

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química

Dinâmica Molecular de Articaína em Membranas POPC

Érica Teixeira Prates

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf

Departamento de Físico-Química
Universidade Estadual de Campinas

Co-orientadora: Dr. Mónica Pickholz

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires

Campinas, SP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

P887d Prates, Érica Teixeira.
Dinâmica molecular de articaína em membranas
POPC – Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Munir Salomão Skaf

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Dinâmica Molecular. 2. Anestésicos. 3. Bio-
membranas. 4. Bicamada fosfolipídica. I. Skaf, Munir
Salomão. II. Universidade Estadual de Campinas. Ins-
tuto de Química. III. Título.

Título em inglês: Molecular dynamics of articaine in POPC membranes

Palavras-chave em inglês: Molecular dynamics, Anesthetics, Biomembranes, Phospho-
lipid bilayers

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Munir Salomão Skaf (orientador), Celso Aparecido Bertran
(IQ-UNICAMP), Hubert Karl Stassen (IQ-UFRGS)

Data da defesa: 03/08/2009

*Pra onde quer que fores,
vai todo, leva junto teu coração.
(Confúcio)*

Agradecimentos

- À minha mãe, Viviane, cujo amor e cuidado superam qualquer distância. Obrigada por sempre me perguntar se eu comi direitinho, estou devidamente agasalhada, etc. Como isso pode ser chato e, ainda assim, ser a melhor coisa do mundo?

À minha inspiração neste trabalho, Dr. Cláudio (ou Babico), anestesista, meu grande amigo e amado pai.

Ao meu irmaozinho, Daniel, pelo amor e amizade. Obrigada por serem a melhor família do mundo.

- Agradeço ao Munir pela amizade e por ter me ensinado tanto. Sou muito feliz por ter você como orientador desde a iniciação científica. Muito obrigada pela dedicação e confiança que depositou em mim.
- À Mônica. Obrigada pela sua amizade e pela sua ajuda preciosa neste trabalho. Quero trabalhar e jogar conversa fora com você por muitas e muitas vezes.
- Agradeço ao pessoal antigo do grupo (Leandro, Milton, Frank, Mônica, Paulo e Carol). Vocês me ajudaram e ajudam muito, muito mesmo. Principalmente no começo, com a tal de programação e o tal do Linux que eu não sabia bulhufas.

Em especial, agradeço ao Leandro. Ele contribuiu muito na realização deste trabalho: muitos dos programas que eu uso foram criados por ele e o cluster que eu uso foi configurado por ele.

Vocês são exemplos para mim de generosidade na Ciência, na vida.

- Agradeço ao pessoal mais novo que agora forma este grupo de pesquisa (Anders, Ary, Thiago, Denise, Jorjão, Tati, Júlio, Karen, Rodrigo, Lucas e Jorge). Obrigada pelas discussões, trocas de experiências, risadas, bandejadas, etc.
- Agradeço ao pessoal da CPG, por serem sempre muito simpáticos, atenciosos e competentes.
- Aos mestres, aqueles que me doaram tempo, conhecimento e experiência. Muito obrigada pela preocupação em nos ‘fazer aprender’.
- Obrigada aos Professores Eneida de Paula (IB-UNICAMP) e Marcelo Ganzarolli, por concordarem prontamente em compor a minha banca de exame de qualificação. Obrigada também pela leitura tão cuidadosa da dissertação e pelas sugestões e críticas valiosas.
- Ao Instituto de Química da UNICAMP. Agradeço às pessoas que fazem toda esta estrutura funcionar muito bem (funcionários, professores e alunos). Obrigada pelo suporte material, segurança, limpeza, etc.
- À FAPESP pelo suporte financeiro.
- Aos meus parentes. Obrigada por sempre me apoiarem e me darem palavras de incentivo. Agradeço especialmente à minha ‘tia-irmã’ Marlise.
- Aos meus amigos, que são fundamentais para que a minha felicidade seja completa. Em especial, agradeço ao Renato e Renata por estarem sempre dispostos a compartilhar momentos felizes e tristes. Também agradeço muito ao Mau pelos momentos divertidos, palavras de amparo, etc.
- Finalmente, agradeço ao Lindo. Antes de tudo, obrigada pelo seu amor, carinho, pela cumplicidade e pelo seu respeito. Também te agradeço muito pelas conversas sobre as nossas pesquisas. Você sempre tem algo a acrescentar e aprendo muito com você.

Curriculum Vitae

- **Informações Pessoais**

Nome: Érica Teixeira Prates

Data de nascimento: 22/01/1985

- **Formação Universitária**

2003 - 2007: Bacharelado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP.

- **Mestrado**

Dinâmica Molecular de Articaína em Membranas POPC.

Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf (Instituto de Química - UNICAMP)

Co-orientador: Dra. Mónica Pickholz (Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA, Buenos Aires)

Instituição: Instituto de Química, UNICAMP, Campinas - SP.

Ingresso: 08/2007, Defesa: 30/07/2009.

- **Prêmios e Distinções**

Menção honrosa ao trabalho “Dinâmica Molecular de Biomoléculas em Soluções Aquosas”, sob orientação do Prof. Munir S. Skaf, no *XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP*, 2006.

• Iniciação Científica

10/2005 a 08/2007: ‘Dinâmica Molecular de Aminoácidos e Peptídeos em Solução Aquosa.’ Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf. Instituição: UNICAMP. Bolsa FAPESP.

• Artigos em preparação

1. Érica T. Prates, Mónica Pickholz e Munir S. Skaf, “Molecular dynamics study on alanine and small homologous series of this amino acid in aqueous solutions”, 2009.
2. Érica T. Prates, Mónica Pickholz e Munir S. Skaf, “New parameters for articaine local anesthetic based on CHARMM force field” 2009.
3. Érica T. Prates, Thaís F. Souza, Leonardo F. Fraceto, Mónica Pickholz e Munir S. Skaf, “Distribution of neutral articaine in a phospholipid bilayer: insights from molecular dynamics simulations”, 2009.
4. Érica T. Prates, Mónica Pickholz e Munir S. Skaf, “Molecular dynamics study of articaine in POPC membranes”, 2009.

• Trabalhos apresentados em congressos

1. Érica T. Prates, Mónica Pickholz e Munir S. Skaf, “Dinâmica molecular da articaína em membranas POPC.” I Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada, 2009, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas - SP (divulgação: palestra).
2. Érica T. Prates, Mónica Pickholz e Munir S. Skaf, “Articaine self-association and interaction with membrane: a theoretical study of local anesthesia.” The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas - PE (divulgação: poster e resumo eletrônico).
3. Érica T. Prates, Mónica Pickholz e Munir S. Skaf, “Distribuição da articaína neutra em uma bicamada fosfolipídica: um estudo de dinâmica molecular.” VII Semana da Química, 2008, Instituto de Química da UNICAMP (divulgação: poster).

4. Denise C. Melo, Érica T. Prates, Edvaldo Sabadini e Munir S. Skaf, “Análise de propriedades dinâmicas e estruturais do óxido de polietileno de diferentes comprimentos em solução aquosa.” Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2008, Petrópolis - MG (divulgação: poster e caderno de resumos).
5. Érica T. Prates, Munir S. Skaf, “Dinâmica molecular de biomoléculas em soluções aquosas.” XV Jornada de Jovens Investigadores, 2007, Universidad Nacional de Asunción, Asunción - Montevideo (divulgação: exposição oral / *flash talk* e poster).
6. Érica T. Prates, Munir S. Skaf, “Simulations studies on saccharides, amino acids and peptides aqueous solutions: structural and dynamical properties.” XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2007, Poços de Caldas - MG (divulgação: poster e caderno de resumos).
7. Milton T. Sonoda e Munir S. Skaf, “Water dynamics in carbohydrate solutions.” XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2007, Poços de Caldas - MG (divulgação: poster e caderno de resumos).
8. Érica T. Prates e Munir S. Skaf, “Análise de propriedades dinâmicas e conformacionais de homopeptídeos em água através de simulação computacional.” XV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2006, Campinas - SP (divulgação: poster).

• Histórico Escolar

Finalizou o curso de mestrado com coeficiente de rendimento (CR) máximo, 0.400. Durante a graduação, permaneceu entre os 10 alunos com melhor CR da turma e sem reprovações. Encerrou o curso com CR 0.794 (máximo 1.000).

• Outros

1. Cursos Científicos

- (a) “Aspectos físico-químicos da estrutura de membranas. Interações de membranas com peptídeos.”

Carga horária: 8 horas.

Responsáveis: Joachim Seelig e Anna Seelig (Biozentrum, University of Basel, Suíça).

Período: 13-17 de agosto de 2007.

Local: Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo - SP.

- (b) “Spring college in Physics, Chemistry and Biology.”

Carga horária: 75 horas.

Responsáveis: Mike L. Klein, Dennis D. Klug, Giacinto Scoles e Sandro Scandolo.

Período: 10 - 20 de abril de 2007.

Local: International Centre for Theoretical Physics (ICTP), Trieste - Itália.

- (c) “Introdução aos métodos de caracterização estrutural de proteínas.”

Carga horária: 16 horas.

Responsável: Nilson I. T. Zanchin.

Período: 06 - 07 de julho de 2006.

Local: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas - SP.

- (d) “Introdução ao fortran 90.” Carga horária: 20 horas.

Responsável: Ricardo Küsel.

Período: julho de 2005.

Local: Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD), Campinas - SP.

2. Seminários a Convite

- (a) 19/06/2008: “Dinâmica molecular de articaína neutra em membranas POPC.” Grupo de Biomembranas, Instituto de Biologia (IB) - UNICAMP, Campinas - SP.

- (b) 07/03/2008: “Dinâmica molecular de articaína em membranas POPC.” I Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada, 2009, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas - SP.

Resumo

Neste trabalho foi feito o estudo das interações da articaína, um anestésico local de ampla aplicação médico-odontológica, com membranas modelo de POPC (palmitoil-oleil-fosfatidilcolina) em condições próximas às biologicamente relevantes empregando-se simulações computacionais de dinâmica molecular. Em uma primeira etapa, empregamos métodos quânticos para modelar a articaína com base no campo de força CHARMM. Das simulações de equilíbrio da articaína em POPC, foi possível obter informações como o seu comportamento conformacional e sua posição transversal na bicamada, assim como suas interações específicas com os lipídios. Os estudos foram realizados para os estados neutro e protonado da articaína, considerando também seus isômeros ópticos. Estas análises, em conjunto com resultados experimentais de ^1H -RMN realizados pela Prof. Eneida de Paula (IB-UNICAMP) e pelo Prof. Leonardo F. Fraceto (Dpto. de Eng. Ambiental - UNESP, Sorocaba - SP), demonstram que a articaína, em sua forma neutra, posiciona-se preferencialmente na interface membrana/água, onde interage frequentemente com os lipídios através de ligações de hidrogênio. Através de ferramentas como perfil de densidade eletrônica do sistema, da parte teórica, e perfil do tempo de relaxação longitudinal para diferentes regiões dos lipídios, da parte experimental, foi discutida a lipossolubilidade da articaína em relação a outros anestésicos. Também foram realizadas simulações de não equilíbrio, utilizando a técnica de Dinâmica Molecular de Caminho Induzido, em que uma molécula de articaína foi removida do interior da membrana para o meio aquoso, através de uma força aplicada em seu centro de massa. Com a aplicação da igualdade de Jarzynski a estas simulações, foi possível estimar a energia livre de partição da ATC neutra (forma mais potente) entre os estados em que encontra-se no seio aquoso e no interior da membrana POPC.

Abstract

We studied the interactions of articaine - a local anesthetic widely used for medical and odontological applications - with model membranes of POPC (palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholine) at biological relevant conditions. We have employed molecular dynamics technique, which allowed us to investigate the system at molecular level. Firstly, we applied quantum mechanical methods to parametrize articaine molecule based on CHARMM force field. We have done extensive molecular dynamics simulations, taking into account the different ionization states of the drug (neutral and protonated) as well as its optical isomers. From the equilibrium simulations of articaine in POPC membranes, we investigated the conformational behaviour of the drug, its transversal position and its specific interactions with the lipids and water molecules. Our results show a preferential orientation of the articaine molecule within the membrane. Neutral articaine was mainly found at the lipid head/water interface, in very good agreement with ^1H -RMN experimental results from Prof. Eneida de Paula (IB-UNICAMP) and Prof. Leonardo F. Fraceto (Dpto. de Eng. Ambiental - UNESP, Sorocaba - SP) and from literature (C. Song *et al*, 2008). By studying properties like electronic density profile and longitudinal time relaxation for different regions of the lipid molecules, we discussed the liposolubility of articaine in comparison to other local anesthetics. We have also performed non-equilibrium simulations, using steered molecular dynamics (SMD) technique. A single articaine molecule was extracted from the membrane to the water phase, by applying an external force in its mass centre. Coupling the Jarzynski identity to the SMD simulations, we estimated the partition free energy of the neutral drug (the most potent specie) in POPC membranes.

Sumário

Lista de Abreviaturas	xix
Lista de Figuras	xxi
Lista de Tabelas	xxiii
1 Introdução	1
1.1 Membranas Biológicas	6
1.2 Anestésicos Locais em Membranas Biológicas	8
1.3 A Articaína em Membranas Modelo	10
2 Metodologia	13
2.1 Dinâmica Molecular	14
2.1.1 As Simulações	14
2.1.2 Potenciais de Interação	18
2.1.3 Parametrização de um Campo de Força	21
3 Parametrização da Articaína	23
3.1 Cargas Parciais Atômicas	25
3.2 Parâmetros de Torção	27
3.3 Simulações de Soluções Aquosas de Articaína	31
4 Dinâmica Molecular de Articaína em Membranas POPC	37
4.1 Descrição das Simulações	37
4.2 Resultados	40

5	Estimativas Preliminares de Energia Livre de Partição	49
5.1	Dinâmica Molecular de Caminho Induzido acoplada à Igualdade de Jarzynski	50
5.2	A técnica aplicada ao sistema de articaína neutra em membranas POPC	53
6	Conclusões	59
A	Arquivo de Parâmetros da Articaína	75

Lista de Abreviaturas

AL	Anestésico local / anestésicos locais
ATC	Articaína
DM	Dinâmica molecular
DMCI	Dinâmica molecular com caminho induzido
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
LH	Ligação de hidrogênio
MM	Mecânica Molecular
PCM	Modelo Contínuo Polarizável
PDE	Perfil de densidade eletrônica
PFM	Potencial de força média
POPC	Palmitoil-oleil-fosfatidilcolina
QM	Mecânica Quântica
R-ATC	R-articaína neutra
S-ATC	S-articaína neutra
HR-ATC	Isômero R-articaína no estado protonado
HS-ATC	Isômero S-articaína no estado protonado

CHARMM *Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*

NAMD *Not Another Molecular Dynamics* (package)

vdW Van der Waals

Lista de Figuras

1.1	Ilustração de uma célula nervosa.	3
1.2	Propostas de mecanismo de ação de anestésicos locais.	5
1.3	Membranas biológicas, estruturas de alta complexidade	7
1.4	Frequências de movimentos típicos de sistemas biológicos.	8
1.5	Fórmula estrutural da articaína.	11
2.1	Aplicação de condições periódicas de contorno a uma caixa de simulação hipotética.	15
2.2	Curvas de potencial de Lennard-Jones e de Coulomb.	20
3.1	Estruturas otimizadas da articaína por cálculos de estrutura ele- trônica.	24
3.2	Tipos atômicos assinalados na estrutura da ATC.	25
3.3	Torções e as respectivas curvas de potencial cujos parâmetros de ajuste foram obtidos neste trabalho.	28
3.4	Sobreposição das estruturas da ATC geradas durante sua otimi- zação clássica e quântica.	31
3.5	Sobreposição de estruturas de ATC geradas nas simulações dos sistemas RATC, SATC e HRATC à gerada pela otimização geo- métrica quântica.	33
3.6	Função de distribuição de pares entre sítios específicos da ATC e da água.	35
4.1	Caixa de simulação de bicamada de POPC.	39
4.2	Trajetória da articaína no eixo perpendicular à superfície da bi- camada.	41

4.3	Perfil de densidade eletrônica dos sistemas de articaína neutra em membrana POPC, com diferentes valores de área por lipídio.	42
4.4	Comparação entre perfis de densidade eletrônica dos sistemas de articaína neutra e protonada em membrana POPC.	43
4.5	Perfis de densidade eletrônica de diferentes conjuntos de átomos presentes nas moléculas de ATC neutra e protonada.	44
4.6	Perfis de densidade eletrônica de diferentes conjuntos de átomos presentes nas moléculas de ATC neutra e protonada.	45
4.7	Representação esquemática da posição e conformação da ATC neutra no interior membranar. Também são indicadas LH da ATC com POPC e com a água.	47
4.8	Efeito da presença de ATC no tempo de relaxação longitudinal, T_1 , de diferentes regiões da bicamada de EPC à 30 °C.	48
4.9	Sobreposição das estruturas da ATC neutra em água (sistema RATC) e no interior membranar (sistema A64-3).	48
5.1	A identidade de Jarzynski possibilita relacionar a diferença de energia livre entre dois estados termodinâmicos a processos irreversíveis conectando estes estados.	52
5.2	Perfis de força em simulações DMCI.	55
5.3	Curvas de trabalho em função do deslocamento da ATC neutra em sua extração do interior da membrana.	56
5.4	Curvas de potencial de força média obtidas através da fórmula exata de Jarzynski e da aproximação desta por expansão cumulante.	56
5.5	Histograma da frequência de valores de trabalho total nas simulações DMCI.	57

Lista de Tabelas

1.1	Estrutura química dos anestésicos locais.	2
3.1	Cargas parciais atômicas calculadas para R-ATC, S-ATC e HR-ATC.	26
3.2	Parâmetros dos diédros T1, T2 e T3.	30
3.3	Descrição das simulações.	32
3.4	Número médio de átomos (H ou O) da água na primeira camada de hidratação de sítios específicos da articaína.	36
4.1	Descrição das simulações.	38

Capítulo 1

Introdução

A dor é um dos problemas mais extensivamente estudados, desafiando cientistas na busca de meios cada vez mais eficazes de evitá-la e saná-la. Neste contexto, surgem os anestésicos locais (AL), substâncias que agem no alívio e prevenção da dor pela interrupção reversível da condução nervosa. Ao contrário dos anestésicos gerais, os AL agem localmente e não levam à amnésia ou perda de consciência. Estes fármacos atuam em qualquer parte do sistema nervoso, e em todos os tipos de fibras nervosas. Podem ser administrados por várias vias, incluindo tópica e infiltrativa [1].

A história da anestesia geral inicia-se há mais de um século, tendo como pioneira na clínica a benzoilmetilecgonina, ou cocaína, extraída das folhas de *Erythroxylon coca* [2]. Mas, embora represente um avanço no campo cirúrgico, efeitos adversos, como toxicidade e dependência, vieram com o uso desta substância. Consequentemente, houve grande esforço para sintetizar compostos com propriedades anestésicas que não causassem os efeitos danosos da cocaína [3]. Por volta de 1890, sintetizou-se a benzocaína e a procaína, ésteres derivados do ácido benzóico, assim como a cocaína. A procaína foi o primeiro anestésico local (AL) sintetizado com potencial uso infiltrativo. Outros derivados do ácido *para*-aminobenzóico mais potentes (tetracaína) e menos tóxicos (clorprocaína) que a mesma foram sintetizados depois (Tabela 1.1) [4].

Devido à toxicidade de metabólitos do ácido *para*-aminobenzóico [5] e a rápida metabolização da ligação éster por esterases plasmáticas que resitringiam o uso

Tabela 1.1. Estrutura química dos anestésicos locais (Tabela adaptada da referência [4]).

Estrutura 1

Anestésico Local	R ₁	R ₂	Síntese	pKa
Benzocaína	-H	-CH ₃	1890	-
Procaina	-H	-CH ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂	1905	8,9
Tetracaina	-C ₄ H ₉	-CH ₂ -N(CH ₃) ₂	1930	8,6

Estrutura 2

Anestésico Local	R ₁	R ₂	Síntese	pKa
Lidocaína	-CH ₃	$\text{---CH}_2\text{---N} \begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	1943	7,9
Etidocaína	-CH ₃	$\text{---CH---N} \begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 & \text{C}_2\text{H}_5 \\ & \\ \text{C}_2\text{H}_5 & \text{C}_3\text{H}_7 \end{matrix}$	1970	7,7
Prilocaina	-H	$\text{---CH---N} \begin{matrix} \text{CH}_3 & \text{H} \\ & \\ \text{C}_3\text{H}_7 & \text{C}_3\text{H}_7 \end{matrix}$	1972	7,7
Mepivacaína	-CH ₃	$\text{---CH}_2\text{---N(CH}_3\text{)---}$ 	1957	7,6
Bupivacaína	-CH ₃	$\text{---CH}_2\text{---N(C}_4\text{H}_9\text{)---}$ 	1957	8,1
Ropivacaína	-CH ₃	$\text{---CH}_2\text{---N(C}_3\text{H}_7\text{)---}$ 	1987	8,1

destes AL (amino-ésteres), a busca de novos compostos com atividade anestésica permaneceu, levando à síntese dos AL tipo amino-amida a partir da década de 40. Estes são menos potentes que os amino-ésteres, mas o grau de toxicidade sistêmica é relativamente menor e têm meia-vida plasmática mais longa. São os AL mais usados atualmente [4].

A estrutura típica dos AL mais usados compreende uma região hidrofílica (um grupo amina) e uma hidrofóbica (um anel aromático) que são separadas por uma ligação éster ou amida. Por exemplo, a lidocaína e a bupivacaína, que estão entre os AL mais utilizados [4], são classificadas como amino-amidas, pois o grupo hidrofílico é uma amina terciária e a ligação com o grupo hidrofóbico (um anel aromático) se dá através de uma amida (Tabela 1.1).

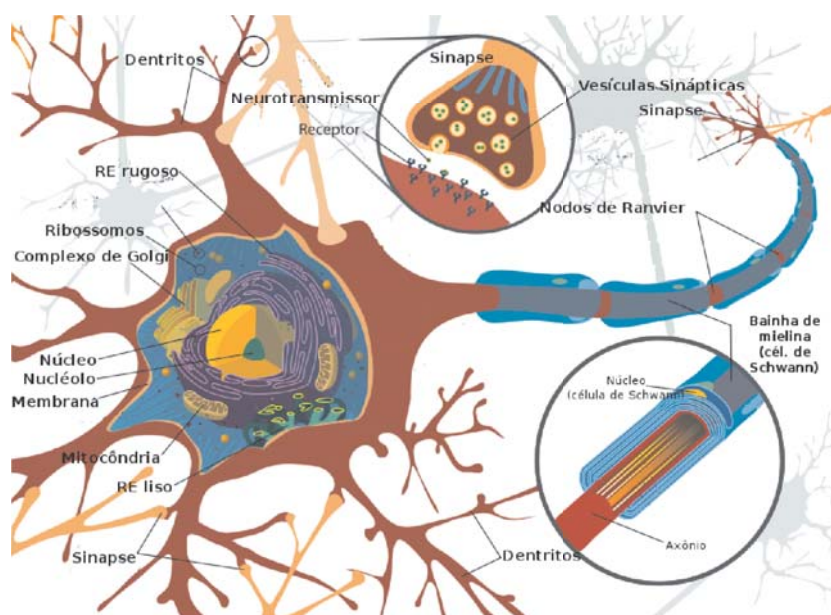


Figura 1.1. A sinalização no sistema nervoso ocorre através de redes de neurônios, células especializadas que levam o impulso elétrico de uma extremidade da célula (o corpo celular) até a outra, passando por uma extensão citoplasmática alongada (o axônio). Os canais voltagem-dependente são essenciais para este mecanismo [6].

A condução do estímulo nervoso nas células nervosas (Figura 1.1) origina-se do desequilíbrio iônico dentro e fora da membrana plasmática [7]. Um gradiente de concentração é criado e mantido ativamente pela bomba de sódio-potássio, que expelle 3 íons Na^+ da célula para cada 2 íons K^+ que introduz no meio citoplasmático. Nestas condições, a proteína canal de sódio voltagem-dependente se abre, fazendo com que haja influxo de sódio e levando à despolarização da membrana. Essa despolarização é propagada unidirecionalmente na célula nervosa pela abertura de outros canais de sódio ao longo do axônio, sendo esta uma etapa fundamental na propagação do impulso elétrico no sistema nervoso [6]. O efeito anestésico ocorre

porque os AL causam uma modificação conformacional na proteína canal de sódio voltagem-dependente, levando à sua inativação temporária e, portanto, interrupção da transmissão do estímulo nervoso que causa a sensação de dor. Há muito tempo, grande esforço tem sido empregado na busca de esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos com o efeito farmacológico dos AL [8–11].

Desde os trabalhos pioneiros de Hodgkin e Huxley [7], em 1953, há muitas evidências experimentais [8, 11–19] da interação direta dos AL com o canal de sódio. Já nos anos 70, Narahashi e colaboradores mostraram que análogos quaternários de AL (sempre carregados) causavam bloqueio de canais de sódio apenas quando infiltrados pela face citoplasmática de membranas de axônios gigantes de lula [20, 21], indicando que há um sítio de ligação seletivo para a forma protonada dos AL na região. Com base neste trabalho, por muito tempo, acreditou-se ser a forma protonada dos AL a responsável pela inativação do canal, restando à forma neutra a função de permear a membrana para que o anestésico atingisse o lado citoplasmático da célula nervosa. Apenas na década de 90, Ragsdale e colaboradores [11, 13] verificaram, através de técnicas de mutação sítio-dirigida, a existência de um sítio de ligação seletivo para o composto neutro, localizado na porção do canal de sódio imersa na membrana. Kuroda e colaboradores [17] estudaram a localização da dibucaína em membranas modelo e observaram que a dibucaína posiciona-se, na membrana, de um modo que a possibilita interagir com um cluster de resíduos hidrofóbicos no canal. Utilizando um peptídeo modelo que continha estes resíduos, o grupo confirmou a interação através de espectros de ^1H -RMN. Hoje, discute-se a possibilidade da existência de, pelo menos, outras três regiões no canal a que os AL se ligam [15, 18, 19].

Atualmente, a forma mais aceita de interpretar a interação dos AL com o canal de sódio voltagem-dependente foi proposta por Hille, em 1977. Segundo esta proposta, as diferentes afinidades desses fármacos pelo(s) sítio(s) seriam moduladas pelo estado conformacional do canal, sendo maior a afinidade pelo estado inativo ou em repouso que pelo estado aberto [22]. Alternativamente, Starmer propôs, em 1987, que os rearranjos conformacionais do canal de sódio que acompanham a despolarização permitem o acesso do AL ao sítio receptor, cuja afinidade seria sempre constante. Assim, os AL agiriam como efetores alostéricos que, ao interagir em seu(s) sítio(s) específico(s) estabilizariam o canal no estado inativado [23].

Esta proposta encontrou maior suporte recentemente com o trabalho de Fraceto e colaboradores [19].

Há estudos na literatura que atribuem as modificações conformacionais do canal de sódio voltagem-dependente à ligação direta do AL a sítios seletivos [12]. Mas levanta-se, também, a hipótese de que interações entre os AL e os lipídios da membrana celular causem alterações em propriedades estruturais e dinâmicas da matriz lipídica, que levariam a mudanças conformacionais no canal de sódio, explicando sua inativação [4, 24]. De fato, foi encontrada uma forte correlação entre a potência de anestésicos e a sua capacidade de penetrar na camada lipídica [4]. Na seção 1.2 a interação de AL com biomembranas será um pouco mais discutida.

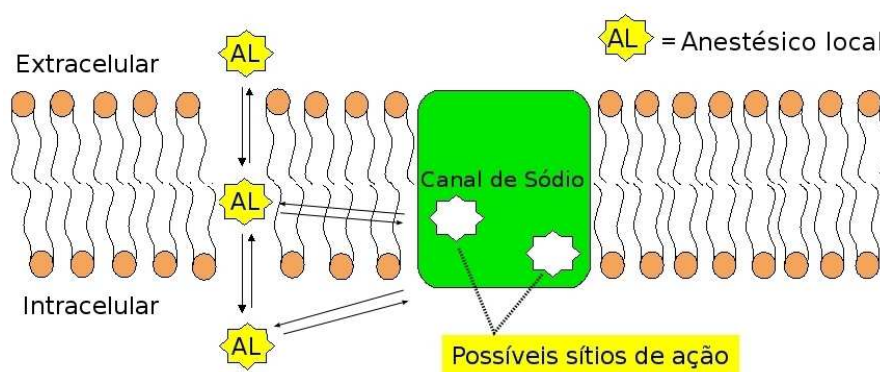


Figura 1.2. Esquema ilustrativo da difusão dos AL pela membrana fosfolipídica e as possíveis vias de acesso a sítios de ligação na proteína do canal de sódio voltagem-dependente (figura adaptada da referência [4]).

Uma proposta que tem recebido atenção nos últimos anos, é a de que a ligação direta dos AL seria necessária para que ocorram as alterações conformacionais do canal e que, por outro lado, a partição/distribuição inespecífica de grande quantidade do AL na bicamada lipídica é importante para facilitar o acesso da molécula ao(s) sítio(s) de ligação na proteína [11, 13, 19, 25, 26]. Tal como foi pensado por Kuroda e colaboradores em 1996, a localização e orientação preferenciais de cada AL na bicamada, determinada por suas características físico-químicas particulares, influenciam diretamente na capacidade do AL em ligar-se ao canal de sódio e, assim, a membrana lipídica teria o papel essencial de modular a etapa de associação do AL ao canal [4, 17, 25].

Deste modo, o estudo da interação de AL com biomembranas tem por finalidade entender o mecanismo molecular da anestesia, melhorar a eficácia desses fármacos e minimizar seus efeitos colaterais através do desenho racional de novos fármacos com atividade anestésica ou através da veiculação (*drug-delivery*) de AL de uso consagrado utilizando, por exemplo, lipossomas [27, 28].

1.1 Membranas Biológicas

O estudo de membranas biológicas e de sistemas modelo de membranas ocupa uma área muito importante de pesquisa em Bioquímica e Biofísica. Do ponto de vista bioquímico, a maioria dos processos celulares fundamentais (transporte, difusão, comunicação celular, fosforilação oxidativa do ATP e outros) ocorre em membranas ou envolve membranas num determinado ponto [29]. Estas estruturas representam uma construção chave nos organismos vivos ao compartimentalizar e diferenciar as células. Trata-se de sistemas muito complexos, principalmente devido à diversidade de lipídios, proteínas, glicoproteínas e glicolipídios que estão presentes em diferentes proporções em cada tipo celular e de organela (Figura 1.3). A base estrutural das biomembranas consiste em uma bicamada de moléculas anfifílicas, os fosfolipídios [30].

As biomembranas têm propriedades muito interessantes: por um lado elas exibem extrema flexibilidade e um comportamento líquido bidimensional que permite, por exemplo, a imersão de proteínas como os canais iônicos na sua estrutura, enquanto, por outro lado, são notavelmente estáveis e eficientes como barreiras interfaciais. A estabilidade das bicamadas é atribuída ao equilíbrio entre os efeitos hidrofóbicos, consequência das caudas dos lipídios evitarem exposição à água, e as interações intermoleculares, dentro da membrana.

Em 1972, Singer e Nicholson demonstraram a dinâmica de membranas celulares que levaram ao modelo mosaico fluido, em que propõe-se que as proteínas são relativamente livres para difundirem-se pela bicamada fosfolipídica, a qual é melhor descrita como um líquido estruturado bidimensionalmente do que como uma estrutura rígida (Figura 1.3) [31]. Deste modo, em condições fisiológicas, o estado líquido-cristalino das membranas pode ser caracterizado por propriedades

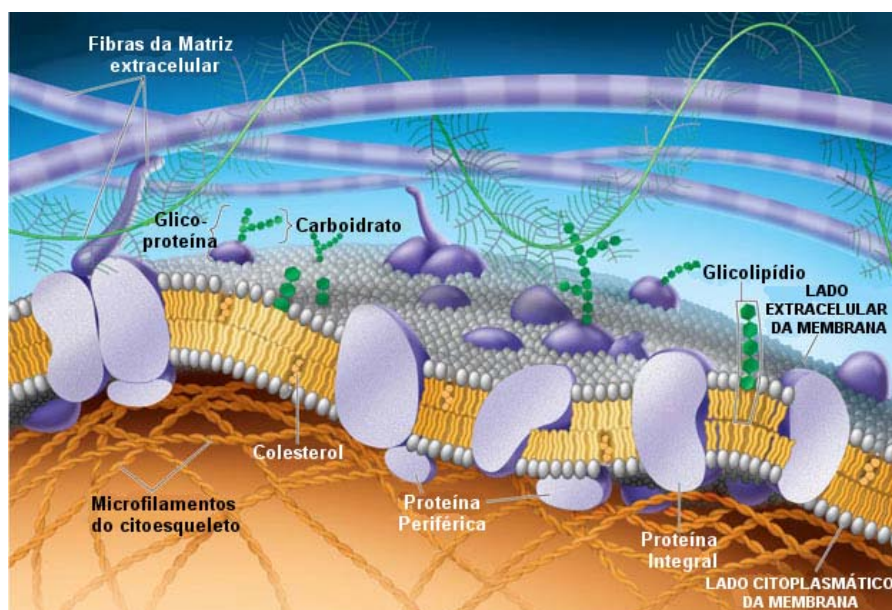


Figura 1.3. Representação da complexidade de membranas biológicas. Imersas em uma matriz fosfolipídica são encontradas proteínas transmembranares e esteróis. Mais superficialmente, verifica-se a presença de proteína periféricas e porções de carboidratos ligados covalentemente a algumas proteínas e lipídios (Fonte: <http://www.bio.miami.edu/>, 2009).

dinâmicas, que na escala microscópica referem-se às vibrações e rotações de grupos moleculares e à difusão das moléculas, enquanto na escala supramolecular compreendem flutuações da bicamada fora do plano, que deformam as células e organelas (Figura 1.4). Esta flexibilidade é responsável, por exemplo, pela habilidade das células sanguíneas de mudarem sua forma quando ligadas a oxigênio e é fundamental para divisão celular e fusão.

Devido à alta complexidade destes sistemas, estudos utilizando sistemas modelo têm grande utilidade, tanto do ponto de vista experimental quanto teórico, para obter informações da função de cada um dos componentes individuais. Podem ser estudados sistemas modelo de interesse, como lipídios puros, misturas de lipídios, misturas reconstituídas de lipídio-proteína, lipídio-fármaco.

Para se entender o comportamento de membranas modelo, diversas técnicas experimentais têm sido utilizadas: difração de raios X [33], difração de nêutrons [34], ressonância magnética nuclear (RMN) [35] e paramagnética eletrônica (RPE) [36], espectroscopia de fluorescência [37] e de infra-vermelho [38], calorimetria [39],

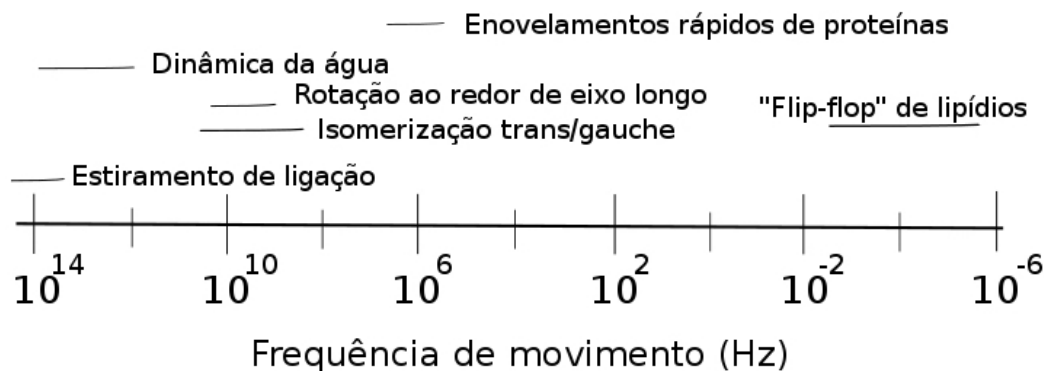


Figura 1.4. Frequências de movimentos típicos de sistemas biológicos. Em membranas fosfolipídicas a escala abrange quase 20 ordens de magnitude de tempo. “Flip-flop” de lipídios e enovelamento protéico são fenômenos fora da escala temporal de simulações atomísticas. Para estudar eventos como estes através de Dinâmica Molecular técnicas especiais devem ser empregadas. Figura adaptada da referência [32]

bem como diversas microscopias [40]. Por outro lado, simulações computacionais possibilitam a análise de propriedades das biomembranas desde uma perspectiva atômica, com um nível de detalhe dificilmente alcançado pelas técnicas experimentais atuais. Neste contexto, a DM aparece como uma ferramenta valiosa, que tem sido amplamente explorada em temas que variam desde a interação de moléculas sintéticas de escala nanométrica com membranas celulares [41] aos detalhes de estrutura e dinâmica da água interfacial à bicamada [42].

1.2 Anestésicos Locais em Membranas Biológicas

Os AL têm grande afinidade pela membrana celular [3]. O caráter anfifílico destes fármacos sugere que estes se localizam majoritariamente na região interfacial da membrana. Estudos clássicos mostram que tal situação altera o sistema membranar de diversas maneiras. Foram observados, por exemplo, efeitos de expansão da bicamada, aumento na fluidez e permeabilidade da membrana e diminuição da temperatura de transição de fases gel – líquido-cristalino [4, 43–45].

Há algumas décadas este tópico tem sido abordado através do uso de diferentes técnicas experimentais [44]. Em particular, tem-se utilizado de lipídios seletivamente deuterados em experimentos de ^2H -RMN que permitem identificar as regiões

das membranas lipídicas em que os AL se inserem preferencialmente. O trabalho de Boulanger e colaboradores é amplamente citado na área, por ter demonstrado a localização diferencial das formas protonada (mais superficial) e neutra da tetracaína em vesículas de fosfatidilcolina de ovo [46]. Estudos posteriores com fluorescência, usando tetracaína como supressor de fluoróforos posicionados em diferentes localizações no interior da bicamada (covalentemente ligados às cadeias acila dos lipídios) permitiram mapear regiões e, por alterações na mobilidade local dos fosfolipídios, demonstrar que a inserção da tetracaína causava alterações que atingiam regiões profundas da membrana [47]. Recentemente, a técnica de fluorescência foi utilizada no estudo das mobilidades rotacional e laterais de lipídios de membrana neuronal na presença de bupivacaína. Verificou-se que ocorrem expansão lateral da bicamada e um aumento de mobilidade muito mais significativo em lipídios da monocamada interna e nas proximidades de proteínas transmembranares do que em outros domínios membranares [48].

Experimentos de microscopia de força atômica mostraram claramente a modificação no empacotamento de bicamadas de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) e de fosfatidilcolina de ovo (EPC) devido à interação do AL dibucaína com as cabeças polares dos lipídios [49]. Por ^{31}P -RMN foram detectadas alterações no empacotamento dos grupos fosfato das cabeças polares de fosfolipídios de membranas de eritrócitos, induzidas por lidocaína e benzocaína, em pH fisiológico [50]. Medidas dos tempos de relaxação longitudinal (^1H -RMN) demonstraram que regiões específicas na cabeça polar dos lipídios de membrana foram especificamente alteradas pela presença da forma neutra da lidocaína e mepivacaína, enquanto que regiões mais profundas (átomos do grupo glicerol e primeiros átomos de carbono das cadeias acila) sofreram alterações na dinâmica molecular por ação da etidocaína e bupivacaína, anestésicos mais hidrofóbicos [50].

Estas alterações em propriedades estruturais e dinâmicas de sistemas membranares na presença de AL estão diretamente correlacionadas entre si e com o fato de os AL perturbarem o empacotamento fosfolipídico por efeitos estéricos e interações intermoleculares. Para o estudo a nível molecular de sistemas de fármacos em membranas biológicas, a utilização da técnica de simulações computacionais por DM tem sido bem sucedida. Podem ser obtidas inúmeras informações, como orientação e posição preferencial do composto no interior membranar, caracteri-

zação de interações específicas, bem como da perturbação na membrana causada pela presença da droga [51–57]. Através de DM, Vemperala *et al* [51] verificaram a partição espontânea do halotano, um anestésico geral, em membranas de dioleil-fosfatidilcolina (DOPC) contendo segmentos peptídicos imersos, representativos da porção ligada à membrana do receptor nicotínico de acetilcolina. Observou-se uma molécula de halotano ligar-se ao resíduo de tirosina identificado experimentalmente como o sítio específico de ligação.

Em nosso grupo de pesquisa, foram estudadas as interações de clorpromazina, um fármaco neuroléptico de amplo uso clínico, em monocamadas de Langmuir de fosfolipídios mediante simulações de DM [52, 53]. Foram considerados os dois estados de ionização do composto e diferentes valores de área por lipídio das monocamadas de dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) ou de dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG). Observou-se que a espécie neutra é solvatada na região das caudas (hidrofóbicas) enquanto que a espécie carregada localiza-se, essencialmente, na interface polar. Foram estudadas diversas propriedades, como parâmetros de ordem (mensuráveis por RMN), orientações das cabeças polares dos fosfolipídios, formação de ligações de hidrogênio e perfis de densidade eletrônica, dentre outras.

Evidentemente, a comunicação entre grupos experimentais e de simulação computacional nesta área de conhecimento pode ser muito profícua. Por exemplo, experimentos ^1H -RMN combinados com a técnica computacional de DM permitiram identificar uma orientação preferencial da prilocaína em sua forma protonada na interface polar da bicamada, e a inserção profunda e anisotrópica das espécies neutras [54]. Neste trabalho, especificamente, contamos com a colaboração do grupo experimental da Profa. Dra. Eneida de Paula e com o Prof. Dr. Leonardo Fraceto, criando um forte sinergismo positivo entre simulação molecular e experimentos.

1.3 A Articaína em Membranas Modelo

Neste trabalho, a técnica de dinâmica molecular (DM) foi usada para estudar o comportamento do anestésico local articaína (metil 4-metil-3-[2-(propilamino)-propionamido]-tiofeno-2-carboxilato; Figura 1.5) em bicamadas de 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), na fase fluido lamelar. Pouco se conhece sobre a atuação da ATC a nível molecular, mas este anestésico, sintetizado pela pri-

meira vez em 1969, vem sendo amplamente utilizado em aplicações odontológicas e dermatológicas, dado sua rapidez em iniciar sua ação anestésica e baixa alergenicidade [58]. Ainda há poucos estudos [59, 60] sobre a interação da articaína com biomembranas ou monocamadas de Langmuir e, especificamente, não há estudos de simulação publicados, ao contrário de outros AL, como a lidocaína, para os quais já existem na literatura alguns trabalhos de seus efeitos em membranas fosfolipídicas usando simulações de DM [56, 57].

A ATC pertence à classe dos AL chamados amino-amidas. Ela tem duas características únicas entre os AL conhecidos: a porção aromática consiste em um anel tiofeno e, ligada a ele, um grupo éster, que contribui para o rápido metabolismo do fármaco, pois é hidrolisado enzimaticamente a ácido articaínico por esterases [58]. Com exceção destas peculiaridades da ATC, a cadeia que contém os grupo amino e amida da ATC é idêntica à da prilocaína.

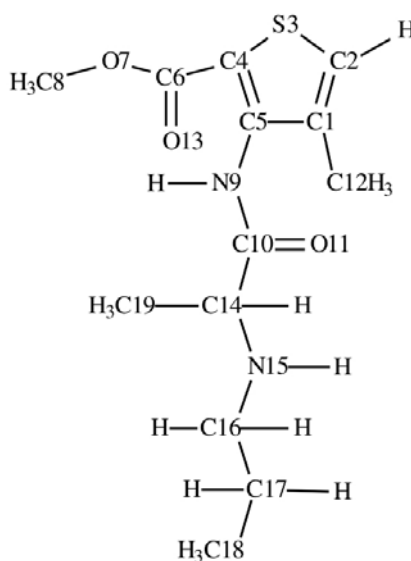


Figura 1.5. Fórmula estrutural da R-articaína em sua forma neutra. Em seu estado carregado, o próton liga-se ao nitrogênio N15. O centro assimétrico C14 confere atividade óptica ao composto.

A ATC possui um carbono assimétrico (C14 na Figura 1.5), evidenciando que o composto apresenta atividade óptica. O pK_a do nitrogênio N15 é de cerca de 7,8. Portanto, ambos os estados da articaína, neutra e protonada, podem ser relevantes

no contexto fisiológico. Neste trabalho, o comportamento de ambas as formas na membrana modelo é investigado. No entanto, como o tempo disponível para o desenvolvimento deste trabalho é limitado, decidiu-se por dedicar maior atenção e esforço à forma neutra, pois é conhecido o fato de que espécies neutras de AL ligam-se mais fortemente a membrana do que o fazem as espécies carregadas e, ainda, que efeitos de toxicidade e potência dos AL estão diretamente relacionados à hidrofobicidade destes fármacos [3, 44, 61].

Desde o trabalho de Malamed e colaboradores em 2000 [62], propaga-se na literatura, de um modo pouco específico, a informação de que o anel tiofeno da ATC torna-a mais lipossolúvel [59, 63]. Em comparação com outros anestésicos locais, a questão da hidrofobicidade da ATC é controversa. No laboratório da Prof. Eneida de Paula, determinaram-se valores de coeficiente de partição para diferentes anestésicos locais na forma neutra, em água/n-octanol. Os resultados deste experimento indicam que, em termos de hidroflicidade/hidrofobicidade, a ATC situa-se como intermediária entre anestésicos mais hidrofóbicos e potentes (tetracaína, etidocaína e dibucaína) e AL de maior caráter hidrofílico (como lidocaína, prilocaína e mepivacaína). Esta questão será abordada novamente nesta dissertação a partir dos resultados obtidos das simulações de ATC em membrana POPC e de experimentos de ^1H -RMN de ATC neutra em fosfatidilcolina de ovo.

Capítulo 2

Metodologia

Essencialmente, as interações entre átomos e moléculas definem seus movimentos e são determinadas pela distribuição eletrônica ao redor dos átomos. Isto, à princípio, poderia ser determinado através de Mecânica Quântica (QM). Entretanto, resolver numericamente equações de Schrödinger dependentes do tempo só é viável computacionalmente para sistemas e condições muito simples. Afora reações, vibrações de ligações e ângulos de frequências muito altas, o estudo de muitos processos e propriedades físico-químicas no nível biomolecular, não requer considerações quânticas explícitas. Com esta motivação, a abordagem *ab initio* pode ser substituída por modelos que descrevem as interações no sistema através de potenciais efetivos clássicos entre átomos. Além do menor custo computacional, estes modelos clássicos têm a vantagem de serem parametrizados diretamente para reproduzir dados experimentais. Estas simplificações permitiram desenvolver a Química *in silico*, em que utiliza-se computadores ao invés de experimentos. Mais do que isso, experimento e teoria frequentemente trabalham juntos. As pesquisas experimentais geralmente motivam e guiam os estudos teóricos e os resultados teóricos, por sua vez, fornecem explicações em nível microscópico aos fenômenos observados experimentalmente.

Neste capítulo, são apresentados alguns conceitos fundamentais de dinâmica molecular, a principal técnica utilizada no desenvolvimento deste trabalho, e são descritos os sistemas e detalhes das simulações realizadas.

2.1 Dinâmica Molecular

O conceito de dinâmica molecular foi introduzido na década de 50 por Alder e Wainwright [64] com o estudo de interações entre esferas rígidas, com a finalidade de contribuir com análises de mecânica estatística de líquidos simples. Alguns anos depois, a técnica avançou com a introdução de potenciais realísticos contínuos para simular argônio líquido [65] e água [66]. Desde então, a DM torna-se cada vez mais abrangente, acompanhando a evolução de procedimentos de simulação e de capacidade computacional. Atualmente, são objetos de estudo na área desde sólidos cristalinos e amorfos até sistemas biológicos complexos (membranas modelo, proteínas, DNA, etc.), passando por líquidos moleculares e iônicos, surfactantes e sistemas interfaciais diversos [67–69].

A metodologia DM é baseada nos princípios básicos da Mecânica Clássica e da Física Estatística e pode proporcionar o acesso ao comportamento dinâmico microscópico dos átomos que constituem um dado sistema. Desta informação, os mecanismos microscópicos da transferência de massa e energia num processo químico, por exemplo, podem ser observados. Além disso, a DM pode ser empregada como um meio de amostragem de um *ensemble* mecânico-estatístico. Assim, é possível determinar propriedades termodinâmicas no equilíbrio, tais como: pressão, temperatura, volume, entalpias, energias livres, etc, além da estrutura, propriedades de transporte, propriedades espectroscópicas e potenciais de força média ao longo de caminhos de reação. Os observáveis em um sistema são formulados em termos de médias no *ensemble*, que são caracterizados por valores fixos das variáveis termodinâmicas tais como energia, E , temperatura, T , pressão, P , volume, V , número de partícula, N , ou potencial químico, μ . Estas variáveis podem ser consideradas como parâmetros experimentais de controle que especificam as condições sob as quais a ‘experiência’ no computador é executada.

2.1.1 As Simulações

Para se aplicar a técnica de DM em um sistema, inicialmente é necessário criar uma ‘caixa de simulação’ contendo N moléculas, sujeita às condições de fronteira

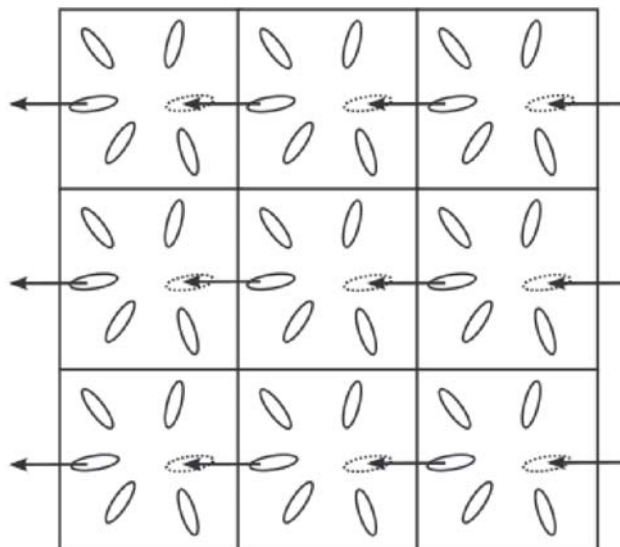


Figura 2.1. Aplicação de condições periódicas de contorno a uma caixa de simulação hipotética. Quando um componente i deixa a caixa, sua imagem entra na caixa pela face oposta, simultaneamente.

apropriadas para a geometria ou simetria do sistema macroscópico [70]. Em um *ensemble* em que se fixa o volume da caixa (canônico ou microcanônico, por exemplo), as dimensões são escolhidas de tal forma que a densidade numérica, N/V , corresponda àquela do sistema real nas condições termodinâmicas desejadas. Quando não se conhece exatamente a densidade experimental do sistema, um procedimento comum é rodar uma simulação longa em *ensemble* NpT , em que o volume do sistema flutua mantendo fixas a pressão e a temperatura.

O número N de moléculas na caixa de simulação é muito pequeno ($10^3 - 10^6$ átomos) se comparado a uma amostra examinada no laboratório. Com isso, os efeitos de superfície, isto é, as interações de átomos na fronteira da caixa são bastante significativos. Para minimizar estes efeitos, geralmente emprega-se *condições periódicas de contorno*. A caixa de simulação é rodeada por suas cópias idênticas em todas as direções, infinitamente, formando um sistema que tenda ao limite termodinâmico, embora periódico, onde as partículas se movimentam de maneira idêntica à movimentação na célula principal (Figura 2.1).

A configuração inicial na caixa de simulação pode ser obtida com a distribuição

aleatória das moléculas na caixa de simulação. Já em simulações de proteínas, as posições iniciais são geralmente obtidas a partir das estruturas cristalográficas. Velocidades iniciais, por sua vez, são geralmente atribuídas aleatoriamente aos átomos do sistema de acordo com uma distribuição de Maxwell-Boltzmann para a temperatura desejada.

Este procedimento deve ser acompanhado por uma prescrição de como as interações entre as imagens das partículas pertencentes a diferentes réplicas periódicas devem ser manipuladas. Se as forças envolvidas forem de curto alcance, podem ser aplicadas as convenções do *raio de corte esférico* e da *imagem mínima*. Quando as forças de interação entre as partículas decaem lentamente com a distância, como nas interações Coulômbicas, podemos substituir na célula de simulação a força de interação simples entre pares de partículas por uma força efetiva (método da soma infinita), obtida somando-se as interações entre todas as imagens periódicas dessas partículas. Um dos métodos bem estabelecidos para isso é o das somas de Ewald.

A idéia essencial na geração das trajetórias de DM é muito simples. Dadas as posições de todos os átomos do sistema, as forças atuando sobre eles podem ser calculadas pela derivada do potencial $\vec{F} = -\nabla V$. De acordo com a Segunda Lei de Newton, podemos computar a aceleração de cada átomo a partir destas forças por

$$-\nabla V = m\vec{a}, \quad (2.1)$$

sendo m a massa do átomo. A aceleração é, então combinada às posições e velocidades em um tempo t para computar as posições e velocidades em um tempo $t + \delta t$. Dadas as posições neste novo instante, os potenciais são recalculados, definindo novas forças, novas acelerações e, assim, permitindo novamente o cálculo das posições em um instante posterior. A repetição deste ciclo leva a obtenção da trajetória das partículas do sistema, ou seja, obtêm-se o *ensemble* nas condições termodinâmicas de interesse.

Existem muitos algoritmos para a resolução das equações de movimento mas todos eles assumem que as posições, velocidades e acelerações podem ser aproximadas como séries de expansão de Taylor [67]:

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \vec{b}(t) + \dots \quad (2.2)$$

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}(t) + \delta t \vec{a}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{b}(t) + \dots \quad (2.3)$$

$$\vec{a}(t + \delta t) = \vec{a}(t) + \delta t \vec{b}(t) + \dots \quad (2.4)$$

em que $\vec{v}$, $\vec{a}$, $\vec{b}$ e etc. são vetores tridimensionais de velocidade (i.e. a primeira derivada no tempo das posições), aceleração (a segunda derivada), terceira derivada, e assim por diante.

Na decisão de qual algoritmo é o mais apropriado, devem ser feitas considerações importantes, como o esforço computacional requerido e a conservação da energia. Dentre os algoritmos mais utilizados atualmente nas simulações, estão o algoritmo Verlet [71] e Verlet-velocidade [71–73]. Este último é o algoritmo implementado no programa NAMD. Segue a descrição do mesmo.

O algoritmo Verlet-velocidade

O algoritmo Verlet-velocidade consiste no cálculo das posições usando a expansão de Taylor truncada na segunda ordem.

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t). \quad (2.5)$$

Já a velocidade no instante $t + \delta t$ é computada pela média das acelerações nos instantes $t + \delta t$:

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t) \delta t}{2} + \frac{\vec{a}(t + \delta t) \delta t}{2} \quad (2.6)$$

O algoritmo Verlet-velocidade é implementado em três etapas, pois, como pode ser visto em 2.6, é necessário armazenar os valores de aceleração nos instantes t e $t + \delta t$ para o cálculo de novas velocidades. Assim, primeiramente, as posições em $t + \delta t$ são calculadas pela Equação 2.5. As velocidades no tempo $t + \frac{1}{2} \delta t$ são, então, determinadas com:

$$\vec{v}(t + \frac{1}{2} \delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t \vec{a}(t) \quad (2.7)$$

A velocidade neste instante intermediário é utilizada para o cálculo das posições em $t + \delta t$,

$$\vec{x}(t + \delta t) = \vec{x}(t) + \vec{v}(t + \frac{1}{2} \delta t) \delta t \quad (2.8)$$

As forças resultantes são calculadas para as novas posições no instante $t + \delta t$ e, então, computa-se $\vec{a}(t)$. Assim, a Equação 2.6 pode ser resolvida, já que

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}(t + \frac{\delta t}{2}) + \frac{\delta t}{2} \vec{a}(t + \delta t). \quad (2.9)$$

Dentre as razões para o corrente uso deste algoritmo em simulações de DM, está a de que ele requer a avaliação das forças apenas uma vez por passo de tempo. Verlet-velocidade é considerado um aprimoramento ao algoritmo Verlet, pois as velocidades são calculadas com maior precisão e menos vetores tem que ser armazenados.

2.1.2 Potenciais de Interação

As forças em DM são modeladas através de potenciais clássicos (campos de força) baseados em dados experimentais e em superfícies de energia potencial oriundas da estrutura eletrônica obtida da Mecânica Quântica. Diversos potenciais efetivos clássicos para o tratamento das interações moleculares foram desenvolvidos e aplicados com sucesso nesta área. Dentre os campos de força bem estabelecidos usados para biomoléculas em geral (sacarídeos, peptídeos, proteínas e ácidos nucléicos), destacam-se OPLS [74, 75], CHARMM [76, 77], AMBER [78–80] e GROMOS [81]. Um campo de força muito utilizado para sistemas poliméricos é o COMPASS [82, 83]. Para materiais inorgânicos, são referência os campos de força Universal (UFF) [84] e Dreiding [85].

Em geral, os campos de força em uso atualmente compõem-se de duas partes (Eq. 2.10), uma descreve os graus de liberdade intra-moleculares (potenciais ‘ligados’ ou ‘covalentes’) e a outra descreve as interações entre átomos não ligados covalentemente (potenciais ‘não ligados’).

$$V = V^{ligado} + V^{não-ligado} \quad (2.10)$$

A parte do potencial ligado divide-se em termos de potenciais de estiramento de ligação, deformação angular e torção de ângulo diedral:

$$V^{ligado} = \sum_l V_l^L + \sum_a V_a^A + \sum_d V_d^D. \quad (2.11)$$

Em condições relativamente brandas (geralmente empregadas na simulações de DM), em que não ocorrem formações e rompimentos de ligações, o potencial de estiramento das ligações covalentes em moléculas comuns pode ser aproximado a um potencial harmônico

$$V_l(r) = \frac{K_l^L}{2}(r - r_{0,l})^2, \quad (2.12)$$

em que r é a distância entre dois núcleos. K_l^L e $r_{0,l}$ são a constante de força do oscilador harmônico e a distância de equilíbrio, respectivamente. Apenas com isto, podemos descrever uma molécula diatômica como o monóxido de carbono no vácuo. Isto é, são dois átomos, um com massa 12 e outro com massa 16 u.a., interagindo através de um potencial harmônico que tem um $r_{0,co}$ correspondente à distância ótima da ligação C-O e uma constante de força K_{co}^L . A distância de equilíbrio e a constante de força podem ser obtidas, por exemplo, a partir de um espectro vibracional, ou usando cálculos de estrutura eletrônica.

A deformação de ângulos de seus valores de equilíbrio também são frequentemente descritas usando um potencial harmônico, caracterizado por uma constante de força e por uma geometria de equilíbrio:

$$V_a^A(\theta) = \frac{K_a^A}{2}(\theta - \theta_{0,a})^2. \quad (2.13)$$

As maiores alterações conformacionais em uma molécula, geralmente, são causadas por uma complexa relação entre termos ‘não ligados’ e os termos de potenciais de diédros [67]. Estes são quase sempre expressos como uma expansão em série de cossenos, a partir da contribuição de todas as sequências de quatro átomos ligados A-B-C-D no sistema. Por exemplo, para uma molécula de etanol, o potencial diedral inclui nove termos referentes a rotação da ligação C-C (6 x H-C-C-H e 3 x H-C-C-O). Uma forma funcional para o potencial diedral é:

$$V_d^D(\chi) = \sum_n \frac{K_{d,n}}{2}(1 + \cos(n\chi - \phi_{d,n})), \quad (2.14)$$

em que $K_{d,n}$ é uma constante associada à altura da barreira da curva de potencial, n é a multiplicidade, que determina o número de pontos mínimos na curva ao rotacionar a ligação completamente, e $\phi_{d,n}$ é o ângulo de fase, que determina quando o ângulo torsional passa por um ponto de mínimo. Estes potenciais são calculados entre átomos próximos espacialmente, o que faz com que a demanda computacional seja relativamente baixa. Já o cálculo das interações entre átomos não ligados é a parte mais custosa de uma simulação por DM, pois existe um número muito maior de interações deste tipo em um sistema. Estes cálculos são responsáveis por 90-95% do tempo de processamento. O potencial ‘não ligado’ constitui-se da soma

de potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb:

$$V^{n\tilde{a}o-ligado} = \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} (V^{LJ}(r_{ij}) + V^C(r_{ij})) \quad (2.15)$$

O potencial de Lennard-Jones caracteriza-se por ser extremamente repulsivo a distâncias curtas e atrativo em distâncias relativamente longas. Ele tem a forma

$$V^{LJ}(r_{kl}) = 4\epsilon_{kl} \left[\left(\frac{\sigma_{kl}}{r_{kl}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{kl}}{r_{kl}} \right)^6 \right], \quad (2.16)$$

em que os parâmetros ϵ_{kl} e σ_{kl} determinam, respectivamente, o valor do mínimo de energia e a distância em que o potencial se anula (Figura 2.2).

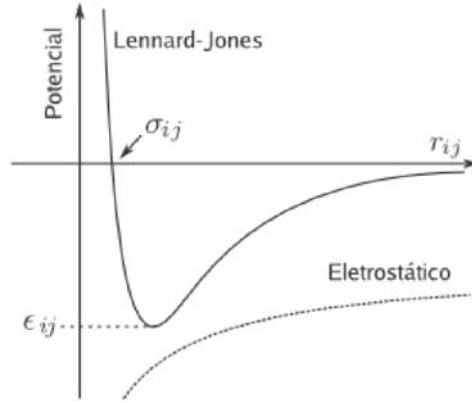


Figura 2.2. Potenciais de interação entre pares de átomos não ligados covalentemente em uma simulação. O potencial de Lennard-Jones representa as interações de van der Waals e é construído a partir de um componente repulsivo (αr^{-12}) e de um componente atrativo (αr^{-6}). O potencial eletrostático depende das cargas parciais atômicas e consiste em um potencial coulômbico clássico.

O potencial coulômbico descreve as interações eletrostáticas segundo:

$$V^C(r_{kl}) = \frac{q_k q_l}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{kl}}, \quad (2.17)$$

em que q_k e q_l são as cargas parciais dos dois átomos envolvidos e r_{kl} , a distância entre eles.

Outros termos são incluídos em alguns campos de força, como, por exemplo, o potencial de diédrio impróprio, necessário em alguns casos para alcançar uma geometria plana (em um grupo amida, por exemplo).

2.1.3 Parametrização de um Campo de Força

Para definir um campo de força, é preciso especificar não só a sua forma funcional como seus parâmetros (as várias constantes, como K_l^L , $K_{d,n}$ e $\sigma_{k,l}$, nas Equações 2.12, 2.14 e 2.16). Esta é uma tarefa desafiadora e importante, pois dela depende a qualidade dos resultados obtidos a partir das simulações por DM. Até mesmo a inclusão de apenas alguns parâmetros a um campo de força já bem estabelecido pode ser um processo bastante trabalhoso.

Não há forma e parâmetros específicos que sejam ‘corretos’ para modelar os constituintes de um sistema. De um modo geral, os campos de força têm seus parâmetros ajustados de modo a reproduzir algumas propriedades estruturais ou termodinâmicas obtidas experimentalmente, tais como entalpia de vaporização e densidade de líquidos, e a curva de compressibilidade em função da pressão de gases. No caso dos líquidos, estas propriedades estão intimamente relacionadas às interações atrativas e repulsivas entre os componentes do sistema. Potenciais assim obtidos são capazes de prever várias outras propriedades que manifestam estas interações.

Outra forma, cada vez mais utilizada, de determinar parâmetros são os cálculos *ab initio* de estrutura eletrônica. Este recurso é particularmente útil para casos em que a quantidade de dados termodinâmicos experimentais são escassos. É o caso, muitas vezes, de macromoléculas biológicas, como proteínas. O campo de força CHARMM, por exemplo, foi desenvolvido tanto a partir de dados experimentais quanto de cálculos quânticos.

Uma importante característica dos campos de força é a transferibilidade, o que significa que um mesmo conjunto de parâmetros pode ser utilizado para modelar moléculas relacionadas, ao invés de ter que definir um novo conjunto de parâmetros para cada molécula individualmente [67]. Parâmetros relacionados a graus de liberdade ‘rígidos’ (estiramento de ligação e deformação angular) influenciam pouco o desempenho de um campo de força e são especialmente transferíveis. Também assume-se frequentemente que um mesmo conjunto de parâmetros de vdW pode ser usado para a maioria, senão todos, os átomos de um mesmo elemento. Já as cargas atômicas podem ser determinadas por ajuste do potencial eletrostático e os parâmetros de torção são comumente obtidos através de cálculos QM para diferen-

tes ângulos de torção, de modo a ajustar o potencial diedral (Eq. 2.14) à curva de energia obtida.

Há na literatura diversos trabalhos de DM envolvendo mono e bicamadas de fosfolipídios, incluindo POPC, cujos campos de força foram e têm sido amplamente testados e aprimorados [86–88]. Neste trabalho, adotamos o campo de força CHARMM27 [89, 90] para os lipídios. Para a água adotamos o modelo TIP3P [91], pois o modelo CHARMM de biomoléculas foi desenvolvido baseado na solvatação em água TIP3P. Além disso, este modelo reproduz bem as propriedades estruturais e termodinâmicas encontradas experimentalmente para a água [91]. A articaína ainda não havia sido parametrizada e, portanto, foi necessário fazê-lo para este trabalho. No Capítulo 3, descreve-se o modelo criado para a ATC, baseado no campo de força CHARMM.

Capítulo 3

Parametrização da Articaína

Devido à ampla variedade de compostos de interesse farmacológico, é frequente a necessidade de desenvolver novos parâmetros que possibilitem o estudo destes compostos por simulações de dinâmica molecular. Nesta parte, é descrita a parametrização da articaína, com base no campo de força CHARMM. Por praticidade, passa-se a referir-se às espécies neutras da articaína como R-ATC e S-ATC e, às protonadas, como HR-ATC e HS-ATC.

Como foi comentado na Seção 2.1.3, alguns parâmetros de campo de força são especialmente transferíveis. Assim, a ATC foi parametrizada explorando as informações do CHARMM, considerando similaridades entre átomos que formam a articaína e os átomos de moléculas já bem descritas neste campo de força, para que os parâmetros de Lennard-Jones e de movimentos internos (principalmente deformação angular e estiramento de ligação) fossem, sempre que apropriado, utilizadas. Para tal, foram considerados fatores como hibridização e eletronegatividade dos átomos nas vizinhanças dos sítios em questão. Especialmente as cargas parciais atômicas e alguns diédros da ATC tiveram que ser calculados quanticamente, conforme descrito nas duas Seções seguintes.

Os valores de distância de equilíbrio, r_0 , e ângulo de ligações, θ_0 , (Eq. 2.12 e 2.13) foram obtidos através da otimização geométrica da estrutura no nível de teoria B3LYP/6-311G(d,p) [92, 93] em um meio de permissividade dielétrica igual à da água, usando um Modelo Contínuo Polarizável (em inglês, sigla PCM) [94–96]. Todos os cálculos quânticos deste trabalho foram efetuados usando o programa

Gaussian 03 [97]. Na Figura 3.1, são apresentadas as estruturas resultantes, de R-ATC, S-ATC e HR-ATC.

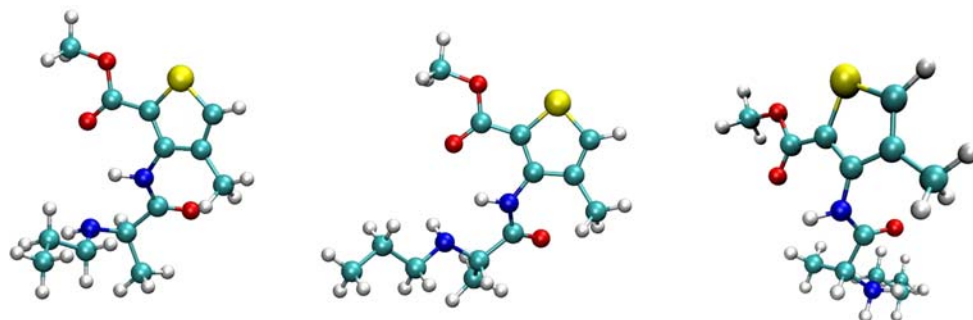


Figura 3.1. Resultado da otimização geométrica da articaína (R-ATC, S-ATC e HR-ATC, respectivamente).

No campo de força CHARMM, assim como na maioria dos campos de força, é preciso definir o ‘tipo atômico’ de cada átomo do sistema. O tipo atômico usualmente informa sobre o número atômico, grau de hibridização e, ainda, ambiente molecular. Por exemplo, é necessário na maioria dos campos de força distinguir entre átomos de carbono com hibridização sp^3 , sp^2 e sp , que adotam diferentes geometrias moleculares. Os parâmetros do campo de força são expressos em termos destes tipos atômicos. No arquivo de parâmetros anexado a este texto e utilizado nas simulações deste trabalho, foram definidos tipos atômicos listados abaixo (identificados na Figura 3.2) para os átomos da ATC.

Tipo atômico	Definição
C	C de carbonila em ambiente similar a <i>backbone</i> de peptídeo (amida)
CA	C de anel aromático
CL	C da carbonila do éster
CT1	C alifático sp^3 terciário
CT2	C alifático sp^3 secundário
CT3	C alifático sp^3 primário
H	H em ligação apolar
HA	H ligado a anel aromático
HB	H em ambiente similar a <i>backbone</i> de peptídeo
HC	H de amina protonada (ocorre

	apenas em ATC protonada)
HP	H em ligação polar
NH1	N em ambiente similar a <i>backbone</i> de peptídeo (amida)
NH2	N de amina secundária
O	O de carbonila em amida
OBL	O de carbonila de éster
OSL	O de éster
SS	S de tiofeno

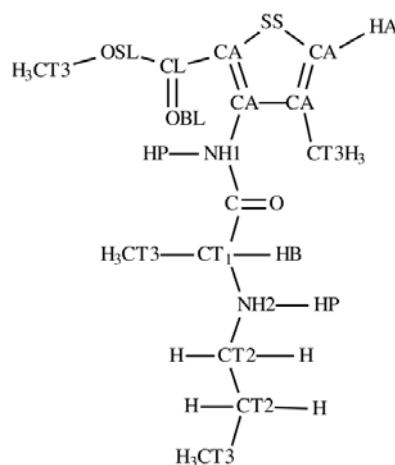


Figura 3.2. Tipos atômicos assinalados na estrutura da ATC.

3.1 Cargas Parciais Atômicas

A escolha mais natural para as cargas parciais atômicas poderia ser as cargas de Mulliken, baseadas nos orbitais moleculares e suas ocupâncias, mas o método de Singh, Kollman [98] e Besler *et al.* [99], conhecido como esquema Merz-Singh-Kollman (MK) deriva cargas parciais que reproduzem melhor o potencial eletrostático quântico no estado fundamental para moléculas em fase condensada.

As cargas parciais de R-ATC, S-ATC e HR-ATC, Tabela 3.1), foram geradas de acordo com o esquema MK, no nível HF/6-31G(d,p) [100]. Aos hidrogênios considerados quimicamente equivalentes foram atribuídas cargas iguais, calculadas a

Tabela 3.1. Cargas parciais atômicas calculadas para as espécies R-ATC, S-ATC e HR-ATC. Os átomos são identificados de acordo com a Figura 1.5, sendo que os átomos de hidrogênio são numerados de acordo com o átomo ao qual se ligam.

Átomo	Cargas parciais atômicas		
	R-ATC	S-ATC	HR-ATC
C1	0.0259	-0.0573	-0.0779
C2	-0.2246	-0.2155	-0.2131
H2	0.2394	0.2393	0.2566
S3	0.0024	0.0043	0.0832
C4	-0.6556	-0.6948	-0.6519
C5	0.5683	0.6682	0.6639
C6	1.0461	1.1132	1.0508
O7	-0.3409	-0.3500	-0.3460
C8	-0.1541	-0.1797	-0.1420
H8	0.1144	0.1109	0.1213
N9	-0.6033	-0.7214	-0.8615
H9	0.3327	0.3267	0.4243
C10	0.5892	0.6750	0.7435
O11	-0.5900	-0.5852	-0.5338
C12	-0.4379	-0.2883	-0.3171
H12	0.1427	0.1035	0.1151
O13	-0.6656	-0.7055	-0.6656
C14	0.4791	0.2398	0.1759
H14	-0.0035	0.0509	0.0818
N15	-0.9348	-0.6507	-0.5892
H15	0.3787	0.3528	0.3803
C16	0.2863	0.0233	0.0662
H16	-0.0046	0.0500	0.1048
C17	0.0709	0.1651	0.0657
H17	0.0175	-0.0015	0.0316
C18	-0.3420	-0.3667	-0.3249
H18	0.0818	0.0870	0.1064
C19	-0.3854	-0.3976	-0.4049
H19	0.0921	0.1053	0.1513

partir da média aritmética entre seus valores. Analisando a Tabela 3.1, verifica-se que as cargas obtidas para as três moléculas têm valores bem parecidos na maioria dos átomos. Comparando os estereoisômeros, observa-se que as diferenças passam a tornar-se maiores à medida em que se aproxima o centro assimétrico, consequência da conformação e arranjo espacial distintos (Figura 3.1). Já quando se faz a comparação entre R-ATC e HR-ATC, leva-se em conta, fundamentalmente, que a presença de um próton em excesso em HR-ATC altera a distribuição eletrônica e a conformação do estado fundamental.

3.2 Parâmetros de Torção

Devido à especificidade da configuração molecular, encontrar parâmetros em um campo de força para caracterizar as torções de uma molécula arbitrária é mais difícil do que para as distâncias e ângulos entre ligações. Entretanto, uma boa descrição das torções é fundamental para as propriedades conformacionais de moléculas flexíveis [101].

Os parâmetros da R-ATC para as rotações torsionais indicadas na Figura 3.3 (parte I, à esquerda) foram determinados a partir das energias obtidas de varreduras de energia com a rotação diedral, no nível de teoria B3LYP/6-311G(d,p). Então, para hipotéticos átomos ‘1-2-3-4’, componentes da ATC, a varredura de energia foi feita em função da rotação de 360 graus ao redor dos átomos 2-3. Cada varredura consiste em uma série de relaxações estruturais, em que somente o ângulo em estudo é mantido fixo. A varredura também foi feita classicamente, usando todos os termos do campo de força, exceto o termo do potencial de torção do ângulo em questão, o qual deseja-se determinar. O resultado da subtração das duas curvas, uma obtida quanticamente e a outra classicamente, pode ser ajustada à forma clássica do potencial de torção diedral (Equação 2.14). Os valores dos parâmetros diedrais $K_{d,n}$, $\chi_{d,n}$ e n resultam deste ajuste não-linear.

Teoricamente, não há limite para o número de termos usados nesta série, mas, na prática, a soma é frequentemente truncada em $n = 3$. O princípio é não usar mais termos do que o necessário para uma boa descrição da curva de energia potencial. Além disso, o ângulo de fase $\phi_{j,n}$ é tipicamente restrito a 0° ou 180° no campo de força CHARMM. Isto preserva a simetria da curva ao redor de $\chi=0$, o que assegura que a molécula e sua imagem especular tenham a mesma energia diedral para mesmos $K_{d,n}$ e $\phi_{d,n}$.

Visando diminuir o custo da varredura QM, a molécula foi redesenhada eliminando as porções que pouco influenciam nas interações eletrônicas entre os átomos que representam esta torção. Assim, por exemplo, para o cálculo do diédro T1, a molécula foi recriada sem alguns grupos da ATC original, como, por exemplo, o grupo amina (Figura 3.3, parte I, à direita). Por outro lado, provavelmente não seria adequado, por exemplo, excluir o grupo amida, uma vez que este deve afetar a densidade eletrônica na região de T1 por ressonância eletrônica através do anel

aromático. No interior dos gráficos, as porções moleculares são representadas com

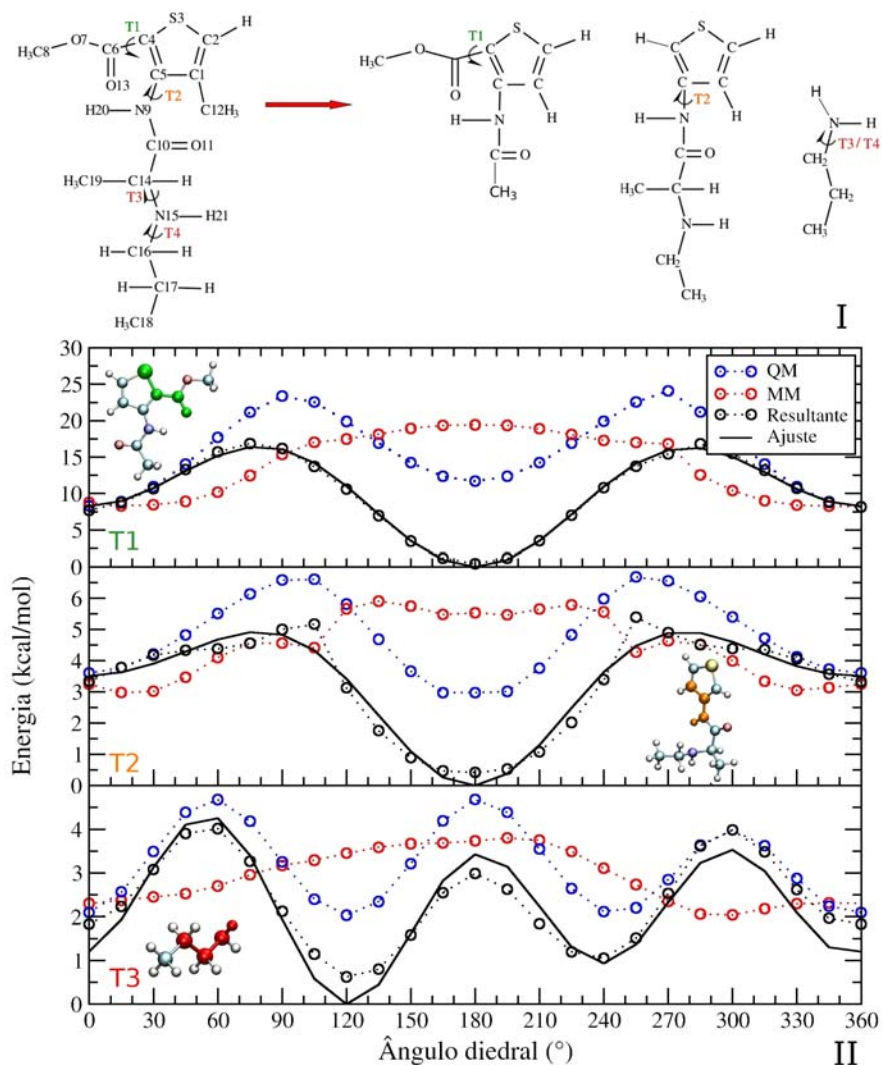


Figura 3.3. I) À esquerda estão assinaladas na estrutura R-ATC as torções cujos parâmetros foram calculados neste trabalho. À direita, apresentam-se moléculas menores do que a ATC, que foram usadas para estes cálculos. II) Curvas de potencial geradas para os diédros T1, T2 e T3. Os pontos circulosados nas curvas em azul são os valores de energia potencial obtidos quanticamente (QM) na varredura destes diédros, ao passo que os pontos das curvas em azul foram obtidos na varredura destes diédros usando o potencial clássico (MM, Equações 2.10-2.17). As curvas ‘resultantes’ são obtidas pela subtração de QM por MM. A partir do ajuste desta curva, obtêm-se os parâmetros diedrais.

os átomos genéricos ‘1-2-3-4’ destacados com uma determinada cor.

A partir deste procedimento e considerações, foram geradas as curvas de potencial para os diédros T1, T2 e T3 apresentadas na parte II da Figura 3.3. A aparência das curvas resultantes reflete fatores como a hibridização dos átomos envolvidos e ressonância eletrônica. Assim, observa-se na curva resultante correspondente à T1, por exemplo, que os mínimos estão em 180° e 0° , o que é condizente com o fato de se tratar de um grupo que tende a permanecer no plano do anel, por ser um substituinte retirador de elétrons do anel aromático por ressonância. Já a curva correpondente à T3 tem três pontos de mínimo, representando bem a estrutura eletrônica do nitrogênio, de hibridização sp^3 , segundo a Teoria dos Elétrons de Valência. A curva de potencial do diédro T4 deve ser muito similar à curva do diédro T3 e, portanto, foram utilizados os mesmos parâmetros para descrever ambos.

A torção de uma ligação pode ser descrita pelo ângulo entre os planos formados por diferentes conjuntos de átomos ‘1-2-3-4’. Por exemplo, a rotação T1 pode ser descrita por S3-C4-C6-O7, C5-C4-C6-O7, S3-C4-C6-O13 ou C5-C4-C6-O13. Em um arquivo de parâmetros do NAMD é preciso identificar $k_{d,n}$ para cada um destes J conjuntos de átomos, tal que $\sum_{j=1}^J k_{d,n}(j) = K_{d,n}$, com valores de $K_{d,n}$ obtidos pelo ajuste das curvas de energia potencial resultantes (Figura 3.3). Assim, ao criar o arquivo de parâmetros para a R-ATC, desmembramos os valores de $K_{d,n}$ adotando o único critério de atribuir valores mais baixos às representações diedrais que envolvam átomos de hidrogênio. Na Tabela 3.2, são apresentados os valores de $k_{d,n}$, obtidos a partir dos ajustes das curvas de potencial dos diédros T1, T2 e T3.

A diferença na configuração das formas isoméricas não influencia na ‘rigidez’ da rotação em torno de uma ligação. A estrutura eletrônica de um diédro poderia ser afetada por efeitos estéricos, mas as interações eletrônicas externas ao diédro já são descontadas quando se faz a subtração das curvas QM e MM. Portanto, os mesmos parâmetros torsionais obtidos a partir da R-ART são utilizados para S-ART. Estes parâmetros também foram usados para HR-ATC. Neste caso, a carga positiva extra em N15 deve afetar as torções T3 e T4. Efeitos desta protonação para a dinâmica conformacional deste diédro são parcialmente incorporados no potencial coluômbico, mas não explicitamente no potencial de torção nos estudos

aqui reportados. Após proceder como descrito, foram geradas cargas parciais atômicas sob influência de um modelo que simula a presença de água como solvente e parâmetros de ligações, ângulos e torsionais independentes de interações entre átomos não ligados.

A minimização clássica da ATC usando as Equações 2.10-2.17 deve gerar uma estrutura muito similar à obtida pela otimização geométrica quântica que, por sua vez, originou os valores de cargas parciais atômicas usadas no modelo clássico.

Tabela 3.2. Parâmetros dos diédros T1, T2 e T3 obtidos através dos ajustes das curvas de potencial mostradas na Figura 3.3.

	Diédro	$k_{d,n}$ (kcal/mol)	n	$\phi_{d,n}$ (graus)
T1	SS- CA - CL -OBL	1.250	1	180.0
	SS- CA - CL -OBL	-1.110	2	0.0
	SS- CA - CL -OSL	1.250	1	180.0
	SS- CA - CL -OSL	-1.110	2	0.0
	CA- CA - CL -OBL	1.250	1	180.0
	CA- CA - CL -OBL	-1.110	2	0.0
	CA- CA - CL -OSL	1.250	1	180.0
	CA- CA - CL -OSL	-1.110	2	0.0
T2	CA- CA -NH1-H	0.770	1	0.0
	CA- CA -NH1-H	-0.780	2	0.0
	CA- CA -NH1-H	0.110	3	0.0
	CA- CA -NH1-C	0.770	1	0.0
	CA- CA -NH1-C	-0.780	2	0.0
	CA- CA -NH1-C	0.110	3	0.0
T3	C-CT1-NH2-H	-0.092	1	0.0
	C-CT1-NH2-H	-0.042	2	180.0
	C-CT1-NH2-H	0.120	3	0.0
	C-CT1-NH2-CT2	-0.092	1	0.0
	C-CT1-NH2-CT2	-0.042	2	180.0
	C-CT1-NH2-CT2	0.120	3	0.0
	CT2-NH3-CT1-HB	-0.092	1	0.0
	CT2-NH3-CT1-HB	-0.042	2	180.0
	CT2-NH3-CT1-HB	0.120	3	0.0
	H-NH3-CT1-HB	-0.092	1	0.0
	H-NH3-CT1-HB	-0.042	2	180.0
	H-NH3-CT1-HB	0.120	3	0.0
	CT2-NH3-CT1-CT3	-0.092	1	0.0
	CT2-NH3-CT1-CT3	-0.042	2	180.0
	CT2-NH3-CT1-CT3	0.120	3	0.0
	CT3-CT1-NH3-H	-0.092	1	0.0
	CT3-CT1-NH3-H	-0.042	2	180.0
	CT3-CT1-NH3-H	0.120	3	0.0

Portanto, como uma forma de testar o modelo proposto para a ATC, foi feita a minimização clássica da ATC (R-ATC, S-ATC e HR-ATC). Para isso, foi utilizado o algoritmo padrão do NAMD de gradiente conjugado. As estruturas obtidas a cada 100 passos puderam ser muito bem sobrepostas à estrutura otimizada quanticamente (Figura 3.4), tanto que diferenças são quase imperceptíveis.

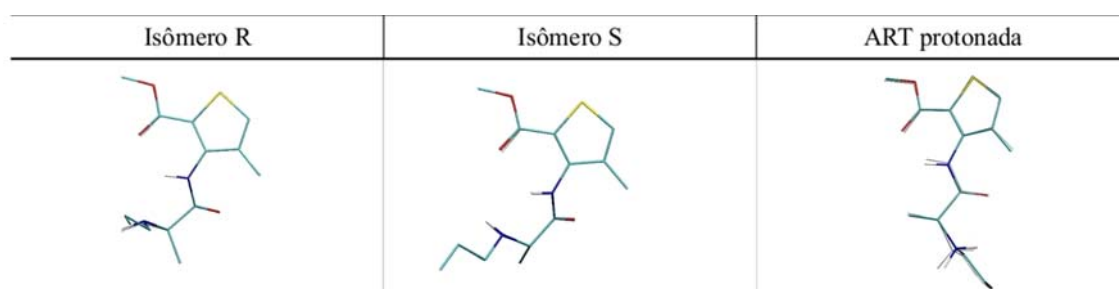


Figura 3.4. Sobreposição das estruturas da ATC geradas durante sua otimização clássica (traços em cinza) e quântica (estrutura colorida).

3.3 Simulações de Soluções Aquosas de Articaína

Em busca de conhecer propriedades do modelo proposto para a articaína em suas condições neutra e protonada, levógira e dextrógira, foram inicialmente estudadas soluções de articaína em água em diluição infinita, isto é, sistemas em que a articaína está totalmente envolta pelo solvente, não interagindo com outra molécula de soluto. Refere-se a estes sistemas como RATC e SATC para os que contêm o isômero R e o isômero S da ATC, respectivamente. O sistema denotado por HRATC contém a R-ATC em seu estado protonado. Neste, um ânion cloreto foi adicionado para manter a neutralidade do sistema. A dinâmica corresponde a condições termodinâmicas de 310 K e 1 bar. Mais detalhes destes sistemas e das respectivas simulações são encontrados na Caixa de Texto a seguir e na Tabela 3.3.

Mais detalhes das simulações Todas as simulações foram conduzidas através do programa NAMD [102, 103], que permite processamento paralelo no *cluster* que o grupo tem à disposição. Foram empregadas condições periódicas de contorno e um raio de corte esférico de decaimento suave a partir de 8 Å até 10 Å. As interações de vdW entre átomos separados por distâncias maiores do que este raio não são calculadas. As forças de Coulomb foram tratadas por somas de Ewald. As simulações foram geradas no *ensemble NPT*, com passo de tempo de 2 fs e aplicação do algoritmo de passos de tempo múltiplos RESPA [104]. As moléculas de água permaneceram completamente rígidas e todas as ligações incluindo átomo de hidrogênio tiveram seus comprimentos mantidos fixos ao valor determinado no arquivo de parâmetros. Para isso, foi empregado o algoritmo SHAKE [105]. Para a visualização dos sistemas moleculares foi utilizado o programa VMD [106], para a edição das figuras, os programas Inkscape [107], Gimp [108] e VMD e, finalmente, para a edição dos gráficos utilizou-se o programa Grace [109].

Tabela 3.3. Breve descrição das simulações feitas neste trabalho. ATC corresponde ao número de moléculas de articaína presentes no sistema e tipo estereoisomérico (R ou S). N_W refere-se ao número de moléculas de água presentes. As simulações analisadas tem duração de tempo dada em ns. N_{sim} é o número de simulações.

Sistema	ATC	N_W	N_{sim}	Tempo (ns)
RATC	1R	1100	1	2
SATC	1S	1100	1	2
HRATC ^a	1R	1100	1	2

^aPresença de um ânion cloro para manter a neutralidade total.

As estruturas da ATC extraídas das trajetórias dos sistemas RATC, SATC e HRATC (Tabela 3.3) foram sobrepostas à estrutura de referência otimizada quantitativamente (Figura 3.5a). As posições dos átomos das estruturas neutras variam nas proximidades da estrutura de referência, principalmente os átomos constituintes da extremidade da ATC (átomos 16-18 na Figura 1.5), o que era esperado para uma porção molecular flexível, sem ressonância eletrônica e formada por ligações simples. Já o resultado para estrutura protonada deve ser observado com maior cautela. Para isso, também foram feitas as sobreposições alinhando o anel aromático da ATC (Figura 3.5b) e, então, pode-se observar claramente que a ATC protonada em meio aquoso apresenta conformações significativamente distintas da estrutura de referência. Foi feita outra otimização geométrica partindo da última

estrutura da ATC protonada obtida na dinâmica, mas o resultado foi uma estrutura muito similar à obtida previamente. Sugere-se que a mudança conformacional em água ocorra de modo a estabilizar um maior momento dipolar da ATC e as interações específicas com a água.

Atualmente, é frequente a preocupação com possíveis efeitos distintos das formas enantioméricas de fármacos no organismo. Na área de anestesia, não raro, existem diferenças importantes entre os isômeros R e S quanto à atividade e farmacocinética. Um exemplo muito citado é do anestésico geral cetamina. O isômero S(+)-cetamina causa efeitos adversos mais leves, de agitação e confusão mental, além de melhor analgesia do que seu enantiômero [110]. Por isso, utiliza-se formulações que tendam a 100% de excesso enantiomérico do isômero S, levógiro. Em quase a totalidade dos casos, interpreta-se os efeitos estereoespecíficos de drogas quirais pela afinidade estereoseletiva com proteínas funcionais. Um trabalho que fugiu a esta tendência é o de Mizogami e colaboradores [111], que pesquisou indícios de estereoseletividade na interação dos enantiômeros da bupivacaína com membranas fosfolipídicas, através de medidas de espectroscopia de fluorescência

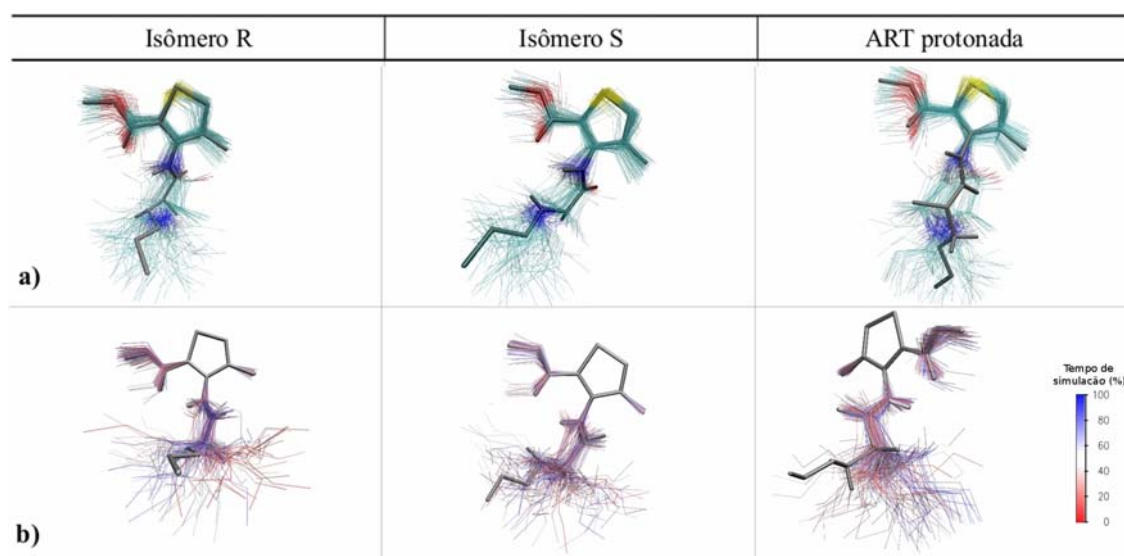


Figura 3.5. a) Sobreposição de estruturas de ATC geradas nas simulações dos sistemas RATC, SATC e HRATC (traços coloridos) à gerada pela otimização geométrica quântica (traços em cinza); b) Idem ao item *a*, mas com o alinhamento do anel aromático. Neste caso, as cores referem-se à evolução das conformações das moléculas no tempo.

e de cromatografia líquida de alta performance. Já se sabe que o isômero S(-)-bupivacaína apresenta vantagens farmacotxicológicas sobre seu antípodo óptico e racemato. Mizogami verificou que os isômeros S(-)- e R(+)-bupivacaína produziam efeitos muito similares de desorganização e abaixamento da temperatura de transição de fases de membranas DPPC e que interações estereoespecíficas só passaram a ser notáveis à medida em que se incorporava colesterol à membrana [111].

Para conhecer um pouco do modo como o arranjo espacial dos isômeros da ATC influencia em suas interações com o meio investigamos a função de distribuição radial de pares. Esta função, geralmente denotada $g_{ij}(r)$, define-se, basicamente, como a probabilidade de se encontrar uma partícula j a uma distância r de uma partícula i , relativamente à probabilidade esperada para uma distribuição homogênea, na mesma densidade [112]. Na prática, a função é computada através da razão entre o número N_j de partículas j em uma casca esférica de raio interno r e externo $r + \Delta r$, com origem em i , e a quantidade esperada de sítios j se estes fossem distribuídos uniformemente, como um gás ideal:

$$g_{ij}(r) = \frac{\langle N_j(r + \Delta r) \rangle}{4\pi\rho_j r^2 \Delta r}, \quad (3.1)$$

em que ρ_j é a densidade de sítios j no sistema. Em simulações de DM, obtêm-se o perfil da função $g_{ij}(r)$ através da média sobre todas as partículas i e j e sobre todo o intervalo de simulação. Alterações na densidade local nas vizinhanças das moléculas de referência geram valores de $g_{i,j}$ diferentes de 1, valor para o qual tende a função em distâncias grandes.

Foram traçadas as curvas de função de distribuição de pares entre sítios receptores e doadores de ligações de hidrogênio (LH) entre os isômeros da ATC e moléculas de água, para os sistemas RATC e SATC. Os resultados estão expostos na Figura 3.6. Nas legendas, estão identificados os sítios da ATC em análise. Deve-se inferir que, quando se trata de um sítio receptor de LH da ATC, o par atômico relevante envolve os átomos de hidrogênio da água. Inversamente, quando se identifica um sítio doador de LH na ATC, toma-se o oxigênio da água. As linhas cheias referem-se ao isômero R-ATC e as tracejadas, ao isômero S-ATC. Verifica-se que a estrutura de hidratação das duas moléculas é muito similar. As diferenças mais evidentes aparecem ao redor do sítio N15, próximo ao carbono assimétrico (C14). Para quantificar as semelhanças e diferenças das funções dos sistemas RATC e

SATC, computou-se o número de coordenação N_{ij} do sítio j em torno do sítio i , através de:

$$N_{ij} = 4\pi\rho_j \int_0^{r_{min}} g_{i,j}(r)r^2 dr, \quad (3.2)$$

sendo r_{min} , a posição do primeiro mínimo da função $g_{i,j}$. Estas e outras informações sobre as distribuições obtidas para os isômeros da ATC em solução aquosa estão dispostas na Tabela 3.4. As curvas correspondentes aos sítios O13, O11, N15, H15 e H9 apresentam o primeiro pico bem definido e posicionado em distância menor do que 2,6 Å. Este é o perfil típico de sítios que interagem significativamente com a água via ligações de hidrogênio.

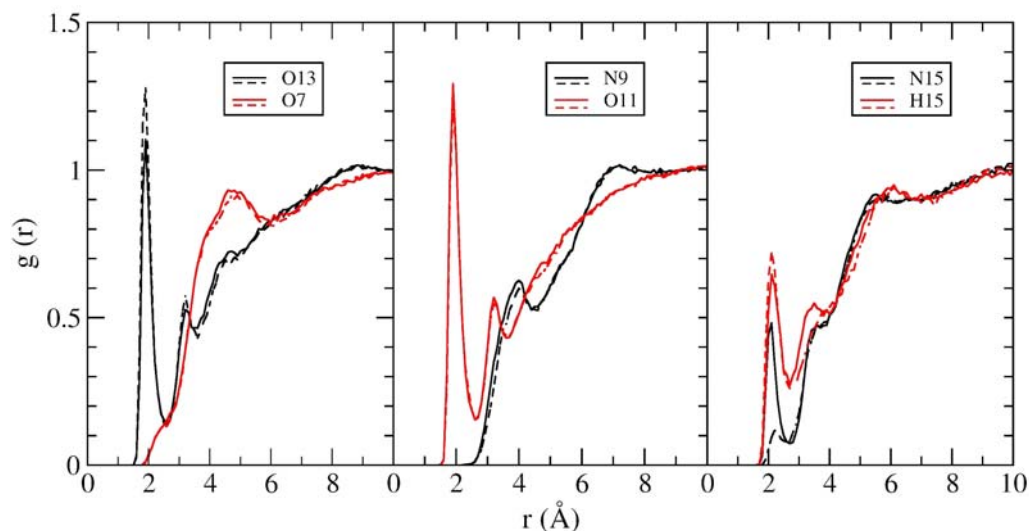


Figura 3.6. Função de distribuição de pares entre sítios específicos da ATC (identificados na legenda) e da água.

Infelizmente, ainda não há estudos experimentais da estrutura de hidratação da ATC que possam ser comparados aos resultados destas simulações. No entanto, os resultados das simulações da ATC em membranas POPC, que serão apresentados e discutidos no capítulo seguinte, mostram grande compatibilidade com resultados experimentais e, assim, sugere-se que o modelo proposto para a ATC é adequado para simulações computacionais deste composto em membranas modelo.

Com base no estudo de Mizogami e nas discussões acima sobre interações estereoespecíficas dos enantiômeros da bupivacaína em membranas lipídicas, espera-se

Tabela 3.4. Dados obtidos a partir das funções de distribuição de pares mostradas na Figura 3.6, sendo r_{min} , a distância do primeiro mínimo da curva, N_w , o número médio de átomos (H ou O) da água na primeira camada de hidratação e r_{pico} , a distância do primeiro pico em relação à origem.

	R-ATC			S-ATC		
	$r_{min} (\text{\AA})$	N_w	$r_{pico}(\text{\AA})$	$r_{min} (\text{\AA})$	N_w	$r_{pico}(\text{\AA})$
O13	2,6	0,8	1,9	2,6	0,9	1,9
O7	–	–	–	–	–	–
N9	4,4	4,4	4,0	4,6	4,9	4,0
H9	2,7	0,6	2,1	2,7	0,4	2,1
O11	2,6	1,0	1,9	2,6	1,0	1,9
N15	2,7	0,4	2,1	2,6	0,1	2,2
H15	2,7	0,8	2,1	2,7	0,9	2,1

que a forma estereoisomérica da ATC pouco afetaria o comportamento geral do sistema de AL em membrana modelo. Nos capítulos seguintes desta Dissertação, serão analisadas propriedades do sistema composto por bicamada e o isômero R, apenas. Simulações com o enantiômero são delegadas a estudos posteriores.

Capítulo 4

Dinâmica Molecular de Articaína em Membranas POPC

4.1 Descrição das Simulações

Foram feitas nove simulações de equilíbrio de sistemas de ATC neutra em bicamada de POPC, sendo que o fármaco, uma única molécula, foi inicialmente posicionado no meio aquoso. Também foram geradas três simulações com a ATC protonada inicialmente no meio aquoso e uma outra simulação foi produzida iniciando-se com o composto no interior membranar. Estes sistemas foram previamente equilibrados (2 ns) e então simulados durante mais 10-20 ns no *ensemble* NP_zAT (número de átomos, pressão normal, área superficial da membrana e temperatura constantes), frequentemente aplicado com campo de força CHARMM [113–116]. Como neste *ensemble* não ocorrem as flutuações de área lateral da membrana que ocorreriam em uma membrana real, foram feitas simulações em que a área média por lipídio foi mantida constante em diferentes valores, próximos ao encontrado experimentalmente (cerca de $65 \text{ \AA}^2$ por lipídio) [117]. Deste modo, é possível verificar se ocorrem diferenças significativas no comportamento da ATC no interior membranar com efeitos de expansão e contração da bicamada.

Os sistemas simulados contendo ATC neutra foram nomeados como A64, A68 e A73 e com a ATC na forma protonada, HA64, em que os valores numéricos correspondem aos respectivos valores de área por lipídio fixados. Os sistemas constituem-se de uma molécula de articaína, cerca de 4580 moléculas de água e uma bicamada formada por 126 lipídios POPC, pré-equilibrada por Tieleman (<http://moose.bio.ucalgary.ca>). A Figura 4.1 mostra as dimensões de uma caixa de simulação de um sistema composto por uma bicamada de POPC (área média

por lipídio de $64 \text{ \AA}^2$) em água. Mais detalhes das simulações são apresentados na Tabela 4.1. As condições descritas na caixa de texto da Seção 3.3.

Tabela 4.1. Breve descrição das simulações feitas neste trabalho. ATC corresponde ao número de moléculas de articaína presentes no sistema e tipo estereoisomérico (R ou S). N_W e N_{POPC} referem-se, respectivamente, ao número de moléculas de água e de POPC presentes. A área por lipídio é dada em $\text{\AA}^2$ por lipídio e as simulações analisadas tem duração de tempo dada em ns. N_{sim} é o número de simulações feitas com o sistema em diferentes configurações iniciais.

Sistema	ATC	N_W	N_{POPC}	$\text{\AA}^2/\text{lip}$	N_{sim}	Tempo (ns)
A64	1R	4580	126	64	5	10-20
A68	1R	4586	126	68	3	10-20
A73	1R	4586	126	73	1	10
HA64 ^a	1R	4586	126	64	4	10-20

^aNeste sistema está presente um ânion cloro para manter a neutralidade total.

A escolha do ensemble

Nas simulações de bicamadas fosfolipídicas, é conhecido o fato de que a combinação do campo de força CHARMM com o *ensemble NPT* gera valores muito baixos de área superficial e propriedades típicas da fase gel [118]. Então, de modo a mimetizar o estado fluido, biologicamente relevante, muitas simulações de membranas modelo têm sido efetuadas com a aplicação de uma tensão superficial γ positiva (*ensemble NP γ T*).

As bicamadas que são estudadas experimentalmente são capazes de ajustar a área por lipídio de modo a atingir um mínimo de energia livre e, assim,

$$(\delta G/\delta A)_{A=A_{eq}} = \gamma = 0.$$

Entretanto, argumenta-se que as condições periódicas de contorno limitam as ondulações da bicamada e, assim, diferente de bicamadas macroscópicas, a tensão superficial de um segmento microscópico de membrana não é clara. Se é ou não apropriado aplicar uma tensão superficial em simulações de membranas ainda é uma questão ainda em aberto. Nós entendemos que a escolha do *ensemble* deva ser feita com base na tentativa de reproduzir as propriedades da bicamada em fase fluida. A avaliação do volume por lipídio, dos perfis de parâmetro de ordem e de

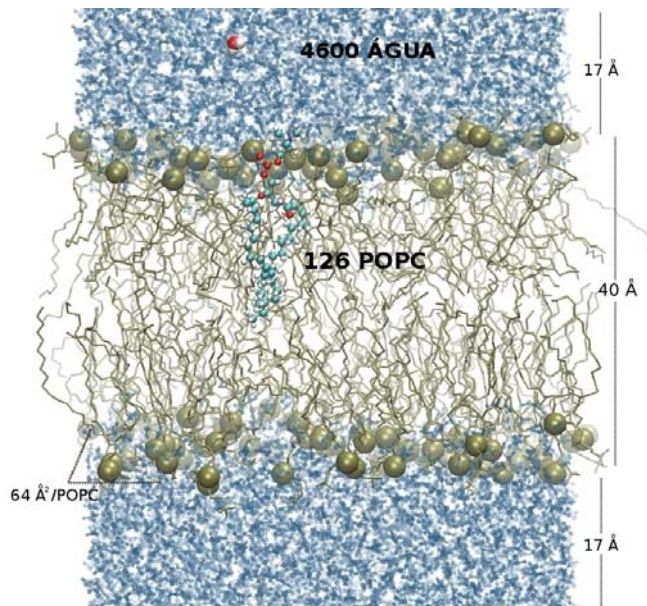


Figura 4.1. Caixa de simulação contendo 126 moléculas de POPC e 4600 de água. A água está representada em azul e os fosfolipídios, em verde-oliva. Uma molécula de água e outra de POPC foram colocadas em evidência, com todos os átomos que as constituem explícitos. As dimensões da caixa estão indicadas, assim como a área média por lipídio.

densidade eletrônica para a membrana de dipalmitoil-fosfatidilcolina mostra, claramente, que o CHARMM cumpre muito melhor este requisito quando combinado ao *ensemble* $NP\gamma T$ do que ao NPT , em que emprega-se um tensor de pressão isotrópico (a tensão superficial é nula) [119].

Uma alternativa a aplicar tensão superficial é fixar a variável conjugada, ou seja, a área superficial da membrana. Há dois argumentos principais a favor de optar por esta última. O primeiro deles é que a equilibração do sistema é muito mais rápida no *ensemble* NP_zAT do que no $NP\gamma T$, fato constatado neste trabalho e já discutido previamente na referência [114] para o sistema constituído de α -hélices em bicamadas. O outro argumento é que o cálculo do virial torna-se complicado pela presença de forças externas (empregadas nas simulações de caminho induzido realizadas neste trabalho), resultando em um rápido aumento na área superficial por lipídio. Esta é uma dificuldade conhecida em simulações com tensão superficial constante [120]. Considerando estes dois pontos, optou-se por utilizar o *ensemble* NP_zAT tanto em simulações de equilíbrio quanto na dinâmica

molecular de caminho induzido.

4.2 Resultados

Em cinco das oito simulações de sistemas de ATC neutra em POPC (sistemas A64, A68 e A73), foi possível observar a difusão do fármaco para ao interior da membrana. A Figura 4.2, mostra a trajetória do centro de massa da ATC ao longo do eixo z , normal à interface, para as simulações em que foi observada a penetração do composto na bicamada. No sistema A64, a difusão ocorreu em três das simulações, que são identificadas como A64-1, A64-2 e A64-3. Em até 22 ns de simulação, em nenhum dos sistemas ocorreu difusão da ATC de volta ao meio aquoso, tampouco houve eventos de transferência da ATC de uma camada lipídica à outra por via hidrofóbica. A simulação A64-3 foi prolongada a 35 ns e, ainda assim, estes eventos não ocorreram. É bem evidente na Figura 4.2 que a ATC tende a permanecer em uma mesma região relativa ao eixo perpendicular à superfície da membrana, comum nestas simulações. Trabalhos de DM com outros anestésicos locais evidenciam a difusão entre monocamadas em intervalos de tempo maiores e/ou quando estão presentes muitas moléculas do fármaco no interior da membrana [55, 121], o que aumenta a probabilidade de ocorrência do evento e, ainda, a fluidez e permeabilidade da membrana [44].

Nas simulações em que a ATC estava em seu estado protonado, não houve difusão da molécula para o interior da membrana, em até 22 ns de simulação. A partir da última configuração obtida em A64-3, a ATC neutra no interior da membrana foi 'manualmente' protonada. Em HA64 (Figura 4.2), verifica-se que a espécie protonada permanece no limiar interfacial, em uma região mais exterior da membrana do que a ATC neutra.

Os resultados descritos a seguir foram gerados a partir dos 6 últimos nanossegundos das simulações e referem-se a análises de propriedades da ATC (na forma neutra ou protonada) em sua posição de equilíbrio na bicamada.

A ordem do sistema pode ser avaliada através do perfil de densidade eletrônica (PDE), um recurso muito utilizado na descrição da organização estrutural de sistemas membranares e que pode ser obtido por experimentos de difração de raios-X e de nêutrons [122]. Geralmente, calcula-se o PDE em função do eixo z (perpen-

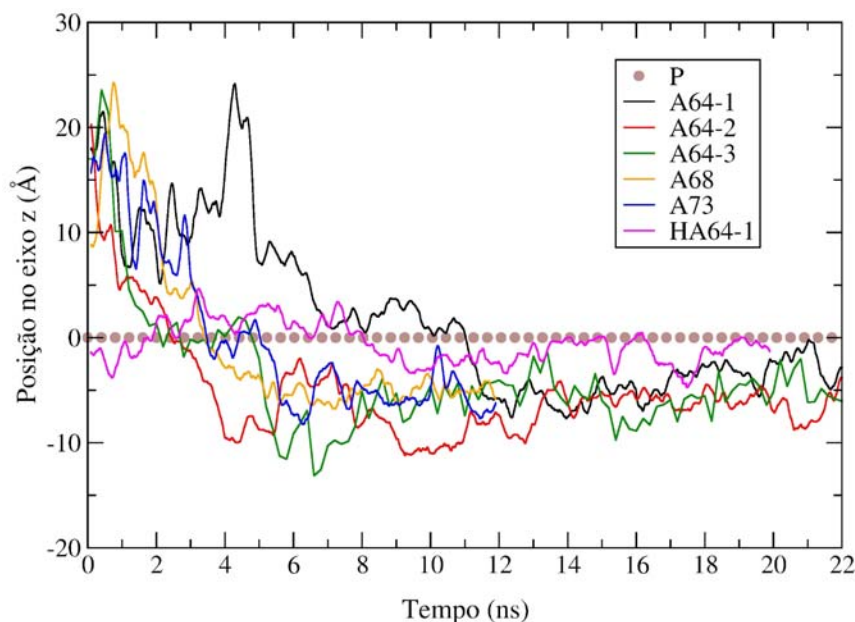


Figura 4.2. Trajetória no eixo z (perpendicular à superfície da bicamada) do centro de massa da ATC em relação à posição média dos átomos de fósforo das cabeças fosfolipídicas, representados por círculos em marrom. Os sistemas correspondentes às trajetórias são identificados na legenda. Em três das simulações do sistema A64, houve difusão da ATC para o interior da membrana (A64-1, A64-2 e A64-3).

dicular à superfície da bicamada), com a origem do eixo localizada no centro da bicamada, conforme esquematizado no topo da Figura 4.3. Basicamente, a análise consiste em calcular a média no tempo da densidade eletrônica em pequenas fatias de volume no eixo z , assumindo que em cada átomo concentra-se o número de elétrons igual ao número atômico do elemento químico correspondente.

O PDE dos sistemas com ATC neutra é apresentado na Figura 4.3. São mostradas apenas curvas de sistemas em que houve difusão da ATC para o interior da bicamada. Como para o sistema A64 isso ocorreu em três das cinco simulações geradas, são mostradas as curvas para ATC destes três casos.

Observa-se na Figura 4.3 que, quanto maior a área lateral fixada, menor o comprimento da caixa de simulação no eixo z e maior a densidade eletrônica por secção volumétrica neste eixo. Esta relação entre as dimensões da caixa de simulação mostra como o sistema se ajusta de modo a manter a densidade total da

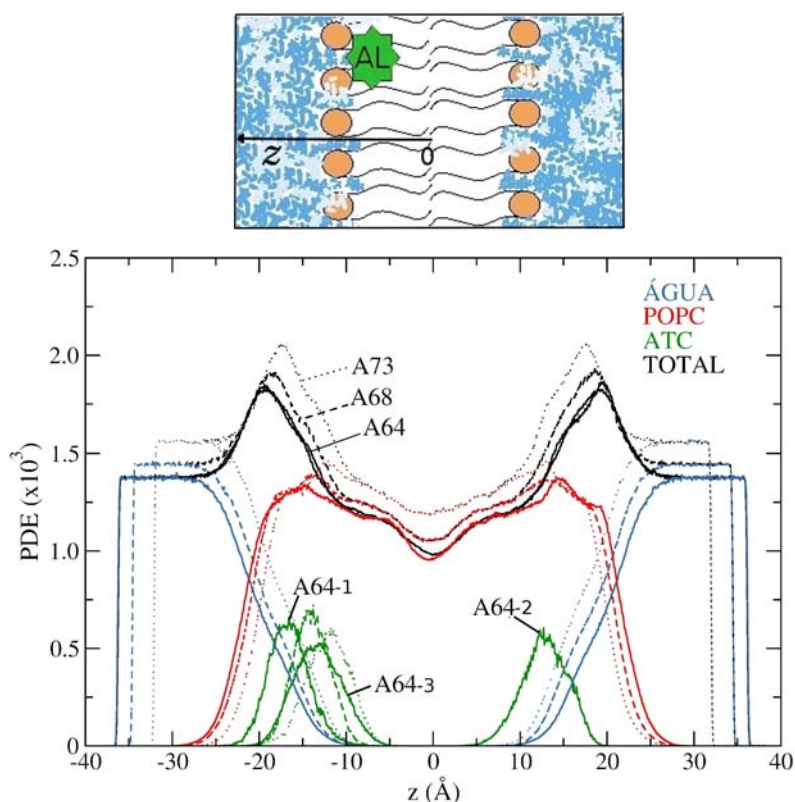


Figura 4.3. Perfil de densidade eletrônica dos sistemas A64 (linhas contínuas), A68 (linhas tracejadas) e A73 (linhas pontilhadas) nas simulações em que ocorreu a difusão da ATC para o interior membranar. As curvas correspondentes à ATC foram aumentadas em 24 vezes para facilitar a visualização. No topo da Figura esquematiza-se a posição do eixo z na membrana, definindo a origem do mesmo no centro da bicamada.

mistura. As distribuições de posições da ATC neutra ao longo das simulações são muito similares para os diferentes sistemas e verifica-se que ela localiza-se preferencialmente na interface água/membrana, próxima às cabeças polares de POPC. Mesmo a curva da ATC que teria difundido pela outra face da membrana (simulação A64-2) poderia ser invertida no eixo z e se sobreporia muito bem às demais. A curva de densidade eletrônica da molécula de ATC referente à simulação A64-1 aparece deslocada para a direita em relação às demais, mas trata-se da simulação em que a ATC demorou mais tempo para penetrar a membrana, de acordo com a Figura 4.2, sugerindo que ela não alcançou sua posição de equilíbrio no interior da membrana no intervalo de simulação analisado. Embora tenham sido empregadas

condições de simulação distintas, a posição do pico do PDE da lidocaína e da prilocaína neutras em sistemas membranares simulados em outros trabalhos [55, 121] é próxima ao encontrado para a ATC.

O perfil de densidade eletrônica da ATC protonada na membrana confirma que o fármaco localiza-se mais externamente na membrana em sua forma protonada do que neutra (Figura 4.4).

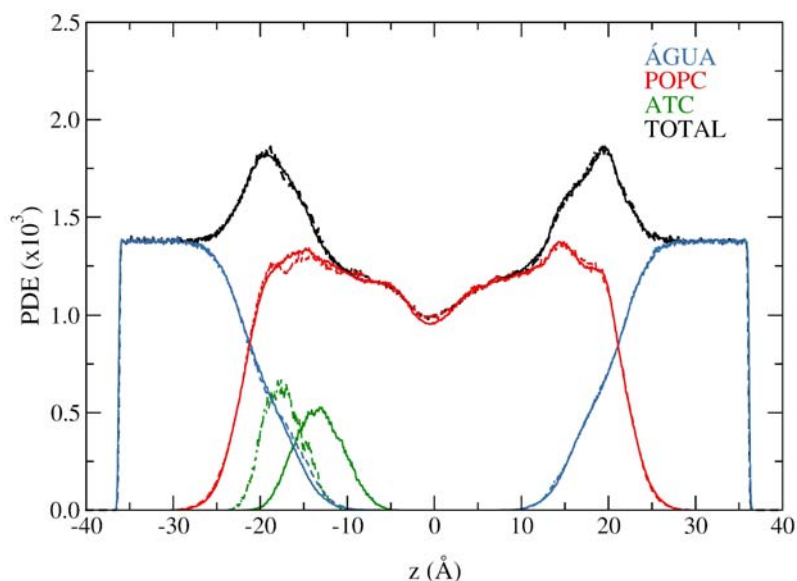


Figura 4.4. Perfil de densidade eletrônica dos sistemas A64-3 (linhas contínuas) e HA64 (linhas tracejadas). As curvas correspondentes à ATC foram aumentadas em 24 vezes para facilitar a visualização.

Daqui em diante as análises da ATC neutra no interior da membrana estão restritas às simulações mais longas (A64-2 e A64-3), em que, supõe-se, o sistema está bem equilibrado para tal estado. Além disso, este sistema apresenta valor de área por lipídio mais próximo do que é encontrado experimentalmente. Acompanhando visualmente estas simulações, verificou-se que, pelo menos nos últimos 10 ns, a ATC neutra aparece predominantemente na conformação e posição relativa à membrana ilustrada na Figura 4.5 (quadro superior) com um *snapshot* da simulação. O perfil de densidade eletrônica para diferentes grupos da molécula, mostrado na Figura 4.6 (à esquerda), confirma esta orientação preferencial, em que o grupo éster e a cadeia alifática se posicionam voltados para o interior hidrofóbico, pre-

servando as interações entre dos grupos amida e amina da ATC com as cabeças polares dos fosfolipídios. Neste gráfico, o conjunto de átomos da metila de C12 são chamados de Grupo 1 (G1) e o conjunto de átomos que compõem as metilas de C8 e C18, de Grupo 2 (G2).

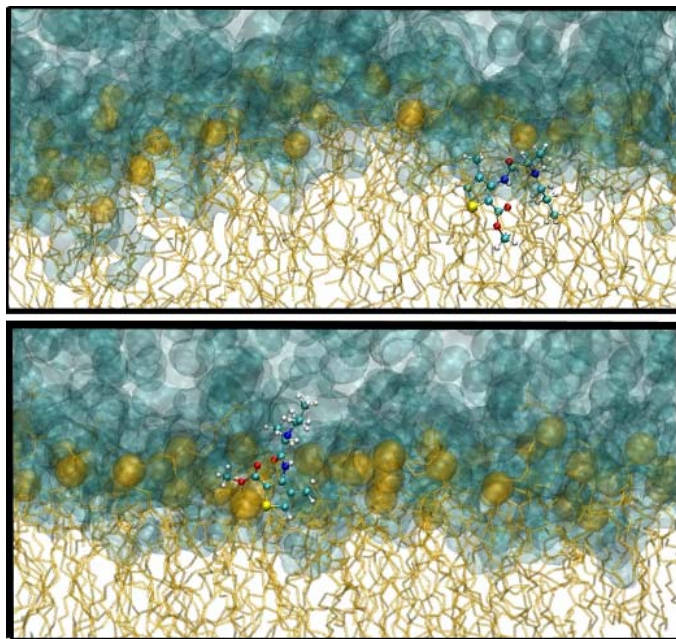


Figura 4.5. Um instante entre os últimos nanossegundos das simulações A64-3 (acima) e HA64 (abaixo). Os lipídios, em amarelo, têm suas cabeças polares representadas com esferas e as caudas, com traços. A 'nuvem' em azul representa a água e a molécula de ATC tem todos os seus átomos representados explicitamente.

A ATC na forma protonada, por outro lado, não apresentou uma orientação preferencial tão evidente nas simulações. Na Figura 4.6 (à direita), em que mostra-se o perfil de densidade eletrônica para diferentes conjuntos de átomos do composto, verifica-se que os picos se sobrepõem muito, o que indica que a molécula protonada tem mobilidade maior do que a forma neutra, localizada numa região mais profunda da bicamada. Entretanto, nota-se que a curva referente ao grupo assinalado como G2', composto pelos átomos da metila do C8, encontra-se ligeiramente deslocado para a direita em relação aos demais. Já o grupo de átomos G4', composto por átomos da metila do C18, tem o pico deslocado no sentido oposto. Isso mostra que o grupo amina da ATC protonada permanece, em média, voltado para

o exterior da bicamada, em concordância com o que se visualiza através de uma análise mais cautelosa da simulação. Um instante da simulação é mostrado na Figura 4.5 (quadro inferior), em que a ATC carregada aparece os grupos tiofeno e amida embebidos no interior membranar, enquanto a amina protonada encontra-se voltada para o meio aquoso.

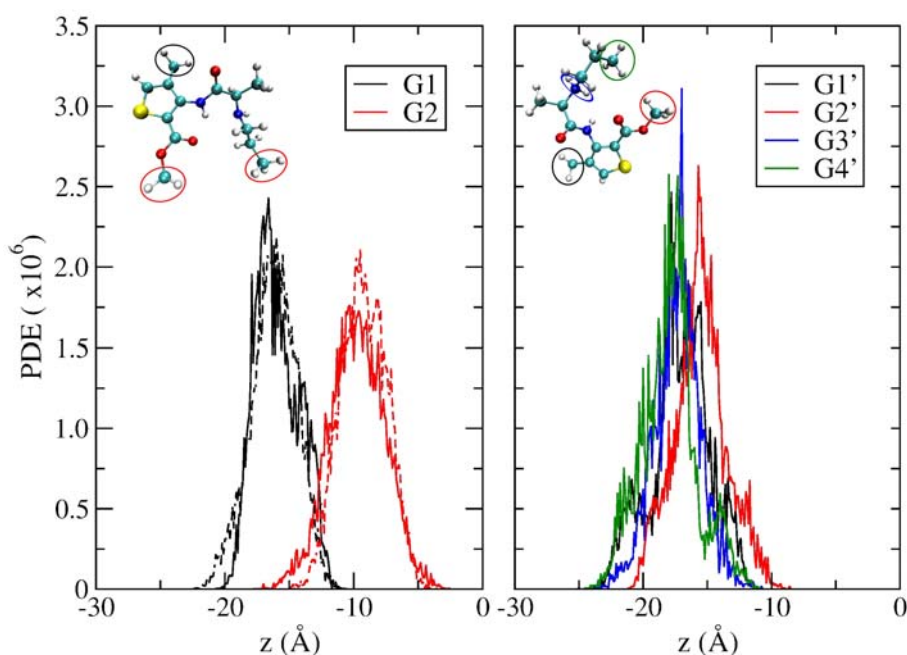


Figura 4.6. Perfis de densidade eletrônica de diferentes conjuntos de átomos presentes nas moléculas de ATC neutra (painel à esquerda) e protonada (painel à direita). No interior dos gráficos, apresenta-se a estrutura molecular da espécie correspondente com os conjuntos de átomos assinalados. Assim, na espécie neutra, o grupo G1 é formado por átomos que compõem a metila C12 e o grupo G2, pelos átomos que compõem as metilas C8 e C18. Na espécie carregada, o grupo G1' é formado pelo grupo metila C12, o grupo G2', pela metila C8, o grupo G3', por N15 e pelos átomos de hidrogênio a ele ligados e, finalmente, o grupo G4' constitui-se de átomos da metila C18.

Para elucidar um pouco mais sobre as interações que estabilizam a forma como a ATC se acomoda no interior da bicamada, foi analisada a estatística de ligações de hidrogênio da ATC com moléculas de água e de POPC. Consideraram-se ligações de hidrogênio interações que satisfizessem as seguintes condições geométricas: Distância H—X menor do que 2,6 Å, distância X—Y menor do que 3,5 Å e o ângulo

X—YH abaixo de 30° , sendo X e Y átomos eletronegativos e X possui um par de elétrons livres [123]. Neste trabalho, X e Y são átomos de oxigênio ou nitrogênio. Verificou-se que, em cerca de 50 % dos últimos 6 ns das simulações A64-2 e A64-3, ocorreram interações via LH entre POPC e ATC na forma neutra, essencialmente com a participação de H15 da ATC e átomos de oxigênio das carbonilas dos grupos éteres das cadeias graxas lipídicas. Ligações de hidrogênio intramoleculares praticamente não ocorrem quando a ATC está no interior da membrana. O posicionamento interfacial da ATC também possibilita frequentes LH (cerca de 15 % do intervalo de simulação) com moléculas da água. Na Figura 4.5 é visível que a ATC permanece em contato com a água, ilustrada como uma nuvem azul que penetra o interior da membrana. Interações específicas com os lipídios e com a água são representadas na Figura 4.7.

Nos últimos 6 ns de simulação do sistema HA64, calculou-se que o composto interage com moléculas de lipídio via LH durante 98 % deste intervalo de tempo. Estas interações ocorrem principalmente entre H9 da ATC e átomos de oxigênio das carbonilas dos éteres nas cadeias acila lipídicas. Ocorrem interações do tipo LH entre água e a ATC protonada em 95 % do tempo, muito maior do que o valor correspondente para a ATC neutra.

Os resultados obtidos das simulações quanto à posição preferencial da ATC neutra em membranas modelo estão em grande acordo com o que revelam os experimentos com estes sistemas. Song *et al* [59] já haviam observado através de experimentos de RMN de sólidos que a ATC neutra causa um grande distúrbio no empacotamento da região polar da bicamada de DSPC (diesteoilfosfatidilcolina), sugerindo ser esta a posição preferencial da ATC na membrana. Os professores Leonardo F. Fraceto e Eneida de Paula fizeram experimentos de ^1H -RMN de ATC neutra (pH=9,0) em lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (EPC) para detectar a localização preferencial da ATC nas bicamadas lipídicas. Para isso, foram determinados valores de tempo de relaxação longitudinal, T_1 , de diferentes regiões da bicamada na ausência e presença do anestésico, já que alterações em T_1 podem estar relacionadas à localização do AL na membrana [124]. Os valores obtidos são plotados no gráfico da Figura 4.8, em que as moléculas de EPC são representadas de forma estendida, a partir dos átomos de hidrogênio da cabeça polar aos das cadeias acila.

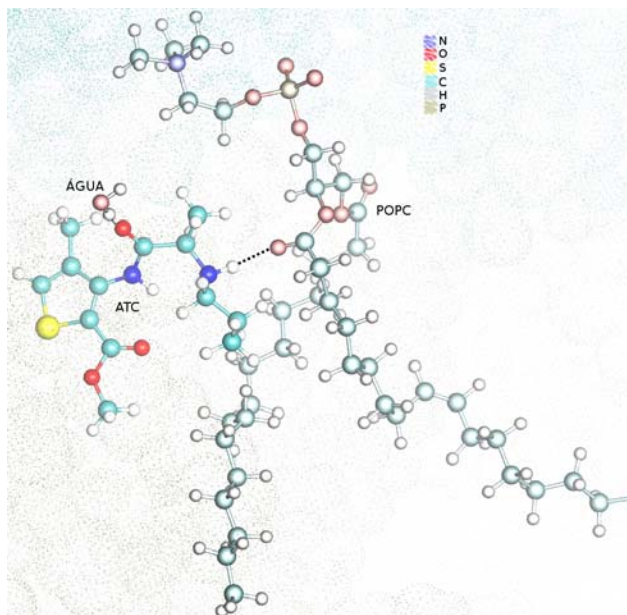


Figura 4.7. Representação esquemática da posição e conformação da ATC neutra no interior membranar. Também são indicadas LH da ATC com POPC e com a água, que ocorrem frequentemente.

Os valores de T_1 foram alterados, principalmente, para os átomos de hidrogênio nas cabeças polares de moléculas de EPC. A diminuição de T_1 dos picos I, J e K indica que os átomos de hidrogênio nas vizinhanças dos grupos fosfato e glicerol têm a mobilidade restringida na presença do anestésico. É possível observar na referência [124], que o perfil da curva é muito similar ao correspondente de outros AL do tipo amino-amida na forma neutra, a saber, lidocaína e mepivacaína. Anestésicos mais hidrofóbicos, como a etidocaína e a bupivacaína, inversamente, causam o aumento na liberdade rotacional de ^1H nesta região do lipídio [124]. Segundo Fraceto e colaboradores, estes compostos inserem-se mais profundamente na bicamada, o que perturba o empacotamento efetivo de moléculas de EPC e leva ao aumento na mobilidade dos átomos de hidrogênio dos grupos colina e glicerol.

Também foram feitas medidas de T_1 para os átomos de hidrogênio da ATC e verificou-se que houve redução na mobilidade de todos eles no ambiente membranar. Equivalentemente, a Figura 4.9 mostra, pela sobreposição dos passos da

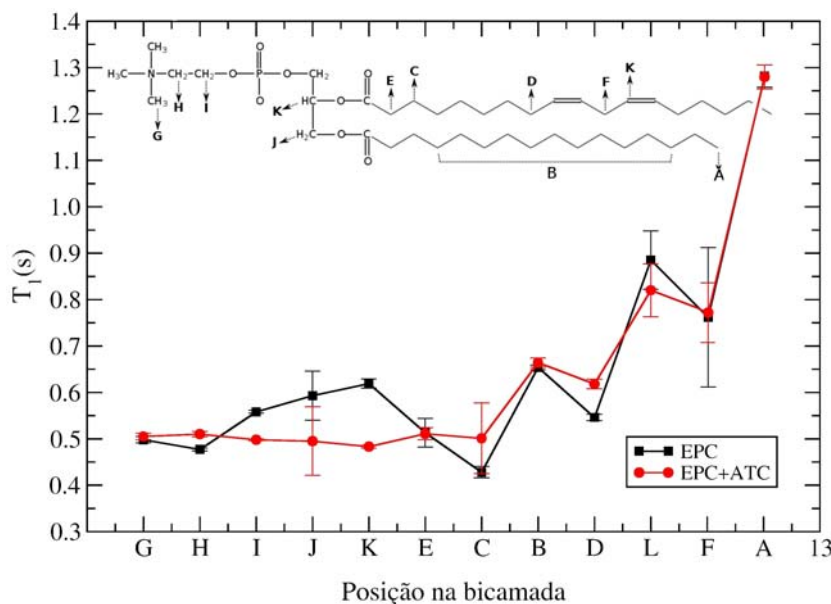


Figura 4.8. Efeito da presença de ATC no tempo de relaxação longitudinal, T_1 , de diferentes regiões da bicamada de EPC à 30 °C (Dados de experimentos de ^1H -RMN, fornecidos pelos Professores Leonardo F. Fraceto e Eneida de Paula) .

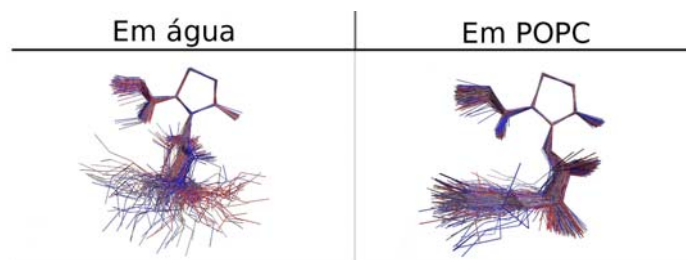


Figura 4.9. Sobreposição das estruturas da ATC neutra em água (sistema RATC) e no interior membranar (sistema A64-3).

trajetória simulação de ATC neutra em água e no interior da membrana (sistemas RATC e A64-3), que a ‘cauda’ da ATC em água exibe maior liberdade do que quando esta encontra-se no interior da membrana. As cargas parciais atômicas da ATC utilizadas geram um momento de dipolo médio da molécula em água de 4,0 D e no interior da membrana, de 2,6 D, o que indica que, no interior hidrofóbico da membrana, a conformação prevalecente do anestésico está de acordo com um meio em que as interações não são predominantemente direcionais.

Capítulo 5

Estimativas Preliminares de Energia Livre de Partição

A determinação de coeficientes de partição, P , de anestésicos em membranas modelo ou em misturas de octanol/tampão é frequentemente eficaz para a predição da potência clínica destas drogas, já que a lipossolubilidade determina o grau em que elas penetram nas membranas das células nervosas. Além disso, este valor serve como guia de experimentos e simulações, no momento em que se decide a composição do sistema em estudo quanto à razão entre moléculas de AL e lipídio. A partição das espécies neutras e carregadas do anestésicos pode ser estudada por diferentes métodos, como espectroscopias ópticas [46, 125, 126], microeletroforese [127], diálise de equilíbrio [128, 129] e depressão na temperatura de transição de fases [130–132].

Por ser um fármaco de uso clínico relativamente recente, ainda há poucos dados experimentais acerca da lipossolubilidade da articaína, e alguns são controversos. Em particular, não existem dados na literatura sobre a partição da ATC em sistemas membrana/água. Simon *et al* [133] relatam que $\log P$ da ATC é 1,23 em pH 7,4 (octanol/tampão), enquanto que MacKenzie e Young informam que $\log P$ é igual a 2,09, mas não especifica as condições experimentais usadas [134]. No laboratório da Prof. Eneida de Paula, determinou-se que o $\log P$ da espécie neutra (octanol/tampão de pH 9,0, 25°C) é igual a 1,38. Já Song *et al* [59] encontraram um valor maior, 2,41, mesmo em condições similares (octanol/tampão pH 10.0). Observa-se, no entanto, que a maioria destes trabalhos não especifica a temperatura em que o experimento foi realizado, dado fundamental, uma vez que a

partição de moléculas em fases é dependente da temperatura. Kaneshina e colaboradores [135] estudaram a dependência da partição da dibucaína em membranas DMPC com a temperatura, concentração e pH da mistura. Demonstrou-se que a constante de partição é especialmente influenciada pelo estado da membrana (gel, líquido-cristalino, etc.).

Estudos de dinâmica molecular podem contribuir com discussões desta natureza diretamente através de cálculos de energia livre, com a vantagem de que as simulações revelam os fatores moleculares que conduzem a partição do soluto entre as fases. Muitos trabalhos foram dedicados ao cálculo de $\log P$ de pequenos compostos orgânicos em misturas octanol/água [136–140]. Entretanto, isto requer uma amostragem muito ampla no espaço configuracional e, por isso, estes cálculos são extremamente caros, principalmente para sistemas complexos, como os biomoleculares. O aprimoramento da eficiência no cálculo de energia livre é um dos maiores desafios atuais das simulações computacionais. Vários métodos são baseados em simulações de equilíbrio ou quase-estáticas, tais como integração termodinâmica e *umbrella sampling*. Mas, após a descoberta da igualdade de Jarzynski [141], o campo de métodos de cálculos de energia livre estendeu-se à simulações de não-equilíbrio como *Steered Molecular Dynamics* (ou Dinâmica Molecular de Caminho Induzido, DMCI).

Nas seções seguintes, discute-se, brevemente, a teoria da igualdade de Jarzynski aplicada a DMCI e os resultados obtidos a partir desta técnica aplicada a simulações em que uma molécula de ATC neutra é extraída irreversivelmente de sua posição de equilíbrio no interior da membrana POPC para o meio aquoso.

5.1 Dinâmica Molecular de Caminho Induzido acoplada à Igualdade de Jarzynski

A técnica de dinâmica molecular de caminho induzido (DMCI) visa acelerar um processo de interesse que, de outro modo, seria muito lento ou de baixa ocorrência. Uma força externa é aplicada a um sítio selecionado de modo a induzi-lo a tomar um percurso relacionado ao fenômeno que se deseja estudar. Esta força é derivada de um potencial harmônico. É como se prendêssemos o sítio escolhido a uma das extremidades de uma mola virtual e, na outra extremidade, um átomo virtual.

Este átomo virtual é movido a velocidade constante e, então, a força entre ambos é medida segundo

$$\vec{F}_{ext}(t) = k(\vec{v}t - \Delta\vec{x}), \quad (5.1)$$

em que k é uma constante de força, $\vec{v}$ é o vetor velocidade do átomo virtual e $\Delta\vec{x}$ é o deslocamento deste em relação à sua posição inicial [142]. A direção em que esta força é aplicada é definida pelo vetor $\vec{v}$. O módulo deste vetor, assim como a constante de força k , são parâmetros a serem ajustados pelo pesquisador. Quanto menor $|\vec{v}|$, mais lentamente a força vai atuar e, deste modo, o ambiente em torno do sítio induzido terá mais tempo para se acomodar à sua passagem. A constante k , por sua vez, deve ser escolhida de forma que um pequeno deslocamento do sítio puxado (1 ou 2 Å) provoque uma redução perceptível na força.

A força possui a interessante propriedade de estar, a todo instante, sendo modulada pela resistência que o meio exerce ao movimento do sítio sendo puxado. Isto ocorre porque, se o deslocamento do sítio é brusco, o termo Δx aumenta rapidamente, fazendo com que a força diminua. Por outro lado, se o sítio não se move, a componente $\vec{v}t$ garante que a força vai aumentar até que a resistência do meio seja vencida (a resistência está geralmente associada às interações intermoleculares). O perfil da força em função do tempo de simulação ou da distância percorrida permite encontrar correlações bastante claras entre instante de grande resistência (maior força) e as interações da molécula com o meio.

Vários processos de não-equilíbrio são rotineiramente estudados em simulações computacionais através de DMCI, como, por exemplo, estiramento de fragmentos protéicos ou a passagem de pequenas moléculas através de um canal. Além disso, com a descoberta da igualdade de Jarzynski [141], simulações de DMCI com força modulada podem ser utilizadas para a construção de potenciais de força média (PFM) ao longo de caminhos de reação pré-determinados. A igualdade de Jarzynski permite relacionar variação de energia livre e o trabalho feito através de um processo fora do equilíbrio (Figura 5.1). Para a transformação isotérmica-isobárica entre dois estados de equilíbrio de um sistema, o trabalho feito no sistema durante a transformação e a diferença de energia livre de Gibbs entre os dois estados satisfaz

$$\langle e^{-\beta W} \rangle = e^{-\beta \Delta G} \quad (5.2)$$

em que $\beta = 1/k_B T$ e W é o trabalho externo, calculado pela integral da força num caminho de reação escolhido.

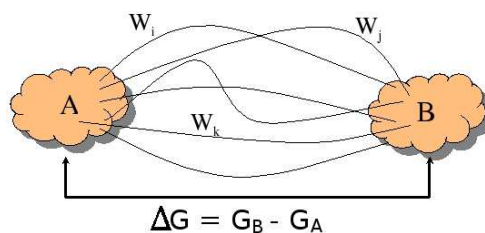


Figura 5.1. A identidade de Jarzynski possibilita relacionar a diferença de energia livre entre dois estados termodinâmicos a processos irreversíveis conectando estes estados.

Assim, realiza-se um conjunto de simulação de DMCI ao longo desta coordenada de reação e computam-se os valores de trabalho W que entram no cálculo da média representada pela Equação 5.2. Por ser uma grandeza de estado, ΔG não depende, evidentemente, do caminhho ou coordenadas de reação, mas a convergência numérica da Eq. 5.2, sim, pode depender fortemente de uma escolha conveniente do caminho reacional ligando os estados termodinâmicos inicial e final.

Dentre as aplicações do método de não-equilíbrio para o cálculo de energia livre [143–150] uma das mais conhecidas consistiu no uso de simulações de dinâmica molecular de caminho induzido para derivar o perfil de energia livre que caracteriza a condução do glicerol no canal protéico aquaporina [151]. Este trabalho, de alta demanda computacional, forneceu suporte teórico para o mecanismo proposto para o transporte do glicerol, através da indentificação de sítios de ligação, barreiras de energia e uma passagem para o glicerol de baixa energia no canal.

Cálculos de energia livre a partir de processos de não-equilíbrio são, em geral, extremamente desafiadores. A principal dificuldade encontrada no uso da igualdade de Jarzynski é que a média exponencial $\langle e^{-\beta W} \rangle$ é dominada por valores pequenos de trabalho, os quais ocorrem apenas raramente. Assim, uma estimativa razoável do PFM requer uma amostragem apropriada dessas trajetórias raras [152]. Uma alternativa frequentemente empregada é o uso da expansão cumulante ao invés da média exponencial. O logaritmo de uma média exponencial pode ser expandido em termo de cumulantes,

$$\log\langle e^x \rangle = \langle x \rangle + \frac{1}{2}(\langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2) + \dots \quad (5.3)$$

Segundo o teorema de Marcinkiewicz [153], quando a distribuição da variável x é uma gaussiana, todos os termos, menos os dois primeiros, desaparecem nesta expansão. Usando a expansão 5.3 para a igualdade de Jarzynski, obtêm-se

$$\log\langle e^{-\beta W(t)} \rangle = \langle W(t) \rangle - \frac{\beta}{2}(\langle W(t)^2 \rangle - \langle W(t) \rangle^2) + \dots \quad (5.4)$$

Quando usamos esta fórmula aproximada, dois tipos de erros estão envolvidos: o erro devido ao truncamento e o erro devido à amostragem insuficiente. Com o uso da fórmula exata (Eq. 5.2) não há o erro devido ao truncamento, mas o erro devido à amostragem é muito mais problemático devido à dificuldade em estimar a média exponencial [150]. Então, para amostragem limitada a fórmula aproximada (Eq. 5.4) pode funcionar melhor do que a fórmula exata.

5.2 A técnica aplicada ao sistema de articaína neutra em membranas POPC

Além das simulações de equilíbrio, simulações de DMCI também foram conduzidas em sistemas contendo uma única molécula de articaína sendo extraída de sua posição de equilíbrio no interior da membrana de POPC para a fase aquosa. Foram aleatoriamente selecionadas 56 configurações dos últimos 10 ns da simulação A64-3. Estas são as configurações iniciais para as rodadas DMCI. As condições de simulação (temperatura, pressão, passo de tempo, raio de corte, etc.) são as mesmas das utilizadas nas simulações de equilíbrio. Ao todo, foram produzidas 86 simulações DMCI de 6 ns. A força externa foi aplicada ao centro de massa da molécula de articaína em direção ao meio aquoso, paralelamente à normal da bicamada. À velocidade $|\vec{v}|$ (Equação 5.1), foi atribuído o valor $3,33 \times 10^{-3}$ Å/ps, escolhido com base no trabalho de Vemperala *et al* [51] sobre halotano em bicamada lipídica. Este valor é consideravelmente menor do que os utilizados em outras simulações DMCI, como, por exemplo, da dissociação da acetilcolina do sítio de ligação do receptor [149], dissociação do ácido retinóico de seu receptor [154], extração de lipídios de membranas fosfolipídicas [155] e, indução da passagem da progesterona em ciclo-dextrina [143]. Com a velocidade escolhida, a ATC percorria aproximadamente 20

$\text{\AA}$ em direção ao meio aquoso.

Em 30 das simulações, foi atribuído valor $4,00 \text{ kcal/mol } \text{\AA}$ à constante de força k . Nas demais, foi utilizado $k = 10,00 \text{ kcal/mol } \text{\AA}$, visando diminuir a flutuação do trabalho para as diferentes trajetórias [150].

A Figura 5.2 mostra o perfil da força externa de simulações em que varia-se a configuração inicial e/ou a constante de força. As diferentes configurações iniciais são identificadas como S1, S2, S3,..., S56. No percurso da ATC do meio lipídico para o meio aquoso ocorrem intervalos em que o deslocamento da molécula é mais lento (perfil da força tem inclinação positiva) e outros em que é mais rápido (inclinação negativa do perfil de força). O aumento na força ocorre devido a estabilização da ATC em determinada posição por interações com os lipídios da bicamada. Quando a ATC avança para o meio aquoso a resistência que o meio impõe torna-se uniforme e a força aplicada varia ao redor de zero. Conforme observa-se nesta Figura, valores maiores da constante de força implicam em flutuações maiores da força externa.

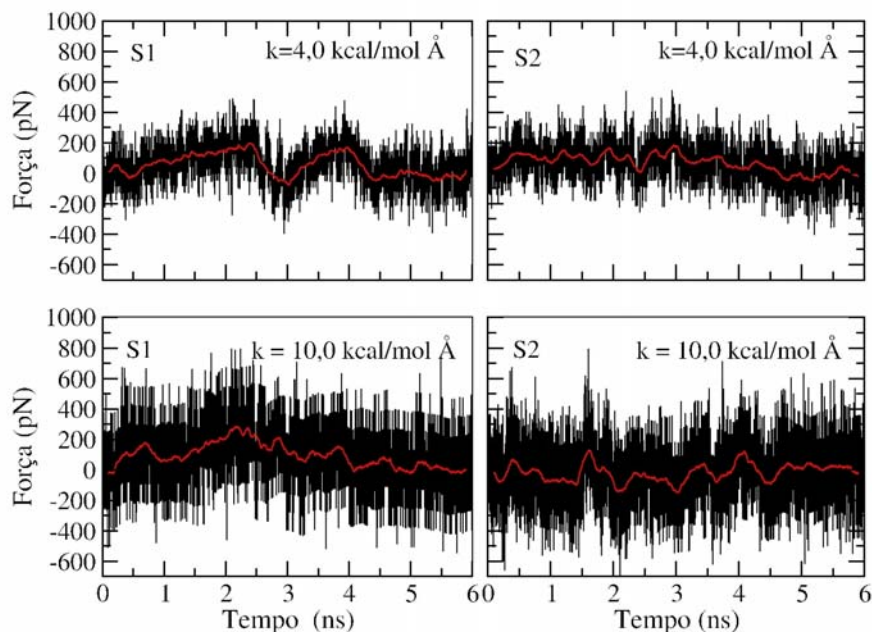


Figura 5.2. Perfis de força das simulações cujas configurações iniciais são S1 ou S2.

As curvas de trabalho em função do deslocamento da mola são apresentadas na Figura 5.3. Comparando as curvas originadas de trajetórias de mesma configura-

ção inicial (S1 ou S2), verifica-se que a magnitude de k influencia muito no perfil energético do processo. O valor do trabalho final de S1, por exemplo, decresceu aproximadamente 14 kcal/mol com o aumento de k , o que descarta completamente a possibilidade de atribuir a diferença a flutuações térmicas. Em destaque, a curva em vermelho (painel superior) mostra um processo que se inicia com bastante facilidade (requer pouca energia) mas, que em seu decorrer, passa a tornar-se difícil. Isto demonstra que, neste sistema, não há como prever a magnitude do trabalho total a partir de condições iniciais como posição da ATC na membrana e suas interações com o meio.

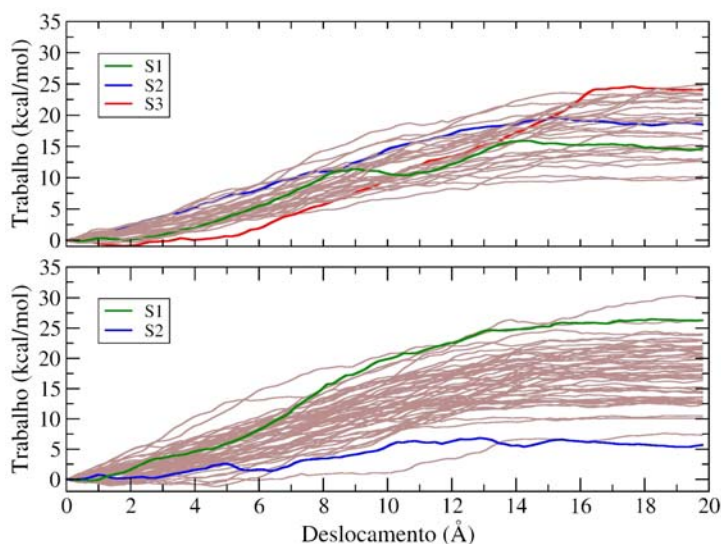


Figura 5.3. Curvas de trabalho em função do deslocamento da ATC neutra em sua extração do interior da membrana POPC. As curvas no painel superior foram geradas utilizando $k=4,0$ kcal/mol Å e as do painel inferior, utilizando $k=10,0$ kcal/mol Å. Algumas curvas estão em destaque para serem comentadas no texto.

A partir das trajetórias geradas para $k=10,0$ kcal/mol Å, foram aplicados os métodos de média exponencial e expansão cumulante para a determinação do potencial de força média (Figura 5.4). No histograma da Figura 5.5, verifica-se que a distribuição trabalho nas simulações DMCI não tem a forma gaussiana. Deste modo, o tratamento dos dados a partir da aproximação da expansão cumulante não é apropriado. Visivelmente, a curva PFM obtida por média exponencial (linha preta, Figura 5.4) tem em seu formato a influência predominante de curvas de

menor trabalho para dado deslocamento. Uma curva de trabalho importante neste aspecto é a S2 da Figura 5.3 (painel inferior) .

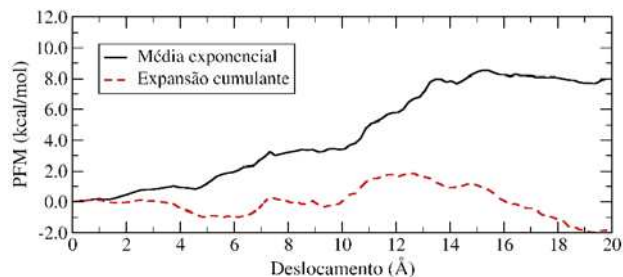


Figura 5.4. Curvas de potencial de força média obtidas através da fórmula exata de Jarzynski e da aproximação desta por expansão cumulante.

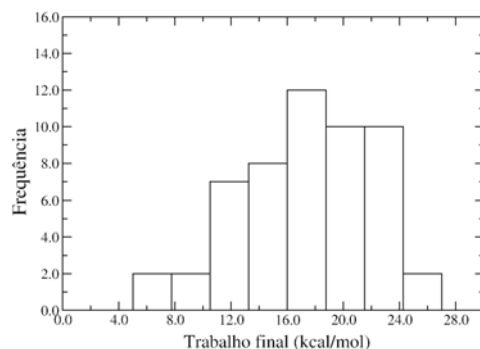


Figura 5.5. Histograma da frequência de valores de trabalho total nas simulações DMCI.

O perfil PFM confirma a tendência do AL a se localizar na complexa região interfacial entre as fases lipídica e aquosa. Vemperala e colaboradores [51] utilizaram esta metodologia para sugerir o PFM da extração do anestésico volátil halotano de membranas DOPC. O valor final encontrado de energia livre de partição da ATC (~ 8 kcal/mol) através da aplicação direta da igualdade de Jarzynski é próximo ao encontrado para o halotano (~ 5 kcal/mol). Uma estimativa preliminar do coeficiente de partição da ATC neutra em membranas POPC a $T=310$ K (37°C) é obtida através de

$$\Delta G = -k_B T \ln K \quad (5.5)$$

em que k_B é a constante de Boltzmann e K (ou P), a constante de partição. Aplicando esta equação, chega-se que $P \sim 284.680$, ou $\log P \sim 5,45$. Kaneshina e colaboradores obtiveram experimentalmente o $\log P$ da dibucaína em membranas DMPC em diferentes temperaturas [135]. Na mais alta delas, 28°C , determinou-se $P \sim 38.000$ e $\log P \sim 4,58$.

Capítulo 6

Conclusões

As membranas são estruturas de grande importância biológica e vêm sendo amplamente estudadas por técnicas experimentais e, mais recentemente, por técnicas de simulação computacional, dado o aumento da capacidade computacional e o desenvolvimento de novas técnicas de DM. No contexto farmacológico, um dos temas muito estudados é o comportamento e efeitos de anestésicos em biomembranas. Busca-se esclarecer o mecanismo de ação que leva à anestesia, melhorar a eficácia e minimizar efeitos colaterais destas substâncias. O foco neste trabalho de DM é o anestésico local de uso dermatodentológico, articaína, e o estudo de seu comportamento e interações específicas no interior de bicamadas modelo de POPC.

Para o conhecimento das interações atômicas, que determinam a trajetória das partículas na simulação, a ATC foi parametrizada segundo o modelo clássico usualmente empregado em campos de força 2.12-2.17. Para tanto, foram considerados os estados de ionização e estereoisomeria do composto. As cargas foram calculadas com Hartree-Fock Restrito para estruturas, otimizadas usando um funcional de densidade e um modelo polarizável contínuo para a água. Os parâmetros de Lennard-Jones, estiramento de ligação e deformação angular são muito bem transferíveis e, portanto, foram buscados no campo de força CHARMM27 [89, 90] a partir de considerações químicas, como grau de hibridização e eletronegatividade dos átomos vizinhos. Já parâmetros diedrais apropriados não são tão facilmente encontrados em um campo de força para uma molécula arbitrária e alguns diédros

da ATC tiveram que ser parametrizados. Para isso, as curvas de energia potencial destas torções, traçadas a partir de sucessivos cálculos de estrutura eletrônica, foram ajustadas ao modelo clássico de potencial diedral 2.14. Com o novo conjunto de parâmetros atribuído à ATC, a conformação no mínimo da superfície de potencial clássico é sobreponível à estrutura otimizada quanticamente. Além disso, verificou-se que a estrutura média obtida a partir de simulações de ATC em solução aquosa diluída é muito similar à obtida via otimização geométrica utilizando métodos de Química Quântica.

Foram feitas várias simulações com a ATC inicialmente posicionada no meio aquoso, na presença da bicamada de POPC. Foi observada a difusão espontânea da ATC neutra para o interior da membrana de POPC, onde posiciona-se na região interfacial e interage frequentemente via LH com moléculas de POPC. De um modo geral, estas interações envolvem o hidrogênio da amina do anestésico e um oxigênio de éster nas proximidades do grupo glicerol dos lipídios. Ocasionalmente, também ocorrem LH com as moléculas de água que hidratam as cabeças polares lipídicas. Nossos resultados quanto ao posicionamento preferencial da ATC na bicamada estão em grande concordância com dados de tempo de relaxação longitudinal de diferentes regiões dos lipídios, obtidos de experimentos de ^1H -RMN. As análises de perfil de densidade eletrônica do sistema membrana e perfil de T_1 para átomos de hidrogênio dos lipídios da membrana na presença de ATC colocam em cheque a suposição de que, devido à presença do anel tiofeno ao invés do anel benzênico, a ATC encontra-se entre os AL mais hidrofóbicos.

A forma carregada da ATC não se inseriu na membrana espontaneamente nas simulações conduzidas. Então, foi produzida uma única simulação com a ATC carregada inicialmente posicionada no interior membrana, de acordo com a posição de equilíbrio encontrada para a espécie neutra. Em concordância com trabalhos anteriores [46], verificou-se que a espécie protonada situa-se mais externamente na membrana do que a espécie neutra. Em grande parte do tempo de simulação, a amina protonada encontra-se voltada para o meio aquoso da interface, enquanto que os grupos aromático e amida permanecem imersos no interior membrana. De fato, ocorrem ligações de hidrogênio com a água em quase todo o tempo de simulação.

O estudo da partição de anestésicos em membranas é de grande utilidade, dado

que a capacidade de inserir-se no interior lipídico é geralmente correlacionada à potência do anestésico [4]. Para a ATC, os dados sobre isto encontrados na literatura são escassos e, algumas vezes, imprecisos. Visando contribuir com a discussão sobre a afinidade da ATC pelo ambiente membranar, aplicou-se a igualdade de Jarzynski a simulações de dinâmica molecular de caminho induzido para obtenção de uma estimativa preliminar da energia livre de partição da ATC em membranas POPC na fase fluido lamelar. Foram produzidas mais de 80 simulações em que a ATC neutra é extraída da membrana para o meio aquoso. Verificou-se que a interação com os lipídios da membrana são de grande importância para a estabilização da ATC em diferentes etapas do processo. Pela aplicação da média exponencial (Equação 5.2) à dezenas de curvas de trabalho, estima-se que $\Delta G \sim 8$ kcal/mol, o que implica no coeficiente de partição da ATC de $\sim 5,5$.

Perspectivas

Propriedades como hidrofobicidade e volume molecular são determinantes na localização preferencial dos anestésicos locais nas membranas fosfolipídicas. É de grande importância o estudo da posição e orientação predominantes dos AL no meio lipídico, já que as alterações nas propriedades da membrana dependem destes fatores. Além disso, propõe-se que o acesso do AL ao(s) sítio(s) de ligação de espécies neutras no canal de sódio voltagem-dependente seja modulado pela forma na qual os anestésicos se distribuem na membrana [44].

Deste modo, estudos futuros sobre a interação da articaína com o canal de sódio voltagem-dependente são encorajados para que, em conjunto os novos resultados acerca de propriedades dos sistemas de ATC em membranas modelo, seja possível uma maior compreensão do mecanismo de ação e das propriedades clínicas deste anestésico.

Nos próximos meses nos dedicaremos à publicação dos parâmetros de campo de força atribuídos à articaína neutra e manteremos a cooperação com os grupos experimentais da Prof. Eneida e do Prof. Leonardo. Já estão em andamento outros experimentos que podem ser úteis no esclarecimento de propriedades da ATC no meio membranar. Por exemplo, propõe-se que, através de experimentos de ^1H -ROESY seja possível a identificação dos principais sítios de interação entre

ATC e lipídios. Além disso, planeja-se avançar nos estudos com o composto em sua forma carregada.

Finalmente, sugere-se que se prossigam os estudos relacionados à partição do anestésico na membrana. A utilização de um método alternativo para o cálculo de energia livre tem sido investigada, para que sejam comparados desempenho e estimativas das diferentes técnicas.

Referências Bibliográficas

- [1] W. Catterall and K. Mackie. *"Local anesthetics" in Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. L. S. Goodman and A. Gilman and J. Hardman and A. G. Gilman and E. L. Limbird, McGraw-Hill, Health Professions Division, New York, 1996.
- [2] K. Koller. *Klin. Mbl. Augenheik*, 22:60, 1884.
- [3] B. G. Covino and H. G. Vassallo. *Local Anesthetics: Mechanisms of Action and Clinical Use*. Grune and Stratton, New York, 1976.
- [4] D. R. Araujo, E. de Paula, and L. F. Fraceto. *Quim. Nova*, 31:1775, 2008.
- [5] D. G. Martin, C. E. Watson, M. B. Gold, C. L. Woodard, and S. I. Baskin. *J. Appl. Toxicol.*, 15:153, 1995.
- [6] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox. *Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 4th Ed., 2005.
- [7] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. *J. Physiology*, 117:500, 1952.
- [8] V. Yarov-Yarovoy, J. C. McPhee, D. Idsvoog, C. Pate, T. Scheuer, and W. A. Catterall. *J. Biol. Chem.*, 277:35393, 2002.
- [9] D. E. Patton, J. W. West, W. A. Catterall, and A. L. Goldin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10905, 1992.
- [10] G. W. Zamponi and R. J. French. *Biophys. J.*, 67:1040, 1994.
- [11] D. S. Ragsdale, J. C. McPhee, T. Scheuer, and W. A. Catterall. *Science*, 265:1724, 1994.

-
- [12] G. R. Strichartz and J. M. Ritchie. *Local Anesthetics: Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, 1987.
- [13] D. S. Ragsdale, J. C. McPhee, R. Scheuer, and W. A. Catterall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9270, 1996.
- [14] D. S. Ragsdale and M. Avoli. *Brain Res. Rev.*, 26:16, 1998.
- [15] C. Nau and G. K. Wang. *J. Membr. Biol.*, 201:1, 2004.
- [16] A. Kondratiev and G. F. Tomaselli. *Mol. Pharmacol.*, 64:741, 2003.
- [17] Y. Kuroda, M. Ogawa, H. Nasu, M. Terashima, M. Kasahara, Y. Kyiama, M. Wakita, Y. Fujiwara, N. Fujii, and T. Nakagawa. *Biophys. J.*, 71:1911, 1996.
- [18] S. A. Godwin, J. R. Cox, and S. N. Wrigth. *Biophys. Chem.*, 113:1, 2005.
- [19] L. F. Fraceto, S. Oyama Jr., C. R. Nakaie, A. Spisni, E. de Paula, and T. A. Pertinhez. *Biophys. Chem.*, 123:29, 2006.
- [20] T. Narahashi and M. Yamada. *Nature*, 223:748, 1969.
- [21] D. T. Frazier, T. Narahashi, and M. Yamada. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 171:45, 1970.
- [22] B. Hille. *J. Gen. Physiol.*, 69:497, 1977.
- [23] C. F. Starmer. *Biophys. J.*, 52:405, 1987.
- [24] A. G. Lee. *Biochim. Biophys. Acta*, 448:34, 1976.
- [25] E. de Paula, S. Schreier, H. C. Jarrell, and L. F. Fraceto. *Biophys. Chem.*, 132:47, 1970.
- [26] I. Yun, E. S. Cho, H. O. Jang, U. K. Kim, C. H. Choi, I. K. Chung, I. S. Kim, and W. G. Wood. *Biochim. Biophys. Acta*, 1564:123, 2002.
- [27] J. G. Boogaerts, N. D. Lafont, A. G. Declercq, C. L. Hongwen, E. T. Gravet, J. A. Bianchi, and F. J. J. Legros. *Clin. Anesth.*, 6:315, 1994.

- [28] V. P. Torchilin. *Nature*, 4:145, 2005.
- [29] T. M. Devlin. *Textbook of Biochemistry*. Wiley-Liss, New York, 1997.
- [30] G. Cevc and D. Marsh. *Phospholipid bilayer: Physical Principles and Models*. John Wiley, New York, 1987.
- [31] S. J. Singer and G. L. Nicholson. *Science*, 175:720, 1972.
- [32] R. B. Gennis. *Biomembranes: molecular structure and function, Springer Advanced Texts in Chemistry*. Springer, New York, 1989.
- [33] J. M. Seddon, G. Cevc, and R. D. Marsh. *Biochemistry*, 23:2634, 1984.
- [34] C. Gliss, H. Clausen-Schaumann, R. Günther, S. Odenbach, O. Randl, and T. M. Bayert. *Biophysical*, 74:2443, 1998.
- [35] D. C. Crans, C. D. Rithner, B. Baruah, B. L. Gourley, and N. E. Levinger. *Biophysical*, 128:4437, 2006.
- [36] M. Zuvic-Butorac, C. M. Herak-Kramberger, D. Krilov, I. Sabólic, and J. N. Herak. *Biochem. Biophys. Acta-Biomembranes*, 1718:44, 2005.
- [37] J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, and G. Feigenzon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:8461, 1999.
- [38] I. Y. Churbanova, A. Torin, J. Strzalka, T. Gog, I. Kuzmenko, J. S. Johansson, and J. K. Blasie. *Biophysical J.*, 90:3255, 2006.
- [39] T. Heimberg. *Biochem. Biophys. Acta*, 1415:147, 1998.
- [40] S. D. Connell and D. A. Smith. *Molecular Membrane Biology (Review)*, 23:17, 2006.
- [41] G. Srinivas and M. L. Klein. *Nanotechnology*, 15:1289, 2004.
- [42] K. Aman, E. Lindhal, O. Edholm, P. Hakansson, and P. O. Westlund. *Biophys. J.*, 84:102, 2003.

-
- [43] G. Poste G. Shepherd D. Papahadjopoulos, K. Jacobson. *Biochim. Biophys. Acta*, 394:504, 1975.
- [44] E. de Paula and S. Schreier. *Braz. J. Med. Res.*, 29:877, 1996.
- [45] J. C. Skou. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 10:317, 1954.
- [46] Y. Boulanger, S. Schreier, L. C. Leitch, and I. C. P. Smith. *Can. J. Biochem.*, 58:986, 1980.
- [47] K. A. Sikaris and W. H. Sawyer. *Biochem. Pharmacol.*, 31:2625, 1982.
- [48] K. I. Koo, J. H. Bae, C. H. Lee, C. D. Yoon, J. H. Pyun, S. H. Shin, Y. C. Jeon, M. K. Bae, H. O. Jang, W. G. Wood, and I. Yun. *Protoplasma*, 234:3, 2008.
- [49] G. S. Lorite, T. M. Nobre, M. E. D. Zaniquelli, E. de Paula, and M. A. Cotta. *Biophys. Chem.*, 139:75, 2009.
- [50] L. F. Fraceto and E. de Paula. *Quim. Nova*, 27:66, 2004.
- [51] S. Vempera, L. Saiz, R. G. Eckenhoff, and M. L. Klein. *Biophys. J.*, 91:2815, 2006.
- [52] M. Pickholz, O. N. Oliveira, and M. S. Skaf. *J. Phys. Chem. B*, 110:8804, 2006.
- [53] M. Pickholz, O. N. Oliveira, and M. S. Skaf. *Biophys. Chem.*, 125:425, 2007.
- [54] L. Cabeça, M. Pickholz, E. de Paula, and A. Marsaioli. *J. Phys. Chem.*, 113:2365, 2009.
- [55] C. J. Hogberg, A. Maliniak, and A. Lyubartsev. *Biophys. Chem.*, 125:416, 2006.
- [56] C. J. Högberg, A. Maliniak, and A. P. Lyubartsev. *Biophys. Chem.*, 125:416, 2007.
- [57] C. J. Högberg and A. P. Lyubartsev. *Biophys. J.*, 94:525, 2008.

- [58] S. E. Jacob and A. R. Patel. *Dermatol. Surg.*, 33:256, 2007.
- [59] C. Song, H. Lygre, and W. Nerdal. *European Journal os Pharmaceutical Sciences*, 33:399, 2008.
- [60] H. Lygre, G. Moe, W. Nerdal, and H. Holmsen. *Acta Odontologica Scandinavica*, 67:1, 2009.
- [61] S. P. Gupta. *Chem. Rev.*, 91:1109, 1991.
- [62] S. F. Malamed, S. Gagnon, and D. Leblanc. *J. Am. Dent. Assoc.*, 131:635, 2000.
- [63] T. L. Lemke and D. A. Williams. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6^a Ed., T. L. Lemke and S. W. Zito Eds., Lippincott Williams and Wilkins, 2007.
- [64] B. J. Alder and T. E. Wainwright. *J. Chem. Pyhs.*, 27:1208, 1957.
- [65] A. Rahman. *Phys. Rev.*, 136:A405, 1964.
- [66] A. Rahman and F. H. Stillinger. *J. Chem. Phys.*, 55:3336, 1971.
- [67] A. R. Leach. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson Education, Harlow, 2001.
- [68] M. Karplus and J. A. McCammon. *Nature Structural Biology*, 9:646, 2002.
- [69] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen. *Angewandte Chemie International - International Edition in English*, 29:992, 2003.
- [70] M. E. Tuckerman and G. J. Martyna. *J. Phys. Chem. B*, 105:159, 2001.
- [71] L. Verlet. *Phys. Rev.*, 159:98, 1967.
- [72] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson. *J. Chem. Phys.*, 76:637, 1982.
- [73] R. P. Feynman, R. B. Leighton, and M. Sands. *The Feynman Lectures on Physics*. Vol. 1, Addison-Wesley, 1963.

- [74] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:11225, 1996.
- [75] W. L. Jorgensen and N. A. McDonald. *THEOCHEM-J Mol. Struct.*, 424:145, 1998.
- [76] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. *J. Comput. Chem.*, 4:187, 1983.
- [77] A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher III, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, Wiórkiewicz-Kuczvera J, D. Yin, and M. Karplus. *J. Phys. Chem. B*, 102:3586–3616, 1998.
- [78] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, and P. Weiner. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:765, 1984.
- [79] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Calwell, and P. A. Kollman. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:5179, 1995.
- [80] R. W. Dixon and P. A. Kollman. *J. Comput. Chem.*, 18:1632, 1997.
- [81] J. Hermans, H. J. C. Berendsen, W. F. van Gunsteren, and J. P. M. Postma. *Biopolymers*, 23:1, 1984.
- [82] H. Sun and D. Rigby. *Spectrochimica Acta*, page 1301, 1997.
- [83] M. J. McQuaid, H. Sun, and D. Rigby. *J. Comput. Chem.*, 25:61, 2004.
- [84] A. K. Rappé, C. . Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard III, and W. M. Skiff. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10024, 1992.
- [85] S. L. Mayo, B. D. Olafson, and W. A. Goddard III. *J. Phys. Chem.*, 94:8897, 1990.
- [86] B. Jórjart and T. A. A. Martinek. *J. Comput. Chem.*, 28:2051, 2007.

- [87] J. Hénin, W. Shinoda, and M. L. Klein. *J. Phys. Chem.*, 112:7008, 2008.
- [88] S. E. Feller and V. Sundararajan. *Computational Modeling of Membrane Bilayers*. Academic Press, Oxford, 2008.
- [89] S. E. Feller, G. Gawrisch, and A. D. MacKerell Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:318, 2002.
- [90] S. E. Feller and A. D. MacKerell Jr. *J. Phys. Chem. B*, 104:7510, 2000.
- [91] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, and J. D. Madura. *J. Chem. Phys.*, 79:926, 1983.
- [92] K. Kim and K. D. Jordan. *J. Phys. Chem.*, 98:10089, 1994.
- [93] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, and M. J. Frisch. *J. Phys. Chem.*, 98:11623, 1994.
- [94] M. T. Cancès, B. Mennucci, and J. Tomasi. *J. Chem. Phys.*, 107:3032, 1997.
- [95] M. Cossi, V. Barone, B. Mennucci, and J. Tomasi. *Chem. Phys. Lett.*, 286:253, 1998.
- [96] B. Mennucci and J. Tomasi. *J. Chem. Phys.*, 106:5151, 1997.
- [97] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, Jr. J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, V. Barone J. Tomasi, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. HrARTHian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng,

- A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. Gaussian 03, revision c.02. 2004.
- [98] U. C. Singh and P. A. Kollman. *J. Comp. Chem.*, 5:129, 1984.
- [99] B. H. Besler, K. M. Merz, and P. A. Kollman. *J. Comp. Chem.*, 11:431, 1990.
- [100] C. C. J. Roothaan. *Rev. Mod. Phys.*, 23:69, 1951.
- [101] O. Guvench and A. D. MacKerell Jr. *J. Mol. Model.*, 14:667, 2008.
- [102] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten. *J. Comp. Chem.*, 26:1781–1802, 2005.
- [103] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>. Technical report, 2009.
- [104] M. E. Tuckerman, B. J. Berne, and G. J. Martyna. *J. Chem. Phys.*, 97:1990, 1992.
- [105] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. *J. Comput. Phys.*, 23:327, 1977.
- [106] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. *J. Mol. Graph.*, 14:33, 1996.
- [107] <http://www.inkscape.org>. Technical report, 2009.
- [108] <http://www.gimp.org>. Technical report, 2009.
- [109] <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>. Technical report, 2009.
- [110] T. N. Cavley. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 39:83, 2008.
- [111] M. Mizogami, H. Tsuchiya, T. Ueno, M. Kashimata, and K. Takakura. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 14:304, 2008.
- [112] M. P. Allen and D. Tildesley. *Computer Simulations of Liquids*. Clarendon Press, Oxford, 1987.

- [113] R. Sankararamakrishnan and H. Weinstein. *J. Phys. Chem. B*, 108:11802, 2004.
- [114] H. I. Petrache, D. M. Zukerman, J. A. Killian, and R. E. Koeppe II and T. B. Woolf. *Langmuir*, 18:1340, 2002.
- [115] J. Gullingsrud and K. Schulten. *Biophys. J.*, 86:3496, 2004.
- [116] M. O. Jensen, O. G. Mouritzen, and G. H. Peters. *Biophys. J.*, 86:3556, 2004.
- [117] G. Lantzsch, H. Binder, and H. Heerklotz. *J. Fluoresc.*, 4:339, 1994.
- [118] S. E. Feller and R. W. Pastor. *J. Chem. Phys.*, 111:1281, 1999.
- [119] J. Sonne, M. O. Jensen, F. Y. Hansen, L. Hemmingensen, and G. H. Peters. *Biophys. J.*, 92:4157, 2007.
- [120] T. E. Cheatham and B. R. Brooks. *Theor. Chem. Acc.*, 99:279, 1998.
- [121] M. Pickholz, L. F. Fraceto, and E. de Paula. *Int. J. Quantum Chem.*, 108:2386, 2008.
- [122] G. S. Smith and J. Majewski. *In X-Ray and Neutron Studies of Lipids Bilayers Structure and Interactions*. J. Kataras and T. Gutberlet Eds., Springer, Berlin, 2000.
- [123] J. A. Padró, L. Saiz, and E. Guàrdia. *J. Mol. Struc.*, 416:243, 1997.
- [124] L. F. Fraceto, A. Spisni, S. Scherier, and E. de Paula. *Biophys. Chem.*, 115:11, 2005.
- [125] A. Seelig, P. R. Allegrini, and J. Seelig. *Biochim. Biophys. Acta*, 939:267, 1988.
- [126] G. R. Strichartz, V. Sanchez, G. R. Arthur, R. Chafetz, and D. Martin. *Anesth. Analg.*, 71:158, 1990.
- [127] S. Ohki. *Biochim. Biophys. Acta*, 777:56, 1984.

- [128] K. Fukushima, M. Someya, and R. Shimozawa. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 66:1613, 1993.
- [129] K. Fukushima, M. Someya, and R. Shimozawa. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 67:2079, 1994.
- [130] E. S. Rowe. *Biochemistry*, 22:3299, 1983.
- [131] Y. Kaminoh, C. Tashiro, H. Kamaya, and I. Ueda. *Biochim. Biophys. Acta*, 946:215, 1988.
- [132] Y. Kaminoh, H. Kamaya, and I. Ueda. *Biochim. Biophys. Acta*, 987:63, 1989.
- [133] M. A. M. Simon, M. J. M. Gielen, N. Alberink, T. B. Vree, and J. van Egmond. *Regional Anesthesia*, 22:29, 1997.
- [134] T. A. MacKenzie and E. R. Young. *Anesth. Prog.*, 40:29, 1993.
- [135] S. Kaneshina, H. Satake, T. Yamamoto, Y. Kume, and H. Matsuki. *Col. Surf.*, 10:51, 1997.
- [136] S. A. Best, K. M. Merz Jr., and C. H. Reynolds. *J. Phys. Chem. B*, 103:714, 1999.
- [137] S. E. DeBolt and P. A. Kollman. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:5316, 1995.
- [138] J. W. Essex, C. A. Reynolds, and W. G. Richards. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:3634, 1992.
- [139] J. E. Eksterowicz, J. L. Miller, and P. A. Kollman. *J. Phys. Chem. B*, 101:10971, 1997.
- [140] W. L. Jorgensen, J. M. Briggs, and M. L. Contreras. *J. Phys. Chem.*, 94:1683, 1990.
- [141] C. Jarzynski. *Phys. Rev. Lett.*, 78:2690, 1997.
- [142] <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/>. Technical report, 2009.

- [143] J. Caballero, C. Zamora, D. Aguayo, C. Yañez, and F. D. González-Nilo. *J. Phys. Chem. B*, 112:10194, 2003.
- [144] R. Amaro, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. *J. Chem. Phys.*, 119:3559, 2003.
- [145] M. Cascella, L. Guidoni, A. Maritan, U. Rothlisberger, and P. Carloni. *J. Phys. Chem. B*, 106:13027, 2002.
- [146] R. Amaro, E. Tajkhorshid, and Z. Luthey-Schulten. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:7599, 2003.
- [147] R. Amaro, E. Tajkhorshid, and Z. Luthey-Schulten. *Chem. Phys.*, 307:147, 2004.
- [148] B. Ilan, E. Tajkhorshid, K. Schulten, and G. A. Voth. *Proteins*, 55:223, 2004.
- [149] D. Zhang, J. Gullingsrud, and J. A. McCammon. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:3019, 2006.
- [150] S. Park and K. Schulten. *J. Chem. Phys.*, 120:5946, 2004.
- [151] S. Izrailev, S. Stepaniants, B. Isralewitz, D. Kosztin, H. Lu, F. Molnar, W. Wriggers, and K. Schulten. *"Steered molecular dynamics" in Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods , Ideas*. P. Deuffhard, J. Hermans, B. Leimkuhler and A. E. Mark and R. Skeel and S. Reich Eds. vol. 4, Springer, Berlin Heidelberg, New York, 1998.
- [152] S. Park, F. Khalili-Araghi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. *J. Chem. Phys.*, 119:3559, 2003.
- [153] J. Marcinkiewicz. *Math. Z.*, 44:612, 1939.
- [154] D. Kosztin, S. Izrailev, and K. Schulten. *J. Mol. Model.*, 76:188, 1997.
- [155] S. Stepaniants, S. Izrailev, and K. Schulten. *J. Mol. Model. (Online)*, 2:473, 1997.

Apêndice A

Arquivo de Parâmetros da Articaína

*** CHARMM parameter file for articaïne. ***

BONDS

!

!V(bond) = Kb(b - b0)**2

!

!Kb: kcal/mole/A**2

!b0: A

!

!atom type Kb b0

!

OBL CL 750.0 1.217

CL OSL 150.0 1.352

OSL CT3 340.0 1.432

CT3 H 322.0 1.091

NH1 HP 440.0 1.020

NH1 C 370.0 1.376

C O 620.0 1.216

C CT1 250.0 1.547

CT1 HB 330.0 1.097

CT1 CT3 222.5 1.537

CT1 NH2 200.0 1.465

NH2 HP 480.0 1.013

NH2 CT2 200.0 1.468

CT2 H 309.0 1.099

CT2 CT2 222.5 1.529

CT2 H 309.0 1.096

```
CT2 CL3 222.5 1.531
CL3 H 322.0 1.094
CA CA 305.0 1.399
CA SS 300.0 1.732
CA CT3 230.0 1.502
CA HA 340.0 1.080
CA CL 270.0 1.457
CA NH1 400.0 1.400
NH2 HC 403.0 1.040
```

ANGLES

```
!
!V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2
!
!Ktheta: kcal/mole/rad**2
!Theta0: degrees
!
!atom types Ktheta Theta0 Kub S0
!
CA CT3 H 49.3 110.7
CA CA NH1 60.0 123.6
CA CA CA 40.0 111.7
CA CA SS 60.0 113.0
CA CA HA 30.0 126.3
CA SS CA 80.0 90.6
CA CA CT3 45.8 124.6
SS CA CL 80.0 122.1
CA CL OSL 65.0 112.1
CA CL OBL 80.0 125.0
CL OSL CT3 40.0 115.8
CL CA CA 45.8 126.3
OSL CT3 H 60.0 108.8
NH1 C CT1 80.0 113.4
NH1 C O 80.0 125.1
C CT1 NH2 43.7 111.8
C CT1 CT3 52.0 110.3
C CT1 HB 50.0 103.4
C NH1 CA 145.0 126.7
O C CT1 80.0 121.4
```

OBL CL OSL 90.0 122.9
CT1 CT3 H 33.43 110.5
CT1 NH2 CT2 50.0 117.6
CT1 NH2 HP 40.4 110.2
CT1 NH2 HC 30.0 109.5
NH2 CT2 H 38.0 110.5
NH2 CT2 CT2 70.0 110.7
CT2 CT2 CL3 58.0 112.8
CT2 CT2 H 26.5 108.8
CT3 CT1 NH2 70.0 117.0
HA CA SS 45.0 119.3
H CT3 H 35.5 107.3
HP NH1 CA 25.0 116.3
HP NH1 C 34.0 113.6
HB CT1 NH2 51.5 105.6
HB CT1 CT3 35.0 107.6
HP NH2 CT2 35.0 110.2
H CT2 H 35.5 106.6
H CT2 CT2 26.5 109.3
CL3 CT2 H 34.6 109.9
H CT2 H 35.5 106.3
H CL3 H 35.5 107.6
CT2 CL3 H 34.6 111.3
CT2 CT2 H 26.5 109.2
HC NH2 HC 44.0 109.5
HC NH2 CT2 30.0 109.5

DIHEDRALS

!
!V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))

!
!Kchi: kcal/mole

!n: multiplicity

!delta: degrees

!
!atom types Kchi n delta

!

! RING DIHEDRALS

CA CA CA SS 10.00 2 180.0
SS CA CA CT3 3.00 2 180.0
CA CA CA HA 2.00 2 180.0
CT3 CA CA HA 1.00 2 180.0

CA SS CA HA 2.00 2 180.0
CA CA SS CA 10.00 2 180.0

CA SS CA CL 5.00 2 180.0
RCA CA SS CA 10.00 2 180.0

CA CA CA SS 10.00 2 180.0
CA CA CA CL 5.00 2 180.0
CL CA CA NH1 3.00 2 180.0
SS CA CA NH1 3.00 2 180.0

CA CA CA CT3 2.00 2 180.0
CA CA CA CA 10.00 2 180.0
CA CA CA NH1 3.00 2 180.0
NH1 CA CA CT3 2.00 2 180.0

CA CA CT3 H 0.20 6 0.0

! ESTER DIHEDRALS

! Calculated "T1"

SS CA CL OBL 1.25 1 180.0
SS CA CL OBL -1.11 2 0.0
SS CA CL OSL 1.25 1 180.0
SS CA CL OSL -1.11 2 0.0
CA CA CL OSL 1.25 1 180.0
CA CA CL OSL -1.11 2 0.0
CA CA CL OBL 1.25 1 180.0
CA CA CL OBL -1.11 2 0.0

CA CL OSL CT3 1.33 1 0.0
CA CL OSL CT3 2.29 2 180.0
CT3 OSL CL OBL 1.33 1 0.0
CT3 OSL CL OBL 2.29 2 180.0

CL OSL CT3 H 0.00 1 180.0

! "TAIL"DIHEDRALS

! Calculated "T2"

CA CA NH1 HP -0.78 2 0.0
CA CA NH1 HP 0.11 3 0.0
CA CA NH1 HP 0.77 1 0.0
CA CA NH1 C -0.78 2 0.0
CA CA NH1 C 0.11 3 0.0
CA CA NH1 C 0.77 1 0.0

CA NH1 C O 2.50 2 180.0
CA NH1 C CT1 2.50 2 180.0
O C NH1 HP 2.50 2 180.0
CT1 C NH1 HP 2.50 2 180.0

NH1 C CT1 HB 0.00 1 0.0
NH1 C CT1 CT3 0.00 1 180.0
O C CT1 HB 0.00 1 0.0
O C CT1 CT3 1.40 1 180.0
NH1 C CT1 NH2 0.60 1 180.0
O C CT1 NH2 0.00 1 180.0

X RCT1 RCT3 X 0.20 3 0.0

! Calculated "T4".

CT1 NH2 CT2 H -0.138 1 0.0
CT1 NH2 CT2 H -0.063 2 180.0

CT1 NH2 CT2 H 0.15 3 0.0
CT2 CT2 NH2 HP -0.138 1 0.0
CT2 CT2 NH2 HP -0.063 2 180.0
CT2 CT2 NH2 HP 0.15 3 0.0
H CT2 NH2 HP -0.138 1 0.0
H CT2 NH2 HP -0.063 2 180.0
H CT2 NH2 HP 0.1 3 0.0
CT1 NH2 CT2 CT2 -0.138 1 0.0
CT1 NH2 CT2 CT2 -0.063 2 180.0
CT1 NH2 CT2 CT2 0.732 3 0.0
CT2 CT2 NH3 HC -0.138 1 0.0
CT2 CT2 NH3 HC -0.063 2 180.0
CT2 CT2 NH3 HC 0.15 3 0.0
H CT2 NH2 HC -0.138 1 0.0
H CT2 NH2 HC -0.063 2 180.0
H CT2 NH2 HC 0.1 3 0.0

! Calucluated "T3"

C CT1 NH2 HP -0.092 1 0.0
C CT1 NH2 HP -0.042 2 180.0
C CT1 NH2 HP 0.12 3 0.0
C CT1 NH2 CT2 -0.092 1 0.0
C CT1 NH2 CT2 -0.042 2 180.0
C CT1 NH2 CT2 0.524 3 0.0
CT2 NH2 CT1 HB -0.092 1 0.0
CT2 NH2 CT1 HB -0.042 2 180.0
CT2 NH2 CT1 HB 0.12 3 0.0
HP NH2 CT1 HB -0.092 1 0.0
HP NH2 CT1 HB -0.042 2 180.0
HP NH2 CT1 HB 0.1 3 0.0
CT2 NH2 CT1 CT3 -0.092 1 0.0
CT2 NH2 CT1 CT3 -0.042 2 180.0
CT2 NH2 CT1 CT3 0.15 3 0.0
CT3 CT1 NH2 HP -0.092 1 0.0
CT3 CT1 NH2 HP -0.042 2 180.0
CT3 CT1 NH2 HP 0.12 3 0.0

NH2 CT2 CT2 CL3 0.0 6 180.0

NH2 CT2 CT2 H 0.195 3 0.0

H CT2 CT2 H 0.195 3 0.0

CL3 CT2 CT2 H 0.195 3 0.0

CT2 CT2 CL3 H 0.16 3 0.0

H CT2 CL3 H 0.16 3 0.0

IMPROPER

!

!V(improper) = Kpsi(psi - psi0)**2

!

!Kpsi: kcal/mole/rad**2

!psi0: degrees

!note that the second column of numbers (0) is ignored

!

!atom types Kpsi psi0

!

OBL X X CL 100.00 0 0.00

NH1 X X HP 20.00 0 0.00

O X X C 120.00 0 0.00

NONBONDED nbxmod 5 atom cdiel shift vatom vdistance vswitch -

cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5

!adm jr., 5/08/91, suggested cutoff scheme

!

!V(Lennard-Jones) = Eps,i,j[(Rmin,i,j/ri,j)**12 - 2(Rmin,i,j/ri,j)**6]

!

```
!epsilon: kcal/mole, Eps,i,j = sqrt(eps,i * eps,j)
!Rmin/2: A, Rmin,i,j = Rmin/2,i + Rmin/2,j
!
!atom ignored epsilon Rmin/2 ignored eps,1-4 Rmin/2,1-4
!
!carbons

CL 0.000000 -0.070000 2.000000
OSL 0.000000 -0.152100 1.770000
CT3 0.000000 -0.078000 2.040000 0.000000 -0.010000 1.900000
NH1 0.000000 -0.200000 1.850000 0.000000 -0.200000 1.550000
NH2 0.000000 -0.200000 1.850000
C 0.000000 -0.110000 2.000000
CA 0.000000 -0.070000 1.992400
O 0.000000 -0.120000 1.700000 0.000000 -0.120000 1.400000
OBL 0.000000 -0.120000 1.700000 0.000000 -0.120000 1.400000
CT1 0.000000 -0.020000 2.275000 0.000000 -0.010000 1.900000
CT2 0.000000 -0.056000 2.010000 0.000000 -0.010000 1.900000
CT2 0.000000 -0.056000 2.010000 0.000000 -0.010000 1.900000
CL3 0.000000 -0.078000 2.040000 0.000000 -0.010000 1.900000
H 0.000000 -0.022000 1.320000
HP 0.000000 -0.046000 0.224500
SS 0.000000 -0.450000 2.000000
HB 0.000000 -0.022000 1.320000
HA 0.000000 -0.030000 1.358200 0.000000 -0.030000 1.358200
HC 0.000000 -0.046000 0.224500
```