna-se mais repulsiva até cerca de 50 ns, pois os surfactantes são aproximados para formar os aglomerados no processo hidrofóbico e permanecem oscilando em torno de um valor médio até o final do tempo de simulação. A energia eletrostática entre as moléculas dos surfactantes e o solvente, Figura 4.4(c), por outro lado, decresce, devido a redistribuição dos contra-íons de sódio presentes no termo SOLV, no intervalo de 0 a ~ 120 ns, e, depois dele, se mantém oscilando em torno de um valor médio praticamente constante.

As energias das interações do tipo Lennard-Jones para estas moléculas inicialmente (até cerca de 50 ns) crescem numa taxa alta e, para tempos maiores, numa taxa muito pequena, que parece compensar em parte o decréscimo nas interações eletrostáticas, possibilitando que o sistema se equilibre a partir de 120 ns.

Processos semelhantes - de um colapso hidrofóbico inicial seguido de um rearranjo controlado por interações tipo Lennard-Jones e Coulombiana entre as moléculas do surfactante e entre estas e as moléculas do solvente - foram reportados em outros trabalhos (Gao et al., 2005, Sammalkorpi et al, 2007 e Jusufi et al, 2008).

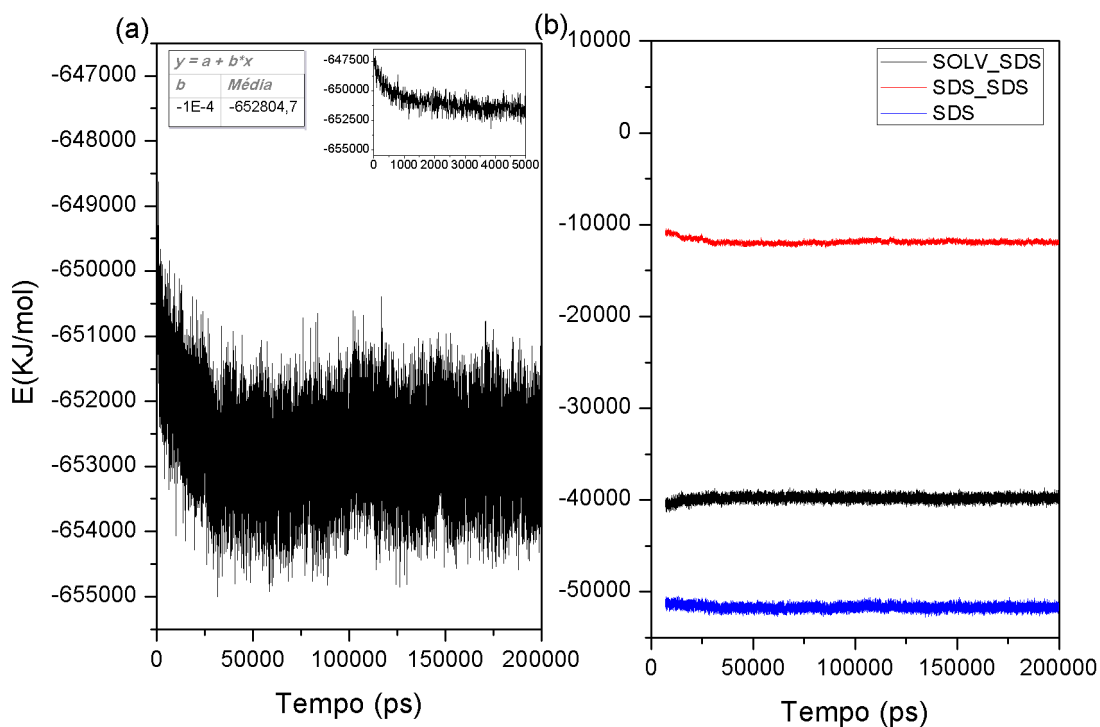
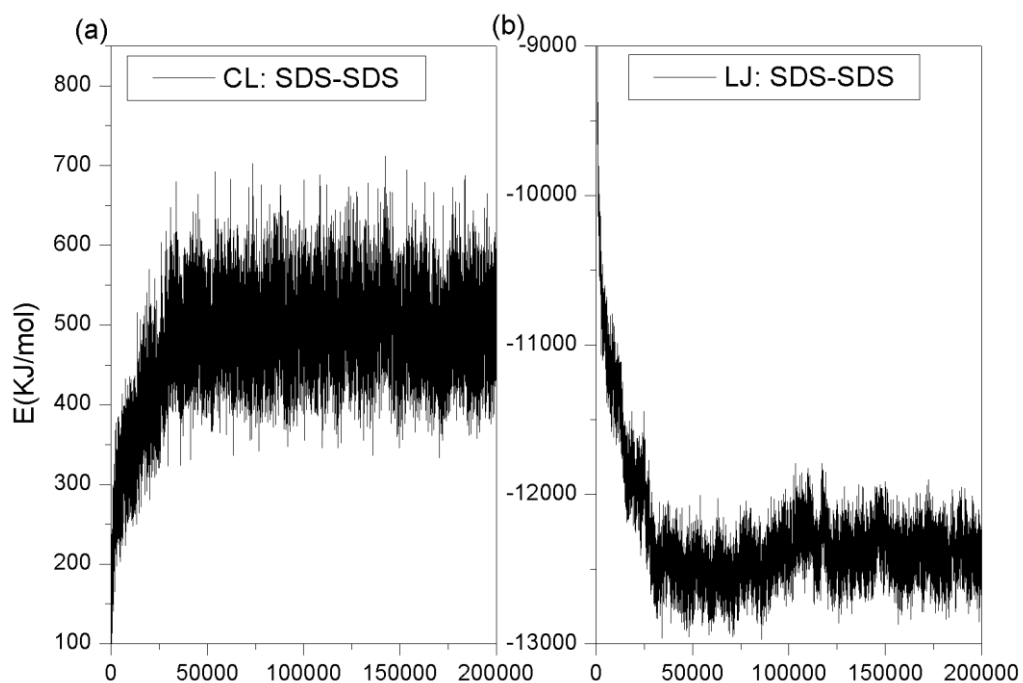


Figura 4.3: Evolução temporal de termos de energia para a simulação 2: a) energia potencial total incluindo tabela com resultados obtidos da análise linear, onde “b” é o coeficiente angular da reta; b) energia de longo alcance (Coulomb mais Lennard-Jones) entre moléculas do surfactante, em vermelho, entre estas e as moléculas do solvente, em preto, e a soma destes dois termos, em azul.



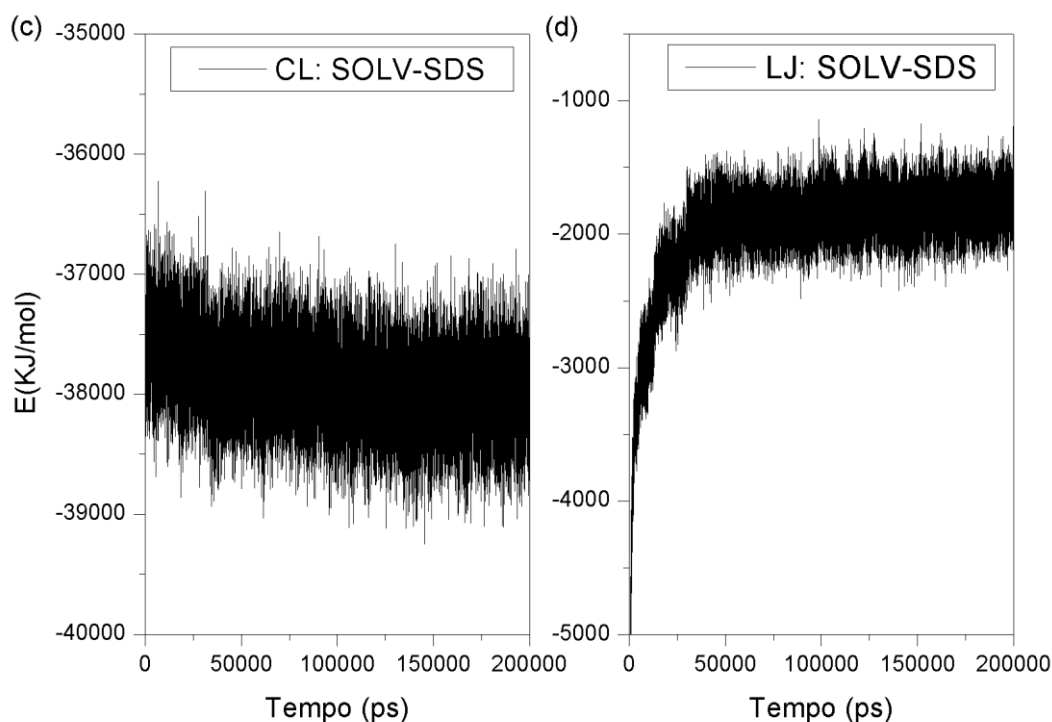


Figura 4.4: Evolução temporal de termos de energia para a simulação 2: a) e b) energias de longo alcance, Coulomb e Lennard-Jones respectivamente, entre moléculas do surfactante; c) e d) energias de longo alcance, Coulomb e Lennard-Jones respectivamente, entre moléculas do surfactante e as moléculas do solvente.

4.3.1.2- Análise Estrutural

Outro aspecto relevante, além do energético, a ser analisado é a estrutura do aglomerado (micela) formado. Particularmente, como os dois experimentos em discussão envolvem o peptídeo, interessa entender se e como a interação com o peptídeo, influencia na estabilidade estrutural da micela. Para isso vamos comparar os resultados obtidos para as simulações 1 e 2 com os resultados obtidos para a simulação da micela pré-formada, na temperatura de 300 K, na ausência do peptídeo, dados mostrados no capítulo anterior, e citados neste capítulo como simulação 3.

A definição de “cluster” (ou aglomerado micelar ou, simplesmente micela) está baseada em critérios de distância entre: (1) os átomos de carbonos C12 de cada surfactante; (2) os átomos de carbonos C5 e (3) entre os centros de massa dos surfactantes. Uma molécula de surfactante pertence ao cluster se ela for vizinha de qualquer outra molécula de surfactante que já pertença ao cluster e isso ocorre quando qualquer das distâncias definidas acima for menor do que “ d_1 ” ou duas delas forem

simultaneamente menores do que “ d_2 ” (= “ d_1 ” + 0,05 nm). A partir dessa determinação dos aglomerados micelares, grandezas como o número de agregação micelar, a excentricidade e o raio micelar médio (R_{Savg}) podem ser determinadas, conforme discutido no capítulo 3.4. Os valores de “ d_1 ” foram variados no intervalo (0.45 – 0.60) nm e os de “ d_2 ” entre 0.50 e 0.65 nm.

Na Figura 4.5 estão mostrados os resultados obtidos para o número de moléculas de surfactante no maior “cluster”, a micela, para a simulação 1 (Figura 4.5(a)) e para a simulação 2 (Figura 4.5(b)). Foram escolhidos os valores extremos para “ d_1 ” e “ d_2 ” para ilustrar as flutuações dessa grandeza. As curvas correspondentes aos valores intermediários de “ d_1 ” e “ d_2 ” são intermediárias entre as duas curvas apresentadas. Como comentado na seção anterior, é evidente da Figura 4.5(b) a ocorrência de um processo tipo colapso hidrofóbico, pois de uma forma muito rápida, cerca de 2 ns, o maior aglomerado passa de algumas moléculas de surfactante para um número em torno de 30, oscilando em torno desse valor até aproximadamente 75 ns e depois crescendo novamente, por cerca de 25 ns, para um valor entre 45 e 50 moléculas. Esse processo está ausente na simulação 1 (figura 4.5(a)), pois ali o aglomerado foi pré-montado e as flutuações revelam somente a dinâmica do sistema e os critérios de classificação para uma molécula pertencer ao aglomerado. Essas observações refletem a escolha de “ d_1 ” igual a 0.45 nm. Para “ d_1 ” = 0.60 nm as duas “transições” ocorrem, porém, os intervalos de tempo são muito mais rápidos o que reflete os critérios de classificação do cluster e sua interdependência com a acomodação das moléculas de surfactante no cluster e blindagem da repulsão eletrostática das cabeças polares devido à redistribuição dos contra-íons Na.

Na Tabela 4.1 estão resumidas as propriedades estruturais dos aglomerados para as duas situações com peptídeo e os dados do capítulo anterior, no qual o peptídeo estava ausente. Os dados para a excentricidade indicam que os clusters formados são aproximadamente esféricos esteja ou não presente o peptídeo. A presença do peptídeo provoca um ligeiro aumento (cerca de 0.04 nm) no raio da micela calculado como o valor médio da distância dos átomos de enxofre da cabeça polar do surfactante ao centro de massa da micela, R_{Savg} , quinta coluna da tabela 4.1. A micela obtida por automontagem, apresenta um valor de R_{Savg} também sistematicamente superior aos valores encontrados para os outros casos, fato que pode ser atribuído em parte à presença do peptídeo e, em parte, ao maior número de surfactantes presentes nos

aglomerados obtidos por esse procedimento, como pode ser comprovado pelos valores médios do número de monômeros de surfactante no cluster (sexta coluna da tabela 4.1).

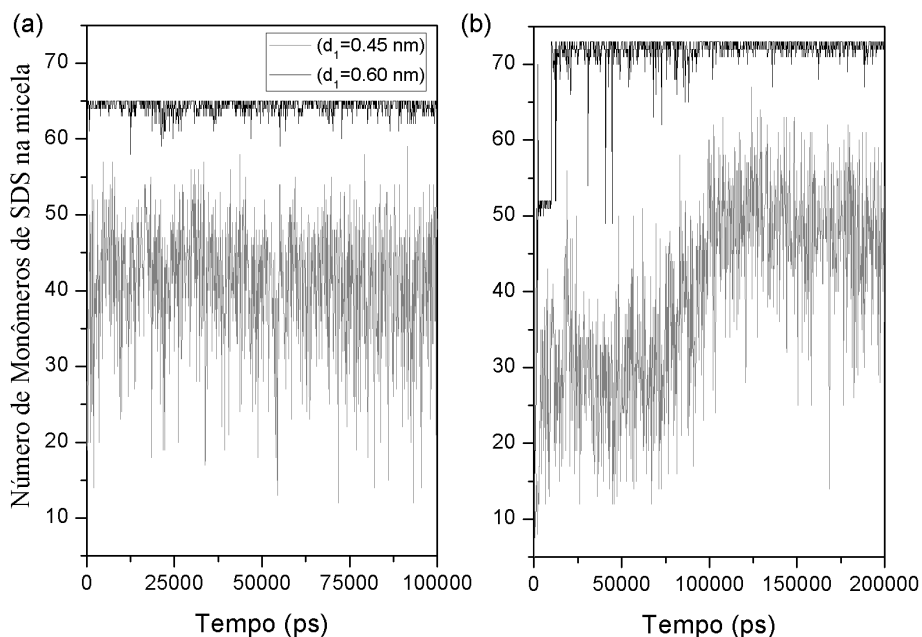


Figura 4.5: Número de monômeros de SDS no maior cluster. Em cinza, número de monômeros de SDS obtido considerando o primeiro critério de classificação de cluster, “ d_1 ”, igual a 0.45 nm, em preto, “ d_1 ” igual a 0.60 nm, em preto.

Tabela 4.1: Médias dos parâmetros estruturais e de forma da micela pré-formada na ausência (3) e na presença do peptídeo (1) e para o auto-arranjo na presença do peptídeo (2) com respectivos desvios. Onde “ d_1 ” é o primeiro critério de classificação dos clusters, “ d_2 ” é o segundo critério de classificação dos clusters, “ e ” é a excentricidade, R_{Savg} é o raio micelar médio, SDS é o número de agregação médio de monômeros de SDS no maior cluster e Cluster é o número médio de clusters.

	d_1 (nm)	d_2 (nm)	e	R_{Savg} (nm)	SDS	Cluster
1	0.45	0.50	0.09±0.07	1.87±0.08	41.0±8.3	5.17±1.97
2			0.08±0.05	1.94±0.05	48.6±7.9	19.6±2.6
3			0.09±0.05	1.84±0.06	41.4±2.5	5±1.98
1	0.50	0.55	0.08±0.05	1.92±0.02	58.0±3.6	2.15±1.05
2			0.07±0.04	1.98±0.02	66.3±3.5	9.17±2.19
3			0.07±0.04	1.88±0.02	58.4±3.5	2.07±1.03
1	0.55	0.60	0.08±0.05	1.92±0.02	63.0±1.7	1.29±0.52
2			0.07±0.04	1.99±0.02	70.8±1.8	4.47±1.17
3			0.07±0.04	1.89±0.02	63.0±1.7	1.25±0.50
1	0.60	0.65	0.08±0.05	1.93±0.02	64.3±1.0	1.07±0.27
2			0.07±0.04	1.99±0.02	72.3±0.9	3.30±0.55
3			0.07±0.04	1.89±0.02	64.4±0.9	1.06±0.24

O número de surfactantes pertencentes à micela (quinta coluna da tabela 4.1) mostra-se muito dependente dos valores de d_1 e de d_2 , por isso decidimos aprofundar nossos estudos antes de definirmos qual o critério usaríamos em nossas análises.

Estudos experimentais e teóricos com micelas formadas de diferentes tipos de surfactantes têm sido realizados nas últimas décadas para a obtenção de parâmetros micelares. Bendedouch e colaboradores (Bendedouch et al, 1983), utilizando medidas de espalhamento de nêutrons a baixos ângulos encontraram um número de agregação aproximadamente igual a 78 surfactantes LDS para uma solução na concentração micelar crítica, cerca de 8.5 mM. Itri e Amaral (Itri et al, 1991) através de medidas de Raios-X a baixos ângulos obtiveram um número de agregação da ordem de 100 surfactantes SDS para uma concentração de solução de 170 mM de SDS. Esses autores fazem uma conciliação de resultados da literatura, para os quais o número de agregação varia de 70, para a CMC, até 128 para uma concentração da ordem de 0.60 M. Quina e colaboradores (Quina et al, 1995) por meio de medidas de espalhamento de luz mostraram que o número de agregação apresenta uma relação linear com a raiz quarta da concentração total de SDS na solução, ao menos para a região entre 20 e 80 mM de SDS. Nessa região o número de agregação obtido varia de 55 a 71 moléculas de SDS.

Recentemente estudos usando simulações por dinâmica molecular de micelas de surfactantes obtiveram resultados para o número de agregação de surfactantes próximos aos valores experimentais, mas utilizando valores consideravelmente maiores de concentrações de SDS.

Na última década Marrink e colaboradores (Marrink et al., 2000) simularam o processo de automontagem de uma micela de DPC a partir de uma solução contendo 1 surfactante para cada 420 moléculas de água, na temperatura ambiente. Esses autores utilizaram como critério para classificar um monômero de DPC como pertencente ao cluster que a distância do seu centro de massa e o centro de massa de algum outro monômero já pertencente à micela deveria estar no intervalo (1.0 – 1.4) nm. Sammalkorpi e colaboradores (Sammalkorpi et al, 2007) e Jusufi e colaboradores (Jusufi et al, 2008) simularam o auto-arranjo de monômeros de SDS, nas proporções de 1:39 e 1:45, respectivamente, e encontraram 70 e 44, respectivamente, para o número de agregação das micelas obtidas. O critério usado no primeiro trabalho foi discutido no capítulo anterior e no segundo a distância entre centro de massa das caudas acílicas de

dois monômeros deve ser menor ou igual a 0.4 nm. Nestes trabalhos os números de monômeros de SDS usados são muito diferentes, respectivamente 200 e 55. Vê-se, portanto, que o critério para definição do “cluster” varia conforme o autor ou a técnica experimental utilizada.

A configuração dos monômeros de SDS e do peptídeo obtidos na simulação 2 deste trabalho está mostrada na Figura 4.6 para dois instantes da fase equilibrada da dinâmica: instantes 175 ns, figuras (a) e (b), e 200 ns, figuras (c) e (d). Os resultados contendo todos os monômeros de SDS estão dispostos nas figuras da esquerda, enquanto nas figuras à direita mostram-se apenas a micela - o maior aglomerado - e o peptídeo, com o centro de massa da micela no centro da caixa de simulação. As setas evidenciam dois conjuntos de monômeros de SDS que pertencem ao mesmo aglomerado apesar da separação entre eles. Quando se usam as condições periódicas de contorno, as imagens das moléculas indicadas com a seta 2 satisfazem os critérios para pertencerem ao aglomerado indicado com a seta 1. Estas figuras sugerem que o número de aglomerados deve estar entre três e quatro.

A proporção de moléculas de SDS por moléculas de água utilizada neste trabalho é aproximadamente de 1:86, tanto para a simulação com a micela pré-formada (simulação 1) como na simulação com auto-arranjo (simulação 2). Os resultados obtidos para o número de monômeros no cluster, mostrados na Tabela 4.1, confrontados com os dados experimentais e de simulação disponíveis, e discutidos acima, e o confronto visual (Figura 4.6) nos conduz a sugerir que o valor “ d_1 ” = 0.55 nm descreve de forma apropriada as características do aglomerado. Sendo assim, nos limitaremos a discutir os demais dados utilizando esse valor.

É interessante observar das Figuras 4.6 a e c que existem outros aglomerados relativamente grandes na micela e que eles formam regiões nas quais há uma organização das moléculas de SDS num arranjo tipo líquido-cristalino, ou seja, micela e estado cristalino e, possivelmente monômeros isolados, convivem nessas condições de concentração e temperatura.

Os dados da Tabela 4.1, quarta e sexta colunas, indicam que tanto o número médio de monômeros nas micelas pré-formadas, como a excentricidade não são alterados de forma significativa pela presença do peptídeo e, além disso, são da mesma

ordem que o número obtido na simulação com automontagem. Os valores obtidos para a excentricidade mostram que as micelas são aproximadamente esféricas. Esses dados são discrepantes daqueles obtidos por Khandelia & Kaznessis (Khandelia et al, 2005) que obtiveram uma variação para a excentricidade de micelas pré-formadas de SDS (60 monômeros) de 0.03, na ausência do peptídeo, para 0.15, na presença do peptídeo, e por Bond & Sansom (Bond et al, 2003) para micelas de DPC. Essa diferença pode ser atribuída à estrutura dos peptídeos simulados, sua carga total, seu tamanho (número de resíduos), sua conformação inicial e à duração das simulações, significativamente mais curtas do que as nossas.

A Tabela 4.1 mostra ainda (quinta coluna) os valores dos raios micelares médios, tomando como referencia a distância do centro de massa da micela ao átomo de enxofre da cabeça polar. Estes valores estão de acordo com dados experimentais: 1.89 nm (Benedouch et al, 1983) e de simulação 1.90 nm (Shang et al, 2008).

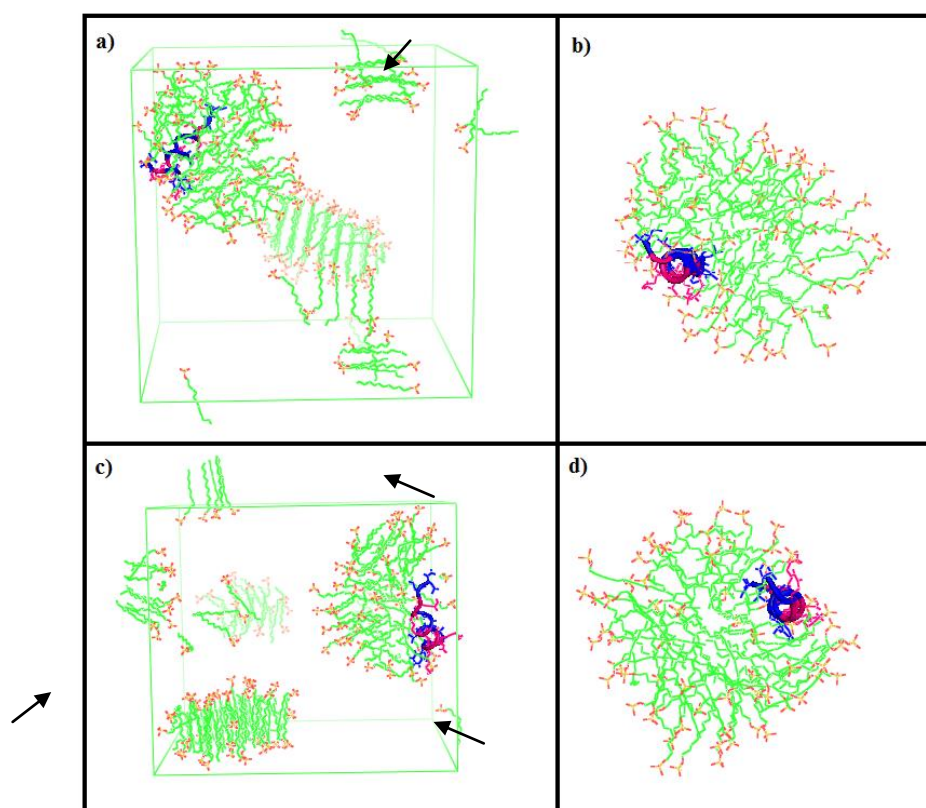


Figura 4.6: Distribuição dos monômeros de SDS e do peptídeo para a simulação 2, em 175 ns (a e b) e 200 ns (c e d) de simulação. Figuras a e c visão geral da caixa de simulação, figuras b e d somente as micelas e o peptídeo. Cores: em verde – átomos das cadeias alifáticas; em vermelho – átomos de oxigênio; em amarelo – átomos de enxofre das cabeças polares do surfactante; em rosa – resíduos hidrofílicos do peptídeo e em azul – resíduos hidrofóbicos do peptídeo. As setas indicam moléculas do surfactante que pertencem ao mesmo aglomerado. A separação nas figuras a e c devem-se à utilização de condições periódicas de contorno.

A análise da função de distribuição radial de pares permite inferir fatores que contribuem para a estruturação e estabilização das micelas e aglomerados. Na Figura 4.7 estão mostradas as curvas obtidas para os pares: S – Na, S – OW (oxigênio da água) e Na – OW. As figuras mostram que para os pares escolhidos as funções são qualitativamente idênticas àsquelas obtidas e discutidas no capítulo anterior para a micela pré-montada na ausência do peptídeo. As posições de máximos e mínimos coincidem e somente para o par S – Na há uma pequena diferença de intensidade na região do segundo mínimo. Isso confirma os dados da Tabela 4.1 que indicavam micelas muito semelhantes nas três simulações.

A integração da função distribuição radial de pares (RIN) A-B até a distância radial r fornece o número de átomos da espécie B naquela vizinhança do átomo A. Os valores do RIN obtidos integrando-se até a segunda camada de hidratação, $r \sim 0.7$ nm, para as três simulações mostram uma relação de 1.15 : 0.99 : 1.07, respectivamente. Isso mostra que apesar da amplitude dos máximos dessas distribuições serem distintos, essa distinção é pouco significativa quando se calcula o RIN dessas curvas. Dessa forma pode-se dizer que os átomos de enxofres se encontram igualmente solvatados por íons sódio nas três simulações.

A posição dos primeiros máximos da função distribuição radial para o par S-Na (figura 4.7(a)) comparada com a posição do primeiro máximo da função distribuição radial para o par S-OW (figura 4.7(b)) e para o par Na-OW (figura 4.7(c)), indicam que os íons de sódio que se encontram nas camadas de solvatação dos átomos de enxofre estão hidratados. Na figura 4.7(c) vemos que a posição e a amplitude do pico da primeira camada de hidratação dos íons sódio são idênticas para as três simulações.

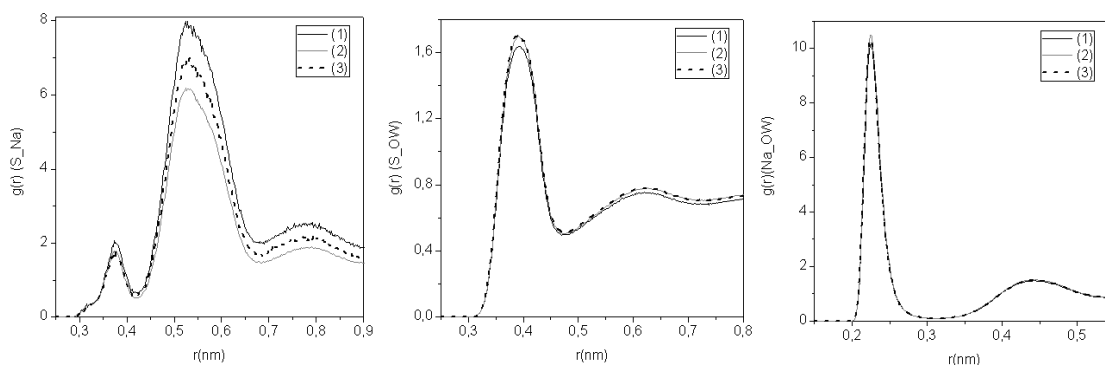


Figura 4.7: Distribuição radial de pares para os átomos de enxofre em relação aos íons de sódio (a), e em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água (b), e para os íons de sódio em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água: linha contínua preta, simulação 1; linha contínua cinza, simulação 2 e linha tracejada preta, simulação 3.

Um dado usualmente utilizado na análise estrutural de micelas é o número de coordenação dos átomos de carbono das cadeias alifáticas dos SDS com as moléculas de água (átomos de oxigênio). Para definir esse número usou-se a distância de 0.35 nm. Os resultados para cada átomo de carbono estão mostrados na figura 4.8. Esse comportamento é típico e repete resultados obtidos por outros autores (MacKerrel, 1995, Bruce et al, 2002 e Gao et al, 2005). Ele revela que os carbonos C1 e C2, que estão localizados próximos à cabeça polar estão hidratados assim como os átomos de carbono da outra extremidade das cadeias acílicas mostrando que estas cadeias possuem uma significativa liberdade rotacional. Os carbonos centrais da cadeia alifática, de 4 a 11, são pouco hidratados sugerindo que o interior da micela é pouco hidratado.

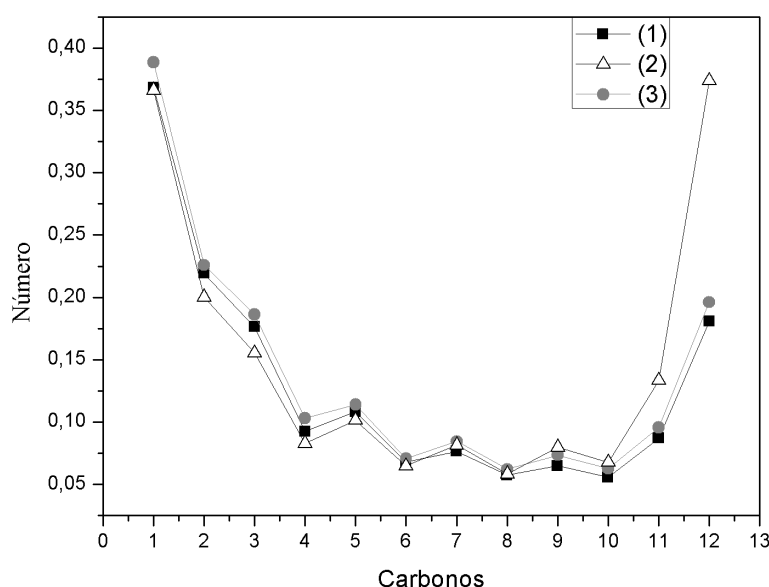


Figura 4.8: Número de coordenação dos átomos de carbono das cadeias acílicas em relação às moléculas de água (átomo de oxigênio) numa distância de 0.35 nm: (1) simulação 1, (2) simulação 2 e (3) simulação 3.

4.3.2- Análise estrutural do Peptídeo

O peptídeo MP-I não possui dados estruturais de Raio-X ou de RMN, portanto sua estrutura secundária não é conhecida. Considerando a homologia entre este peptídeo e o peptídeo MP-X, que tem estrutura de RMN depositada no PDB, dados experimentais de dicroísmo circular e de simulação por dinâmica molecular em misturas TFE-água, Broggio Costa (Broggio Costa, 2006 e dos Santos Cabrera et al., 2008) foi proposta uma estrutura em α -hélice para o MP-I. Essa estrutura foi utilizada como conformação inicial do peptídeo nas simulações realizadas.

Na figura 4.9 apresentamos os padrões de estruturas secundárias para cada resíduo do peptídeo como função do tempo de simulação para a simulação 1 (Figura 4.9 (a)), para a simulação 2 (Figura 4.9 (b)) e para a simulação do peptídeo em água (Figura 4.9 (c)). A classificação nestes padrões é obtida usando o programa DSSP (Kabsch et al, 1983).

A figura 4.9(a) mostra que durante, praticamente, os 100 ns de simulação os resíduos de 3 a 13 permaneceram estruturados em α -hélice. Isso significa que aproximadamente 78,6% dos resíduos do peptídeo se mantiveram nessa conformação durante a simulação, valor comparável ao obtido experimentalmente por dicroísmo circular - 74,1% - para uma solução aquosa de 30 mM de SDS (Wang et al., 2008).

Para a simulação 2, processo de automontagem da micela na presença do peptídeo, por outro lado, esse bloco estruturado limita-se aos resíduos de 3 a 10, como é evidente da figura 4.9(b). Os resíduos das extremidades da cadeia nessa simulação permanecem em conformação aleatória, o que se pode considerar esperado levando em conta a liberdade estrutural destes resíduos. Apesar da diferença no número de resíduos em padrão de α -hélice, nas duas simulações, os resultados indicam que a estrutura helicoidal para o peptídeo MP-I é estável em ambientes anfipáticos, sejam eles com cabeças polares catiônicas, compensadas por contra-íons, como nas micelas de SDS ou em misturas TFE-água cuja polaridade é sensivelmente menor (Broggio Costa, 2006).

A estabilidade da estrutura secundária do peptídeo depende do ambiente micelar. Essa afirmação pode ser verificada contrastando as simulações na presença da micela com a simulação do peptídeo em água (simulação 4), para a qual os padrões de estrutura secundária por resíduo estão dispostos na Figura 4.9(c). Dela verifica-se que apenas um pequeno grupo de resíduos, do 3 ao 6, permanecem estruturados como α -hélice em quase todo o período simulado (~400 ns). A conjectura é que a estrutura é rompida pela presença de moléculas de água na vizinhança da cadeia principal do peptídeo, rompendo as pontes de hidrogênio que colaboram para estabilizar a estrutura helicoidal.

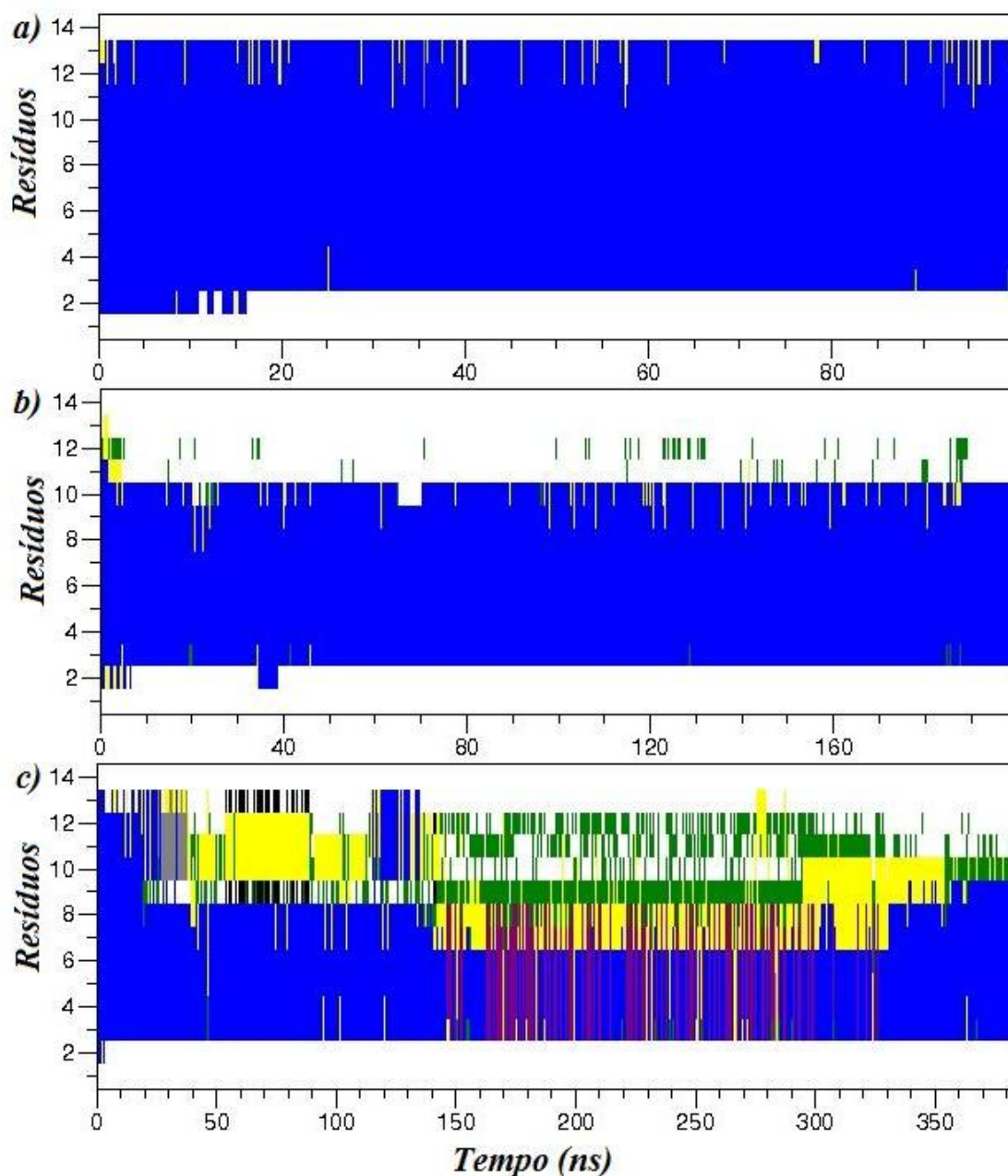


Figura 4.9: Padrões de estrutura secundária por resíduo ao longo da simulação para o peptídeo MP-I: a) para a simulação 1, b) para a simulação 2 e c) para a simulação do peptídeo MP-I em solução aquosa (simulação 4). Em branco, resíduos em conformação aleatória; em amarelo, resíduos em voltas (“turn”); em azul, resíduos em α -hélice; em verde, resíduos em curvas (“bend”); em preto, resíduos em folha- β e em roxo, resíduos em hélice 5.

As ligações pelo hidrogênio entre o oxigênio da carbonila do n -ésimo resíduo e o nitrogênio do grupo amina do resíduo $n + 4$, são fundamentais para a caracterização e manutenção da estrutura em α -hélice. Na Tabela 4.2 estão dispostos os resultados obtidos para o tempo de permanência (percentagem do tempo de simulação) das possíveis ligações pelo hidrogênio para as simulações 1, 2 e 4. Observa-se, como era

esperado da análise dos padrões acima, que, para a simulação 1, a maior parte das possíveis ligações de hidrogênio da cadeia principal permanecem intactas durante quase toda a simulação. Mesmo o resíduo 14, não classificado pelo DSSP na estrutura helicoidal, faz essa ligação com o resíduo 10, 80% do tempo de simulação. Para a simulação 2 essas ligações só ocorrem para os resíduos iniciais da cadeia – do resíduo 2 ao resíduo 11. Para a simulação 4, do peptídeo em solução aquosa, essas ligações ocorrem significativamente dos resíduos 2 ao 9, e em porcentagens menores comparadas as das outras simulações.

Tabela 4.2: Porcentagem de permanência temporal das ligações pelo hidrogênio do tipo n-n+4 para a cadeia principal dos resíduos do peptídeo.

	2-6	3-7	4-8	5-9	6-10	7-11	8-12	9-13	10-14
1	90%	94%	96%	95%	96%	95%	81%	67%	81%
2	89%	95%	97%	90%	90%	60%	0,0%	0,0%	0,0%
4	86%	75%	55%	53%	25%	3,3%	3,1%	13%	6,8%

O número máximo de possíveis ligações do tipo n – n+4 para o peptídeo MP-I com C-terminal amidado é 11. Se considerarmos como estáveis as ligações com tempo de permanência acima de 75 %, os dados da tabela 4.2 mostram que 8, 5 e 2, respectivamente, são as ligações estáveis para as simulações 1, 2 e 4. Dados que confirmam as observações feitas a partir das Figuras 4.9 (a), (b) e (c) sobre a estabilidade da conformação em α -hélice.

Curiosamente a ligação 1 – 5 nunca se forma e o programa DSSP raramente classifica o resíduo 2 no padrão helicoidal. A razão para isso parece ser a existência de uma ligação de hidrogênio entre o a carbonila da cadeia lateral do aspártico na posição 2 com o NH da cadeia principal da lisina 5, que existe por cerca de 30 % do tempo de simulação. Além disso, como discutiremos abaixo a Isoleucina na posição 1 é altamente hidratada. Essa situação foi também observada em simulações do peptídeo em mistura TFE-água (Broggio Costa, 2006).

A pequena variabilidade conformacional dos resíduos no interior da cadeia peptídica, resíduos 3 ao 9 nas simulações 1 e 2, são confirmadas pelos dados de RMSD e RMSF. Na Figura 4.10 (a) e (b) estão dispostos os resultados obtidos para o RMSD e RMSF, respectivamente, para as simulações 1, 2 e 4. Tanto o RMSD como o RMSF estão calculados para os átomos da cadeia principal e tem como referencia a

conformação inicial do peptídeo (RMSD) e a conformação média obtida da dinâmica (RMSF).

Da figura 4.10(a) observa-se que, para a simulação 1, os valores do RMSD tem um ligeiro aumento após os primeiros 20 ns de simulação e depois permanecem oscilando em torno de um valor de 0.16 nm, mostrando que há um ajuste inicial da conformação do peptídeo sem, contudo, tirá-lo da conformação de α -hélice. No caso da simulação 2 há um aumento rápido do RMSD nos primeiros nano segundos de simulação, compatível com o fato dos resíduos do final da cadeia perderem a conformação em α -hélice, estabilizando-se o RMSD num valor ligeiramente superior ao da simulação 1 nos últimos 80 ns, para os quais a dinâmica foi considerada equilibrada. Por outro lado, e compatível aos dados da Figura 4.9 (c), os valores de RMSD obtidos para a simulação 4 indicam uma variação significativa em relação à conformação inicial, mostrando que parte significativa da conformação helicoidal é perdida na simulação em água. Os valores obtidos para o RMSF por resíduo são compatíveis a esses dados, pois para as simulações 2 e 4 há obviamente uma maior variabilidade conformacional, sobretudo da parte final da cadeia peptídica.

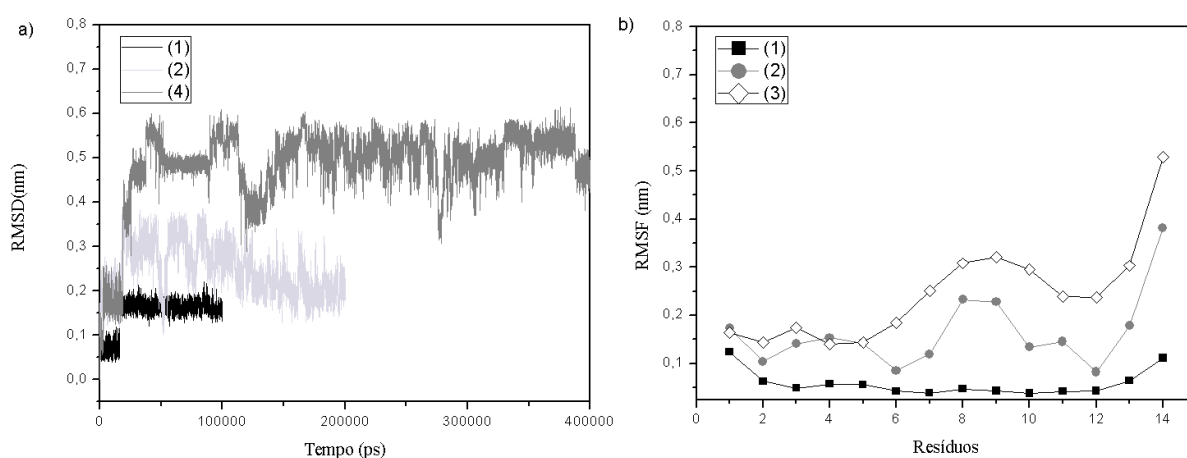


Figura 4.10: a) RMSD em função do tempo de simulação e b) RMSF em função dos resíduos do peptídeo. Em preto, dados obtidos na simulação 1, em cinza claro, dados obtidos na simulação 2 e em cinza escuro, dados obtidos da simulação 4.

Moléculas d'água na vizinhança da cadeia principal do peptídeo podem competir pelas ligações de hidrogênio entre a carbonila e o grupo amina, devido a polaridade das moléculas de água. Essa competição pode conduzir à quebra das ligações $CO_n - NH_{n+4}$ produzindo a desestabilização da estrutura secundária. Nesse sentido, estudar a hidratação da cadeia principal é relevante para avaliar a inter-relação ambiente-estrutura secundária. Na figura 4.11 estão mostrados os resultados obtidos para o número médio

de moléculas de água contidos numa esfera de 0.5 nm de raio centrada em cada um dos C_{α} do peptídeo, integrando a função distribuição radial de pares para o par C_{α} -OW (água), para as três simulações 1, 2 e 4.

Para a simulação 1 o número de moléculas na distância considerada é sempre menor do que três, com exceção dos C_{α} dos resíduos das extremidades (1, 2 e 12). Esses dados são compatíveis com uma conformação em α -hélice anfipática, pois os resíduos 3, 6, 7 e 10, praticamente, não apresentam moléculas de água nas vizinhanças de seus C_{α} . Os resíduos 4, 5, 8, 9 e 11 apresentam um número da ordem de duas moléculas de água e são, com exceção do resíduo 9, todos carregados. Essa baixa quantidade de moléculas de água nas vizinhanças desses grupos indica a ausência de competição das moléculas de água pelos grupos doadores e aceptadores de prótons da cadeia principal, proporcionando a estabilidade das ligações de hidrogênio tipo $n - n+4$, discutidas acima.

O padrão de distribuição de moléculas de água ao redor dos C_{α} na simulação 2 segue um padrão semelhante ao da simulação 1 com exceção dos resíduos 8 e 9 que apresentam uma quantidade de moléculas de água maior, principalmente o resíduo 9. Comparando essa informação com a existência e estabilidade de ligações de hidrogênio (Tabela 4.2) vê-se que a ligação 9 – 11 não se forma no período da simulação 2 analisado (120 a 200 ns). Isso é compatível com uma competição das moléculas de água, como doadora de próton, pela carbonila (CO), aceptadora. A disparidade da hidratação do resíduo 9 pode ser a principal responsável pelas diferenças de conformação e estabilidade entre as simulações 1 e 2.

Para as simulações 1 e 2 o peptídeo mantém parte significativa de seus resíduos em α -hélice anfipática, como está ilustrado na figura 4.12. A face hidrofóbica, formada pelos resíduos hidrofóbicos (3, 6, 7, 9, 10), pouco hidratados, com a possível exceção do resíduo 9 na simulação 2, está voltada para o centro de massa da micela, interagindo preferencialmente com as caudas acílicas dos monômeros de SDS, enquanto a face hidrofílica, formada pelos resíduos polares ou carregados (1, 2, 4, 5, 8, 11, 12) localiza-se, preferencialmente, na interface das cabeças polares com o solvente e, portanto, são mais hidratadas. (Voltaremos a essa discussão na próxima seção). De passagem é conveniente destacar que o tipo de inserção do peptídeo na micela está de acordo com as sugestões dos modelos de interação em membranas, sendo uma ilustração inequívoca da primeira etapa, qual seja o ancoramento e inserção paralela a membrana.

Como era de se esperar a simulação 4 apresenta um quadro completamente distinto das outras duas simulações com relação à hidratação dos C_{α} . Nesse caso somente os resíduos 3, 5, 6 e 7 têm menos do que três moléculas ao redor dos C_{α} e as únicas ligações tipo $n - n+4$ da cadeia principal que apresentam alguma estabilidade são a de 2 – 6 (85 %) e de 3 – 7 (55%). O C_{α} do resíduo 6 apresenta um valor próximo a 1 para o número de moléculas de água ao seu redor, enquanto o C_{α} do resíduo 7 é da ordem de três, portanto com maior probabilidade de doar o próton (NH) para uma molécula de água, razão pela qual a ligação $CO_3 - NH_7$ é menos estável do que a $CO_2 - NH_6$.

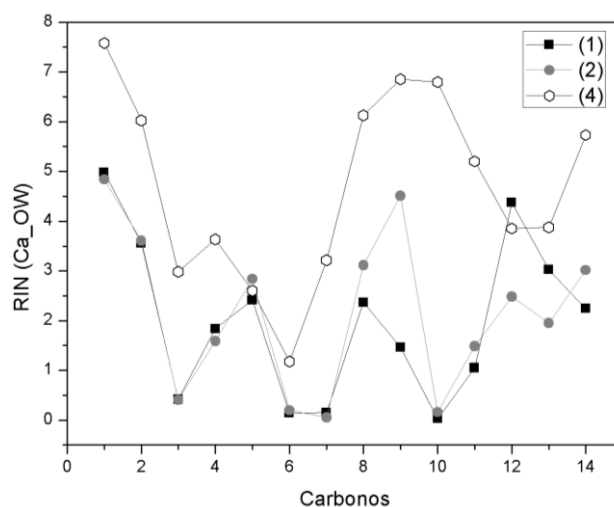


Figura 4.11: Número médio de moléculas de água (átomos de oxigênio) contidos numa esfera de 0.5 nm centrada em cada C_{α} do peptídeo. Em (1), dados da simulação 1 e em (2) dados da simulação 2.

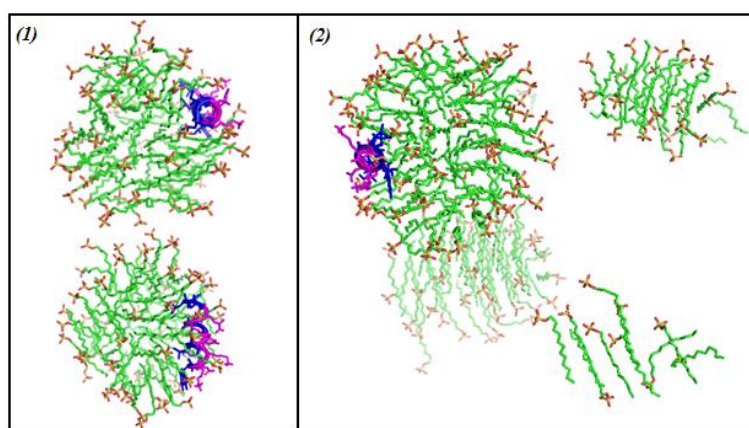


Figura 4.12: Distribuição dos monômeros de SDS e do peptídeo. (1) configuração final para a simulação 1 após 100ns de simulação e (2) configuração final para a simulação 2 após 200 ns de simulação. Em azul, resíduos hidrofóbicos do peptídeo; em rosa, resíduos hidrofílicos do peptídeo e em verde, cadeias alifáticas dos monômeros de SDS. Da cabeça polar dos monômeros de SDS destacamos em vermelho os átomos de oxigênio e em amarelo os átomos de enxofre.

No trabalho de Broggio Costa (Broggio Costa, 2006) foi proposto que a estabilidade da conformação helicoidal anfipática obtida para o peptídeo numa simulação em misturas de TFE-água também se devia, além de outras interações, ao arranjo de cargas entre a carga negativa da cadeia lateral do ácido aspártico 2 e as cargas positivas do N-terminal e lisinas 4 e 5, e o arranjo semelhante para o ácido aspártico 8, as lisinas 4, 5 11 e o grupo polar da glutamina 12. Esses arranjos proporcionavam uma diminuição na repulsão eletrostática e conseqüentemente serviam como coadjuvantes na estabilidade das estruturas. Estabilidade de estruturas secundárias por pontes salinas entre grupos carregados de cadeias laterais foram sugeridas por Baldwin e colaboradores (Marqusee et al, 1989). Na Tabela 4.3 estão dispostos os valores médios e respectivos desvios quadráticos para as distância entre os grupos carregados das Asp 2 e 8 e os grupos carregados do N-terminal, lisinas 4, 5 e 11, da glutamina 12 e do amina no C-terminal para as três simulações.

Tabela 4.3: Distâncias médias entre os grupos de cargas e grupos polares das cadeias laterais do peptídeo MP-I para as três simulações. Para as lisinas selecionamos o centro de massa do grupo NH_3^+ , para glutamina e grupo amida do C-terminal selecionamos o centro de massa do grupo NH_2 , e para os ácidos aspárticos selecionamos o centro de massa do grupo COO^- . Todas as distâncias estão em nanômetros (nm).

		<i>Nter</i>	<i>Lys4</i>	<i>Lys5</i>	<i>Lys11</i>	<i>Gln12</i>	<i>Cter</i>
<i>1</i>	<i>Asp2</i>	0,71±0,06	0,73±0,21	0,68±0,23	1,41±0,20	1,35±0,19	1,98±0,13
	<i>Asp8</i>	1,42±0,18	1,08±0,13	0,79±0,20	0,57±0,15	0,52±0,20	1,18±0,12
<i>2</i>	<i>Asp2</i>	0,71±0,06	0,71 ± 0,19	0,59±0,16	1,42± 0,17	1,69 ±0,17	2,52±0,10
	<i>Asp8</i>	1,50± 0,08	1,11± 0,09	0,83 ±0,19	0,58± 0,14	1,00 ±0,16	1,72± 0,11
<i>4</i>	<i>Asp2</i>	0,74±0,04	0,80 ± 0,14	0,61±0,15	1,44± 0,36	0,97 ±0,26	1,08±0,33
	<i>Asp8</i>	1,38± 0,32	0,78± 0,28	0,98 ±0,28	1,26± 0,31	1,22 ±0,33	1,44± 0,11

Na Figura 4.13, como exemplo do tipo de arranjo geométrico referido, mostra-se um instantâneo da simulação 1, destacando por linhas pontilhadas os grupos de cargas positivas e/ou polares (N-terminal, lys 4, 5 e 11 e Gln 12) com as cargas negativas dos ácidos aspárticos (Asp 2 e 8).

A análise da Tabela 4.3 é muito semelhante para as três simulações se tomarmos como referencia o arranjo em torno da Asp 2. Há um pequeno aumento nos valores obtidos para as distâncias médias, mas elas permanecem no intervalo de oscilação indicado pelo desvio quadrático médio. Ao mesmo tempo os dados anteriores mostram

que essa é a parte da cadeia peptídica que se mantém em conformação helicoidal nas três simulações.

O arranjo em torno da Asp 8 é diferente para cada simulação. Na simulação 1 o grupo COO^- da Asp 8 dista, em média, 0.57 nm da Lys 11 e 0.52 do grupo polar NH_2 da Gln 12. Na simulação 2, por outro lado, essas distâncias são respectivamente 0.58 e 1.00 nm, ou seja, embora a distância entre Asp 8 e Lys 11 se mantenha, a interação entre a Asp 8 e a Gln 12 praticamente desaparece se considerarmos que essa é uma interação tipo carga-dipolo. Além disso, a lisina 5 parece ter um papel importante pois as distâncias do NH_3^+ com a Asp 2 e 8 são respectivamente, 0.59 ± 0.16 e 0.83 ± 0.19 , na simulação 2 e 0.68 ± 0.23 e 0.79 ± 0.20 nm, na simulação 1, ou seja, embora a diferença esteja na barra de erro, o resultado indica que a lisina 5 está mais presa ao Asp 2 na simulação 2 do que na simulação 1. Esses dois fatores em conjunto podem ser responsáveis pela instabilidade da ligação de hidrogênio entre os resíduos 7 – 11 e a não formação da ligação 8 – 12 da cadeia principal na simulação 2 e à não manutenção da estrutura helicoidal nessa simulação. Por fim, na simulação 4 perde-se completamente esse arranjo pelos dados dispostos na tabela 4.3 e não é de se estranhar que a conformação helicoidal dessa parte do peptídeo se perca também.

Se a manutenção destes arranjos são as causas para as alterações conformacionais ou apenas conseqüências delas demanda maior investigação, o que está sendo feito com um peptídeo análogo ao MP-I, mas modificado na posição 2. De qualquer forma, os dados apontam, resumidamente, que a manutenção destes arranjos está correlacionada à estabilidade da estrutura helicoidal anfipática observada no trabalho de Broggio Costa em mistura TFE-água e neste trabalho na presença de micelas de SDS.

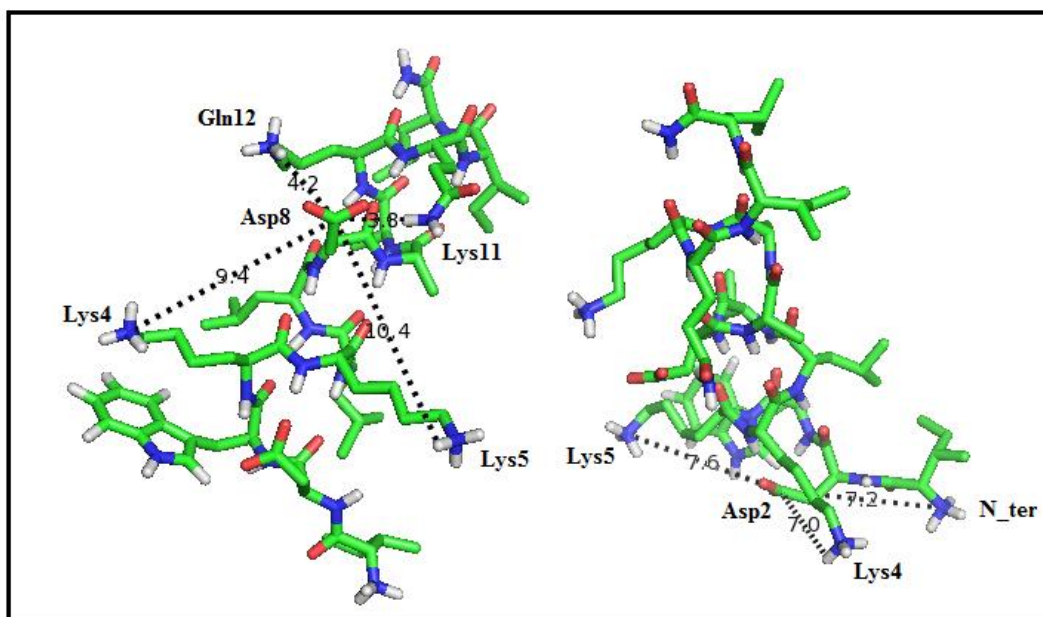


Figura 4.13: Estrutura, no instante 50 ns da simulação 1 destacando os arranjos geométricos formados pelos grupos de cargas positivas (N-ter, Lys 4 e Lys5) e a carga negativa (Asp2) e entre o grupo (Lys4, Lys5, Lys11 e Gln 12) e a carga negativa (Asp8) através das linhas tracejadas pretas. Em azul, átomos de nitrogênio; em branco, átomos de hidrogênio; em verde, átomos de carbono e em vermelho, átomos de oxigênio.

4.3.3- Análise da interação peptídeo-aglomerado

A análise do sistema precisa ser completada com estudos sobre a interação entre o peptídeo e o aglomerado. Aspectos como a inserção e posição relativa do peptídeo na micela são relevantes e podem ser revelados tanto pela visualização da dinâmica nos seus diferentes instantes, como pelo estudo do ambiente ao redor do peptídeo.

Na Figura 4.14 está mostrada como função do tempo a distância entre os centros de massa da micela e do peptídeo. As diferenças de comportamento no início das duas simulações é evidente. Para a simulação 1, há uma rápida queda nesse valor evidenciando que o peptídeo se insere rapidamente na micela, enquanto para a simulação 2 a micela vai se formando com o peptídeo já inserido. Depois da inserção as duas simulações mostram que essa distância flutua entre valores de 1.3 a 1.7 nm, com valores médios de 1.36 e 1.41 nm, respectivamente, para as simulações 1 e 2, como será discutido abaixo.

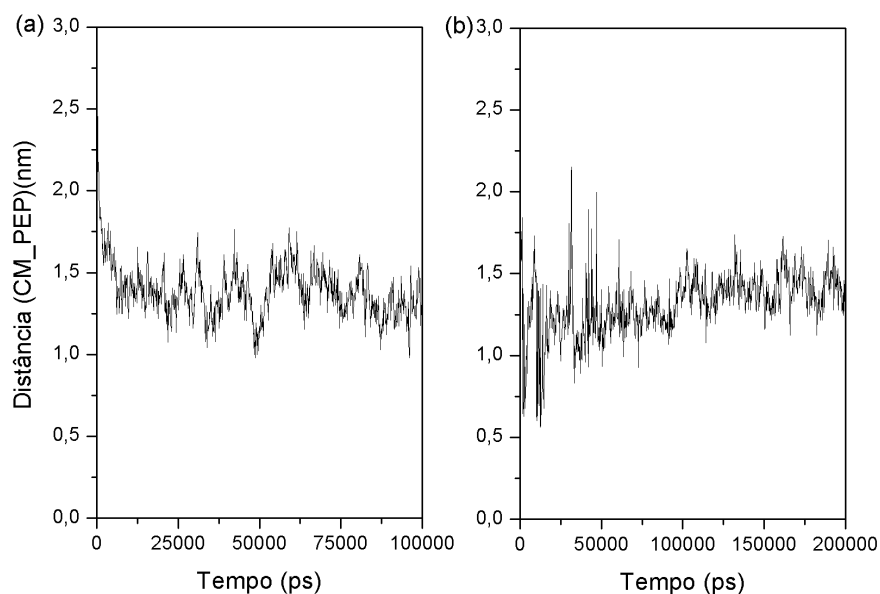


Figura 4.14: Distância entre os centros de massa da micela e do peptídeo como função do tempo de simulação: a) dados da simulação 1 e em b) dados da simulação 2.

Na Figura 4.15 estão mostradas as energias de longo alcance (Coulomb mais Lennard-Jones) para a interação SDS – peptídeo e solvente – peptídeo. Novamente, no início da simulação 1 há uma sensível queda da energia entre SDS – peptídeo (curva SDS-PROT) seguida de uma relativa estabilidade. Na simulação 2, por outro lado a energia flutua em torno do valor final desde alguns poucos nano segundos de simulação, a despeito de todo o rearranjo discutido anteriormente da micela de SDS.

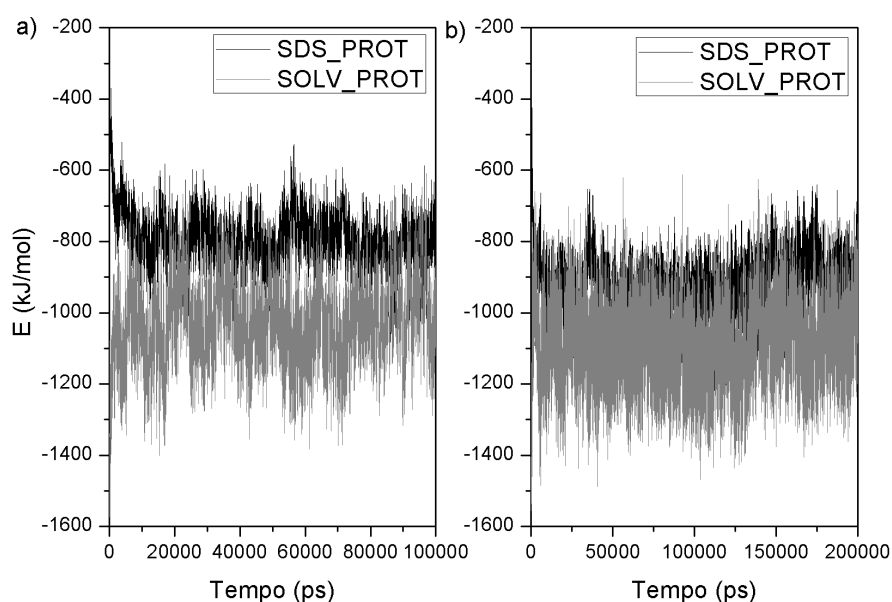


Figura 4.15: Evolução temporal dos termos de energia de longo alcance, Coulomb mais Lennard-Jones, para a interação entre os surfactantes SDS e o peptídeo, em preto, e para as moléculas do solvente e o peptídeo, em cinza: a) simulação 1 e b) simulação 2.

Na Tabela 4.4 está apresentado um conjunto de distâncias médias que permitem caracterizar a micela, o peptídeo e a inserção do peptídeo na micela. As três primeiras linhas são de dados da micela, o primeiro dos quais já discutido acima. O raio de parafina, R_{par} está em razoável acordo com dados de simulação por dinâmica molecular (1.7 nm) (Shang et al, 2008) e experimentais (1.67 nm) (Itri et al, 1991). Considerando que os carbonos C_1 e C_2 estão mais hidratados pode-se imaginar a micela dividindo o espaço numa região hidrofóbica, das caudas acílicas, de raio entre 0 e ~ 1.6 nm e uma coroa esférica com raio interno ~1.6 nm e raio externo entre 2.0 e 2.5 nm considerando a camada de contra-íons de sódio.

Tabela 4.4: Conjunto de distâncias para análise da interação peptídeo - micela

<i>Simulação</i> <i>Distância(nm)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
R_S	1.93 ± 0.02	1.99 ± 0.02
R_{par}	1.76 ± 0.02	1.82 ± 0.02
R_{C12}	1.10 ± 0.04	1.12 ± 0.03
$d_{end-to-end}$	2.24 ± 0.11	2.74 ± 0.15
$d_{COM-CMPEP}$	1.36 ± 0.14	1.41 ± 0.10
d_{COM-N1}	1.76 ± 0.16	1.85 ± 0.24
$d_{COM-N15}$	1.56 ± 0.17	1.92 ± 0.17
d_{N1-N10}	1.41 ± 0.07	1.44 ± 0.07

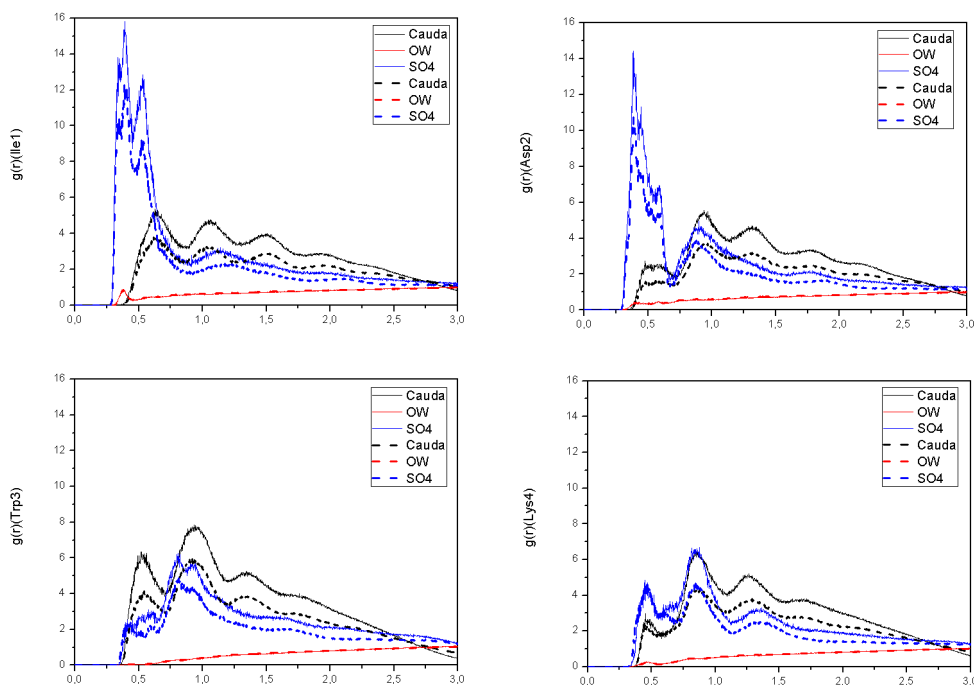
R_S – Raio micelar medido como a distância média do centro de massa da micela (COM) até o átomo de enxofre (S) da cabeça polar; R_{par} – raio de parafina, distância média do COM até o átomo C_1 das moléculas de SDS; R_{C12} distância média do COM até o átomo C_{12} das moléculas de SDS; $d_{end-to-end}$ distância entre os átomos de Nitrogênio do resíduo 1 e do grupo amina do C-terminal; $d_{COM-CMPEP}$, d_{COM-N1} , $d_{COM-N15}$ distâncias médias do COM ao centro de massa do peptídeo e átomos de Nitrogênio dos resíduos 1 e C-terminal, respectivamente e d_{N1-N10} distâncias entre átomos de Nitrogênio dos resíduos 1 e 10.

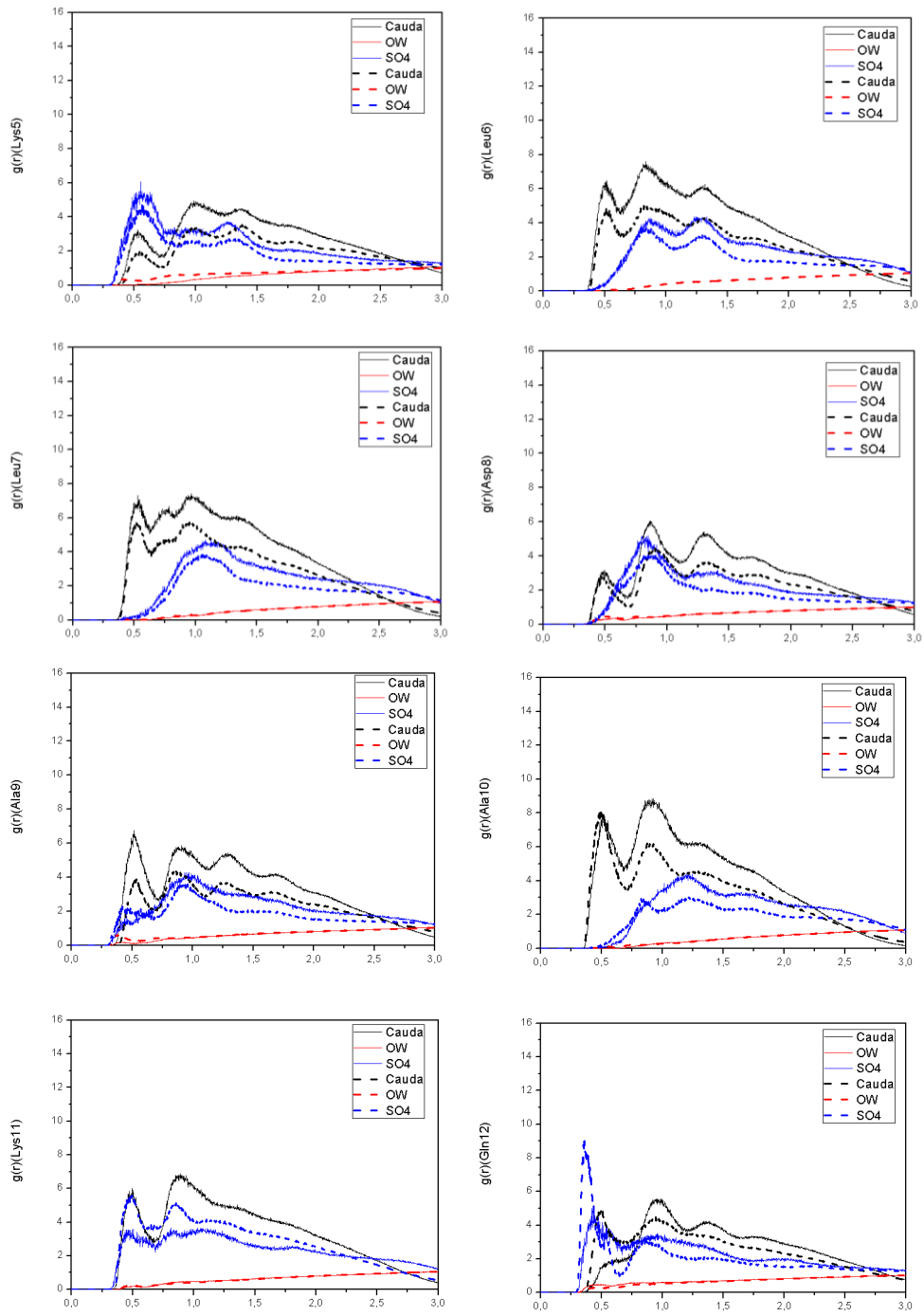
Os demais dados são relativos ao peptídeo. A comparação dos valores $d_{end-to-end}$ e d_{N1-N10} expõe a desestruturação da α -hélice na parte final do peptídeo que ocorre no processo de automontagem. Os valores de d_{N1-N10} são essencialmente iguais porque na seqüência dos resíduo de 3 ao 10 o peptídeo se encontra em α -hélice nas duas simulações. Essa estrutura permanece na simulação 1 até o resíduo 13 enquanto na simulação 2 a seqüência é desestruturada. Essa diferença resulta numa distância entre

extremos que é aproximadamente 0.5 nm maior na simulação 2 em comparação com a simulação 1.

Os dados para as distâncias $d_{\text{COM} - \text{CMPEP}}$, $d_{\text{COM} - \text{N1}}$ e $d_{\text{COM} - \text{N15}}$ fornecem informações sobre a inserção do peptídeo na micela. Essa inserção é com o peptídeo posicionado paralelamente à superfície da micela, com seu centro de massa, que se localiza próximo ao eixo da hélice entre os resíduos 7 e 8, na região das caudas acíclicas das moléculas de SDS, ou seja, $d_{\text{COM} - \text{CMPEP}}$ igual a 1.36 e 1.41 nm para as simulações 1 e 2, respectivamente. Por outro lado as extremidades do peptídeo estão localizadas nas regiões das cadeias polares e/ou dos raios de parafinas. Resumidamente, portanto, o peptídeo se insere na micela protegendo a cadeia principal dos resíduos centrais na região hidrofóbica e as extremidades permanecem na região das cabeças polares que é hidrofílica, como descrito em vários trabalhos citados no capítulo 1.

Essas informações são comprovadas pela análise da função distribuição de pares ao redor dos C_{α} dos resíduos do peptídeo. Na figura 4.16 mostramos essas funções com os grupos: sulfato SO_4 , as caudas acíclicas das moléculas de SDS e as moléculas de água (átomo de oxigênio, OW) para todos os C_{α} do peptídeo.





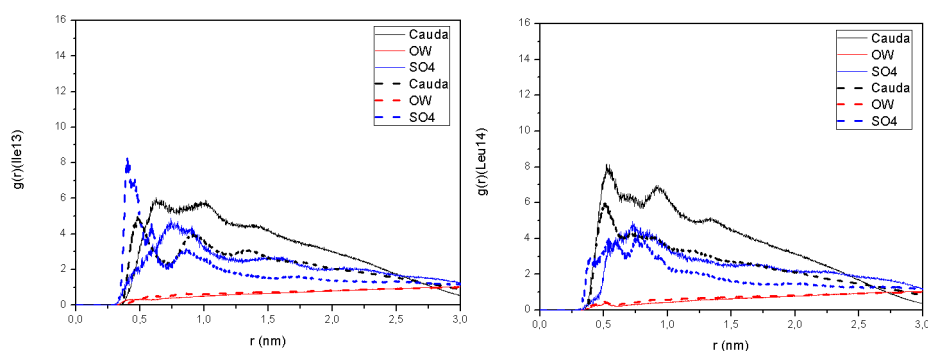


Figura 4.16: Distribuição radial de pares de algumas moléculas ao redor dos C_{α} dos resíduos do peptídeo. Em vermelho, de átomos de oxigênio de moléculas da água; em azul, de grupos sulfatos dos SDS e em preto, das caudas alifáticas dos SDS. A linha contínua corresponde aos dados da simulação 1 e a linha tracejada aos dados da simulação 2.

As funções de distribuição radial de pares da Figura 4.16 mostram que os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, com exceção da Ile 13, têm como vizinhança de seus C_{α} as caudas apolares dos monômeros de SDS, enquanto os resíduos hidrofílicos, a única exceção é o Asp 8, estão num ambiente rico de grupos SO_4 e água. De fato, calculando a distância média de cada C_{α} do peptídeo ao centro de massa da micela, dados mostrados na Tabela 4.5, confirmam-se estes dados, sobretudo se lembrarmos que a região anular entre 1.50 e ~ 1.75 nm define a interface entre a parte hidrofóbica e hidrofílica da micela.

Os dados da figura 4.16 constituem verdadeiras impressões digitais das interações dos diferentes resíduos com o solvente e a micela. A análise destes dados podem dar indicações de como modificar o peptídeo para potencializar uma função biológica desejada.

Os grupos carregados das cadeias laterais do peptídeo, por outro lado estão dispostos na média na região das cabeças polares, como mostram os dados da Tabela 4.6, na qual estão calculadas a distância dos centros de massa dos diversos grupos carregados ao centro de massa da micela.

Tabela 4.5: Distâncias médias dos átomos de C_α do peptídeo ao centro de massa da micela. Todas as distâncias estão em nm.

<i>Resíduo</i> \ <i>Simulação</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
<i>Ile 1</i>	1.68 ± 0.15	1.84 ± 0.16
<i>Asp 2</i>	1.68 ± 0.14	1.80 ± 0.15
<i>Trp 3</i>	1.40 ± 0.15	1.49 ± 0.15
<i>Lys 4</i>	1.59 ± 0.16	1.64 ± 0.15
<i>Lys 5</i>	1.63 ± 0.13	1.74 ± 0.13
<i>Leu 6</i>	1.28 ± 0.14	1.42 ± 0.13
<i>Leu 7</i>	1.25 ± 0.15	1.30 ± 0.13
<i>Asp 8</i>	1.56 ± 0.15	1.62 ± 0.13
<i>Ala 9</i>	1.46 ± 0.16	1.58 ± 0.13
<i>Ala 10</i>	1.18 ± 0.16	1.26 ± 0.14
<i>Lys 11</i>	1.43 ± 0.16	1.44 ± 0.15
<i>Gln 12</i>	1.66 ± 0.16	1.59 ± 0.14
<i>Ile 13</i>	1.50 ± 0.18	1.75 ± 0.16
<i>Leu 14</i>	1.39 ± 0.17	1.70 ± 0.21

Tabela 4.6: Distâncias dos centros de massa dos grupos carregados das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido do peptídeo ao centro de massa da micela. Todas as distâncias estão em nm.

<i>Grupo lateral</i>	<i>Resíduo</i>	<i>Simulação1</i>	<i>Simulação 2</i>
<i>NH₃⁺</i>	<i>Ile 1</i>	1.76 ± 0.16	1.92 ± 0.17
<i>COO⁻</i>	<i>Asp 2</i>	1.83 ± 0.14	1.95 ± 0.16
<i>NH₃⁺</i>	<i>Lys 4</i>	1.98 ± 0.20	2.00 ± 0.20
<i>NH₃⁺</i>	<i>Lys 5</i>	2.09 ± 0.15	2.22 ± 0.15
<i>COO⁻</i>	<i>Asp 8</i>	1.80 ± 0.14	1.86 ± 0.13
<i>NH₃⁺</i>	<i>Lys 11</i>	1.82 ± 0.16	1.83 ± 0.13
<i>CONH₂</i>	<i>Gln 12</i>	1.87 ± 0.17	1.59 ± 0.19

Esse modelo de inserção do peptídeo vem sendo proposto há longo tempo (ver discussão no capítulo 1). Nele um peptídeo em conformação de α-hélice anfipática se

“enterra” na micela ou membranas modelo, protegendo os resíduos hidrofóbicos e expondo os hidrofílicos, principalmente aqueles com grupos carregados à região externa da micela. Recentemente, Khandelia e Kaznessis (Khandelia et al, 2005) mostraram que o peptídeo OVIS ao interagir com uma micela de monômeros de SDS constitui-se num segmento anfipático posicionado entre as cabeças polares e as cadeias carbônicas dos monômeros de SDS, com as cadeias hidrofóbicas do peptídeo ancoradas no interior da micela e a face hidrofílica exposta ao solvente.

Pelas suas propriedades fluorescentes o triptofano tem sido utilizado como uma sonda para o estudo do ambiente (solvatação) no qual está inserido. Por exemplo, na interação de peptídeos, contendo triptofano, com sistemas miméticos de membranas, o desvio para o azul (blue shift) do pico de intensidade do espectro de fluorescência indica a preferência do triptofano por um ambiente mais hidrofóbico. Freitas e colaboradores (Freitas et al. 2007) mostraram que o peptídeo EBO₁₆ na presença de micelas de SDS localizam-se preferencialmente na região das caudas alifáticas das moléculas de SDS. Leite e colaboradores (Leite, et al. 2010) mostraram que o peptídeo MP-I na presença de vesículas aniônicas e zwitteriônicas também preferem a região das caudas apolares. Para estudar a solvatação do triptofano, apresentamos na figura 4.17 as curvas da função distribuição radial de pares entre o centro de massa da cadeia lateral do triptofano com o oxigênio da água, as cabeças polares (grupo SO₄) e as caudas acílicas dos monômeros de SDS.

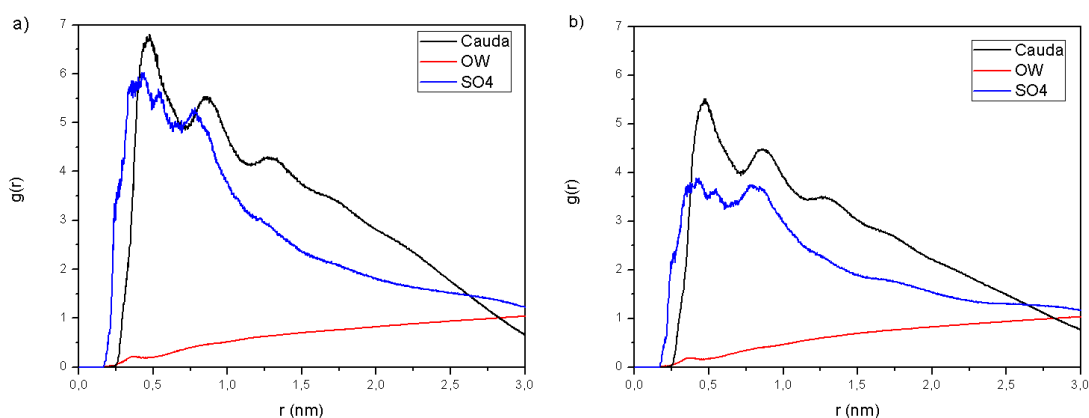


Figura 4.17: Distribuição radial de pares da cadeia lateral Trp3 em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água, linha vermelha, das cabeças polares dos monômeros de SDS, linha azul, e das caudas acílicas dos monômeros de SDS, linha preta. Em a) dados para a simulação 1 e em b) dados para a simulação 2.

Da figura 4.17 pode-se inferir que o triptofano se encontra na região entre as cabeças polares e as caudas apolares, pois os picos principais da função de distribuição encontram-se, essencialmente às mesmas distâncias. As intensidades indicam uma preferência suave (um pouco mais marcada para a simulação 2) pela região apolar. Como a cadeia lateral do Trp não pode obviamente estar nos dois lugares ao mesmo tempo, esses dados sugerem uma dinâmica de equilíbrio na qual a cadeia lateral do triptofano oscile entre as regiões apolares e polares da micela.

Na figura 4.18 está mostrada a evolução temporal de diversas distâncias que caracterizam o sistema micela-peptídeo, para a simulação 1. Para a simulação 2, quando o sistema está equilibrado, os dados apresentam o mesmo comportamento. As distâncias consideradas referem-se em todos os casos ao centro de massa da micela (COM). Elas são: ao centro de massa da cadeia lateral do Trp 3 (curva preta); o raio micelar (curva vermelha), o raio de parafina (distância média ao átomo C_1 – curva verde); distância média aos átomos C_{12} (curva azul) e distância ao centro de massa do peptídeo (curva amarela). Esses dados evidenciam o caráter dinâmico do equilíbrio, como comentado acima, e confirmam a inserção do peptídeo na micela, com certa liberdade de movimento para o peptídeo como um todo (ver curva verde) e que a cadeia lateral do triptofano apresenta flutuações adicionais, possivelmente oriundas de rotações em torno da cadeia principal.

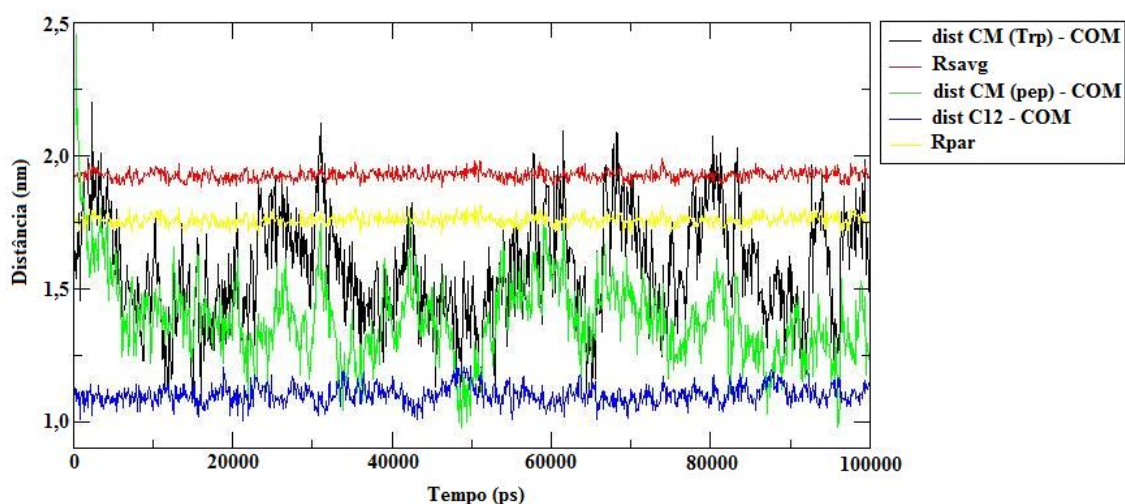


Figura 4.18: Evolução temporal de diversas distâncias que caracterizam o sistema micela-peptídeo, para a simulação 1. Estas distâncias são em relação ao centro de massa da micela. Elas são: ao centro de massa da cadeia lateral do Trp 3 (curva preta); ao átomo de enxofre S, raio micelar (curva vermelha), o raio de parafina (distância média ao átomo C_1 – curva verde); distância média aos átomos C_{12} (curva azul) e distância ao centro de massa do peptídeo (curva amarela).

4.4- Conclusões

O objetivo principal do trabalho era estudar a interação do polybia MP-I com a micela de SDS, discutindo a forma de inserção e estabilidade do peptídeo e da micela de SDS.

Mostramos nesse capítulo que o peptídeo se insere na micela paralelamente à superfície, com sua cadeia principal enterrada logo abaixo da região hidrofílica, seus resíduos hidrofóbicos voltados para as caudas acíclicas das moléculas de SDS e os grupos carregados na região de interface entre as cabeças polares, água e íons Na⁺. Essa conclusão apóia-se no estudo da solvatação dos C_α, mostrados na figura 4.16, nas posições médias destes mesmos átomos de carbono (tabela 4.5), nas posições médias do centro de massa, N-terminal e C-terminal do peptídeo relativo ao centro da micela.

Além disso, os dados da simulação 1 indicam que a inserção do peptídeo na micela é um processo rápido (alguns nano segundos) dirigido pela atração eletrostática e pelo colapso hidrofóbico. Esta inserção causa um pequeno aumento no raio micelar (tabela 4.1) da simulação 1 comparada à simulação 3 (micela na ausência do peptídeo). Um acréscimo adicional ocorre na simulação 2 comparada à simulação 1, devido ao aumento do número de peptídeos na micela. O volume médio ocupado por uma molécula de SDS na micela (simulação 3) é ~ 0.45 nm³, enquanto a diferença de volume entre as micelas com e sem o peptídeo é ~1.4 nm³, volume suficiente para abrigar um cilindro com 2.2 nm de comprimento (a distância entre extremos do peptídeo na conformação helicoidal da simulação 1) e de raio 0.45 nm, que é bem razoável para representar o peptídeo nessa conformação. O volume do peptídeo é mais difícil de estimar na simulação 2, pois parte da estrutura helicoidal é perdida. Mantendo o volume do peptídeo constante, ou seja, assumindo que o alongamento do mesmo seja compensado por uma área de base menor, o aumento do volume da micela formada na simulação 2 em relação àquela da simulação 1 é ~ 3.33 nm³, aproximadamente o volume necessário para abrigar as oito moléculas de SDS a mais dessa micela. Esses dados obtidos de forma simplificada indicam que a imagem de uma micela esférica com o peptídeo inserido em seu interior forma um quadro coerente.

O anel aromático do triptofano apresenta uma dinâmica que indica flutuações entre a parte apolar e a parte polar da micela. Essa dinâmica é bastante rápida (~ 15 ns) e os valores médios indicam uma ligeira preferência pelo meio apolar (~ 1,57 nm as duas simulações).

Indicamos que o peptídeo em interação com a micela de SDS pré-montada, mantém a estrutura helicoidal anfipática e a estabilidade pode ser atribuída à inserção num ambiente hidrofóbico, protegendo as ligações de hidrogênio da cadeia principal e também pelas pontes salinas entre os resíduos de ácido aspártico e as lisinas 4, 5 e 11. Mostramos que quando a micela é obtida por automontagem e na presença do peptídeo, o C-terminal do peptídeo se desestrutura e isso pode ser atribuído tanto a uma maior hidratação média dos C_{α} (figura 4.16 e tabela 4.5) como ao enfraquecimento da ponte salina envolvendo o resíduo Asp 8. Na simulação do peptídeo em água, a cadeia principal está exposta à água e a rede de ligações de hidrogênio do tipo $n, n+4$ se rompe desestruturando ainda mais o peptídeo. No intervalo de tempo simulado (400 ns) entretanto, mantêm-se uma volta de α -hélice, resíduos 3 ao 6, provavelmente devido a duas ligações de hidrogênio e à ponte salina.

Apesar das diferenças nos valores do raio micelar, a interação da micela com o peptídeo não produz modificações na micela suficientes para que esta deixe de ser esférica.

Estudos complementares envolvendo a interação do polybia MP-I com micelas zwitteriônicas e de peptídeos homólogos ao MP-I, obtidos por mutações pontuais, deixando o peptídeo mais ou menos hidratado e mais ou menos catiônico estão presentemente em curso e deverão permitir uma compreensão mais completa dos fatores determinantes para a interação de peptídeos antimicrobianos com membranas modelo.

Bibliografia

- [1] ALLEN, P. M. et al. **Comp. Sim. of Liq.**. Oxford: Clarendon Press, 1987.
- [2] ARGIOLOS, A. et al. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. **J. Biol. Chem**, v. 258, p. 13697-13702, 1983.
- [3] ASWAL, V. K. et al. Selective counterion condensation in ionic micellar solution. **Phys. Rev. E: Stat Phys, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.**, v. 67, p. 051401, 2003.
- [4] BALES, B. L. A definition of the degree of ionization of a micelle based on its aggregation number. **J. Phys. Chem. B.**, v. 105, p. 6798 – 6804, 2001
- [5] BALES, B. L. et al. Precision Relative Aggregation Number Determinations of SDS Micelles Using a Spin Probe. A Model of Micelle Surface Hydration. **J. Phys. Chem. B.**, v. 102, p. 10347-10358, 1998.
- [6] BECHINGER, B. et al. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 1758, p. 1529-1539, 2006.
- [7] BENDEDOUCH, D. et al. Structure of Ionic Micelles from Small Angle Neutron Scattering. **J. Phys. Chem**, v. 87, p. 153, 1983.
- [8] BERENDSEN, C. J. H. et al. Interaction models for water in relation to protein hydration. **Interm. Forces**, Dordrecht, Reidel Publishing, p. 331-342, 1981.
- [9] BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **J. Chem. Phys.**, v. 81, p.3684-3690, 1984.
- [10] BERENDSEN, C. J. H. et al. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Comp. Phys. Comm.**, v. 91, p. 43-56, 1995.
- [11] BOCCHINFUSO, G. et al. Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations. **J. Pept. Sci.**, v. 15, p. 550-558, 2009.
- [12] BOCKSTAHL, F. et al. Size of Sodium Dodecyl Sulphate Micelles in Aqueous NaCl Solutions as Studied by Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy. **Chem. Phys.**, v. 256, p. 307-313.
- [13] BOGUSZ, S. et al. Molecular Dynamics Simulation of Octyl Glucoside Micelles: Structural Properties. **J. Phys. Chem. B.**, v. 104, p. 5462-5470, 2000.
- [14] BOMAN, H. G. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 61-92, 1995.

- [15] BOND, P. T. et al. Membrane Protein Dynamics versus Environment: Simulations of OmpA in a Micelle and in a Bilayer. **J. Molec. Biol.**, v. 239, p. 1035-1053, 2003.
- [16] BRAUN, R. et al. Molecular Dynamics Simulations of Micelle Formation around Dimeric Glycophorin A Transmembrane Helices. **Biophys. J.**, v. 87, p. 754-763, 2004.
- [17] BRODGEN, K. A., **Nature Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 238-250, 2005.
- [18] BROOKS, B. R. et al. A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comp. Chem.**, v. 4, p. 187-217, 1983.
- [19] BROGGIO COSTA, S. T. Estudos conformacionais por Dinâmica Molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos mastoparanos em mistura de TFE-água. 2006. 133 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- [20] BRUCE, C. D. et al. Molecular Dynamics Simulation of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Water: Micellar Structural Characteristics and Counterion Distribution. **J. Phys. Chem. B**, v. 106, p. 3788-3793, 2002.
- [21] CHARTTERJEE, A. et al. Thermodynamics of Micelle Formation of Ionic Surfactants: A Critical Assessment for Sodium Dodecyl Sulfate, Cetyl Pyridinium Chloride and Dioctyl Sulfosuccinate (Na Salt) by Microcalorimetric, Conductometric, and Tensiometric Measurements. **J. Phys. Chem. B.**, v. 105, p. 12823-12831, 2001.
- [22] CROONEN, Y. et al. Influence of Salt, Detergent Concentration, and Temperature on the Fluorescence Quenching of I-Methylpyrene in Sodium Dodecyl Sulfate with m-Dicyanobenzene. **J. Phys. Chem.**, v. 87, p. 1426-1431, 1983.
- [23] DARDEN, T. et al. Particle mesh Ewald: An N.log(N) method for Ewald sums in large systems. **J. Chem. Phys.**, v. 98, p. 10089-10092, 1993.
- [24] DATHE, M. et al. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potencial to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1462, p. 71-87, 1999.
- [25] DAVIS, W. R. et al. Antimicrobial peptide interactions with silica bead supported bilayers and *E.coli*: buforin II, magainin II, and arecinin. **J. Pept. Sci.**, v. 15, p. 511-522, 2009.
- [26] DELANO, W. L.; The PyMOL molecular *graphics* system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org> (2002).
- [27] DOHTSU, K. et al. **Nat. Tox.**, v. 1(5), p. 271-276, 1993.

- [28] dos SANTOS CABRERA, M. P. et al. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **J. Pept. Res.**, v. 64, p. 95-103, 2004.
- [29] DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. **Eur. Biophys. J.**, v 37, p 879–891, 2008.
- [30] dos SANTOS CABRERA, M. P. et al. Study of the mechanism of action of anoplin, a helical antimicrobial decapeptide with ion channel-like activity, and the role of the amidated C -terminus. **J. Pept. Sci.**, v 14, p. 661–669, 2008.
- [31] EISENBERG, D. et al. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. **J. Mol. Biol.**, v 179, p 125-142, Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R (1984).
- [32] FREITAS, S. M. et al. Structure of the Ebola Fusion Peptide in a Membrane-mimetic Environment and the Interaction with Lipid Rafts. **J. Biolog. Chem.**, v. 282, p. 27306-27314, 2007.
- [33] GAO J. et al. From Homogeneous Dispersion to Micelle-A Molecular Dynamics Simulation on the Compromise of the Hydrophilic and Hydrofobic Effects of Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution. **Langm.**, v. 21, p. 5223-5229, 2005.
- [34] GAZIT E. et al. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membrane, **J. Mol. Biol.**, v. 258, p. 860-870, 1996.
- [35] GHOSH, T. et al. “Role of Backbone Hydration and Salt-Bridge Formation in Stability of α -Helix in Solution”, **Biophys. J.**, v. 85, p. 3187-3193, 2003.
- [36] HESS, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. **J. Chem. Theor. Comp.**, v. 4, p. 116-122, 2008.
- [37] HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **J. Chem. Theor. Comp.**, v. 4, p. 435-447, 2008.
- [38] HORI, Y. et al. Interaction of mastoparan with membranes studied by 1H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state 2H-NMR and 15N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 302-309, 2001.
- [39] ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. London: Academic Press, 1991.
- [40] ITRI, R. et al. Distance Distribution Function of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles by X-ray Scattering. **J. Phys. Chem.**, v. 95, p. 423-427, 1991.

- [41] JOSHI, T. et al. Micellization and Interaction of Anionic and Nonionic Mixed Surfactant System in Water. **Coll. Surf. A.**, v. 260, p. 209-215, 2005.
- [42] JUSUFI, A. et al. Implicit Solvent Models for Micellization of Ionic Surfactants. **J. Phys. Chem. B.**, v. 112, p. 13783-13792, 2008.
- [43] KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolym.**, v. 22, p. 2577–2637, 1983.
- [44] KHANDELIA, H. et al. The impact peptides on lipid membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, p. 1528-1536, 2008.
- [45] KHANDELIA, H. et al. Molecular Dynamics Simulation of Helical Antimicrobial Peptides in SDS micelles: What do point mutations achieve? **Peptides**, v. 26, p. 2037-2049, 2005.
- [46] KONNO, K. et al. Structure and biological activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**, v.38, p. 1505-1515, 2000.
- [47] KONNO, K. et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1550, p. 70-80, 2001.
- [48] LEE, B. et al. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. **J. Mol. Biol.**, v. 55, p. 379-400, 1971.
- [49] LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy, aceito para publicação no **Amino Acids.**, 2010.
- [50] LUDTKE, J. S. et al. Membrane pores induced by magainin. **Biochem.**, v. 35, p. 13723–13728, 1996.
- [51] MACKERELL Jr, D. A. Molecular Dynamics Simulation of a Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Aqueous Solution Fluidity of the Micelle Hydrocarbon Interior. **J. Phys. Chem.**, v. 99, p. 1846-1855, 1995.
- [52] MARQUSEE, S. et al. Helix stabilization by Glu⁻ ... Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, p. 8890-8902, 1987.
- [53] MARRINK, J. S. et al. Molecular Dynamics Simulation of the Kinetics of Spontaneous Micelle Formation. **J. Phys. Chem. B.**, v. 104, p. 12165-12173, 2000.
- [54] MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v 1788, p 1687–1692, 2009.

- [55] MATSUZAKI, K. et al. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. **Biochem.**, v. 34, p. 6521–6526, 1995.
- [56] MATSUZAKI, K. et al. Orientational and aggregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers. **Biochem.**, v. 33, p. 3342-3349, 1994.
- [57] MÁTYUS, E. et al. Computer Simulation of Antimicrobial Peptides. **Cur. Medic. Chem.**, v. 14, p. 2789-2798, 2007.
- [58] MAYNE, L. et al. Stabilizing effect of a multiple salt-bridge in a pre-nucleated peptide, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 10643–10645, 1998.
- [59] MAZER, N. A. et al. An Investigation of the Micellar Phase of Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Sodium Chloride Solutions Using Quasielastic Light Scattering Spectroscopy. **J. Phys. Chem.**, v. 80, p. 1075, 1976.
- [60] MIYAMOTO, S. et al. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **J. Comp. Chem.**, v. 13, p. 952-962, 1992.
- [61] MURATA, K. et al. Novel mastoparan and protonectin analogs isolated from a solitary wasp, *Orancistrocerus drewseni* drewsen. **Amino Acids.**, v. 37, p. 389-394, 2009.
- [62] NAKAJIMA T et al. Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Pep.**, v. 6, n. 3, p. 425-430, 1985.
- [63] NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolym.**, v. 25, p. S115-S121, 1986.
- [64] OREN, Z. et al. **Biopolym.**, v. 47, p. 451-463, 1998.
- [65] PARK, N. G. et al. Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. **Biopolym.**, v. 36, p. 793-801, 1995.
- [66] PATRA, M. et al. Systematic Comparison of Force Fields for Microscopic Simulations of NaCl in Aqueous Solution: Diffusion, Free Energy of Hydration, and Structural Properties. **J. Comp. Chem.**, v. 25, p. 678-689, 2004.
- [67] QUINA, F. H. et al. Growth of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles with Detergent Concentration. **J. Phys. Chem.**, v. 99, p. 17028-17031.
- [68] RAKITIN, A. R. et al. Molecular Dynamics Simulation of Ionic Interactions with Dodecyl Sulfate Micelles. **J. Phys. Chem. B.**, v. 108, p. 2712-2716, 2004.

- [69] RICO, I. et al. Formamide, a Water Substitute. 12. Krafft Temperature and Micelle Formation of Ionic Surfactants in Formamide' **J. Phys. Chem.**, v. 90, p. 5870-2, 1986.
- [70] ROCCATANO, D., et al. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 12179-12184, 2002.
- [71] ROMANI, P. A. et al. Spectrofluorimetric Determination of Second Critical Micellar Concentrations of SDS and SDS/Brij 30 Systems. **J. Fluoresc.**, v. 19, p. 327-332, 2009
- [72] SHANG, Z. B. et al. Molecular Dynamics Simulation of Interaction between a Sodium Dodecyl Sulfate Micelle and Poly(Ethylene Oxide) Polymer. **J. Phys. Chem.**, v. 112, p. 2888-2900, 2008.
- [73] SALANIWAL, S. et al. Molecular Simulation of a Dichain Surfactant/Water Carbon Dioxide System. 1. Structural Properties of Aggregates. **Langm.**, v. 17, p. 1773-83, 2001.
- [74] SAMMALKORPI, M. et al. Structural Properties of Ionic Detergent Aggregates: A Large-Scale Molecular Dynamics Study of Sodium Dodecyl Sulfate. **J. Phys. Chem. B.**, v. 111, p. 11722-11733.
- [75] SATO, H. et al. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membranedeconstruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1758, p. 1245-1256, 2006.
- [76] SHANKS, P. C. et al. Estimation of micellization parameters of aqueous sodium dodecyl sulfate from conductivity data. **J. Phys. Chem.**, v 96, p 1794 – 1805, 1992.
- [77] SHINODA, K. **Pure. Appl. Chem.**, v. 52, p. 1195, 1980.
- [78] SOUZA, B. M. et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, p.2157-2164, 2005.
- [79] STEINER, H. et al. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. **Biochim Biophys. Acta.**, v. 939, p. 260–266, 1988.
- [80] TIAN, J. et al. An Alpha-Helical Peptide in AOT Micelles Prefers to be Localized at the Water/Headgroup Interface. **J. Biophys.**, v. 96(10), p. 57-59, 2009.
- [81] TIELEMAN, P. D. et al. Molecular Dynamics Simulations of Dodecylphosphocholine Micelles at Three Different Aggregate Sizes: Micellar Structure and Chain Relaxation. **J. Phys. Chem. B.**, v. 104, p. 6380-8, 2000.

- [82] TOSSI, A. et al. Peptides. **Biopolym. (Peptide Sci.)**, v. 55, p. 4-30, 2000.
- [83] VAN GUNSTEREN, W. F. et al. Gromos-87 Manual. **Biomos.**, Groningen, Netherlands, 1987.
- [84] VAN HIMBERGEN, J. A. J. et al. Mastoparan analogues stimulate phospholipase C- and phospholipase D-activity in Chlamydomonas: a comparative study. **J. Exp. Bot.**, v. 50, No. 341, p. 1735–1742, 1999.
- [85] VAUTIER-GIONGO, C. et al. Estimate of the Ionization Degree of Ionic Micelles Based on Krafft Temperature Measurements. **J. Phys. Chem. B.**, v. 107, p. 5398-5403, 2003.
- [86] VERLET, L. Computer experiments on classical fluids I: thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Phys. Rev.**, v. 159, p. 98-103, 1967.
- [87] WAKAMATSU, K. et al. Membrane-bound conformation of Mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. **Biochem.**, v. 31, p. 5654-5660, 1992.
- [88] WANG K. R. et al. Antitumor effects, cell selectivity and structure–activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, v. 67331, 2008.
- [89] WEINER, S. J. et al. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **J. Comp. Chem.**, v. 7, p. 230-252, 1986.
- [90] WHILES, J. A. et al. Orientation and effects of Mastoparan X on phospholipid bicelles. **J. Biophys. J.**, v. 80, p. 280-293, 2001.
- [91] WYMORE, T. et al. Molecular Dynamics Simulation of the Structure and Dynamics of a Dodecylphosphocholine Micelle in Aqueous Solution. **J. Mol. Struct.**, v. 485-486, p. 195-210, 1999.
- [92] WYMORE, T. et al. Molecular Dynamics Study of Substance P Peptides Partitioned in a Sodium Dodecylsulfate Micelle. **J. Biophys.**, v. 76, p. 1213-27, 1999.
- [93] YANG, L. et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **J. Biophys.**, v. 81, p. 1475-1485, 2001.
- [94] YOSHII, N. et al. A Molecular Dynamics Study of Surface Structure of Spherical SDS Micelles. **Chem. Phys. Lett.**, v. 426, p. 66-70, 2006.
- [95] YOSHII, N. et al. A molecular dynamics study of free energy of micelle formation for sodium dodecyl sulfate in water and its size distribution. **J. Chem. Phys.**, v. 124, p. 184901-184906, 2006.
- [96] ZANA, R. Dynamics of Surfactant Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles, and Lyotropic Phases. **Surfac. Sci. Series**: CRC Press: Boca Raton, FL, v. 125, 2005.

[97] ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nat.**, v. 415, p. 389-395, 2002.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, /05/2010

Assinatura

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)