



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Influência de Anestésico na Estrutura e Dinâmica de
Membrana Celulares – Modelação e Simulação**

Marcelino da Costa Ribeiro

Orientação:

Professor Doutor António M. Teixeira Martins do Canto

Professor Doutor Luís Filipe Guerreiro Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Influência de Anestésico na Estrutura e Dinâmica de
Membrana Celulares – Modelação e Simulação**

Marcelino da Costa Ribeiro

Orientação:

Professor Doutor António M. Teixeira Martins do Canto

Professor Doutor Luís Filipe Guerreiro Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2017

Agradecimentos

Quero agradecer para às entidades que darem apoio durante o meu processo de aprendizagens. Nesta oportunidade pela dedicada aqueles que alguma forma, tanto foi contribuíram para a realização deste trabalho. A todos eles deixaria aqui o meu agradecimento sincero.

Quero agradecer os meus pais, o estado de Republica Democrática de Timor Leste, especialmente o Ministério da Educação Timor Leste, pelo apoio financeiro para continuar o meu estudo em Portugal. Ao Instituto Superior Cristal e Universidade de Évora, especialmente o departamento de química pela cooperação e apoio colaboração.

Queria agradecer os meus orientadores, Professor Doutor António Manuel Teixeira Martins do Canto e co-orientador, professor Doutor Luís Filipe Guerreiro Martins, muito especial pelo apoio orientação, e disponibilidade para ter transmitido os conhecimentos me ter com sua amizade.

Agradeço também para todos os amigos pelo apoio e disponibilidade prestada nos momentos mais delicados, pois sem elas este trabalho não seria concluído.

A todas as famílias e especialmente a minha mulher Ana Juliana Zefania da Silva que todos orações e apoiar moral, me agradeço. Agradeço também para todas as colegas Timorenses que estão cá Portugal.

Quero agradecer ainda, à Universidade de Évora, enquanto estabelecimento onde me proponho a concluir o mestrado em Bioquímica, instituição que me abraçou durante estes três anos e que me permitiu formar-me enquanto estudante e pessoa.

Índice

Agradecimentos.....	iv
Índice.....	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	viii
Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Anestésicos	1
1.2. Xénon	2
1.3. Membranas Celulares.....	3
1.3.1 Perspetiva Histórica.....	5
1.3.2. A Estrutura das Membranas	6
1.3.3. Importâncias dos Lípidos	7
1.3.4. Colesterol.....	9
1.3.5. Composição Lipídica	11
1.3.6. Estado Físico das Membranas Lipídica.....	12
1.4. Dinâmica de Molecular (MD).....	13
1.4.1. Base da Dinâmica de Molecular (MD).....	13
1.4.2. Campos de Força	14
1.4.3. Implementação Prática.....	18
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. OBJETIVO GERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MOTIVAÇÃO, PROTOCOLO E FERRAMENTAS DE ANÁLISE	27
3.1. Motivação	27
3.2. Protocolo	28
3.3. Ferramentas de Análise.....	30
3.3.1. Área por Lípidos e Espessura de Membrana.....	30
3.3.2. Parâmetros de Ordem (Scd).....	31
3.3.3. Densidade.....	32
3.3.4. Pontes de Hidrogénio.....	32
3.3.5. Dinâmica Rotacional	34

3.3.6. Difusão lateral das espécies em estudo	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Sistema de DLPC, DPPC e DLPC/DPPC com Xénon	36
4.1.1. Área por Lípido e Espessura da Membrana	36
4.1.2. Parâmetro de Ordem (-Scd).....	38
4.1.3. O parâmetro de ordem de DLPC/DPPC, DLPC/DPPC/4Xe e DLPC/DPPC/08Xe	42
4.1.4. Densidade dos sistemas	43
4.1.5. Pontes de Hidrogénio	47
4.1.6. Dinâmica de Rotacional	48
4.1.7. Difusão Lateral.....	52
4.2. Sistema de DOPC, SM e DOPC/SM/CHOL com Xénon	54
4.2.1. Área por Lípidos e Espessura da Membrana	55
4.2.2. Parâmetros de Ordem (-ScD)	57
4.2.3. Densidade dos Lípidos	60
4.2.4. Pontos de Hidrogénio	64
4.2.5. Dinâmica de Rotacional de Eixos	65
4.2.6. Difusão de Lateral	70
4.3. Sistema de POPC e POPC/SM/CHOL com Xénon.....	73
4.3.1. Área por Lípidos e Espessura da Membrana	74
4.3.2. Parâmetros de Ordem (-Scd).....	76
4.3.3. Densidade dos Lípidos.....	79
4.3.4. Pontos de Hidrogénio.....	82
4.3.5. Dinâmica de Rotacional de Eixos	83
4.3.6. Difusão de Lateral	89
4.4. Sistema de DOPE, DPPC, e DOPE/DPPC/CHOL com Xénon.....	87
4.4.1. Área por Lípidos e Espessura da Membrana	87
4.4.2. Parâmetros de Ordem (-Scd).....	90
4.4.3. Densidade dos Lípidos.....	92
4.4.4. Pontes de Hidrogénio.....	95
4.4.5. Dinâmica de Rotacional de Eixos	97
4.4.6. Difusão de Lateral	102
5. Conclusão.....	92
Bibliografia	93

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição de membranas de várias origens (Metzler, 2003).....	12
Tabela 2: Composição do sistema de lípidos.....	28
Tabela 3: Composição do sistema de vários lípidos.....	28
Tabela 4: Os valores obtidos de área por lípidos e espessura da membrana..	37
Tabela 5: Os valores de parâmetro de ordem de sn-1 e sn-2.....	39
Tabela 6: Os Valores de Pontos de Hidrogénio.....	47
Tabela 7: Dinâmica de Rotacional dos Lípidos de sn-1, sn-2 e P-N.....	51
Tabela 8: Difusão Lateral de Rotacional dos Lípidos.....	52
Tabela 9: Os valores de área por lípidos e espessura da membrana.....	56
Tabela 10: Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$) sn-1 e sn-2.....	58
Tabela 11: Pontos de Hidrogénio de DOPC/SM/Chol.....	64
Tabela 12: Dinâmica de Rotacional (C(t)) sn-1, sn-2 e P-N de DOPC/SM/Chol	66
Tabela 13: Difusão de lateral (msd) de DOPC/SM/Chol.....	71
Tabela 14: Área por Lípidos e Espessura da Membrana.....	74
Tabela 15: Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$) sn-1 e sn-2.....	77
Tabela 16: Pontos de Hidrogénio de POPC e o POPC/SM/Chol.....	82
Tabela 17: Dinâmica de Rotacional de Eixos de POPC e o POPC/SM/Chol ...	89
Tabela 18: Difusão de Lateral de POPC e POPC/SM/Chol.....	90
Tabela 19: Área por Lípidos e Espessura da Membrana.....	88
Tabela 20: Parâmetros de Ordem.....	90
Tabela 21: Pontos de Hidrogénio de DOPE, DPPC e o POPE/DPPC/Chol.....	96
Tabela 22: Dinâmica de Rotacional de Eixos de DOPE/DPPC/Chol.....	101
Tabela 23: Difusão de Lateral de DOPE e DOPE/DPPC/Chol.....	102

Lista de Figuras

Figura 1: Relação entre o parâmetro crítico de empacotamento de um lípido e as estruturas que potencialmente formam em meio aquoso. (Santos, 2010; Martins do Canto, 2007).

(http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/ryhanen/biophysi.pdf)	9
Figura 2: Estrutura de Colesterol. Adaptado (Yeagle, 2004; Martins do Canto, 2007) (Principles of Biochemistry, 4/e, 2006 Pearson Prentice Hall, Inc)	10
Figura 3: Área por lípidos de DLPC, DPPC e DLPC/DPPC.	38
Figura 4: Parâmetros de ordem de – sn-1 e – sn-2.	40
Figura 5: Parâmetros de ordem de – sn-1 e – sn-2	41
Figura 6: Parâmetros de ordem de – sn-1 e – sn-2	42
Figura 7: Densidade de DLPC, DLPC/4Xe e DLPC/8Xe	44
Figura 8: Densidade de DPPC, DPPC/4Xe e DPPC/8Xe	45
Figura 9: Densidade de DLPC/DPPC, DLPC/DPPC/4Xe e DLPC/DPPC/8Xe ..	46
Figura 10: A dinâmica de rotacional de sn-1 e sn-2 de DLPC	48
Figura 11: A dinâmica de rotacional de sn-1 e sn-2 de DPPC	49
Figura 12: A dinâmica de rotacional de sn-1 e sn-2 de DLPC/DPPC	49
Figura 13: A dinâmica de rotacional de P-N de DLPC	50
Figura 14: A dinâmica de rotacional de P-N de DPPC	50
Figura 15: A dinâmica de rotacional de P-N de DLPC/DPPC	51
Figura 16: Difusão lateral de DLPC	53
Figura 17: Difusão lateral de DPPC	53
Figura 18: Difusão lateral de DLPC/DPPC	54
<i>Figura 19: Área por Lípidos de DOPC, SM e DOPC/SM/Chol</i>	<i>57</i>
Figura 20: Parâmetro de Ordem sn-1 e sn-2 de DOPC	59
Figura 21: Parâmetro de Ordem sn-1 e sn-2 de SM	59
Figura 22: Parâmetro de Ordem sn-1 e sn-2 de DOPC/SM	60
Figura 23: Densidade de DOPC, DOPC/4Xe e DOPC/8Xe	60
Figura 24: Densidade de SM, SM/4Xe e SM/8Xe	61
Figura 25: Densidade de DOPC/SM/Chol, DOPC/SM/Chol/4Xe e DOPC/SM/Chol/8Xe	63
Figura 26: Dinâmica de Rotacional (C(t)) P-N de DOPC	66
Figura 27: Dinâmica de Rotacional (C(t)) P-N de SM	66

Figura 28: Dinâmica de Rotacional (C(t)) P-N de DOPC/SM/Chol.....	67
Figura 29: Dinâmica de Rotacional (C(t)) de sn-1	68
Figura 30: Dinâmica de Rotacional (C(t)) de sn-2.....	69
Figura 31: Difusão de lateral (msd) de DOPC.....	72
Figura 32: Difusão de lateral (msd) de SM.....	72
Figura 33: Difusão de lateral (msd) de DOPC/SM/Chol.....	72
Figura 34: Área por lípidos de POPC, SM e POPC/SM/Chol.....	76
Figura 35: Parâmetros de Ordem (-SCD) sn-1 e sn-2 de POPC.....	77
Figura 36: Parâmetros de Ordem (-SCD) sn-1 e sn-2 de POPC/SM.....	78
Figura 37: Densidade de POPC, POPC/4Xe e POPC/8Xe	79
Figura 38: Densidade de POPC/SM/Chol, POPC/SM	81
Figura 39: Dinâmica de Rotacional de P-N	84
Figura 40: Dinâmica de Rotacional de sn-1	86
Figura 41: Dinâmica de Rotacional de sn-2 e Chol.....	88
Figura 42: msd de POPC, SM e DOPC/SM/Chol.....	91
Figura 43: Área por lípidos de DOPE, DPPC e DOPE/DPPC/Chol	89
Figura 44: Parâmetros de Ordem de DOPE.....	91
Figura 45: Parâmetros de Ordem de DPPC.....	91
Figura 46: Parâmetros de Ordem de DOPE/DPP/Chol	92
Figura 47: Densidade de DOPE e Xénon.....	93
Figura 48: Densidade de DPPC.....	93
Figura 49: Densidade de DOPE/DPPC/Chol.....	95
Figura 50: Dinâmica de rotacional de P-N de DOPE	97
Figura 51: Dinâmica de rotacional de P-N de DPPC	97
Figura 52: Dinâmica de rotacional de P-N de DPPC/DOPE/Chol	98
Figura 53: Dinâmica de rotacional de sn-1	99
Figura 54: Dinâmica de rotacional de sn-2.....	101
Figura 55: Difusão Lateral de DPPC, DOPE e DPPC/DOPE/Chol.....	103

Abreviaturas

DLPC	= 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPC	= 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPC	= 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	= 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPC	= 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	= 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
SM	= Esfingomielinas
CHOL	= Colesterol
MD	= Dinâmica Molecular
SNC	= Sistema nervoso central
Xe	= Xénon
EMEA	= Agência Europeia de Medicamentos
ASA	= Associação Americana de Anestesiologia
PCE	= Parâmetro Crítico de Empacotamento
VDM	= Van der Waals
LINCS	= Solucionador de restrição linear
PME	= Malha de partículas de Ewald
NVE	= Número de partículas, Volume e Energia
NPT	= Número de partículas, Temperatura e Pressão
PL	= Fosfolípido
GL	= Glicolípido
SL	= Esfingomielina
PE	= Fosfatidiletanolamina
PS	= Fosfatidilserina
PI	= Fosfatidilinositol
PA	= Ácido fosfatídico
PC	= Fosfatidilcolina

Resumo

O trabalho desenvolvido nesta tese teve como objetivo de avaliar as alterações produzidas pelas moléculas anestésicas (xenon molecular) nas membranas que possam influenciar o processo de neurotransmissão. Com esse intuito, avaliamos várias propriedades estruturais e dinâmicas de modelos de membranas celulares (bicamadas lipídicas) na presença e na ausência de moléculas anestésicas, recorrendo à simulação computacional (dinâmica molecular).

Foram contruídos vários modelos de membrana, com um, dois ou três lípidos, com a seguinte composição relativa. DLPC, DPPC, DPPC/DLPC (1:1), DOPC, SM, DOPC/SM/CHOL (2:2:1), POPC, POPC/SM/CHOL (2:2:1), DOPE, DPPC e DOPE/DPPC/CHOL. Estas membranas foram simuladas na ausência de anestésico (para efeitos de validação e comparação) e na presença de concentrações baixas de xenon molecular (4 e 8 Xe por membrana). Estes sistemas foram então simulados utilizando o método de dinâmica molecular e os resultados analisados em busca de diferenças.

Os resultados mostraram que a molécula xénon interage com todas bicamadas e que, estas, sofrem alterações mensuráveis das suas propriedades em consequência dessa interação.

Palavra-chave: Anestésico, Xénon, Membrana Celulares, Simulações

Abstract

Influence of Anesthetic on Cell Membrane Structure and Dynamics - Modeling and Simulation

The work developed in this thesis had as objective to evaluate the changes produced by the anesthetic molecules (molecular xenon) in the membranes that can influence the process of neurotransmission. With this in mind, we evaluated several structural and dynamic properties of cell membrane models (lipid bilayers) in the presence and absence of anesthetic molecules, using computational simulation (molecular dynamics).

Several membrane models were constructed with one, two or three lipid types, with the following relative composition. DLPC, DPPC, DPPC/DLPC (1:1), DOPC, SM, DOPC/SM/CHOL (2:2:1), POPC, POPC/SM/CHOL (2:2:1), DOPE, DPPC and DOPE/DPPC/CHOL. These membranes were simulated in the absence of anesthetic (for validation and comparison purposes) and in the presence of low concentrations of molecular xenon (4 and 8 Xe per membrane). These systems were then simulated using the molecular dynamics method and the results analyzed for differences.

The results showed that the xenon molecule interacts with all bilayers and that they undergo measurable changes in their properties as a result of this interaction.

Keyword: Anesthetic, Xenon, Cell Membrane, Simulation

1. Introdução

1.1. Anestésicos

Em geral os anestésicos já são conhecidos em medicina há mais de 150 anos, mas ainda não são totalmente conhecidos os seus mecanismos de ação nas membranas celulares e também ainda não se conhece o local principal de ação dos anestésicos (Figueira Paiva, 2010; Urban, 2006). Segundo a maioria dos autores o local de ação encontrar-se-á nos lípidos da bicamada ou em algumas proteínas de membrana (Figueira Paiva, 2010). Os anestésicos tendem a imobilizar ou impedir os impulsos elétricos ao nível do sistema nervoso central, podendo causar temporariamente amnésia. Numa primeira abordagem, pensa-se que a bicamada lipídica das membranas celulares constitui o primeiro alvo para anestésicos, sendo a sua hidrofobicidade um parâmetro importante na sua ação (Hironori Tsuchiya, 2008; Ronald, 2011). Alguns dos anestésicos testados ao longo das últimas décadas são compostos orgânicos e, com base em resultados experimentais, Meyer e Overton estabeleceram uma relação linear entre a potência anestésica de uma série de anestésicos gerais (sobretudo anestésicos por inalação) e a solubilidade em líquidos apolares ou gorduras (Satyvani Vemparala, 2006). Os anestésicos podem ser classificados de diversas formas, existindo duas categorias principais: anestésicos gerais e anestésicos locais. Os anestésicos gerais constituem o maior grupo de anestésicos de uso comum em medicina, sendo indicados para as cirurgias mais complexas (Laurence L. Brunton, 2006). A anestesia geral está relacionada com uma alteração na transmissão dos impulsos nos neurónios do sistema nervoso central (SNC). O mecanismo para esta mudança não é completamente conhecido e pode resultar do bloqueio dos canais de iões da membrana nervosa

(muitos anestésicos reduzem o fluxo transmembranar) e também pode estar relacionado com uma modificação não específica dos lípidos da membrana, pois a potência dos anestésicos gerais gasosos está estreitamente ligada à sua solubilidade nos lípidos das membranas, como estabelece a hipótese de Meyer e Overton (Simões, 1989).

Os anestésicos são usados clinicamente em procedimentos cirúrgicos para tornar o paciente inconsciente e insensível à estimulação dolorosa. Os neurónios são muito sensíveis a concentrações relativamente baixas de anestésicos, observando-se a interrupção da transmissão de estímulos do nociceptivos, efeito que se deve principalmente à inibição da transmissão sináptica, e pode ser devida a uma redução da libertação de neurotransmissores (Dales, 2012).

1.2. Xénon

Xénon é uma substância química gasosa incolor e estável com baixa solubilidade em água e com propriedades anestésicas, tendo sido usado clinicamente desde há mais de 150 anos (Lorna M. Stimson, 2005). O xénon pode ser encontrado na natureza sob a forma de alguns isótopos que são Xe^{129} (26,44%), Xe^{131} (21,18%), Xe^{132} (26,89%) e Xe^{134} (10,44%). Identificado pela primeira vez em 1898 pelos químicos britânicos Sir William Ramsay e Morris Travers, o xénon foi pela primeira vez usado como anestésico geral em seres humanos em 1951 por Cullen e Gross, tendo também outras aplicações, razão pela qual são produzidos mais de 6,5 milhões de litros anualmente (Lynch C., 2000; Fernandes Mendes F., 2003). O isótopo 129 possui um tempo de meia-vida de cerca de 17 milhões de anos, tendo sido utilizado para determinar a idade

de meteoros e meteoritos (Fernandes Mendes F., 2003). Outros isótopos são usados em outras aplicações no âmbito da medicina, como na determinação do fluxo sanguíneo ou na obtenção de imagens para avaliação da função pulmonar (Fernandes Mendes F., 2003; Ecem Esencan, 2013).

Em 2007 foi aprovado o uso do xénon como anestésico pela European Medicines Agency (EMA) em doentes com classificações de estado funcional I e II da American Association of Anesthesiology (ASA). Em 2008 no Hospital da Universidade de Coimbra – Portugal, foi pela primeira vez utilizado na Europa, numa formulação com a designação de LENOXe™ (Nuno Santos Carvalho, 2008) (Ricardo Morais, 2014). Devido ao facto de ser inerte, o xénon é considerado o anestésico ideal; tem ação sobre os neuro-recetores centrais e não é metabolizado pelo organismo, sendo eliminado sob forma inalterada por via pulmonar. Por outro lado, não tem ação poluente quando libertado na atmosfera. Nas últimas décadas recrudescer o interesse pelo uso do xénon como anestésico, bem como a investigação sobre o seu modo de ação, os mecanismos pelos quais produz anestesia e as suas propriedades como anestésico geral, nomeadamente a sua interação com os recetores proteicos das membranas celulares (Nuno Santos Carvalho, 2008; Ricardo Morais, 2014)

1.3. Membranas Celulares

A membrana celular é uma estrutura supramolecular organizada que separa dois meios e é permeável a alguns componentes dos mesmos mediante a aplicação de uma força motriz adequada (Teles Martins, 2013; Martins do Canto, 2007). As membranas biológicas consistem essencialmente em duplas camadas lipídicas e constituem a fronteira entre as células e o seu exterior,

sendo, pois, uma barreira à passagem de moléculas polares e iões. A organização das membranas desenvolve-se numa arquitetura central em dupla camada de lípidos, sendo o “mosaico fluido” um modelo usado para descrever a estrutura básica de uma membrana celular. Os lípidos membranares são moléculas anfifílicas, com uma extremidade hidrofóbica e outra hidrofílica. As interações hidrofóbicas entre elas e as interações hidrofílicas com água originam a estrutura de bicamada lipídica. As membranas biológicas têm cerca de 5 a 10 nm de espessura, trata-se de uma estrutura trilaminar constituída de duas camadas polares (zwitteriónicas em alguns casos) e uma camada apolar central. (Martins do Canto, 2007)

A membrana é atualmente definida como estrutura fina e tipicamente plana que separa dois ambientes, sendo considerada como um sistema semipermeável, permitindo desta forma a comunicação entre a célula e o exterior. Em 1925 o primeiro modelo de membrana celular a surgir foi o de Gorter e Grendel (E. Gorter, 1925). Já por esta altura, a ideia de uma membrana semi-permeável e não polar era considerada, sendo que estes autores propuseram pela primeira vez o arranjo em bicamada, que ainda hoje é considerada como a unidade estrutural básica de todas as membranas biológicas. Gorter e Grendel previram que se uma membrana plasmática fosse realmente uma bicamada, então a sua superfície deveria ser metade da superfície ocupada por todos os seus lípidos distribuídos numa monocamada (Heimburg, 2007). As membranas são semipermeáveis e controlam o transporte de diversas substâncias de e para as células por processos ativos ou passivos. A membrana celular contém igualmente várias enzimas atuam na zona da fronteira celular, e também fundamentais na manutenção do potencial de

membrana em repouso. As membranas biológicas, como consequência da sua complexidade, são estudadas frequentemente com base em modelos através dos quais se pode estudar as suas propriedades, minimizando as variáveis, com o intuito de facilitar o seu estudo. (Ben-Shaul, 1995. 361-362)

1.3.1 Perspetiva Histórica

O conceito de membrana celular remonta ao século XVII quando Robert Hooke descobriu a célula, mas apenas no século XIX surgiram os primeiros modelos representativos da sua estrutura e composição química. No início do século XX, Charles Ernest Overton iniciou o seu estudo com células vegetais, e, ao observar que as células absorviam substâncias lipossolúveis com facilidade, ele propôs que a membrana plasmática era constituída por lípidos, tendo igualmente sugerido a hipótese utilizada para prever a eficiência de anestésicos (Katz, 1994; Cantor, 2001). Em 1925, Gorter e Grendel, estimulado pelas descobertas de Franklin e Overton, realizaram uma série de estudos que tiveram um grande impacto com a forma de conceber a estrutura da membrana. Estes autores extraíram os lípidos de membranas de eritrócitos de uma variedade de espécies e calcularam a área coberta por estes lípidos quando espalhada sobre a água para formar uma camada monomolecular. Verificaram que a área da camada monomolecular era o dobro da área da membrana; isto é, havia lípido suficiente para formar uma camada dupla de lípido ou bimoleculares em torno das células (E. Gorter, 1925; Martins do Canto, 2007). Em 1935, Davson e Danielli introduziram alterações ao modelo proposto por Gorter e Grendel, incluindo proteína na estrutura da membrana. As características essenciais deste modelo são um núcleo lipídico biomolecular com

cerca de 5 nm de espessura e corresponde ao modelo de Gorter-Grendel e as camadas interiores e exteriores de proteína ligada aos grupos de cabeça polares dos lípidos por interações iónicas (Heimburg, 2007; Moreira, 2014). Em 1972, Singer e Nicolson contribuíram de forma decisiva para o estudo das membranas biológicas. Segundo o seu modelo designado por “mosaico fluido”, as membranas podem ser vistas como uma solução bidimensional constituída por uma bicamada fluida de fosfolípidos que inclui proteínas de membranas, com liberdade de movimento (fluidez), posicionadas, quer à superfície, quer no interior da membrana (Martins do Canto, 2007; Heimburg, 2007). A topologia de membrana obtida pelo modelo de mosaico fluido apresenta várias imprecisões devido à sua simplicidade. O modelo foi refinado em 2003, numa tentativa de unificar a visão dada pelo modelo de mosaico fluido com as novas observações realizadas, tirando o enfoque na fluidez e evidenciando o papel do citoesqueleto e da matriz extracelular na manutenção da consistência e firmeza das células dos animais. Apesar de todos os esforços, um modelo de membrana que descreva ao pormenor as suas características estruturais e funcionais, bem como o seu papel face aos fenómenos de regulação, não foi ainda proposto, constituindo um desafio para a Biologia celular e para Bioquímica de membranas (Martins do Canto, 2007; Kechuan Tu, 1998).

1.3.2. A Estrutura das Membranas

As membranas celulares são formadas por estruturas lamelares constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas, e diferentes compartimentos onde se alojam e são construídas uma proteínas e lípidos. A estrutura das membranas é, em grande medida, determinada pela natureza anfifílica dos

lípidos. O termo “anfifílico” significa que o composto químico em causa possui propriedades hidrófilas e hidrofóbicas em simultâneo em zonas diferentes da sua molécula. As moléculas que formam as bicamadas, em contacto com meio aquoso, orientam-se de forma que as caudas apolares dos lípidos fiquem distantes da água e, portanto, viradas sobre si próprias, mantendo as cabeças hidrofílicas viradas para o interior e para o exterior da célula (meios predominantemente aquosos) (Popescu, 2008; Heimburg, 2007).

As membranas celulares são, pois, compostas, na sua maioria por lípidos e proteínas, sendo que a quantidade de proteína numa membrana varia tipicamente entre 25 e 75% em massa. Os componentes lipídicos formam a maior parte da área superficial de uma membrana. A principal função dos lípidos nas membranas é permitir a formação de uma bicamada estável e, a partir dela, o desenvolvimento das propriedades funcionais característica de cada tipo de membranas. Uma membrana celular típica pode ter cerca de 100 lípidos, sendo os fosfolípidos a família de lípidos mais comum em membranas biológicas. Esta, por sua vez, divide-se em glicerofosfolípidos e esfingofosfolípidos. Os glicerofosfolípidos são derivados do *sn*-glicero-3-ácido fosfórico, com dois ácidos gordos esterificados na posição *sn* 1 e 2 do glicerol. Os esfingofosfolípidos são, em geral, derivados da ceramida, contendo a fosfocolina ou a fosfoetanolamina como grupos polares (Yeagle, 2004; Gennis, 1988).

1.3.3. Importâncias dos Lípidos

Há milhares de lípidos que, em potência, podem formar biomembranas. Porém, os lípidos mais comumente encontrados em membranas celulares pertencem maioritariamente a uma de três classes: fosfolípidos (PL), glicolípidos (GL) e esfingolípidos (SL), apresentando cada classe uma combinação típica de

cadeias de ácidos gordos na zona hidrofóbica da molécula. Nessa zona da membrana, raramente em contacto direto com a água, o número de ligação duplas das cadeias carbonadas dos lípidos é fundamental da determinação das suas propriedades físico-químicas. Exemplos de lípidos que apresentam insaturações na sua estrutura são DOPC (1,2-dioleí-sn-glicero-3-fosfatidilcolina), POPE (1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina), POPC (1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina) e DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina). O principal papel da ligação dupla é manter a fluidez da membrana, estando também indiretamente envolvida na sinalização celular e na funcionalidade das proteínas de membrana. Por outro lado, lípidos de cadeias saturadas são, por exemplo, o DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) e o DLPC (1,2-dilauril-sn-glicero-3-fosfatidil colina) (Feller et al, 1997).

A ligação dos ácidos gordos à parte polares dos lípidos ocorre em geral por esterificação de dois ácidos gordos em duas posições adjacentes de uma unidade de glicerol em glicerolípidos ou pela ligação amida de um ácido gordo com o álcool esfingosina em esfingolípidos. Em geral o íão fosfato ligado ao glicerol ou à esfingosina e colina ou etanolamina ligada ao fosfato compõem a cabeça polar dos fosfolípidos e esfingolípidos. Nos glicolípidos, um monossacarídeo ligado à esfingosina constituem a parte polar da molécula (Heimburg, 2007).

A solubilidade de lípidos de membrana em água é muito baixa, devido ao efeito hidrofóbico característico das moléculas anfifílicas. As baixas concentrações, tendem a formar monocamadas quando depositadas à superfície da água. O comportamento deste tipo de moléculas em meio aquoso pode ser racionalizado em função de um parâmetro que relaciona as dimensões da

cabeça polar e a partes apolar dos lípidos, designado por parâmetro de crítico de empacotamento (PCE) (Santos, 2010; Vaz, 2008) e dado por:

$$PCE = \frac{v_c}{a \cdot l_c} \dots\dots\dots(1)$$

Onde v_c é o volume das cadeias hidrofóbicas, l_c o comprimento das cadeias e a é a área ocupado pela cabeça polar do lípido.

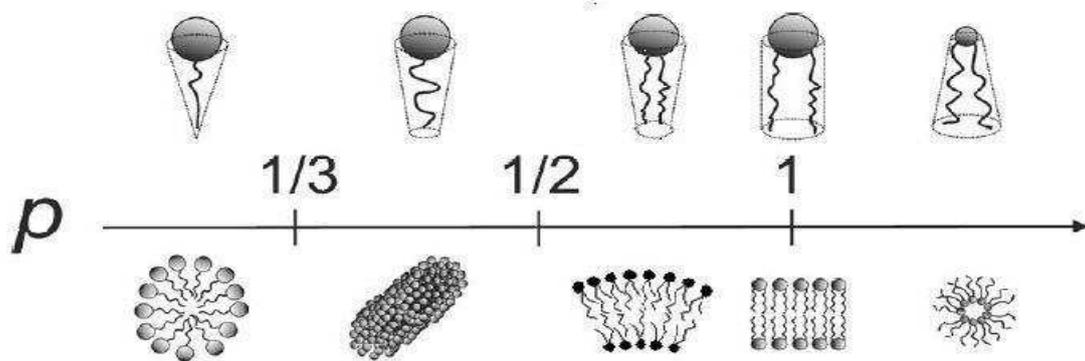


Figura 1: Relação entre o parâmetro crítico de empacotamento de um lípido e as estruturas que potencialmente formam em meio aquoso. (Santos, 2010; Martins do Canto, 2007).
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/ryhanen/biophysi.pdf>

Assim, sistemas com $PCE < 1/3$ tenderão a formar micelas normais com curvaturas positivas, sistemas com $PCE \sim 1$ estruturas em bicamada e com $PCE > 1$ formar-se-ão micelas invertidas (Martins do Canto, 2007; Ryhänen, 2006).

1.3.4. Colesterol

O colesterol (Chol) é um componente importante na estrutural da membrana plasmática celular dos mamíferos, estando envolvido na regulação da permeabilidade da membrana e na sua fluidez (Robalo et al, 2013; Martins do

Canto, 2007). Desempenha igualmente um papel importante, juntamente com os lípidos e as proteínas de membrana na transdução de sinal celular, resposta imune, a infecção de células, e a polaridade da superfície celular (Harder, 1997; Martins do Canto, 2007; Zoe Cournia, 2007). O colesterol é composto por um sistema anelar planar tetracíclico com um grupo hidroxilo e uma curta cadeia ramificada de oito átomos de carbono e é em grande parte uma molécula hidrofóbica. O efeito do colesterol nas propriedades funcionais, estruturais e dinâmicas da membrana tem recebido atenção considerável nas últimas décadas. Tem sido demonstrado que o colesterol influencia as propriedades biofísicas das membranas, tais como a sua fluidez e pode também desempenhar outras funções associadas a membranas, como a regulação da função de proteínas de membrana, o que influencia a sua permeabilidade (Zoe Cournia, 2007).

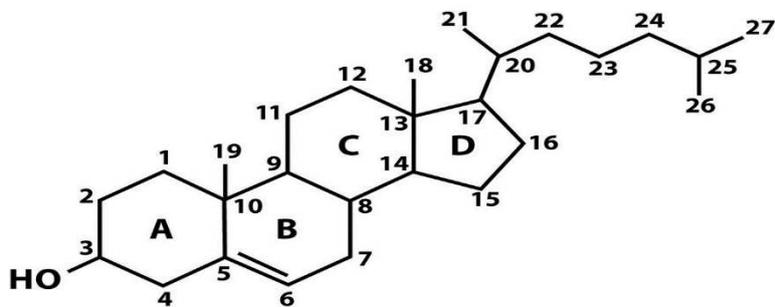


Figura 2: Estrutura de Colesterol. Adaptado (Yeagle, 2004; Martins do Canto, 2007) (Principles of Biochemistry, 4/e, 2006 Pearson Prentice Hall, Inc)

A estrutura do colesterol baseia-se essencialmente num tetraciclopentafenantreno tetracíclico com uma cadeia lateral de iso-octilo no carbono 17. Os quatro anéis (A, B, C, D) têm as junções de anel trans; a cadeia lateral e os dois grupos metilo (em C -18 e C-19), bem como o grupo hidroxilo

em C-3, encontram-se projetados para cima em relação ao plano dos anéis. Existe uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6. Assim, a molécula tem um núcleo planar rígido de quatro anéis com uma cauda de flexível. O colesterol tem uma grande influência nas propriedades físico-química das membranas, devido às suas particularidades enquanto lípido (Martins do Canto, 2007).

1.3.5. Composição Lipídica

Os lipídios presentes nas membranas celulares pertencem predominantemente ao grupo dos fosfolípidos. Estas moléculas são formadas pela união de três grupos de moléculas menores: um álcool, geralmente o glicerol, duas moléculas de ácidos gordos e um grupo fosfato, que pode conter ou não uma segunda molécula de álcool, em geral colina ou etanolamina. A membrana biológica, constituída fundamentalmente por de proteínas e lípidos, desempenha um papel importante na estruturação e no funcionamento das células, a unidade estrutural da vida. As membranas celulares contêm, em média, 40% de lípidos e 60% de proteínas em peso seco, água, colesterol e iões metálicos. O colesterol não se encontra em todas as membranas e a proporção lípidos/proteínas varia de membrana para membrana. Na membrana celular existem fosfolípidos de diferentes famílias, sendo as mais importantes as fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilcolinas (PC), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilinositóis (PI) e ácidos fosfatídicos (PA), enquanto outros são mais específicos de alguns tipos celulares (Metzler, 2003; Martins do Canto, 2007; Mahalka, 2013).

Tabela 1: Composição de membranas de várias origens (Metzler, 2003)

Composto	Mielina (Bovino)	Hasta de retiniana	Membrana plasmática (eritrócito humano)	Membrana mitocôndria	Membrana bacteriana (E. cóli)	Membrana de Cloroplastos
Proteína	22	59	60	76	75	48
Lípido total	78	41	40	24	25	52
PC	7.5	13	6.9	8.8		
PE	11.7	6.5	6.5	8.4	18	
PS	7.1	2.5	3.1			
PI	0.6	0.4	0.3	0.75		
PG					4	
Cardiolipina		0.4		4.3	3	
SM	6.4	0.5	6.5			
GL	22	9.5	-	-		
Chol	17	2	9.2	0.24		
GPL total	33	27	24	22.5	25	4.7
% GPL dos lípidos totais	42	66	60	94	>90%	9

Predominam nas membranas os fosfolípidos PC, PE e PS e os esfingolípidos., Os lípidos da família das fosfatidilcolinas apresentam uma distribuição de cadeias com diferentes graus de insaturados e comprimentos, mas a esfingomielina apresenta longas cadeias saturadas (Metzler, 2003).

1.3.6. Estado Físico das Membranas Lipídica

O estado físico da membrana depende da estrutura das moléculas dos lípidos que a compõem, sendo, porém, a relação entre eles bastante complexa. A fluidez da membrana reveste-se de uma importância particular, sendo definida como o inverso da viscosidade. Em geral, na membrana, as duas fases principais que os lípidos podem apresentar em misturas são o estado gel (L_{β}) e o estado líquido (L_{α}). A fase gel é formada a baixas temperaturas pelos lípidos que formam a estrutura lamelar, onde as cadeias de acilo dos lípidos estão totalmente

estendidas com todas as suas ligação C – C na conformação *trans* e acondicionados em conjunto paralelas entre si. No estado $L\beta$ as moléculas de lípido estão impedidas de se moverem lateralmente ao longo da membrana, as cadeias acilo são estabilizadas por interações de Van der Waals fortes e apresentam uma ordem rotacional e translacional elevada, sendo a espessura da bicamada máxima. Na fase líquida ($L\alpha$), a bicamada é caracterizada por uma razão conformacional *trans/gauche* baixa. A diminuição das interações de Van der Waals, relativamente à fase gel, origina um aumento da distância entre os lípidos e uma diminuição da organização das cadeias acilo e da ordem rotacional e translacional. Nesta fase a espessura da bicamada, relativamente à fase gel, diminui. Com o ligeiro aumento de temperatura, as interações de van der Waals entre as cadeias acilo que favorecem o empacotamento cristalino vão, progressivamente, ficando mais fracas. Devido à excitação rotacional, induzida termicamente nas cadeias acilo, dão origem a uma fase em que as cadeias acilo se encontram ligeiramente inclinadas em relação ao plano, fase $L\beta'$. A inclinação é interpretada como o resultado de a área das cabeças do fosfolípido, ser ligeiramente maior que a área das duas cadeias acilo (Alves Branco, 2013; Heimburg, 2007; Yeagle, 2004).

1.4. Dinâmica de Molecular (MD)

1.4.1. Base da Dinâmica de Molecular (MD)

O conceito de dinâmica molecular foi originalmente desenvolvido por Alder & Wainwright no início de 1950, como uma técnica para simular um sistema composto por esferas rígidas (Alder & Wainwright, 1959). Ao longo dos anos, foi possível simular sistemas mais realistas, partindo dos gases nobres até

moléculas biológicas e sistemas organizados de grande complexidade. A técnica baseia-se na resolução das equações de Newton do movimento para o conjunto de centros de interação que compõem o sistema em estudo, obtendo as posições e as velocidades de cada centro em cada momento da simulação. Os cálculos são efetuados usando os conceitos da mecânica newtoniana:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i = - \nabla_{r_i} U(r_1, r_2, \dots, r_N) \dots\dots\dots(2)$$

A análise pelos métodos da mecânica estatística das trajetórias realistas assim obtidas permite determinar propriedades estruturais e dinâmicas de assembleias de moléculas, bem como propriedades termodinâmicas e termofísicas dos sistemas modelo (Monné, 2010; Martins do Canto, 2007).

1.4.2. Campos de Força

As simulações de computador são uma ferramenta poderosa para estudar a estrutura e a dinâmica das macromoléculas biológicas. Em princípio, todos os detalhes de estruturas moleculares e as interações podem ser previstos a partir dos primeiros princípios usando a mecânica quântica. Trata-se porém de uma tarefa difícil para moléculas complexas ou sistemas com um número elevado de partículas. Os cálculos efetuados na simulação baseiam-se na mecânica clássica, recorrendo ao conceito de campo de forças, como forma de caracterizar as interações entre as partículas do sistema em questão. Como classificação geral, um campo de forças pode ser atomístico, descrevendo com detalhe as interações entre todos os átomos, ou não atomístico (United-atom ou Coarse grain), que considera conjuntos de átomos (pseudoátomos) como centros de

interação. A energia potencial é normalmente dividida em diferentes contribuições das interações ligantes e não ligantes, incluindo as interações de extensão de ligação (dois átomos), flexão de ângulo entre ligações (três átomos) e torção ou variação do ângulo diedro (quatro átomos), interações de van der Waals e Coulomb (Schlick, 2010; Martins do Canto, 2007).

Quando se usam campos de forças, dada a natureza clássica da abordagem, apenas os movimentos dos núcleos são calculados, sendo os detalhes da dinâmica eletrônica ignorados através da consideração de um campo médio para toda a molécula (Monné, 2010; Martins do Canto, 2007).

Como se disse, a maioria dos campos de força clássicos contar com cinco termos com uma interpretação física simples: energia potencial associada à deformação do comprimento e do ângulo da ligação e à rotação em torno dos ângulos diedros (torções), e os chamados termos não ligantes, que descrevem as interações eletrostáticas e as interações de dispersão e de repulsão (van der Waals) (Chinellato, 2003; Martins do Canto, 2007). Alguns campos de forças mais complexos incluem termos adicionais representando polarização atômica e os termos de acoplamento mais complexos, como o acoplamento cruzado entre extensão de ligações e ângulos. Na simulação não há um campo de forças específico para um sistema, mas pretende-se que, quer as formas funcionais dos termos de energia, quer os seus parâmetros sejam transferíveis e aplicáveis a diferentes sistemas. A separação dos termos de energia permite uma fácil interpretação do modo como os diferentes componentes afetam a capacidade de reproduzir a estrutura e a dinâmica do sistema em estudo. Além disso, uma separação entre termos de energia é a base para a utilização de múltiplos algoritmos para simulações de dinâmica molecular, em que os componentes

ligantes e não ligante são atualizados com diferentes frequências, permitindo simulações mais rápidas. Os fatores que estão na base da parametrização do campo de forças tendem para se encontrar um equilíbrio entre os recursos computacionais e a qualidade dos resultados (Monné, 2010; Marrink S. J., 2007).

Alguns dos campos de forças usados em simulação de sistemas biológicos são, por exemplo, AMBER, CHARMM, GROMOS, ou OPLS. Em simulação, deve escolher-se um campo de forças adequado aos sistemas a estudar e que consiga reproduzir um determinado conjunto das suas propriedades (Martins do Canto, 2007). Na simulação por dinâmica molecular, o sistema é descrito pela sua energia potencial, sendo que um campo de forças contém dois componentes importantes: 1) O conjunto de equações usado para gerar as energias potenciais. 2) Os parâmetros usados nesse conjunto de equações. A energia calculada a partir do campo de forças é escrita como uma soma de termos, cada um descrevendo a energia requerida para mover a molécula ou parte dela de um modo específico (Martins do Canto, 2007; Niemelä, 2007). Essa energia pode ser representada por:

$$U = U_{bond} + U_{ang} + U_{tors} + U_{vdw} + U_{coul} \dots\dots\dots(3)$$

Onde U é a energia potencial total do sistema, U_{bond} é função de energia potencial para estiramento da ligação entre dois átomos, U_{ang} é a energia necessária para alterar um certo ângulo formado por três átomos, U_{tors} é a energia torsional para uma rotação em torno de uma ligação, U_{vdw} e U_{coul} são componentes de energia das interações entre átomos não diretamente ligados, o primeiro as interações de dispersão e o segundo as interações entre átomos carregados (Coulomb). A energia interna de um sistema estudado por simulação

pode ser representada pela forma funcional seguinte:

$$\begin{aligned}
 U = & \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i^b}{2} (r_i - r_i^{eq})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i^\alpha}{2} (\theta_i - \theta_i^{eq})^2 + \\
 & \sum_{\text{torsões}} \sum_n k_{\Phi,n} (1 + \cos(n\Phi - \Phi^{ref})) + \\
 & \sum_{\text{pares}} \left(\left\{ \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \right\}_{vdm} + \left\{ k_e \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right\}_{coul} \right) \dots\dots\dots(4)
 \end{aligned}$$

Onde U é a energia potencial total em função da posição de cada partícula. A energia de extensão das ligações e de deformação dos ângulos é descrita pelo modelo do oscilador harmónico. No primeiro termo da função de energia responsável pela ligação, k_i^b é a constante de força de ligação e $r_i - r_i^{eq}$ é o desvio entre o comprimento da ligação e o seu valor de equilíbrio. No segundo termo na equação, referente aos ângulos de ligação, k_i^α é a constante de força e $\theta_i - \theta_i^{eq}$ é o desvio em relação ao ângulo do equilíbrio entre três átomos ligados. O terceiro termo é para os diedros (ângulos de torção) em que $k_{\Phi,n}$ representa a constante de força, n é a multiplicidade da função, Φ o ângulo diedro e Φ^{ref} é o deslocamento de fase. As interações não ligantes entre pares de átomos (i, j) são representados pelos dois últimos termos. Por definição, as interações não ligantes são consideradas somente para pares de átomos separados por pelo menos três ligações. O termo de energia decorrente das interações de van der Waals (VDW) é calculado recorrendo ao potencial de Lennard-Jones (6-12) padrão e a energia eletrostática ao potencial de Coulomb (Martins do Canto, 2007; Monné, 2010; Niemelä, 2007).

Cada campo de forças é um conjunto organizado de funções e dos parâmetros correspondentes para os vários tipos de átomos (ou centros de interação em geral) considerados. Os parâmetros são o resultado de ajuste entre valores simulados e experimentais para um conjunto de propriedades macroscópicas do sistema ou podem ser obtidos através de cálculos quânticos ou recorrendo a dados espectroscópicos (Martins do Canto, 2007).

1.4.3. Implementação Prática

Na implementação prática de um trabalho de simulação molecular, a escolha dos campos de forças e dos algoritmos para integrar eficientemente as equações do movimento e fornecer uma correta descrição do comportamento do sistema.

1.4.3.1. Integrador

Os vários integradores usados na integração numérica do movimento dependem das características do sistema na simulação dinâmica molecular e a sua escolha é muitas vezes dependente do problema. As propriedades de uma determinada configuração dependem de um conjunto de posições ($r_{i=1,N}$) e velocidades ($V_{i=1,N}$) a um tempo t , sendo que o integrador “atualiza” o sistema para uma nova configuração no momento $t+\Delta t$, onde Δt é o intervalo de tempo. As famílias de integradores utilizados em dinâmica molecular, derivadas do algoritmo de Verlet, truncam o erro para as coordenadas na quarta ordem, $O(\Delta t^4)$ (Leach, 2001; Martins do Canto, 2007). A formulação original é:

$$r(t+\Delta t) = 2r(t)-r(t-\Delta t)+\Delta t^2a(t)+O(\Delta t^4) \dots\dots\dots(5)$$

Onde a propagação depende das posições e aceleração no tempo t e da posição em $t - \Delta t$, sendo a velocidade dada por:

$$V(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t} \dots\dots\dots(6)$$

Têm sido desenvolvidas algumas variantes do algoritmo Verlet, dando origem exatamente à mesma trajetória, e diferindo na forma como as variáveis são armazenados na memória. O algoritmo de *leap-frog* é uma dessas variantes. Uma ainda melhor execução do mesmo algoritmo básico é o assim chamado esquema de Verlet velocidade, onde as posições, velocidades e acelerações no tempo $t + \Delta t$ são obtidos com as mesmas quantidades no tempo t da seguinte forma:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \times v(t + \frac{1}{2} \Delta t)$$

$$v(t + \frac{1}{2} \Delta t) = v(t + \frac{1}{2} \Delta t) + \Delta t \times a(t) \dots\dots\dots(7)$$

Este algoritmo é bastante robusto e exibe um excelente desempenho computacional. No entanto, possui um grande inconveniente: a não sincronização de tempo entre a posição e velocidade. Por esta razão, o algoritmo não permite um cálculo preciso da energia total do sistema, porque a contribuição das energias cinética e potencial são conhecidos em diferentes tempos (Leach, 2001; Allen & Tildesley, 1987).

1.4.3.2. Passo de tempo de integração e restrições

O passo de simulação, Δt , é um tempo entre os instantes que constituem a trajetória de simulação. Um passo curto permite um maior número de iterações para uma amostragem mais satisfatória do espaço de fases. Simulações com passos mais longos podem até resultar em trajetórias erradas, dada a sua incapacidade para captar os movimentos de alta frequência, podendo também levar a instabilidades numéricas especialmente devido à aproximação harmónica nos modos de alta frequência simultaneamente associada com desacoplamento entre as ligações e os ângulos. Por outro lado, um passo demasiado curto torna a simulação mais demorada e os ficheiros de resultados mais pesados, do ponto de vista computacional. Assim, a escolha do passo numa simulação é sempre uma solução de compromisso, escolhendo-se muitas vezes 1/10 do período dos movimentos de mais alta frequência do sistema. Os valores de passo mais utilizados na prática para sistemas biológicos situam-se no intervalo 1-2 fs (Martins do Canto, 2007).

Os processos que ocorrem em sistemas biológicos abrangem escalas de tempo muito diferentes. Embora os processos estejam na verdade combinados, os que menos afectam as propriedades dos sistemas biológicos são os movimentos de alta frequência. Para resolver este problema, os movimentos rápidos são de algum modo forçados a serem limitados (restrições), de modo que o intervalo de tempo (passo) possa ser aumentado sem, em princípio, alterar significativamente a evolução temporal correta. Uma das maneiras de reduzir os graus de liberdade em simulação dinâmica molecular é considerar as moléculas como corpos rígidos. A complexidade da aplicação destas restrições e a perda completa de graus de liberdade internos muitas vezes limita a sua aplicação.

Outro método envolve a aplicação de uma grande força, suficiente para restringir a liberdade de um movimento e fixar o seu respectivo parâmetro, por exemplo, a distância da ligação. Este método é muito ineficiente, porque requer passos mais curtos. As restrições mais comuns em dinâmica molecular são aos comprimentos de ligação covalente e aos ângulos de flexão (Berendsen et al, 1993; Leach, 2001). Por exemplo, uma restrição holonômica de um comprimento de ligação pode ser definida por:

$$(r_i - r_j)^2 - d_{ij}^2 = 0 \dots\dots\dots(8)$$

Onde d_{ij} é a distância entre os átomos ou grupos de átomos i e j . Com estas restrições, pode ser possível um aumento de até quatro vezes no valor do passo. Os sistemas moleculares apresentam movimentos que ocorrem em diferentes escalas temporais, considerando tanto as forças intermoleculares como as intramoleculares. Normalmente essas últimas são de ordem de magnitude superior às das primeiras, de modo que os movimentos vibracionais são muito mais rápidos que os translacionais e rotacionais. Dessa forma, os passos de integração devem ser aumentados neste caso, implicando um aumento substancial do tempo de cálculo. No entanto, se os movimentos mais rápidos forem congelados (subtraídos do cálculo das interações), restringindo os graus de liberdade correspondentes aos movimentos de maior frequência, pode-se conseguir uma maior eficiência através da utilização de um passo temporal maior na integração das equações do movimento, reduzindo consideravelmente o custo computacional (Frenkel, 2002; Berendsen et al, 1993). Neste trabalho, foi aplicado o algoritmo LINCS, enquanto para o modelo de água rígida foi utilizado o algoritmo SETTLE. A outra opção consiste em resolver iterativamente todas as restrições simultaneamente por aplicação de correções para os

comprimentos e velocidades até à tolerância desejada (Leach, 2001; Martins do Canto, 2007; Hess et al, 1997).

1.4.3.3. Condições de fronteira e interações de longo alcance

Como referido anteriormente, as interações de van der Waals podem ser tratadas apenas como interações de curto alcance, uma vez que o potencial de interação intermolecular decai rapidamente com o aumento da distância entre as partículas. No entanto, para o tratamento das interações de longo alcance (potencial de Coulomb), em que o potencial decai com a distância que é menor do que r^d (d é a dimensão do sistema), a diminuição do potencial produz um efeito que, em muitos casos, compromete severamente os resultados das simulações. Este problema tem sido contornado com a utilização de métodos baseados em somas de *Ewald*, como o método PME (*Particle-mesh Ewald*), que produzem trajetórias estáveis, ou por métodos que empregam aproximação do campo de reação (Leach, 2001; Martins do Canto, 2007).

1.4.3.4. Ensemble

A simulação por dinâmica molecular consiste em resolver numericamente as equações de movimento de um conjunto de partículas (átomos), dadas as forças sobre as partículas. Simulações moleculares dinâmicas clássicas que resolvem equações de Newton do movimento geram trajetórias no âmbito do ensemble microcanónico (número constante de partículas, volume e energia (NVE)). É geralmente desejável realizar simulações em outro ensemble, tal como o ensemble isobárico – isotérmico (constante *NPT*). Além de ser a escolha natural para a correspondência com as condições experimentais típicas, o

ensemble *NPT* é útil para a validação de campos de forças, verificando a sua capacidade para reproduzir parâmetros estruturais importantes e conhecidos a partir de medições experimentais, tais como a superfície de área por lípido, o espaçamento interlamelar, e a espessura da membrana, e para prever estas quantidades quando elas não são conhecidas. Manter a temperatura e a pressão de um sistema constantes implica controlar as flutuações da energia cinética das partículas e o volume do sistema, respetivamente, e há várias maneiras de o fazer. Os melhores algoritmos, em termos da sua capacidade para gerar rigorosamente o conjunto *NPT*, baseiam-se na abordagem "Sistema Alargado", em que são introduzidas algumas variáveis dinâmicas adicionais, por exemplo, um coeficiente de fricção em função do tempo para controlar a temperatura e um pistão para controlar a pressão. As equações do movimento com base na conservação de energia são consistentemente resolvidas de modo a que a função de distribuição microcanónica para o espaço de fases prolongada dê a distribuição isobárica-isotérmica para as partículas após a integração. É agora amplamente aceite que é vantajoso simular as membranas a uma pressão constante, mas há algum desacordo quanto à forma do tensor de pressão, se a pressão deve ser diferente da pressão perpendicular à membrana. Esta escolha é apropriada para um verdadeiro sistema interfacial, tal como as interfaces ar / hidrocarboneto ou ar / água, com uma tensão superficial significativa. Dado que em interfaces do tipo membrana / água a tensão superficial é mais baixa, em simulação de membranas trabalha-se com um tensor pressão isotrópico. No entanto, alguns autores têm argumentado que, para corrigir os efeitos de tamanho finito em simulações de membrana pequenas, uma tensão superficial modesta deve ser imposta. Pode-se argumentar que uma tensão superficial deve

ser aplicada para esticar uma pequena porção de membrana de forma a contrariar o encolhimento devido a efeitos de tamanho finito. No entanto, a imposição de uma tensão superficial pode alterar o espectro de flutuações da interface (com efeito no endurecimento da membrana) (Oren M. Becker, 2001; Martins do Canto, 2007).

A temperatura instantânea de simulação é a temperatura medida ao longo do intervalo de tempo correspondente ao passo de simulação que, $T = \langle T(t) \rangle$. Portanto, a temperatura instantânea está diretamente relacionada com a sua energia cinética e o número de graus de liberdade.

$$T(t) = \frac{1}{N_f K_B} \sum_{i=1}^n m_i v_i(t) v_i(t) \dots \dots \dots (9)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, $T(t)$ a temperatura instantânea m_i e $v_i(t)$ a massa e a velocidade instantânea de cada partícula e N_f o número de graus de liberdade do sistema. Para modificar a temperatura $T^{\text{anterior}} = T^{\text{novo}}$ de um sistema tem que ser fazer um escalamento de velocidade $V^{\text{novo}} = C_t V^{\text{anterior}}$ em cada passo do tempo (Harvey R.P., 2007; Martins do Canto, 2007).

Outro método que se utiliza é o acoplamento fraco, no qual as equações do movimento são modificadas de forma que ocorra a relaxação da temperatura instantânea do sistema para a temperatura de referência. Neste caso, o fator de escala C_T pode ser obtido como:

$$C_T = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)} \dots \dots \dots (10)$$

Onde τ_T é a constante de acoplamento da temperatura, e que representa a força de acoplamento e T_0 é a temperatura inicial. Quanto maior for τ_T , mais fraco é o acoplamento ao banho. No limite em que τ_T se aproxima de Δt , a expressão é equivalente a forçar T a permanecer constante.

1.4.3.4. Limitações

As principais limitações da simulação por dinâmica molecular para compreender as interações entre as moléculas pequenas e bicamada lipídica são o comprimento as dimensões e o tempo das escalas acessíveis à simulação, e os campos de força usados para descrever as interações dentro do sistema. A aplicação do método de MD depende pois das capacidades dos recursos computacionais disponíveis em face das limitações impostas pelo tamanho e pelo tempo do sistema simulado. Uma simulação de várias centenas de lípidos por algumas centenas de nano segundos será atualmente considerado o estado da arte. Embora existam simulações mais longas e maiores na literatura, ainda estão longe de ser rotina. As limitações de escala de tempo apresentam um sério problema para o cálculo das interações entre muitas moléculas pequenas e bicamadas lipídicas. Por exemplo, a água penetra tão lentamente através de uma bicamada lipídica que há pouca oportunidade para observar este fenómeno numa simulação de 100 ns de 64 lípidios. Isto requer a utilização de técnicas de amostragem tendenciosa (*biased*), que força o sistema a amostrar o evento de interesse, enquanto continua a fornecer um método rigoroso para a simulação não *biased*. No entanto, mesmo com este tipo de técnica, há ainda muito a melhorar na amostragem de movimentos lentos em bicamadas lipídicas. Limitações de escala ao nível das dimensões do sistema geralmente representam um problema menor em pequenas simulações de moléculas de

lipídios. No entanto, em alguns casos, por exemplo os que envolvem mudanças de fase de lípidos ou grandes alterações na curvatura da bicamada, os grandes sistemas podem ser necessárias para evitar os efeitos de tamanho finito e estabilização artificial da bicamada, devido aos efeitos de fronteira. Dado o aumento da capacidade e velocidade dos computadores, tem sido possível simular sistemas cada vez maiores para tempos cada vez mais longos. Simulações que exigiam enormes esforços computacionais há uma década, por exemplo, podem ser consideradas quase triviais hoje em dia (Martins do Canto, 2007; Monné, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é estudar a estrutura e a dinâmica de anestésicos em modelos de membrana com diferentes composições lipídicas e a interação entre os anestésicos e as estruturas lipídicas. O estudo pretende dar um pequeno contributo para a descrição do mecanismo da anestesia para anestésicos gasosos ou administrados por inalação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Especificamente, pretende-se identificar e estudar as interações entres moléculas na membrana celular de DLPC, DOPC, DOPE, DPPC, POPC, POPE, PSM e anestésicos simples como gases nobres (xénon em particular).

3. MOTIVAÇÃO, PROTOCOLO E FERRAMENTAS DE ANÁLISE

3.1. Motivação

A membrana é uma barreira seletiva delineando as fronteiras de células e organizando-as em compartimentos. A função da membrana é regular o transporte de água, íons e outros componentes para dentro e para fora da membrana celular. A composição lipídica de membrana é altamente específica. Geralmente, um lípido consiste num grupo (cabeça) polar e uma região (cauda) hidrofóbica, sendo que uma célula pode ter mais de um milhão de espécies diferentes de lípidos. A formação de camadas duplas e outras estruturas de lípidos, tais como micelas ocorre quando as caudas hidrofóbicas se orientam para longe do meio aquoso enquanto os grupos polares se aproximam da água por interagirem favoravelmente com ela. As propriedades estruturais e dinâmicas de modelos de membranas celulares (bicamadas lipídicas) na presença e na ausência de moléculas anestésicas com diferentes concentrações, recorrendo à simulação computacional (dinâmica molecular), com o objetivo de avaliar as alterações produzidas pelas moléculas anestésicas nas membranas que possam influenciar o processo de neurotransmissão constitui a principal motivação deste trabalho. As simulações de dinâmica molecular proporcionam uma visão atômica das características físico-químicas das membranas lipídicas e portanto, tem sido desenvolvida nos últimos anos uma vasta gama de famílias de campos de forças capazes de modelar vários tipos de lípidos. Para modelar membranas numa composição lipídica biologicamente realista, sistemas de simulação contendo múltiplos lípidos diferentes devem ser montados (Veiga et al, 2004; Martins do Canto, 2007).

Para melhor compreendermos o comportamento destes anestésicos normalmente aplicados por inalação (xénon), nomeadamente no que toca à interação com membranas, foi utilizada uma abordagem *in silico* de dinâmica molecular, que permite visualizar comportamentos e estruturas dos intervenientes: xénon, água e lípidos.

3.2. Protocolo

Todas as simulações MD foram realizadas com Gromacs v5.1.4. O programa Dinâmica Visual Molecular (VMD) foi utilizado para todas as visualizações (Holtje et al, 2001). Ferramentas do Gromacs foram utilizadas para construir as configurações iniciais dos sistemas estudados nesta tese, membranas de um componente:

Tabela 2: Composição do sistema de lípidos

Lípidos	Número de sistema	Água total	Água por lípidos	Campo de Força	Obs.
DLPC	128	3840	30	GROMOS53a6	
DPPC	128	3840	30	GROMOS53a6	
DOPC	128	3840	30	GROMOS53a6	
SM	144	4320	30	GROMOS53a6	
POPC	128	3840	30	GROMOS53a6	
DOPE	128	3840	30	GROMOS53a6	

E membranas de vários componentes:

Tabela 3: Composição do sistema de vários lípidos

Lípidos	Número de sistema	Água total	Água por lípidos	Campo de Força	Obs.
DLPC/DPPC	144	4320	30	GROMOS53a6	
DOPC/SM/CHOL	160	4800	30	GROMOS53a6	
POPC/SM/CHOL	160	4800	30	GROMOS53a6	
DOPE/DPPC/CHOL	160	4800	30	GROMOS53a6	

Os parâmetros ligantes e não ligantes das moléculas de lípidos foram obtidos da página web do grupo de D. P. Tieleman (http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?pagina?=Structures_and_Topologies), com a excepção do modelo de SM. Esta molécula e os seus parâmetros ligantes e não ligantes (desenvolvidos por Perttu Niemelä & Ilpo Vattulainen), foram obtidos através da web page (<https://lipidbook.bioch.ox.ac.uk/package/>).

Para a água, foi utilizado o modelo de carga pontual simples (SPC). Todas as ligações foram limitadas aos seus comprimentos de equilíbrio com o algoritmo de limitação linear (LINCS). Foram aplicadas condições de fronteiras periódicas. Foi aplicado um *cut-off* de 1,0 nm às interações de Lennard-Jones e à parte real do espaço das interações electrostáticas. O método Particle Mesh Ewald (PME) foi utilizado para calcular as interações electrostáticas, uma vez que se demonstrou que o tratamento adequado da componente electrostática é crucial em sistemas de biomembrana. Para a minimização da energia, utilizou-se o algoritmo de descida mais acentuada (*steepest descent method*). Todas as simulações de MD de produção foram feitas no *ensemble* isotérmico-isobárico (*NPT*) O intervalo de tempo para resolução das equações de movimento foi definido como 2,0 fs. Todos os sistemas foram simulados durante 200 ns e essas trajetórias analisadas para efeitos de validação da metodologia e de comparação com as simulações em que os sistemas continham Xe. Posto isto, a todos os sistemas foram adicionados 4 e 8 Xe e os novos sistemas simulados segundo o mesmo protocolo (van Gunsteren et al, 1981; Martins do Canto, 2007).

3.3. Ferramentas de Análise

As propriedades analisadas a partir das trajetórias resultantes das simulações incluem propriedades estruturais e dinâmicas que foram sistematicamente calculadas em todos os sistemas. Os erros associados a todas as propriedades calculadas nesta tese foram estimados usando o método dos blocos de Flyvbjerg e Petersen (H. Flyvbjerg, 1989).

3.3.1. Área por Lípidos e Espessura de Membrana

A área por lípido foi calculada usando uma abordagem monte carlo implementada num software *in house* que, de uma forma sucinta, atribui para cada fosfolípido 3 pontos de referência (3 átomos na cabeça polar: P, N e o C entre os dois) no plano xy e para cada Chol 2 pontos de referência no mesmo plano (H e O do grupo hidroxilo). O programa (para cada frame da trajetória) adiciona em xy pontos aleatórios que são atribuídos, por critérios de proximidade ao ponto de referência mais próximo. A cada adição o programa calcula a área em xy da caixa de simulação (que contem o total dos pontos aleatórios e de referência), e calcula, por proporcionalidade direta, a fração da área total correspondente a cada ponto de referência consoante o numero de pontos aleatórios que lhe foi previamente atribuído. Somando as áreas de cada ponto de referência para cada lípido fica-se a saber a área desse lípido. Este algoritmo é repetido para cada lípido e para cada tempo, permitindo saber a área por lípido de cada um e calcular médias e variações temporais (Hofsass et al, 2003; Martins do Canto, 2007; Monné, 2010).

3.3.2. Parâmetros de Ordem (S_{cd})

O parâmetro de ordem (S_{cd}) é um parâmetro normalizado que indica o grau de ordenamento do sistema. Quanto mais próximo de 0 (zero) for o valor de S_{cd}, menor o alinhamento das cadeias alifáticas. Os lípidos numa bicamada fluida são altamente dinâmicos, sendo que ocorrem nas membranas lipídicas muitos movimentos em diferentes escalas temporais: rotação em torno de ligação química e isomerizações *trans/gauche*, rotação em torno do eixo lípidos, ondulação. Estes movimentos influenciam os parâmetros de ordem das cadeias de acilo, e a localização do xénon no núcleo hidrofóbico da bicamada tem efeitos substanciais na ordenação das cadeias acilo lipídicas. O tensor, parametro de ordem, S, é definido como:

$$S_{ab} = \left\langle \frac{3}{2} \cos^2(\theta_{ab}) - \delta_{ab} \right\rangle \quad a, b = x, y, z \quad \dots\dots\dots(11)$$

Onde θ_{ab} é o ângulo relativo entre o vetor de ligação e a normal à bicamada. Os parênteses denotam a média sobre as moléculas e o tempo de simulação e δ_{ab} é o delta de Kronecker. O parâmetro de ordem fornece uma medida quantitativa do alinhamento das caudas lipídicas. Nas nossas simulações utilizando um campo de forças de átomos unidos, o parâmetro de ordem para carbonos saturados e insaturados, é dado pelas seguintes relações:

$$S_{CD}^{sat} = \frac{2}{3} S_{xx} + \frac{1}{3} S_{yy} \quad \dots\dots\dots(12)$$

$$S_{CD}^{Unsat} = \frac{1}{4} S_{zz} + \frac{3}{4} S_{yy} + \frac{\sqrt{3}}{2} S_{xy}$$

Os valores de parâmetro S_{cd} podem situar-se entre 0,5 (o que corresponde a uma ordem completa ao longo da normal da bicamada) e -0,25

(que corresponde a uma ordem completa ao longo do plano da bicamada), enquanto $S_{cd}=0$ denota uma orientação isotrópica. Os parâmetros de ordem permitem-nos olhar para o interior da membrana e medir o seu estado: ordenado ou não. Podemos assim medir alterações provocadas pela interação com as moléculas de gases anestésicos como o xénon e ver de que forma o arranjo estrutural das bicamadas lipídicas as membranas celulares se alteram com a sua adição (Monné, 2010; Aittoniemi et al, 2007).

3.3.3. Densidade

É importante caracterizar a estrutura média da membrana em diferentes regiões ao longo do seu eixo normal, sendo provavelmente as ferramentas mais importantes para tal o perfil de densidades de vários átomos ou grupos atômicos. Os cálculos dos perfis de densidade são uma tarefa bastante simples: a ocorrência média dos átomos de interesse por configuração tem que ser contada em diferentes fatias laterais da membrana e dividida pelo volume da fatia. Para obter melhores estatísticas é aconselhado geralmente calcular a média dos perfis obtidos, para as duas camadas separadas, podendo estes fornecer informações sobre a eficiência de amostragem da estrutura de equilíbrio das camadas de membrana (Dickson et al, 2012; Robalo, 2013).

3.3.4. Pontes de Hidrogénio

Neste trabalho, as interações via pontes de Hidrogénio entre lípidos de membrana e solvente foram analisados em todos os sistemas. Foi utilizado um critério para decidir da existência ou não de cada ponte de hidrogénio. Os

critérios mais usados costumam envolver considerações energéticas ou geométricas. Neste caso, admite-se a existência de ponte de hidrogénio, para que um trio dador – H – aceitador, a distância dador – aceitador é inferior a 0,35 nm e o ângulo H – dador – aceitador é inferior a 30°.

$$\begin{aligned} r &\leq r_{HB} = 0,35 \text{ nm} \\ \alpha &\leq \alpha_{HB} = 30^\circ \end{aligned} \dots\dots\dots(13)$$

Para identificar os átomos de hidrogénio em cada ligação, podemos classificar em dois grupos: os hidrogénios ligados a oxigénio (ou outro átomo eletronegativo) e os que não estão ligados a átomos eletronegativos. Além disso, podemos classificar os outros átomos de acordo com o número total de ligações hidrogénio em que participam e também classificar as moléculas de acordo com o número total de ligações hidrogénio, ou seja, em geral, quanto maior o número de ligações de hidrogénio mais forte a interação. Em GROMACS é também possível estudar a própria dinâmica das ligações de hidrogénio, através da avaliação do seu tempo de vida. Assim, o tempo de vida das ligações de hidrogénio foi calculado a partir da média de todas as funções de autocorrelação de existência de todas as ligações de hidrogénio.

$$C(\tau) = \langle S_i(t) S_i(t + \tau) \rangle \dots\dots\dots(14)$$

Onde $S_i(t)$ é a função da existência de ligação de hidrogénio, os valores de $S_i(t)$ apenas de $S_i(t) = \{0;1\}$, em que o valor 0 equivalente à não existência e o 1 correspondendo à existência de ligação hidrogénio i no tempo t . No presente estudo, os tempos de vida da ligação de hidrogénio foram obtidos a partir da integração da função de autocorrelação definida acima:

$$\tau_{HB} = \int_0^{\infty} C(\tau) d\tau \dots\dots\dots(15)$$

Onde τ é a vida útil da ligação de hidrogénio e $C(\tau)$ é a função de autocorrelação (Hess, 2010; Martins do Canto, 2007).

3.3.5. Dinâmica Rotacional

A dinâmica rotacional foi estudada calculando os movimentos rotacionais dos eixos selecionados das moléculas de lípidos das membranas. Para tal, calculou-se a função autocorrelação rotacional dos eixos rotacionais relevantes.

$$C(t) = \langle P_2(\cos \theta(\zeta)) \rangle \dots\dots\dots(16)$$

Onde $\theta(\zeta)$ é o ângulo que o vetor que define determinado eixo faz entre os tempos ζ e $t+\zeta$, $P_2(x) = (3x^2 - 1)/2$ é o polinómio de Legendre de segunda ordem. A média foi feita em ζ o que assumindo uma trajetória suficientemente ergótica nos dá uma boa aproximação da média do ensemble (Lakowicz, 1999; Monné, 2010; Martins do Canto, 2007).

3.3.6. Difusão lateral das espécies em estudo

Uma propriedade dinâmica importante dos sistemas de bicamadas lipídicas é a difusão. Os coeficientes de difusão laterais podem ser calculados a partir de uma única trajetória de partículas através do deslocamento quadrático médio d-dimensional. A partir das trajetórias de dinâmica molecular, o deslocamento quadrático médio (MSD) das moléculas individuais foi medido primeiro e calculado pela fórmula de Einstein em duas dimensões:

$$D = \frac{1}{2d} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{dMSD(t)}{dt} \dots\dots\dots(17)$$

Sendo que, a determinação de MSD(t) é definida como:

$$MSD_{(t)} = \left\langle \left\| \vec{R}(t+t_0) - \vec{R}(t_0) \right\|^2 \right\rangle \dots\dots\dots(18)$$

Onde \vec{R} é o vetor posição do centro de massa da espécie em estudo e a média é calculada relativamente ao tempo com origem em t_0 . Com o intuito de eliminar o ruído devido a flutuações no centro de massa de cada monocamada (quando é relevante), as análises de MSD dos lípidos da membrana ou do xénon a interagir com as membranas, foram feitas com o centro de massa das membranas fixo (Martins do Canto, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sistema de DLPC, DPPC e DLPC/DPPC com Xénon

Para iniciar as simulações, os modelos das membranas foram construídos e solvatados com ferramentas do GROMACS (Van der Spoel & Lindahl, 2010). Assim foram contruídos modelos de membranas de DLPC (128 moléculas de DLPC e 3840 moléculas de água), DPPC (128 moléculas de DPPC e 3840 moléculas de água) e DLPC/DPPC (72 moléculas de DLPC, 72 moléculas de DPPC, 4320 moléculas de água). A partir de cada um destes três sistemas foram construídos sistemas aos quais foram adicionados 4 ou 8 Xe. Depois de construídas, as membranas (com ou sem Xe) foram simuladas durante 200 ns, com um passo de integração de 2 fs, à temperatura de 300 K e à pressão de 1 atm. O campo de força GROMOS96 53a6 foi usado para descrever todas as interações e comportamentos dos componentes de todos os sistemas.

4.1.1. Área por Lípido e Espessura da Membrana

A área por lípido é um parâmetro lentamente convergente nas simulações de dinâmica molecular, mas seu valor médio foi estável nos 100 ns finais da simulação, o que nos levou a concluir que os sistemas simulados haviam atingido um estado estacionário após 100 ns da simulação. Os valores da área por lípidos com diferentes concentrações de xénon estão na tabela em baixo:

Tabela 4: Os valores obtidos de área por lípidos e espessura da membrana

Lípidos	nXe	ApL/nm ²	Espessura/nm ²
DLPC	0	0.616 ± 0.010	3.14 ± 0.05
	4	0.607 ± 0.009	3.28 ± 0.05
	8	0.595 ± 0.010	3.47 ± 0.06
DPPC	0	0.520 ± 0.016	4.43 ± 0.10
	4	0.515 ± 0.013	4.58 ± 0.09
	8	0.521 ± 0.019	4.62 ± 0.15
DLPC/DPPC (1:1)	DLPC	0	3.72 ± 0.06
	DPPC		
	DLPC	4	3.72 ± 0.06
	DPPC		
	DLPC	8	3.84 ± 0.07
	DPPC		

Em todos os sistemas os valores da área por lípido se mantêm, aproximadamente, constante e dentro dos limites do desvio padrão o que é, também, visível nos gráficos de variação temporal destes parâmetros, que apresentam variações bastante sobrepostas (Fig. 3). A ver-se alguma tendência, para o DLPC, seria a de uma diminuição da área, indicadora de um efeito de condensação causado pela presença do Xe que não se verifica na membrana de DPPC. Isto pode ser causado pelo facto de que, enquanto que o DLPC se encontra numa fase fluida, o DPPC apresentar ApLípido próximas de uma fase gel (0.48-0.49 nm²). Apesar de, para a concentração mais baixa de Xe, a ApDPPC baixar, volta a subir para a concentração mais alta de Xe para valores praticamente sobreponíveis aos do sistema sem Xe.

A espessura de membrana parece ser um parâmetro mais sensível e melhor comportado à presença do Xe, apresentando em todos os sistemas um aumento tendencial, com a concentração do Xe indicador de um efeito de condensação provocado pelo Xe no core hidrofóbico da membrana, mas, aparentemente com pouca relevância na superfície da membrana.

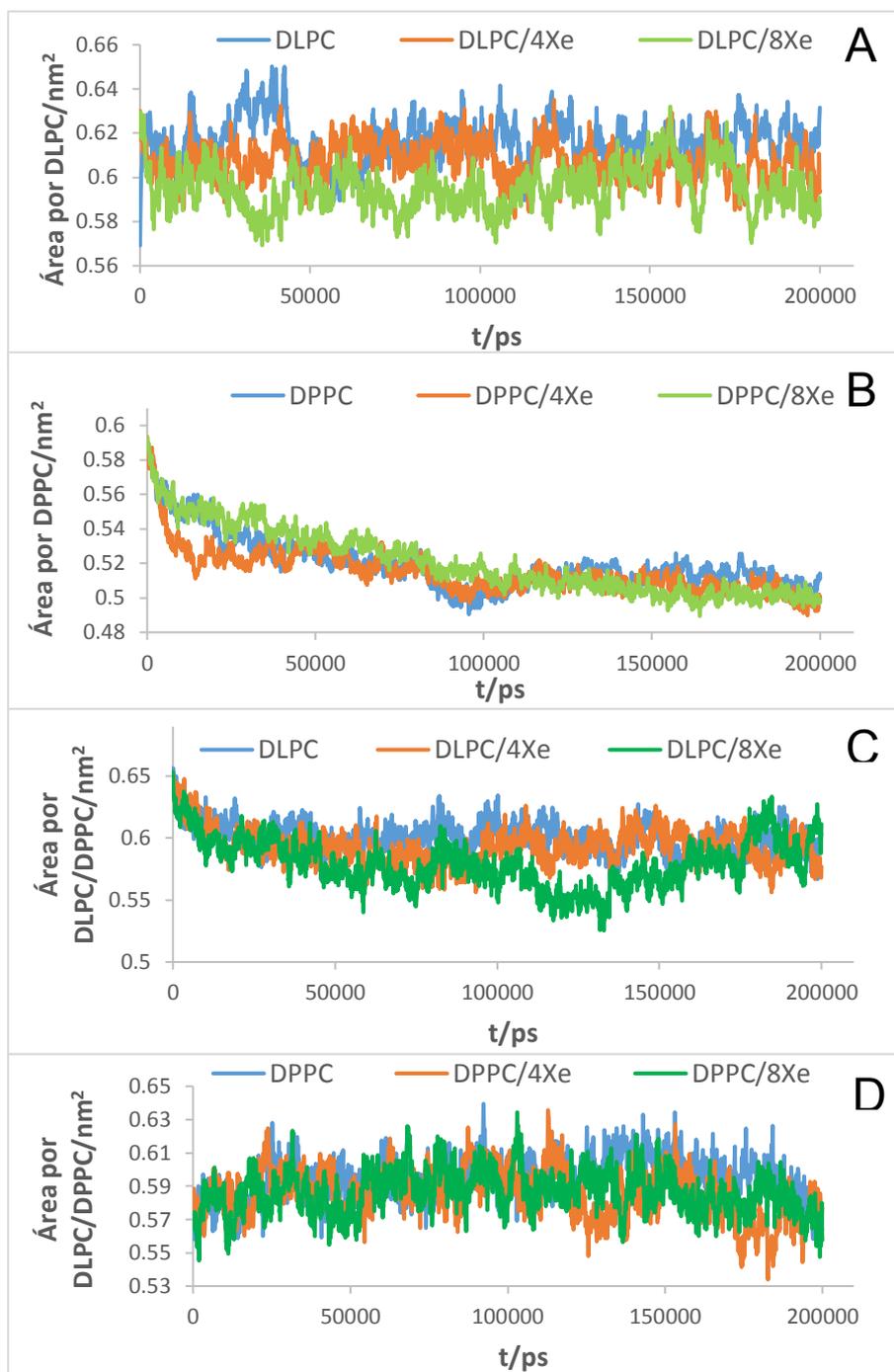


Figura 3: Área por lípidos de DLPC, DPPC e DLPC/DPPC.

4.1.2. Parâmetro de Ordem ($-S_{CD}$)

A tabela 5 mostra as médias dos parâmetros de ordem dos carbonos das cadeias acilo *sn-1* e *sn-2* de cada lípido e de cada sistema, com ou sem Xe.

Tabela 5: Os valores de parâmetro de ordem de $sn-1$ e $sn-2$

Sistemas/Lípidos	nXe	$-S_{CD}$		
		$sn-1$	$sn-2$	
DLPC	0	0.166 ± 0.027	0.161 ± 0.033	
	4	0.175 ± 0.025	0.166 ± 0.028	
	8	0.177 ± 0.023	0.172 ± 0.026	
DPPC	0	0.294 ± 0.033	0.296 ± 0.033	
	4	0.313 ± 0.043	0.305 ± 0.036	
	8	0.307 ± 0.039	0.320 ± 0.040	
DLPC/DPPC (1:1)	DLPC	0	0.190 ± 0.028	0.188 ± 0.025
		4	0.196 ± 0.027	0.194 ± 0.022
		8	0.198 ± 0.026	0.198 ± 0.021
	DPPC	0	0.152 ± 0.042	0.151 ± 0.046
		4	0.176 ± 0.037	0.177 ± 0.047
		8	0.192 ± 0.038	0.189 ± 0.047

Por observação dos resultados da tabela 5, e como sugerido atrás, os dois lípidos estão em estados diferentes sendo o DLPC mais fluido que o DPPC nas membranas puras e o reverso nas membranas de dois componentes. O efeito do Xe é consistente em todos estes sistemas: provoca um efeito de condensação/ordenação que é dependente da concentração.

4.1.2.1. O parâmetro de ordem de DLPC, DLPC/4Xe e DLPC/08Xe

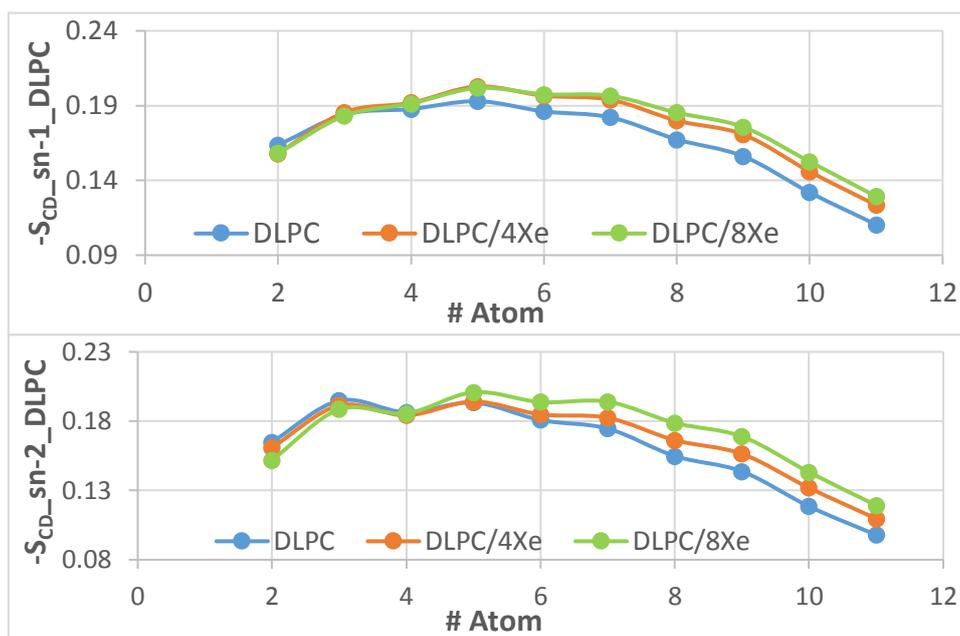


Figura 4: Parâmetros de ordem de $-sn-1$ e $-sn-2$.

A Fig. 4 mostra os parâmetros de ordem ($-S_{CD}$) ao longo das cadeias $sn-1$ e $sn-2$ nos sistemas DLPC, DLPC/4Xe, DLPC/8Xe. Na bicamada DLPC/4Xe e DLPC/8Xe, a presença de xénon geralmente evoca um aumento (tabela 5) no valor dos parâmetros de ordem dos átomos de C da cadeia acilo, em ambas as cadeias, sendo este aumento mais significativo quanto mais afastado está o C da interface, ou seja, quanto mais próximo está o C dos Xe que se encontram (ver cap. 4.1.4). Este aumento também é tanto maior quanto maior a concentração de Xe.

4.1.2.2. O parâmetro de ordem de DPPC, DPPC/4Xe e DPPC/8Xe

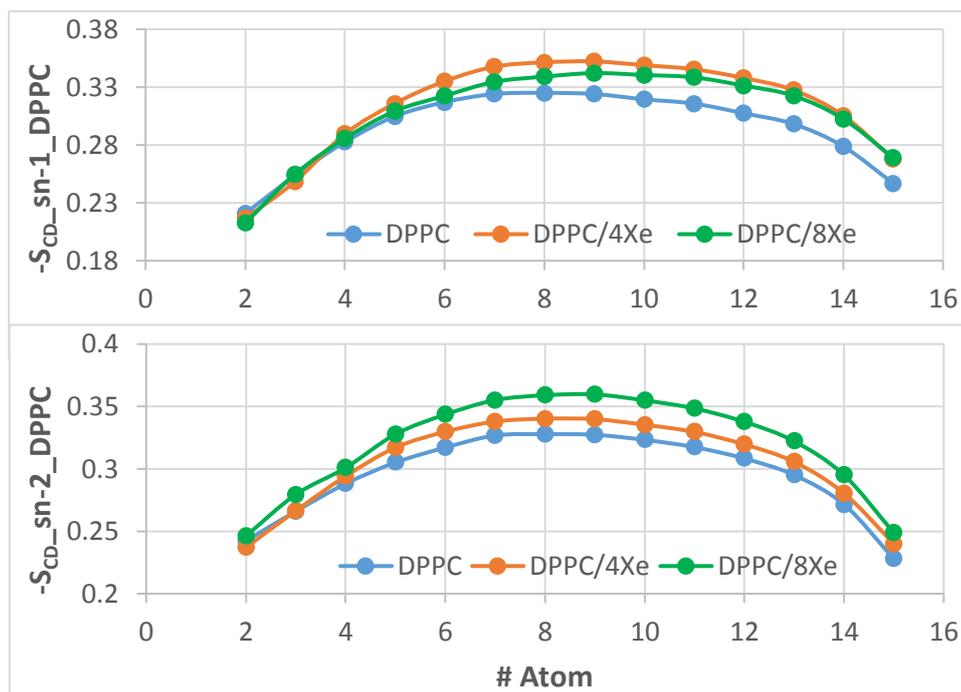


Figura 5: Parâmetros de ordem de $-sn-1$ e $-sn-2$

A Fig. 5 mostra os parâmetros de ordem ($-S_{CD}$) ao longo das cadeias $sn-1$ e $sn-2$ nos sistemas DPPC, DPPC/4Xe, DPPC/8Xe. Na bicamada DLPC/4Xe e DLPC/8Xe, a presença de xénon geralmente evoca um aumento (tabela 5) no valor dos parâmetros de ordem dos átomos de C da cadeia acilo, em ambas as cadeias, sendo este aumento mais significativo quanto mais afastado está o C da interface, ou seja, quanto mais próximo está o C dos Xe que se encontram (ver cap. 4.1.4), como no caso anterior. Também como no caso anterior, o aumento nos valores dos parâmetros de ordem é tanto maior quanto maior a concentração de Xe.

4.1.3. O parâmetro de ordem de DLPC/DPPC, DLPC/DPPC/4Xe e DLPC/DPPC/8Xe

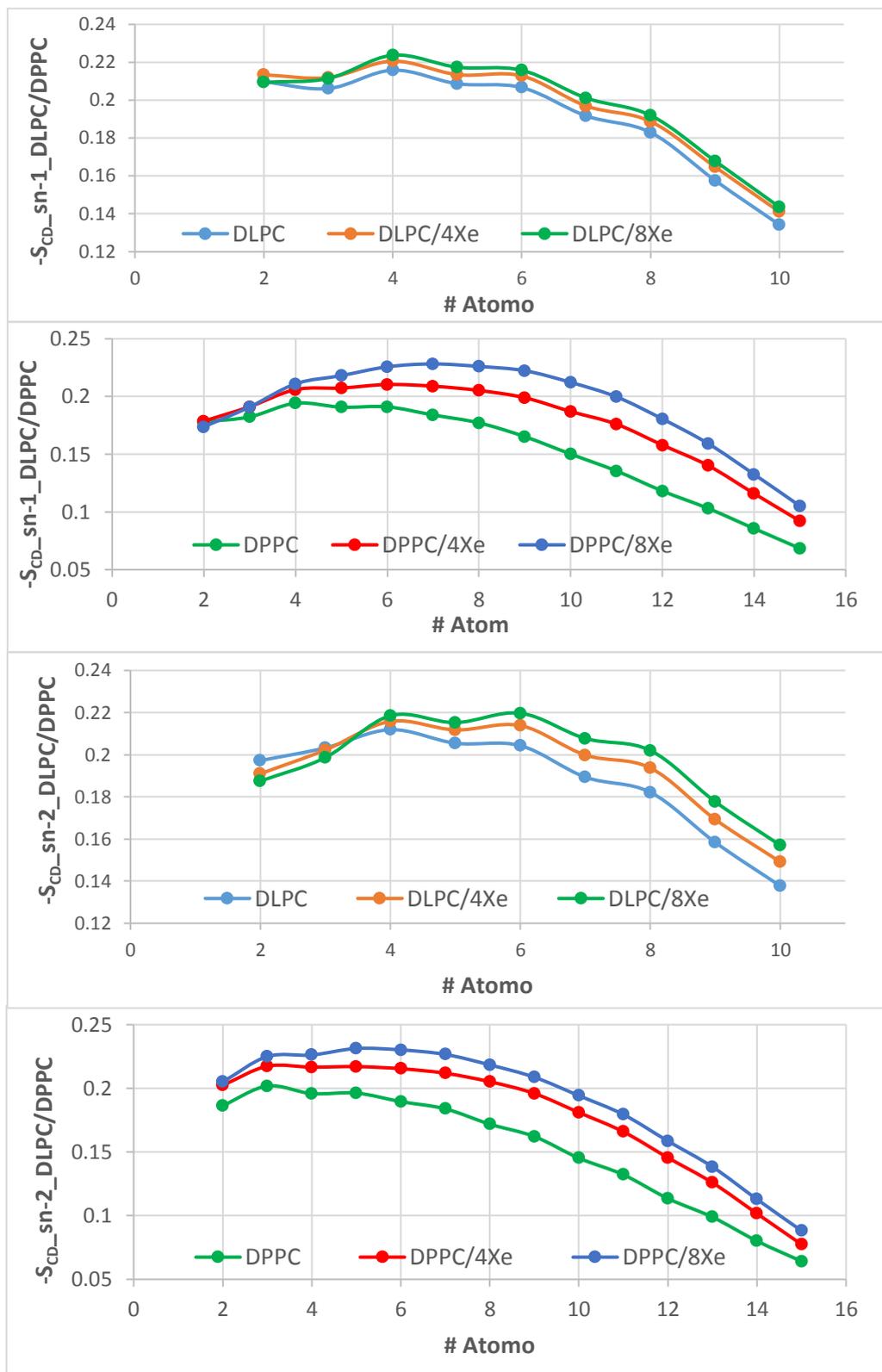


Figura 6: Parâmetros de ordem de $-sn-1$ e $-sn-2$

A Fig. 6 mostra os parâmetros de ordem ($-S_{CD}$) ao longo das cadeias sn-1 e sn-2 nos sistemas DPPC/DLPC, DPPC/DLPC/4Xe, DPPC/DLPC//8Xe. A presença de xénon evoca um aumento (Tabela 5) no valor dos parâmetros de ordem dos átomos de C da cadeia acilo, em ambas as cadeias, sendo este aumento mais significativo quanto mais afastado está o C da interface, ou seja, quanto mais próximo está o C dos Xe que se encontram (ver cap. 4.1.4), como nos casos anteriores. O aumento nos valores dos parâmetros de ordem é, também aqui, tanto maior quanto maior a concentração de Xe e tem uma grandeza maior para o DPPC o que sugere uma interação mais próxima entre este lípido e o Xe.

4.1.4. Densidade dos sistemas

4.1.4.1. Densidade de DLPC, DLPC/4Xe e DLPC/8Xe

A Fig. 7 mostra as densidades de massa de cada componente dos sistemas de DLPC, DLPC/4Xe e DLPC/8Xe. A densidade de massa foi calculada para as moléculas presentes em cada sistema em estudo (média dos últimos 100 ns da simulação) ao longo da normal ao plano da membrana como mostrado na Fig. 7.

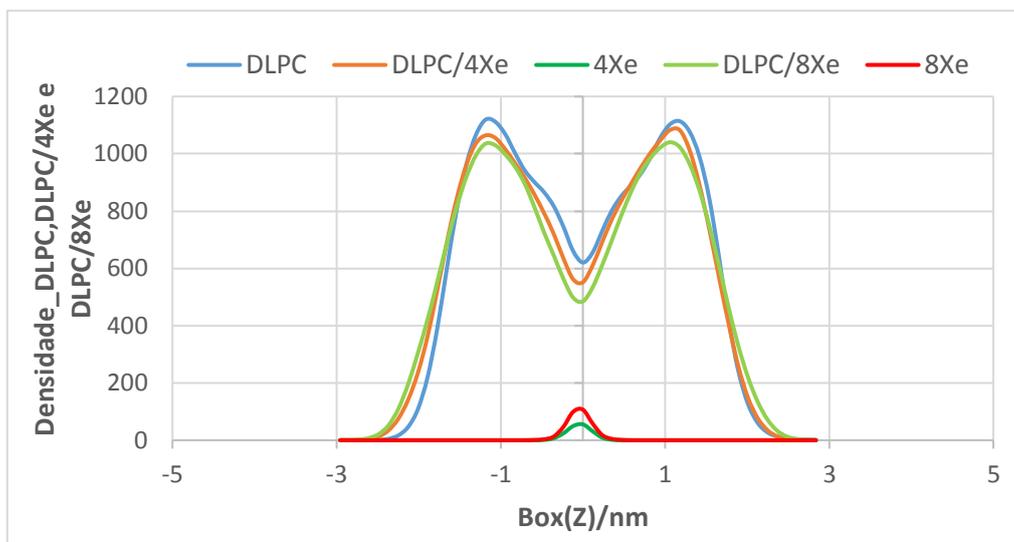


Figura 7: Densidade de DLPC,DLPC/4Xe e DLPC/8Xe

O perfil de densidade destas membranas que contêm Xe está alterado. A densidade do lípido está diminuída na interface membrana-água e no core hidrofóbico onde se localiza o Xe. Estas diferenças estão de acordo com o aumento da espessura de membrana e aumento dos parâmetros de ordem sugerindo que o Xe provoca um efeito de condensação dependente da concentração.

4.1.4.2. Densidade de DPPC, DPPC/4Xe e DPPC/8Xe

A fig. 8 mostra as densidades massa de cada sistema de DPPC, DPPC/4Xe e DPPC/8Xe. A densidade de massa foi calculada dos últimos 100 ns em cada sistema do seu estudo ao longo da normal ao plano da membrana como mostrado na Fig. 8.

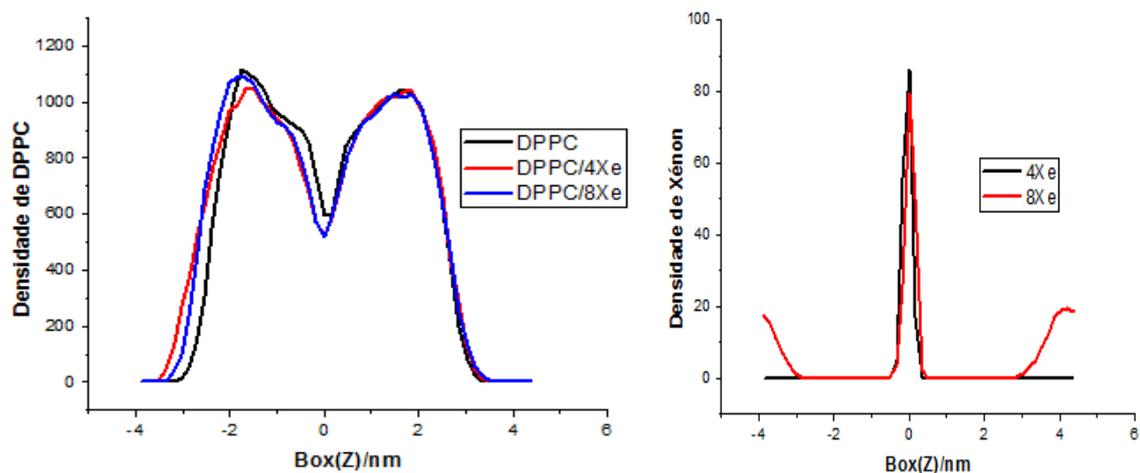


Figura 8: Densidade de DPPC, DPPC/4Xe e DPPC/8Xe

O perfil de densidade destas membranas que contêm Xe está alterado. A densidade do lípido está diminuída na interface membrana-água e no core hidrofóbico onde se localiza o Xe. Estas diferenças estão de acordo com o aumento da espessura de membrana e aumento dos parâmetros de ordem sugerindo que o Xe provoca um efeito de condensação dependente da concentração.

4.1.4.3. Densidade de DLPC/DPPC, DLPC/DPPC/4Xe e DLPC/DPPC/8Xe

A fig. 9 mostra a densidade massa de cada componente nos sistemas de DLPC/DPPC, DLPC/DPPC/4Xe e DLPC/DPPC/8Xe. Deste sistema foi simulado dos últimos 100 ns do seu estudo ao longo da normal da membrana.

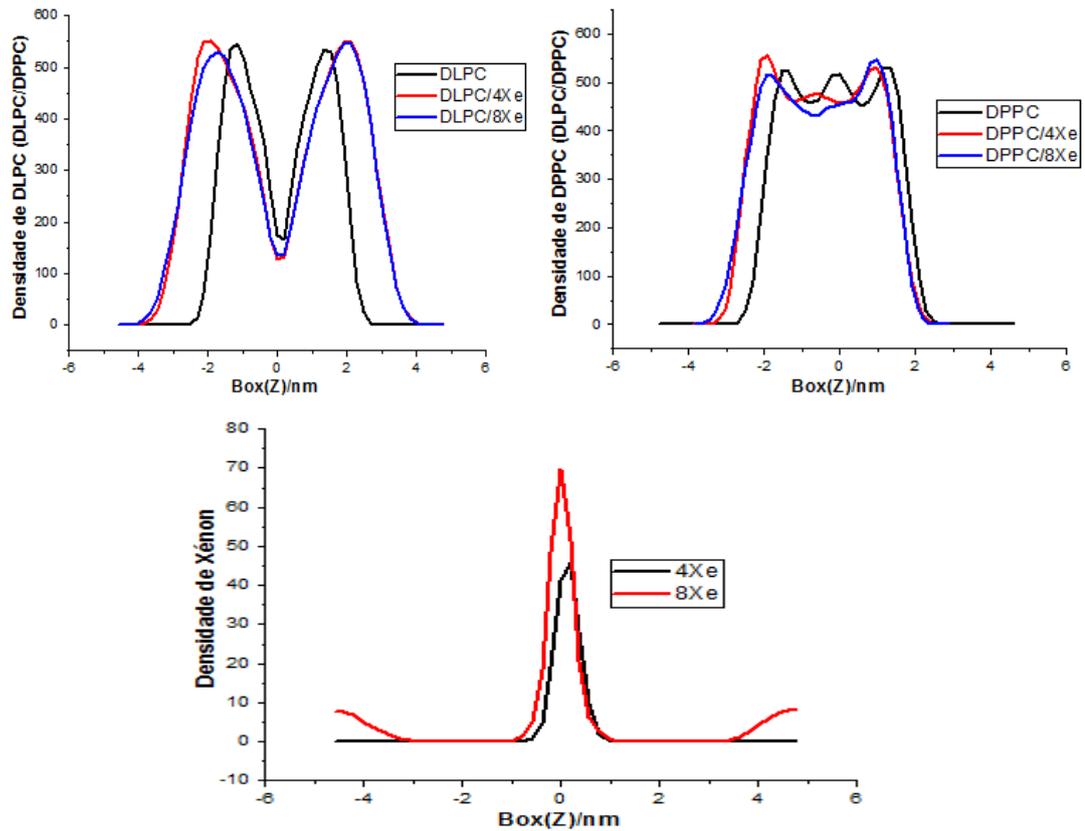


Figura 9: Densidade de DLPC/DPPC, DLPC/DPPC/4Xe e DLPC/DPPC/8Xe

O perfil de densidade destas membranas que contêm Xe está alterado. A densidade do lípido está diminuída na interface membrana-água e no core hidrofóbico onde se localiza o Xe. Estas diferenças estão de acordo com o aumento da espessura de membrana e aumento dos parâmetros de ordem sugerindo que o Xe provoca um efeito de condensação dependente da concentração.

4.1.5. Pontes de Hidrogénio

4.1.5.1. Pontes de Hidrogénio de DLPC, DLPC/4Xe e DLPC/8Xe

A Tabela 6 apresenta a média do numero de pontes de hidrogénio que os componentes de cada sistema fazem.

Tabela 6: Os Valores de Pontos de Hidrogénio

Sistema	nXe	numHB	
		DLPC-Sol	DPPC-Sol
DLPC	0	6.28 ± 0.15	
	4	6.29 ± 0.15	
	8	6.32 ± 0.17	
DPPC	0		5.72 ± 0.14
	4		5.90 ± 0.15
	8		5.82 ± 0.20
DLPC/DPPC (1:1)	0	6.08 ± 0.17	6.18 ± 0.17
	4	6.06 ± 0.18	6.15 ± 0.19
	8	6.08 ± 0.18	6.17 ± 0.18

Nas membranas puras o DLPC faz mais pontes de H com o solvente do que o DPPC. Isto pode ser devido ao facto da membrana de DLPC ser mais fluida e assim mais permeável e mais acessível à água, permitindo um numero superior de pontes de H.

Na membrana de DLPC/DPPC, o DLPC faz menos pontes de H do que quando na membrana pura o que pode ser devido a uma maior rigidez, anteriormente sugerida pelos -Scd. Nesta membrana o DPPC, menos ordenado do que na membrana pura, aparenta um comportamento semelhante ao DLPC puro, i.e., maior fluidez e maior acessibilidade ao solvente, logo, maior numero de pontes de H.

Em todos os casos o Xe aparenta não ter efeito sobre o num de pontes de H, o que sugere um efeito restrito ao core hidrofóbico da membrana que não condiciona grandemente a interface, pelo menos neste parâmetro.

4.1.6. Dinâmica de Rotacional

Foi avaliada a dinâmica de rotacional de eixos selecionados: os eixos sn-1 e sn-2 (definidos entre os 2º e penúltimos carbonos acilo de cada cadeia) e o eixo P-N (definido entre o P do fosfato e o N da colina). Para tal, e como explicado anteriormente, foram calculadas as funções de autocorrelação dos movimentos rotacionais de cada um destes eixos para os últimos 100 ns das simulações (Fig. 10 e 11). Para facilitar a análise deste conjunto grande de curvas/resultados, calcularam-se as médias dos valores de $C(t)$ para cada eixo (Tabela 6), o que nos dá informação extra e auxilia a interpretação das curvas.

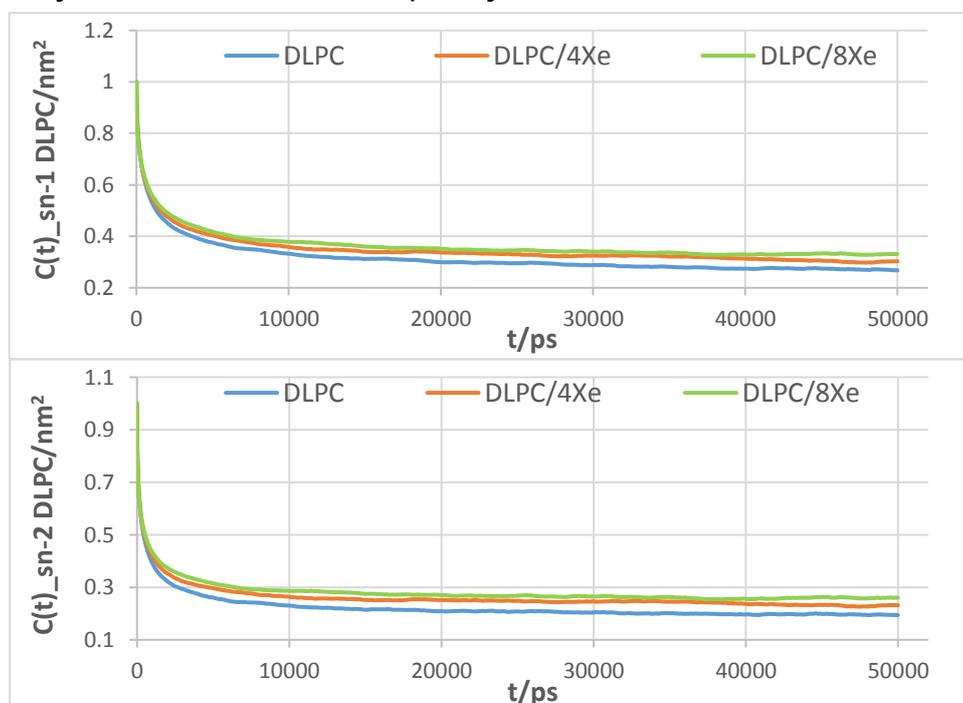


Figura 10: A dinâmica de rotacional de sn-1 e sn-2 de DLPC

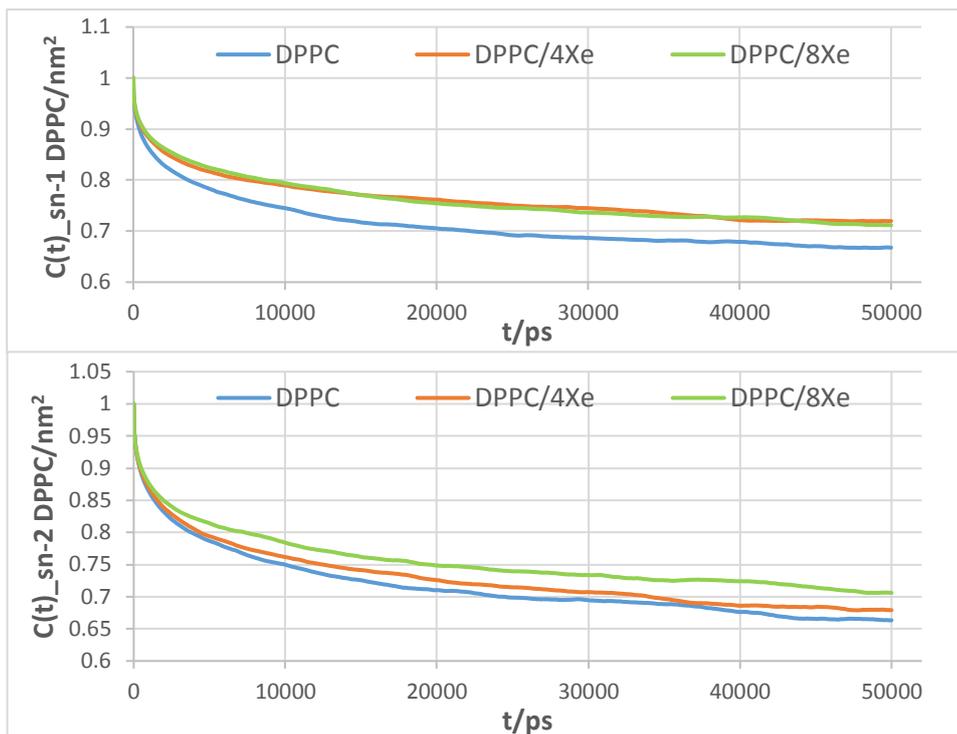


Figura 11: A dinâmica de rotacional de sn-1 e sn-2 de DPPC

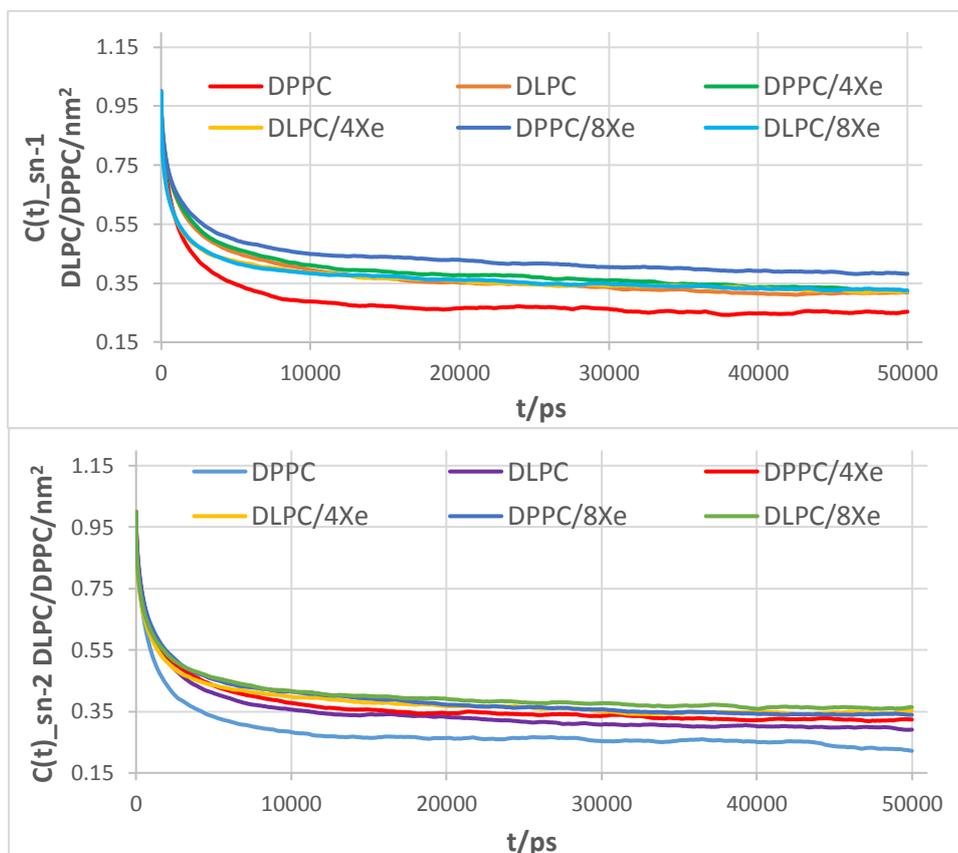


Figura 12: A dinâmica de rotacional de sn-1 e sn-2 de DLPC/DPPC

Nos sistemas de DLPC a presença de Xe vai dificultar os movimentos de rotação no core hidrofóbico o que é patente tanto pelas curvas de $C(t)$ dos eixos sn-1 e sn-2 (Fig. 10), como pelas médias (Tabela 7). Efeito este que mais uma vez enfatiza o efeito condensador que o Xe está a ter nestas concentrações e com estas membranas. Este efeito também é observado nas membranas de DPPC como nas membranas de DPPC/DLPC, que apesar de estarem já num estado mais ordenado, sofrem também deste efeito de condensação (Fig. 12 e Tabela 7).

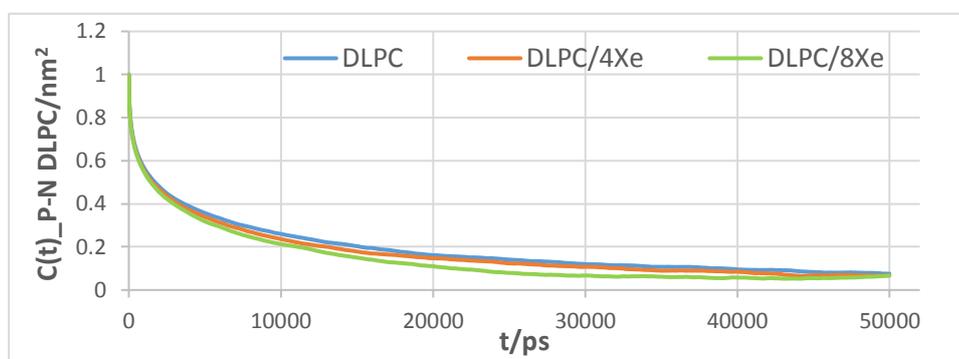


Figura 13: A dinâmica de rotacional de P-N de DLPC

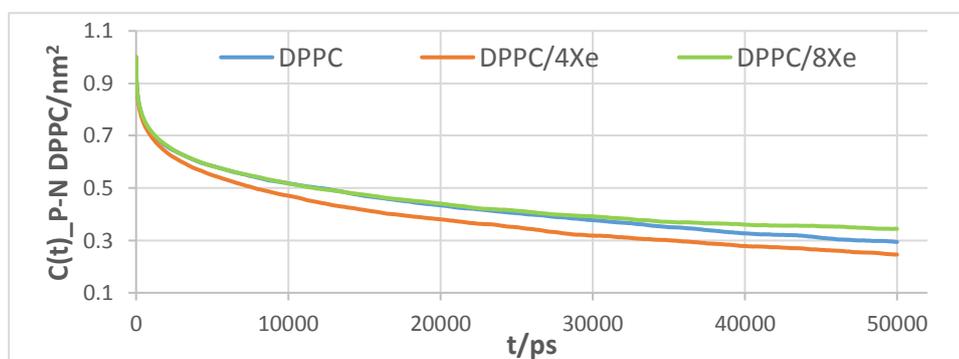


Figura 14: A dinâmica de rotacional de P-N de DPPC

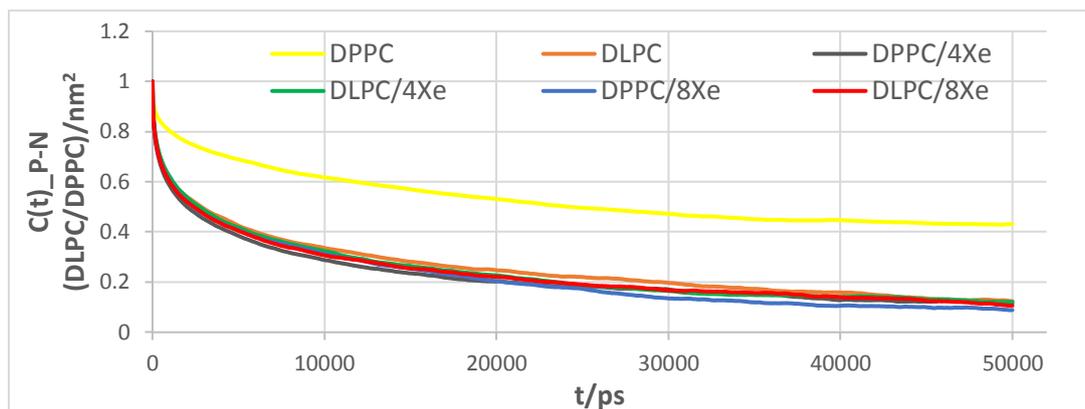


Figura 15: A dinâmica de rotacional de P-N de DLPC/DPPC

Nos sistemas de bicamadas DLPC, DPPC, a interação o Xe com as membranas do modelo não altera significativamente a dinâmica rotacional do eixo P-N (Fig.13 e 14), uma vez que os $C(t)$ são praticamente sobreponíveis e as médias estão dentro dos limites do desvio padrão. Na membrana de DPPC/DLPC não se pode dizer o mesmo pois aqui observa-se um aumento da dinâmica deste eixo, sendo este efeito mais significativo no DPPC (Fig. 11 e Tabela 7) do que no DLPC onde a diminuição observada se encontra dentro dos limites dos desvios padrão.

Tabela 7: Dinâmica de Rotacional dos Lípidos de sn-1, sn-2 e P-N

Lípidos	nXe	C(t)			
		sn-1	sn-2	P-N	
DLPC	0	0.135 ± 0.067	0.223 ± 0.055	0.187 ± 0.125	
	4	0.347 ± 0.062	0.261 ± 0.051	0.170 ± 0.125	
	8	0.365 ± 0.060	0.282 ± 0.049	0.143 ± 0.130	
DPPC	0	0.713 ± 0.050	0.716 ± 0.050	0.429 ± 0.110	
	4	0.762 ± 0.042	0.729 ± 0.048	0.381 ± 0.117	
	8	0.760 ± 0.045	0.754 ± 0.042	0.444 ± 0.099	
DLPC/DPPC (1:1)	DPPC	0	0.287 ± 0.077	0.281 ± 0.074	0.533 ± 0.103
		4	0.389 ± 0.076	0.365 ± 0.073	0.222 ± 0.119
		8	0.434 ± 0.066	0.388 ± 0.071	0.217 ± 0.123
	DLPC	0	0.369 ± 0.080	0.343 ± 0.077	0.255 ± 0.125
		4	0.367 ± 0.061	0.381 ± 0.061	0.239 ± 0.129
		8	0.369 ± 0.060	0.401 ± 0.061	0.234 ± 0.123

4.1.7. Difusão Lateral

Difusão lateral são os coeficientes que foram calculados a partir do deslocamento quadrático médio bidimensional. Os resultados da simulação estão nos seguintes tabela:

Tabela 8: Difusão Lateral de Rotacional dos Lípidos

Sistema	nXe	$D_{lat}/10^{-8}cm^2s^{-1}$		
		DLPC	DPPC	Xe
DLPC	0	3.40 ± 0.01		
	4	3.47 ± 0.01		47.23 ± 0.96
	8	3.63 ± 0.01		129.02 ± 3.08
DPPC	0		0.81 ± 0.01	
	4		0.71 ± 0.01	16.55 ± 0.15
	8		0.67 ± 0.01	95.40 ± 1.41
DLPC/DPPC (1:1)	0	2.43±0.01	2.82±0.01	
	4	2.45±0.01	2.29±0.01	57.74 ± 1.13
	8	2.47±0.01	2.43±0.01	282.50 ± 1.79

Na tabela 8 mostra, que o efeito da presença do Xe é o de induzir um aumento no coeficiente de difusão no DLPC e uma diminuição no DPPC, mas que esse efeito é pouco significativo. Apesar de estar a induzir um aumento de ordem em todas estas membranas, o DLPC parece estar a ser perturbado pelo Xe de forma a difundir-se mais na presença de Xe. O DPPC, mais ordenado e de maior dimensão, não sofre deste efeito e difunde menos na presença de Xe. Por seu lado o Xe difunde muito mais que os lípidos, devido às suas pequenas dimensões e apesar de se encontrar em concentração baixa evoca, ainda assim efeitos mensuráveis nestas membranas.

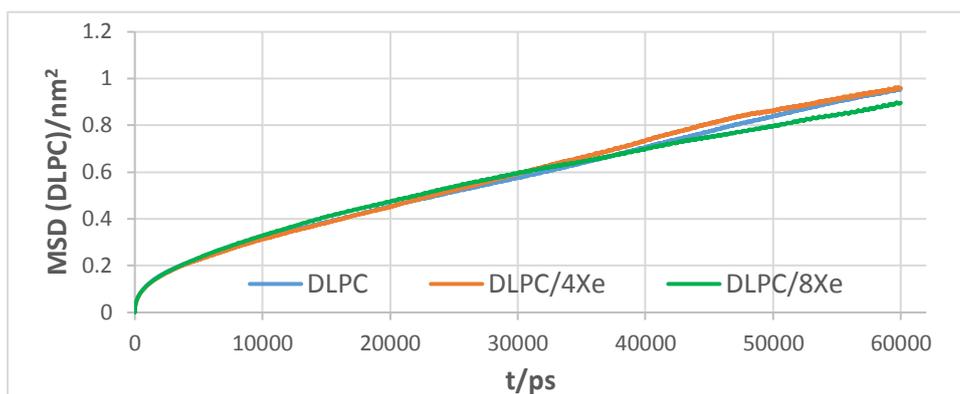


Figura 16: Difusão lateral de DLPC

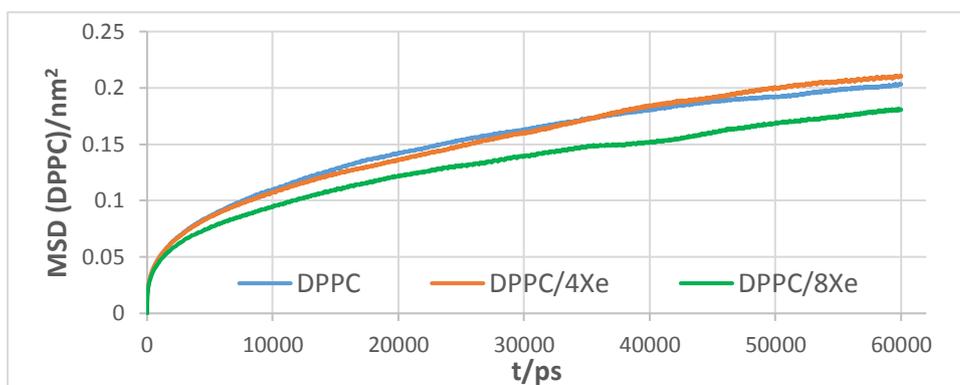


Figura 17: Difusão lateral de DPPC

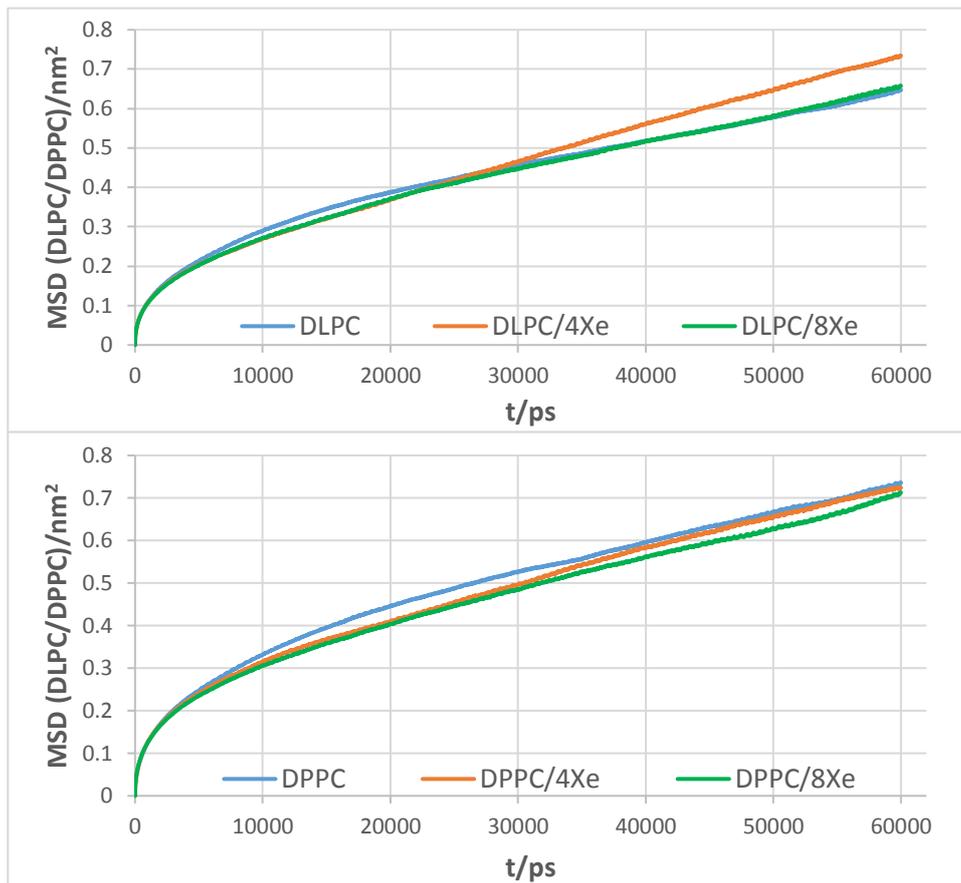


Figura 18: Difusão lateral de DLPC/DPPC

Os gráficos dos MSDs de todos os lípidos em todos os sistemas, reforçam a observação dos coeficientes de difusão mostrando a similitude de comportamento dos diferentes sistemas com a presença de Xe.

4.2. Sistema de DOPC, SM e DOPC/SM/Chol com Xénon

Para iniciar as simulações, os modelos das membranas foram construídos e solvatados com ferramentas do GROMACS (Van der Spoel & Lindahl, 2010). Assim foram contruídos modelos de membranas de DOPC (128 moléculas de DOPC e 3840 moléculas de água), SM (144 moléculas de SM e 4320 moléculas de água) e DOPC/SM/Chol (64 moléculas de DOPC, 64 moléculas de SM, 32 moléculas de Chol e 3840 moléculas de água). A partir de cada um destes três

sistemas foram construídos sistemas aos quais foram adicionados 4 ou 8 Xe. Depois de construídas, as membranas (com ou sem Xe) foram simuladas durante 200 ns, com um passo de integração de 2 fs, à temperatura de 300 K e à pressão de 1 atm. O campo de força GROMOS96 53a6 foi usado para descrever todas as interações e comportamentos dos componentes de todos os sistemas.

4.2.1. Área por Lípido e Espessura da Membrana

Nas simulações de dinâmica molecular, a área por lípido é um parâmetro lentamente convergente, mas o seu valor foi estável nos 100 ns finais da simulação, foi concluído os sistemas simulados haviam atingido um estado estacionário após 100 ns da simulação. Os valores da área por lípidos com diferentes concentrações de xénon estão na seguinte tabela:

Tabela 9: Os valores de área por lípidos e espessura da membrana

Lípidos	nXe	ApL/nm ²	Espessura/nm ²
DOPC	0	0.591 ± 0.009	4.28 ± 0.06
	4	0.582 ± 0.009	4.46 ± 0.06
	8	0.581 ± 0.009	4.57 ± 0.07
SM	0	0.447 ± 0.013	4.98 ± 0.10
	4	0.448 ± 0.015	5.09 ± 0.12
	8	0.447 ± 0.014	5.21 ± 0.11
DOPC/SM/Chol (2:2:1)	DOPC	0	0.502 ± 0.016
	SM	0	0.451 ± 0.016
	Chol	0	0.095 ± 0.006
	DOPC	4	0.499 ± 0.013
	SM	4	0.457 ± 0.013
	Chol	4	0.175 ± 0.011
	DOPC	8	0.498 ± 0.017
	SM	8	0.468 ± 0.013
	Chol	8	0.362 ± 0.021

A Tabela 9 mostra que, com a exceção do Chol na membrana de DOPC/SM/Chol, todos os lípidos mantêm ApLípido aproximadamente constantes e dentro dos limites do desvio padrão. O Chol, no entanto, parece bastante influenciado pela presença do Xe no core hidrófóbico da membrana que, vai provocar uma exposição crescente do Chol ao solvente, sendo este efeito proporcional à concentração de Xe no sistema.

A espessura de membrana do sistema de DOPC sofre um aumento com a presença de Xe, efeito esse que também é observado na membrana de SM. Estas membranas apesar de apresentarem alguma ordem (ApLípido baixas) ainda têm latitude para sofrerem condensação provocada pelo Xe, como atrás. No entanto o sistema de DOPC/SM/Chol é bastante rígido e a presença do Xe tem aqui o efeito contrário, o de fluidização da membrana o que é sugerido pela diminuição da espessura de membrana.

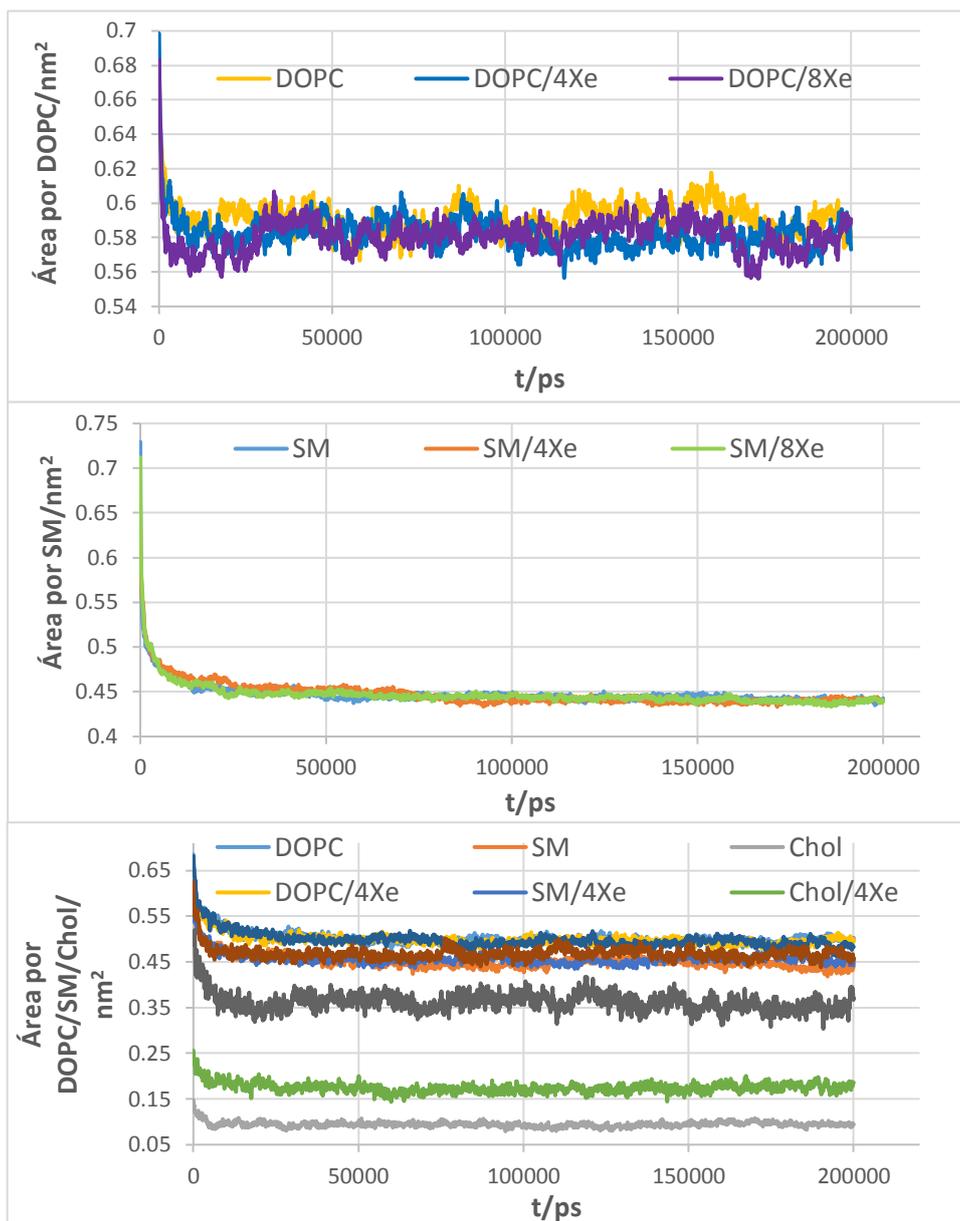


Figura 19: Área por Lípidos de DOPC, SM e DOPC/SM/Chol

4.2.2. Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$)

A tabela 10 mostra, as médias dos parâmetros de ordem dos carbonos das cadeias acilo *sn-1* e *sn-2* de cada lípido e de cada sistema, com ou sem Xe.

Por observação dos resultados da tabela 7, e como sugerido atrás, os dois lípidos estão em estados diferentes sendo o DOPC mais fluido que o SM tanto

nas membranas puras como nas membranas de três componentes. O efeito do Xe apesar de mínimo é o de, principalmente nas membranas mais ordenadas, de causar alguma perturbação e, conseqüente, diminuição dos parâmetros de ordem (principalmente para as concentrações mais elevadas de Xe).

Tabela 10: Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$) *sn-1* e *sn-2*

Sistemas	nXe	$-S_{CD}$		
		<i>sn-1</i>	<i>sn-2</i>	
DOPC	0	0.175 ± 0.049	0.173 ± 0.053	
	4	0.185 ± 0.047	0.189 ± 0.052	
	8	0.184 ± 0.048	0.185 ± 0.051	
SM	0	0.353 ± 0.033	0.343 ± 0.092	
	4	0.356 ± 0.031	0.348 ± 0.093	
	8	0.353 ± 0.028	0.337 ± 0.091	
DOPC/SM/Chol (2:2:1)	DOPC	0	0.328 ± 0.077	0.330 ± 0.078
		4	0.326 ± 0.077	0.331 ± 0.078
		8	0.316 ± 0.072	0.326 ± 0.079
	SM	0	0.399 ± 0.037	0.371 ± 0.104
		4	0.402 ± 0.039	0.371 ± 0.103
		8	0.388 ± 0.035	0.361 ± 0.102

Na tabela acima mostrou que, o valor de parâmetro de ordem de DOPC *sn-1,2* foi aumentado na DOPC e DOPC/4Xe, mas na DOPC/8Xe o valor foi diminuído. O valor *sn-1,2* de DOPC compara com DOPC (DOPC/SM/Chol) são os valores diminuído nos oito xénons, a cadeia de acilo na membrana foi desordenado porque o xénon foi absorve na dentro membrana e a alteração de estrutura membrana celulares. Os seguintes gráficos de parâmetros de ordem de *sn-1* e *sn-2* de DOPC e SM.

Na figura 15 mostra, os parâmetros de ordem ($-S_{CD}$) ao longo das cadeias *sn-1* e *sn-2* nos sistemas DOPC, SM e DOPC/SM/Chol. Como já referido atrás, nas membranas mais fluidas de DOPC, a presença de Xe evoca um efeito de condensação semelhante ao observado atrás para o DLPC, p.e., sendo esse

efeito mais significativo quanto mais nos aproximamos do centro da membrana. Nas membranas mais rígidas de SM e DOPC/SM/Chol observa-se o efeito contrário, i.e., uma perda de ordem causada pela perturbação que o Xe provoca nestas membranas já de si bastante ordenadas.

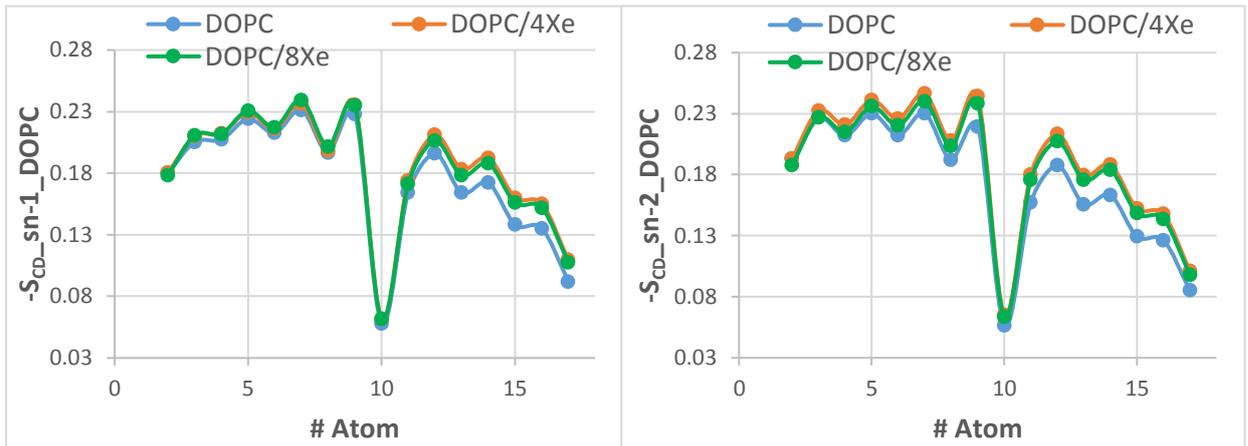


Figura 20: Parâmetro de Ordem sn-1 e sn-2 de DOPC

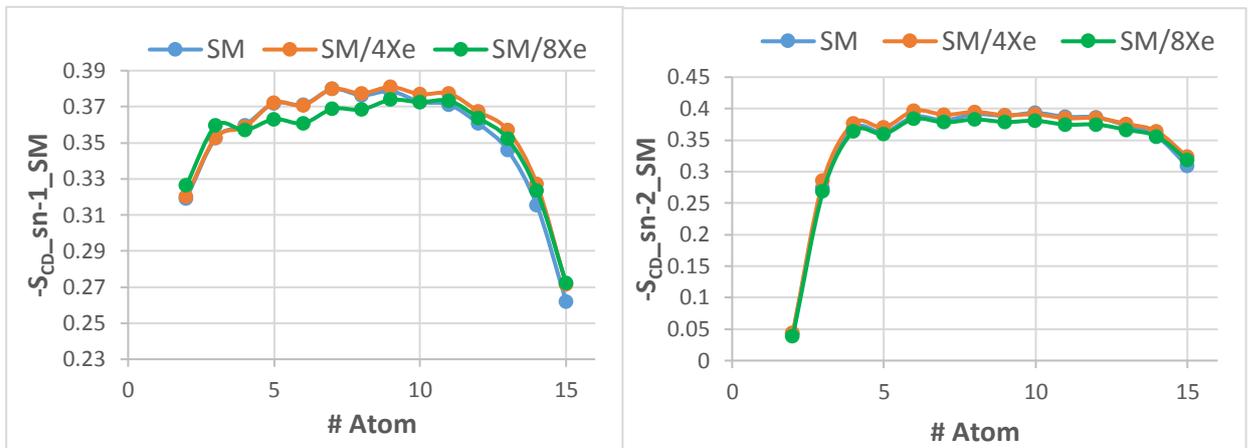
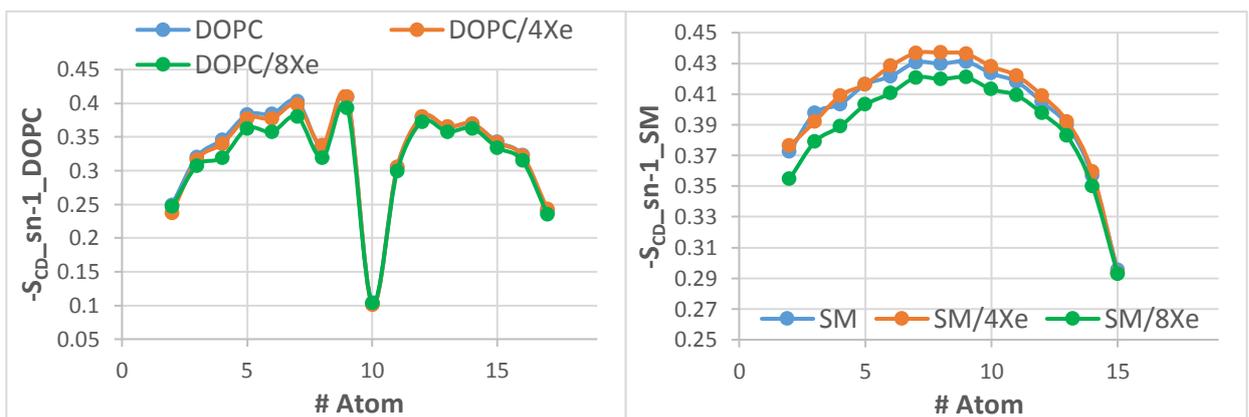


Figura 21: Parâmetro de Ordem sn-1 e sn-2 de SM



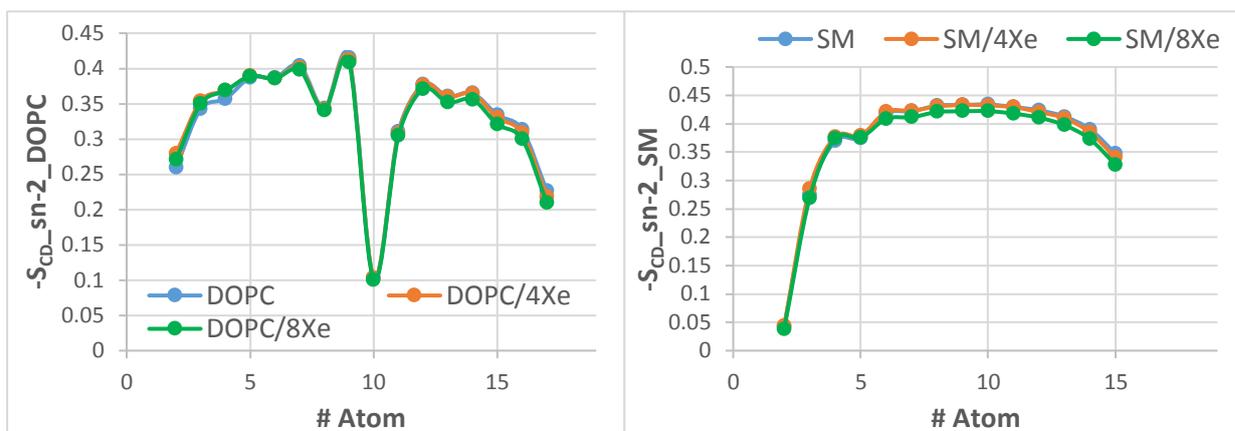


Figura 22: Parâmetro de Ordem sn-1 e sn-2 de DOPC/SM

4.2.3. Densidade dos Lípidos

4.2.3.1. Densidade de DOPC, DOPC/4Xe e DOPC/8Xe

A Fig. 23 mostra as densidades de massa de cada componente dos sistemas de DOPC, DOPC/4Xe e DOPC/8Xe. A densidade de massa foi calculada para as moléculas presentes em cada sistema em estudo (média dos últimos 100 ns da simulação) ao longo da normal ao plano da membrana como mostrado na Fig. 23.

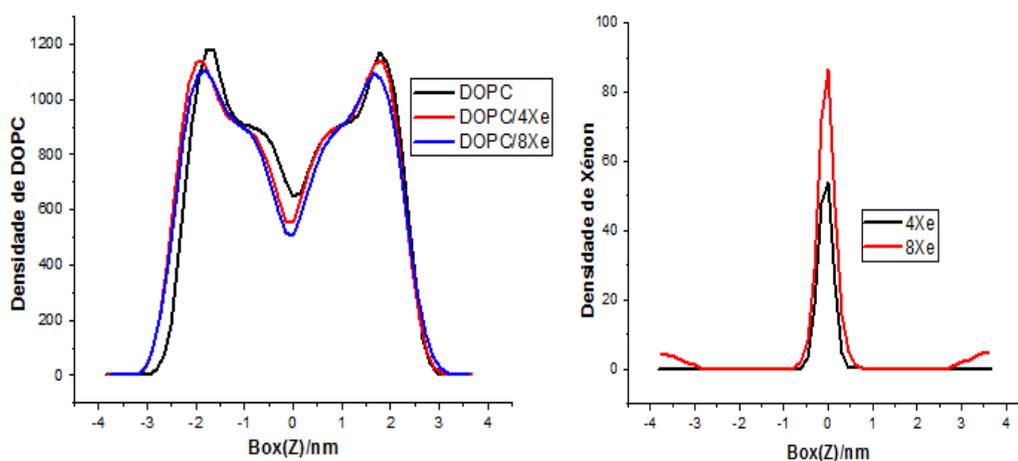


Figura 23: Densidade de DOPC, DOPC/4Xe e DOPC/8Xe

O perfil de densidade destas membranas que contêm Xe está alterado. A densidade do lípido está diminuída na interface membrana-água. Estas diferenças estão de acordo com o pequeno aumento da espessura de membrana e aumento dos parâmetros de ordem sugerindo que o Xe provoca um efeito de condensação dependente da concentração.

4.2.3.2. Densidade de SM, SM/4Xe e SM/8Xe

A fig. 24 mostra as densidades massa de cada sistema de SM, SM/4Xe e SM/8Xe. A densidade de massa foi calculada dos últimos 100 ns em cada sistema do seu estudo ao longo da normal ao plano da membrana como mostrado na Fig. 24.

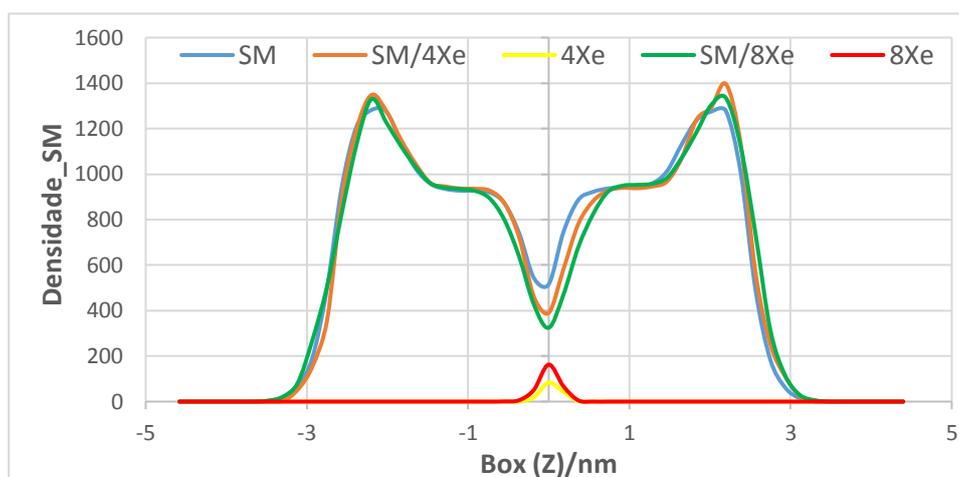


Figura 24: Densidade de SM, SM/4Xe e SM/8Xe

O perfil de densidade destas membranas que contêm Xe está alterado. A densidade do lípido está aumentada na interface membrana-água e diminuída no core hidrofóbico onde se localiza o Xe. Estas diferenças são mínimas o que pode ser explicado pelo facto de se tratar de uma membrana numa fase muito

ordenada e rígida que, pelo menos a estas concentrações de Xe, é perturbada, mas não muito como vemos pela baixa magnitude dos efeitos observados.

4.2.3.3. Densidade de DOPC/SM/Chol, DOPC/SM/Chol/4Xe e DOPC/SM/Chol/8Xe

A fig. 25 mostra as densidades de massa de cada lípido em de cada sistema de DOPC/SM/Chol, DOPC/SM/Chol/4Xe e DOPC/SM/Chol/8Xe. A densidade de massa foi calculada dos últimos 100 ns em cada sistema do seu estudo ao longo da normal ao plano da membrana como mostrado na Fig. 25.

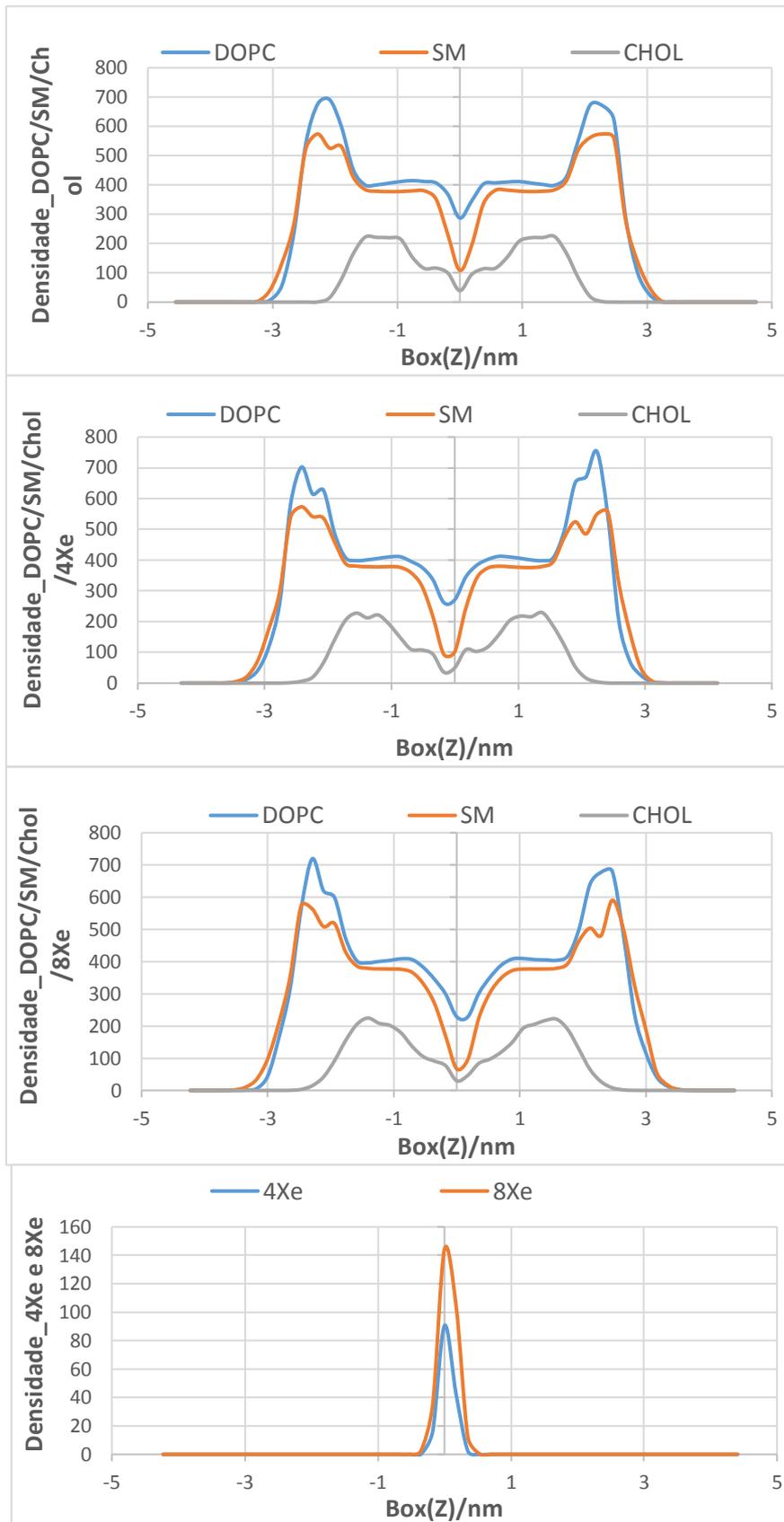


Figura 25: Densidade de DOPC/SM/Chol, DOPC/SM/Chol/4Xe e DOPC/SM/Chol/8Xe

Também nestas membranas os efeitos são mínimos o que também pode ser explicado pela rigidez dos sistemas e a baixa concentração de Xe.

4.2.4. Pontes de Hidrogénio

A Tabela 11 apresenta a média do numero de pontes de hidrogénio de cada sistema.

Tabela 11: Pontes de Hidrogénio de DOPC/SM/Chol

Sistema	nXe	numHB		
		DOPC-Sol	SM-Sol	Chol-Sol
DOPC	0	6.03 ± 0.16		
	4	6.05 ± 0.15		
	8	6.12 ± 0.13		
SM	0		4.33 ± 0.08	
	4		4.49 ± 0.15	
	8		4.42 ± 0.09	
DOPC/SM/ Chol (2:2:1)	0	5.52 ± 0.23	4.69 ± 0.23	0.56 ± 0.11
	4	5.38 ± 0.24	4.72 ± 0.21	0.47 ± 0.11
	8	5.51 ± 0.22	4.75 ± 0.23	0.52 ± 0.10

Nas membranas puras o DOPC faz mais pontes de H com o solvente do que a SM uma vez que se trata de uma membrana mais fluida e como tal o DOPC tem maior liberdade de movimentos e conformações podendo interagir com o solvente de uma forma mais eficiente e com menos rigidez. Na membrana de DOPC/SM/Chol, membrana bastante ordenada, o DOPC faz menos pontes de H com o solvente devido a essa mesma rigidez provocada pela presença de SM e Chol. O reverso acontece com a SM que parece mais disponível para fazer pontes de H, ou por estar mais exposta ao solvente ou por uma maior disponibilidade conformacional induzida pela presença do, mais fluido, DOPC. A

presença de Xe parece não ter grande influencia nestas interações de interface uma vez que as pontes de H se mantêm, aproximadamente constantes (dentro dos limites dos desvios padrão), com a presença de Xe.

4.2.5. Dinâmica de Rotacional de Eixos

Foi avaliada a dinâmica de rotacional de eixos selecionados: os eixos sn-1 e sn-2 (definidos entre os 2º e penúltimos carbonos acilo de cada cadeia) e o eixo P-N (definido entre o P do fosfato e o N da colina). Para tal, e como explicado anteriormente, foram calculadas as funções de autocorrelação dos movimentos rotacionais de cada um destes eixos para os últimos 100 ns das simulações (Fig. 18 a 20). Para facilitar a análise deste conjunto grande de curvas/resultados, calcularam-se as médias dos valores de $C(t)$ para cada eixo (Tabela 12), o que nos dá informação extra e auxilia a interpretação das curvas.

Tabela 12: Dinâmica de Rotacional ($C(t)$) $sn-1$, $sn-2$ e $P-N$ de DOPC/SM/Chol

Lípidos	nXe	C(t)			Chol	
		$sn-1$	$sn-2$	$P-N$		
DOPC	0	0.46 ± 0.08	0.44 ± 0.09	0.31 ± 0.12		
	4	0.51 ± 0.06	0.48 ± 0.07	0.32 ± 0.12		
	8	0.47 ± 0.07	0.45 ± 0.08	0.25 ± 0.12		
SM	0	0.89 ± 0.02	0.92 ± 0.01	0.72 ± 0.04		
	4	0.91 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.71 ± 0.04		
	8	0.92 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.68 ± 0.05		
DOPC/SM/Chol (2:2:1)	DOPC	0	0.90 ± 0.01	0.89 ± 0.01	0.66 ± 0.06	
		4	0.90 ± 0.01	0.89 ± 0.01	0.62 ± 0.09	
		8	0.88 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.66 ± 0.07	
	SM	0	0.91 ± 0.01	0.92 ± 0.01	0.69 ± 0.04	
		4	0.92 ± 0.01	0.92 ± 0.01	0.58 ± 0.09	
		8	0.90 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.63 ± 0.07	
	Chol	0				0.74 ± 0.07
		4				0.77 ± 0.05
		8				0.73 ± 0.06

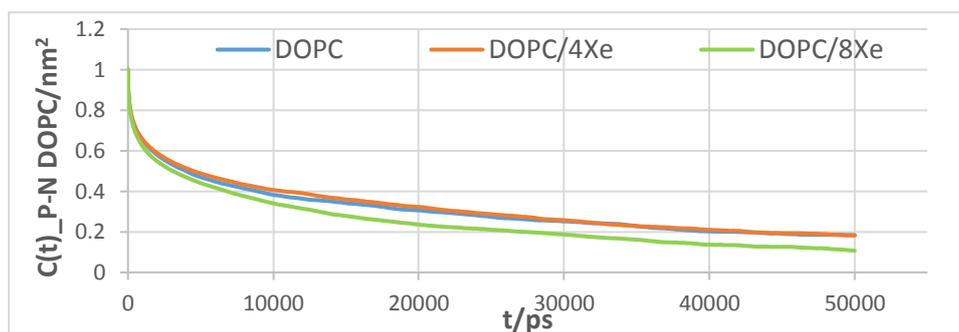


Figura 26: Dinâmica de Rotacional ($C(t)$) $P-N$ de DOPC

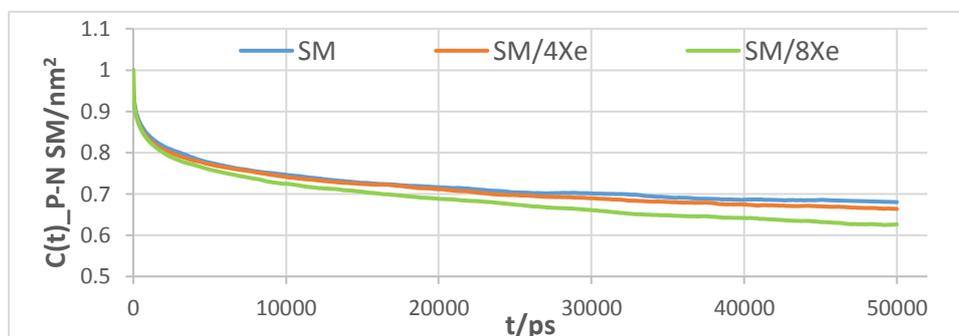


Figura 27: Dinâmica de Rotacional ($C(t)$) $P-N$ de SM

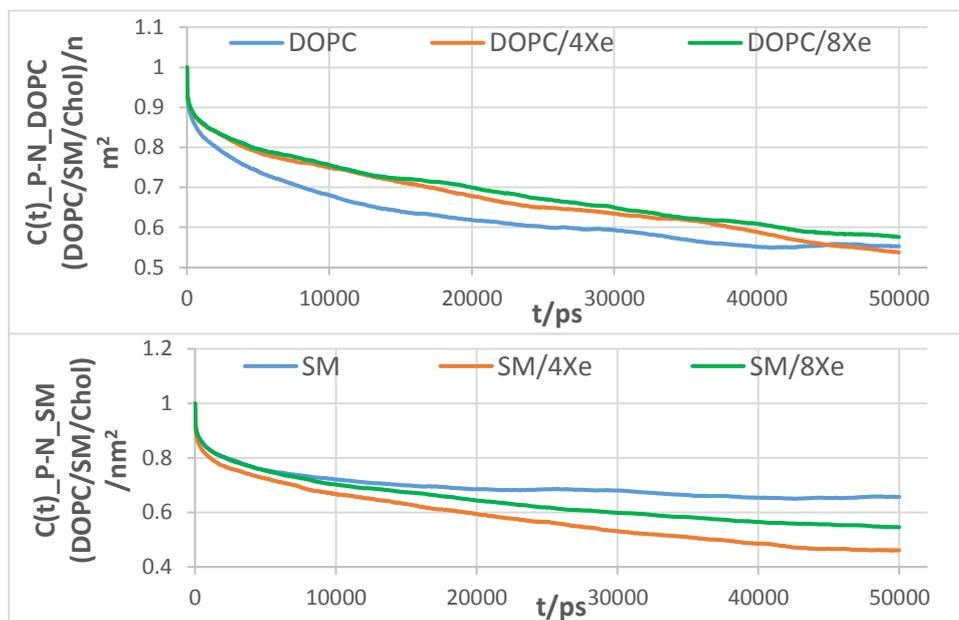


Figura 28: Dinâmica de Rotacional ($C(t)$) P-N de DOPC/SM/Chol

O eixo P-N do DOPC e da SM nas membranas puras, parece (fig. 26 e fig. 27) sugere uma fluidização desse eixo interfacial com a concentração mais elevada de Xe mas este efeito é, aparentemente diminuto, uma vez que as médias das curvas $C(t)$ no intervalo de tempo em estudo não diferem significativamente umas das outras (Tabela 12). No sistema DOPC/SM/Chol observa-se o que já tinha sido sugerido pela análise das pontes de H, i.e., uma fluidização da SM e uma condensação do DOPC, também aqui (Tabela 12), os efeitos são pouco significativos.

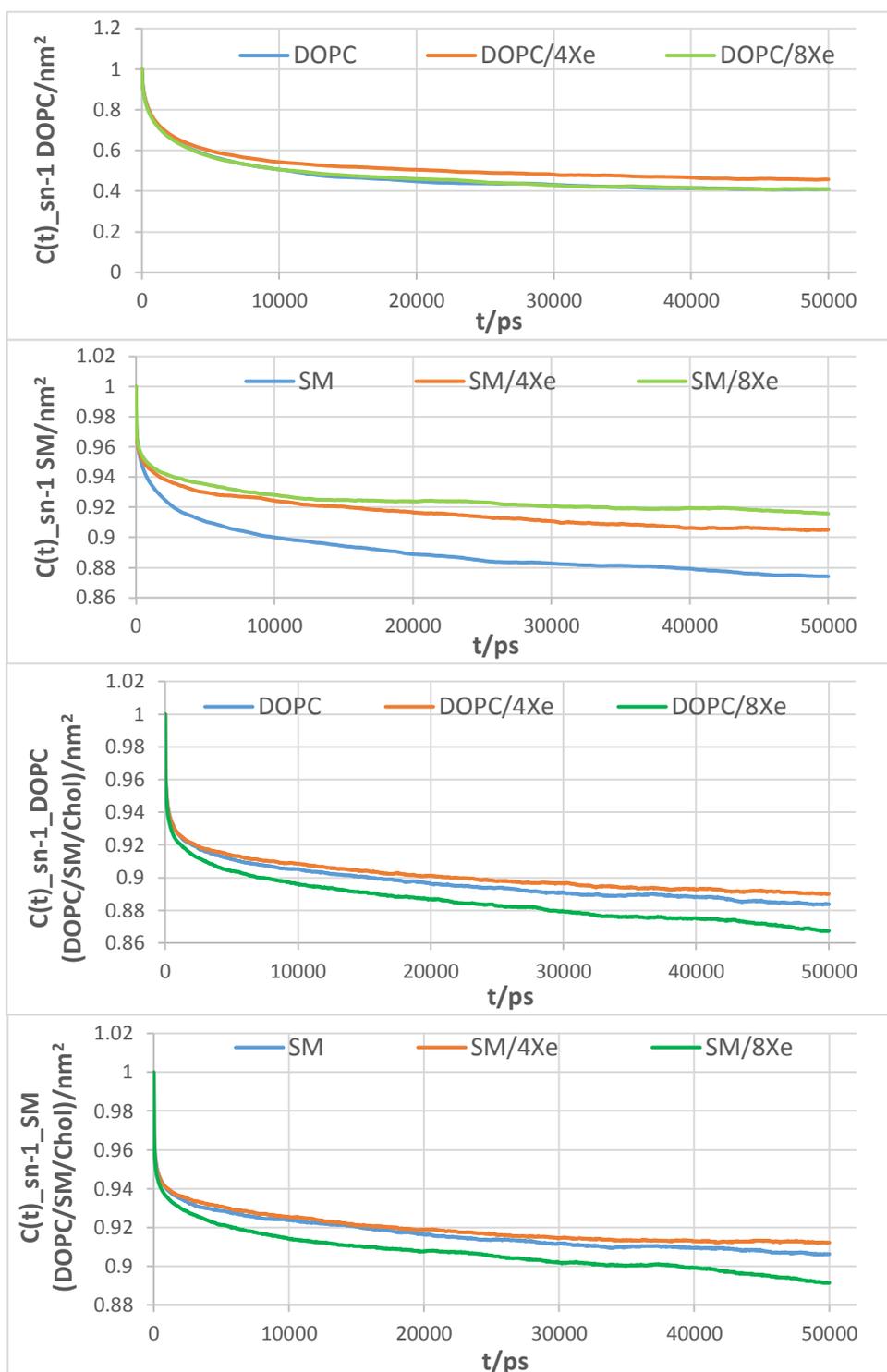


Figura 29: Dinâmica de Rotacional ($C(t)$) de sn-1

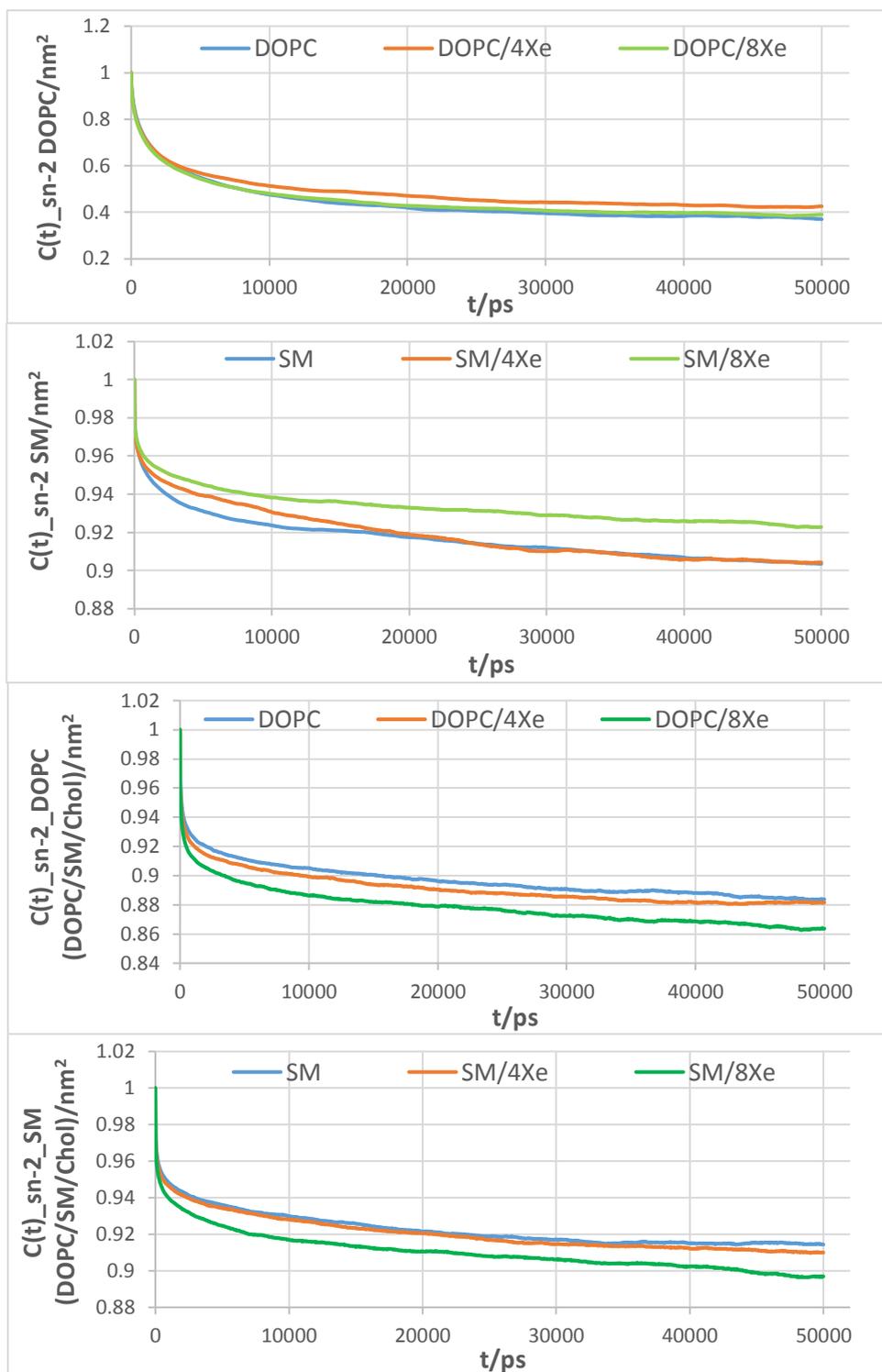


Figura 30: Dinâmica de Rotacional ($C(t)$) de sn-2

No sistema de DOPC puro o Xe tem pouco efeito sobre a dinâmica rotacional dos eixos sn-1 e sn-2 (Fig. 29 e 30 e Tabela 12). A membrana de DOPC é bastante fluida com muito volume livre que o Xe pode ocupar sem interferir grandemente com o DOPC. O mesmo não pode ser dito da membrana de SM que é muito ordenada e, como tal, tem pouco espaço livre e aqui o Xe provoca restrições ao movimento rotacional de ambos os eixos em estudo (Fig. 29 e 30 e Tabela 12). A membrana de DOPC/SM/Chol é bastante rígida e ordenada de tal forma que a presença de Xe vai causar disrupção dessa ordem e rigidez tornando os eixos em estudo mais dinâmicos (Fig. 29 e 30 e Tabela 12).

4.2.6. Difusão de Lateral

Difusão lateral são os coeficientes que calculados a partir do deslocamento quadrático médio bidimensional. Os resultados da simulação estão nos seguintes tabela:

Tabela 13: Difusão de lateral (msd) de DOPC/SM/Chol

Sistema	nXe	$D_{lat}/10^{-8}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$			
		DOPC	SM	Chol	Xe
DOPC	0	1.80 ± 0.01			
	4	2.02 ± 0.01			57.53 ± 0.92
	8	2.42 ± 0.01			204.24 ± 2.81
SM	0		0.12 ± 0.01		
	4		0.12 ± 0.01		29.69 ± 0.30
	8		0.10 ± 0.01		34.35 ± 0.26
DOPC/SM/Chol (2:2:1)	0	0.33 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.39 ± 0.01	
	4	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	27.35 ± 0.20
	8	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	56.81 ± 0.63

Na tabela 13 mostra, o valor de difusão lateral de DOPC em estudo na simulação foi aumentada porque o aumento de espessura da membrana e área por lípidos no sistema. Também a adsorção de Xe na membrana foi aumento a rotacional e translacional e o valor de D_{lat} foi elevado mas os desvio padrão dos erros de DOPC e SM são iguais. Isto é o coeficiente de difusão está bem definido apenas no limite de longo prazo onde o MSD é proporcional ao tempo (fig. 31 a 33). No sistema de SM os valores aumento na simulação 100 ns porque o Xe foi absorve no sistema, e por causa de aumento a área por lípidos e espessura da membrana. Por outro lado, quando a concentração de xénon mais elevada foi dar uma pressão na parte bidimensional da membrana e a estrutura bidimensional foi desordenados. Também nestes sistemas o Xe difunde muito mais que os lípidos, devido às suas pequenas dimensões e apesar de se encontrar em concentração baixa evoca, ainda assim efeitos mensuráveis nestas membranas.

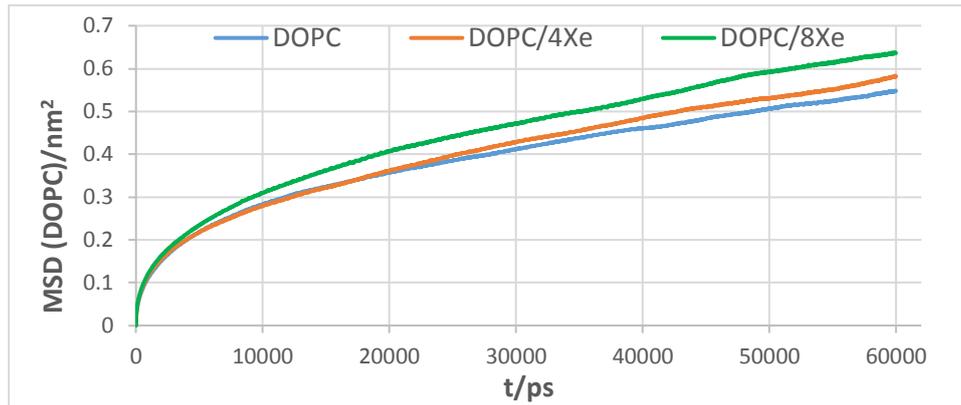


Figura 31: Difusão de lateral (msd) de DOPC

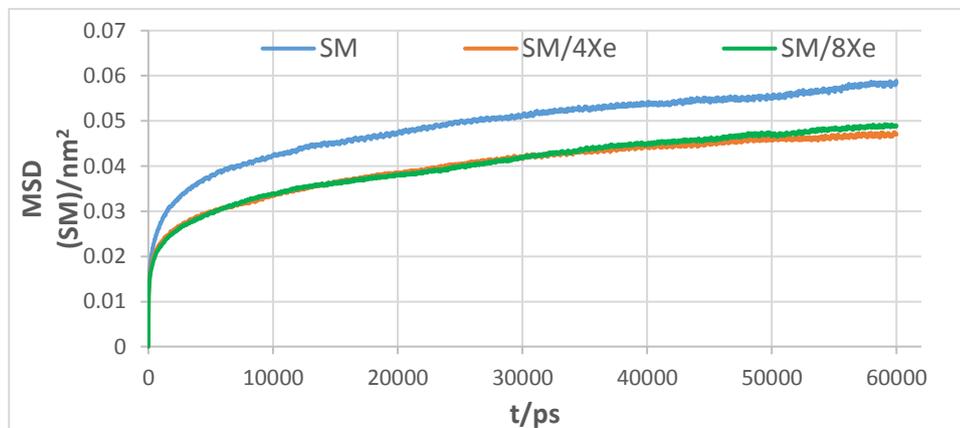


Figura 32: Difusão de lateral (msd) de SM

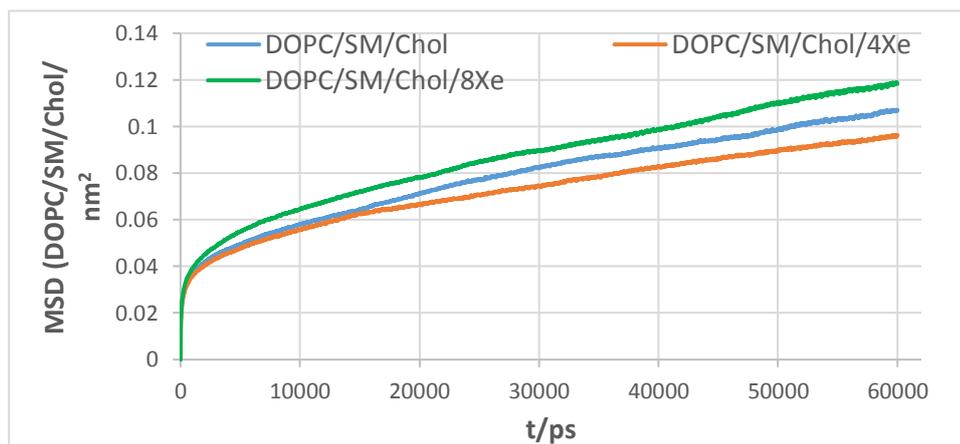


Figura 33: Difusão de lateral (msd) de DOPC/SM/Chol

O gráfico de MSD em todos os sistemas são lineares, a difusão lateral no sistema DOPC, DOPC/4Xe e DOPC/8Xe são fluidos no core hidrofóbico da membrana e os valores muito baixas (Tab. 13). Por outro lado, o sistema de DOPC/SM/Chol, DOPC/SM/Chol/4Xe e DOPC/SM/Chol/8Xe são valores muito elevados por causa de xenon, que alterar as membranas no sistema, quando o sistema aumento pode ser resultado do desordenamento causado pela adsorção do xénon.

4.3. Sistema de POPC e POPC/SM/CHOL com Xénon

Para iniciar as simulações, os modelos das membranas foram construídos e solvatados com ferramentas do GROMACS (Van der Spoel & Lindahl, 2010). Assim foram contruídos modelos de membranas de POPC (128 moléculas de POPC e 3840 moléculas de água), SM (144 moléculas de SM e 4320 moléculas de água) e POPC/SM/Chol (64 moléculas de POPC, 64 moléculas de SM, 32 moléculas de Chol, 4800 moléculas de água). A partir de cada um destes três sistemas foram construídos sistemas aos quais foram adicionados 4 ou 8 Xe. Depois de construídas, as membranas (com ou sem Xe) foram simuladas durante 200 ns, com um passo de integração de 2 fs, à temperatura de 300 K e à pressão de 1 atm. O campo de força GROMOS96 53a6 foi usado para descrever todas as interações e comportamentos dos componentes de todos os sistemas.

4.3.1. Área por Lípidos e Espessura da Membrana

A área por lípido é um parâmetro lentamente convergente nas simulações de dinâmica molecular, mas seu valor médio foi estável nos 100 ns finais da simulação, o que nos levou a concluir que os sistemas simulados haviam atingido um estado estacionário após 100 ns da simulação. Os valores da área por lípidos com diferentes concentrações de xénon estão na tabela em baixo:

Tabela 14: Área por Lípidos e Espessura da Membrana

Lípidos	nXe	ApL/nm ²	Espessura/nm ²	
POPC	0	0.608 ± 0.011	4.03 ± 0.07	
	4	0.602 ± 0.012	4.16 ± 0.07	
	8	0.602 ± 0.011	4.24 ± 0.07	
POPC/SM/Chol (2:2:1)		POPC	0.479 ± 0.022	
	0	SM	0.471 ± 0.016	5.06 ± 0.15
		Chol	0.163 ± 0.013	
		POPC	0.481 ± 0.020	
	4	SM	0.474 ± 0.019	4.24 ± 0.13
		Chol	0.176 ± 0.014	
		POPC	0.483 ± 0.017	
	8	SM	0.469 ± 0.015	4.37 ± 0.11
		Chol	0.176 ± 0.014	

Em todos os sistemas os valores da área por lípido mantêm-se, aproximadamente, constante e dentro dos limites do desvio padrão o que é, também, visível nos gráficos de variação temporal destes parâmetros, que apresentam variações bastante sobrepostas (Fig. 34). A ver-se alguma tendência, para o POPC, seria a de uma diminuição da área, indicadora de um efeito de condensação causado pela presença do Xe que também se reflete num aumento da espessura de membrana. No sistema de POPC/SM/Chol também o

valor das áreas por lípido se mantêm, aproximadamente, constantes e dentro dos limites do desvio padrão (este efeito também é visível nos gráficos de variação temporal destes parâmetros). Neste sistema, no entanto a espessura de membrana sofre uma diminuição com a presença de Xe. Também aqui o Xe, parece ter um efeito diferente consoante a membrana e o seu estado: na membrana fluida de POPC vai estabilizar as caudas acilo do POPC e causar um efeito de condensação, ainda que ligeiro, na membrana rígida de POPC/SM/Chol tem o efeito contrário desestabilizando a membrana e tornando-a menos espessa.

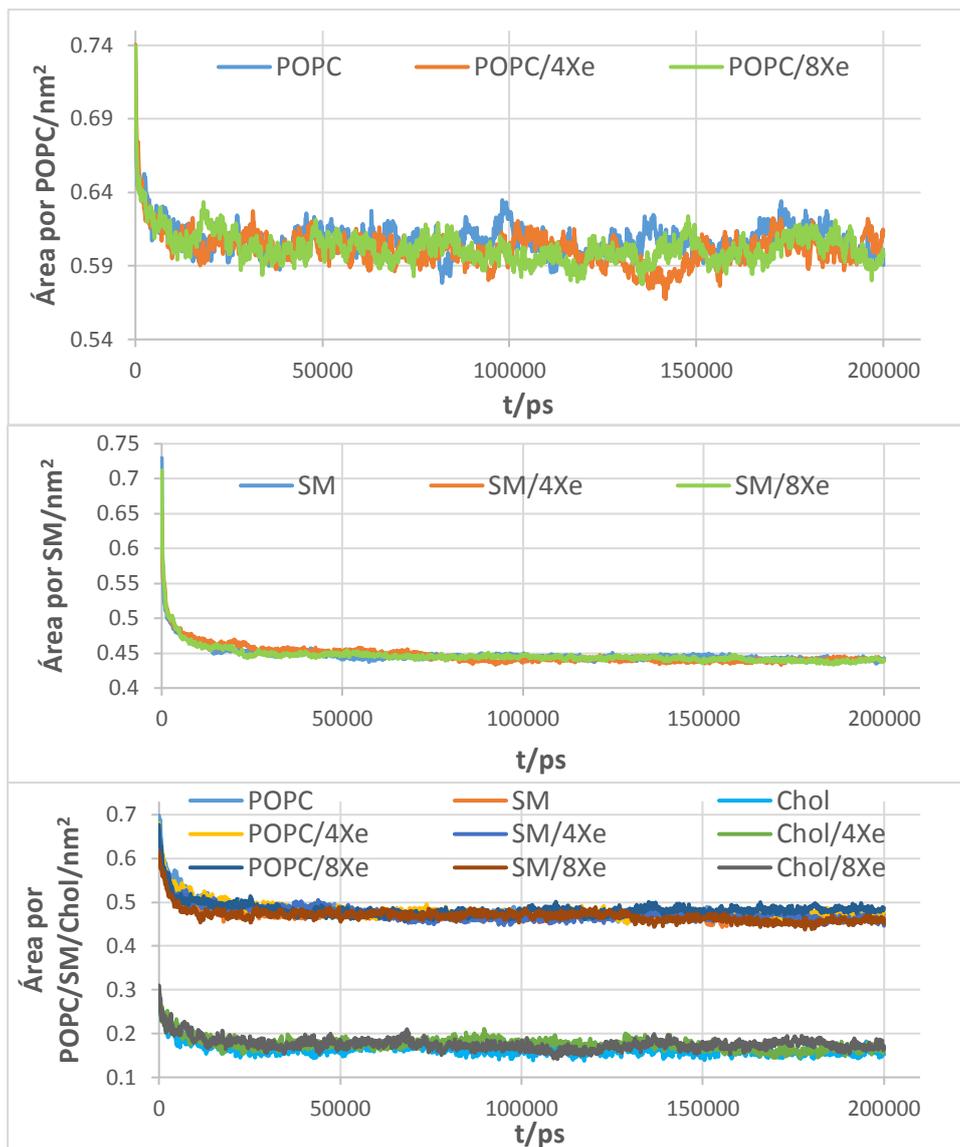


Figura 34: Área por lípidos de POPC, SM e POPC/SM/Chol

4.3.2. Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$)

A tabela 15 mostra as médias dos parâmetros de ordem dos carbonos das cadeias acilo *sn-1* e *sn-2* de cada lípido e de cada sistema, com ou sem Xe.

Tabela 15: Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$) $sn-1$ e $sn-2$

Lípidos	nXe	$-S_{CD}$		
		$sn-1$	$sn-2$	
POPC	0	0.139 ± 0.051	0.187 ± 0.038	
	4	0.149 ± 0.048	0.197 ± 0.040	
	8	0.146 ± 0.047	0.199 ± 0.039	
POPC/SM/Chol	POPC	0	0.309 ± 0.078	0.406 ± 0.039
		4	0.304 ± 0.079	0.395 ± 0.042
		8	0.310 ± 0.080	0.391 ± 0.041
	SM	0	0.414 ± 0.038	0.409 ± 0.071
		4	0.406 ± 0.042	0.401 ± 0.071
		8	0.406 ± 0.040	0.401 ± 0.066

Por observação dos resultados da tabela 15, e como sugerido atrás, as duas membranas estão em estados diferentes sendo a de POPC mais fluida que a de POPC/SM/Chol. O efeito do Xe é consistente com o discutido no sub-capítulo anterior, i.e., aumenta a ordem no sistema fluido e diminui a ordem no sistema mais rígido.

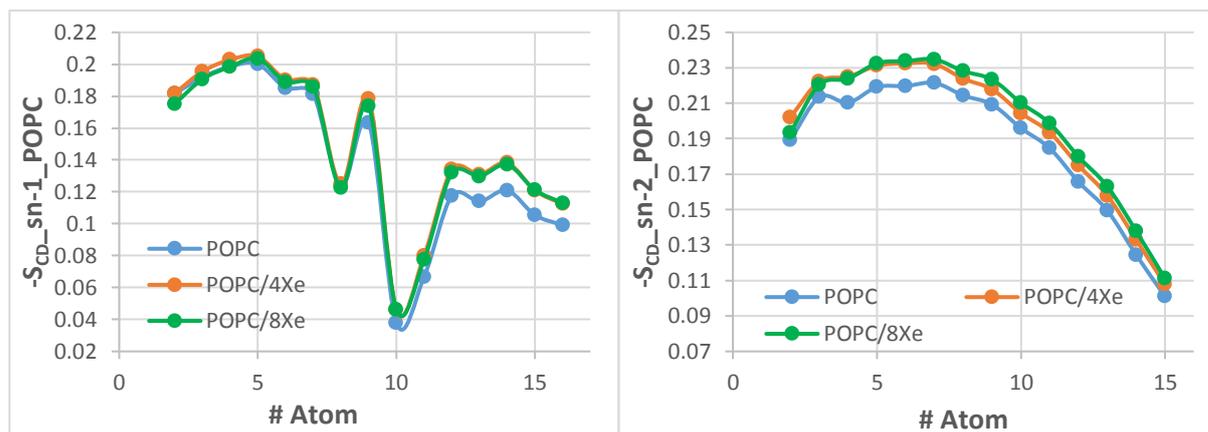


Figura 35: Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$) $sn-1$ e $sn-2$ de POPC

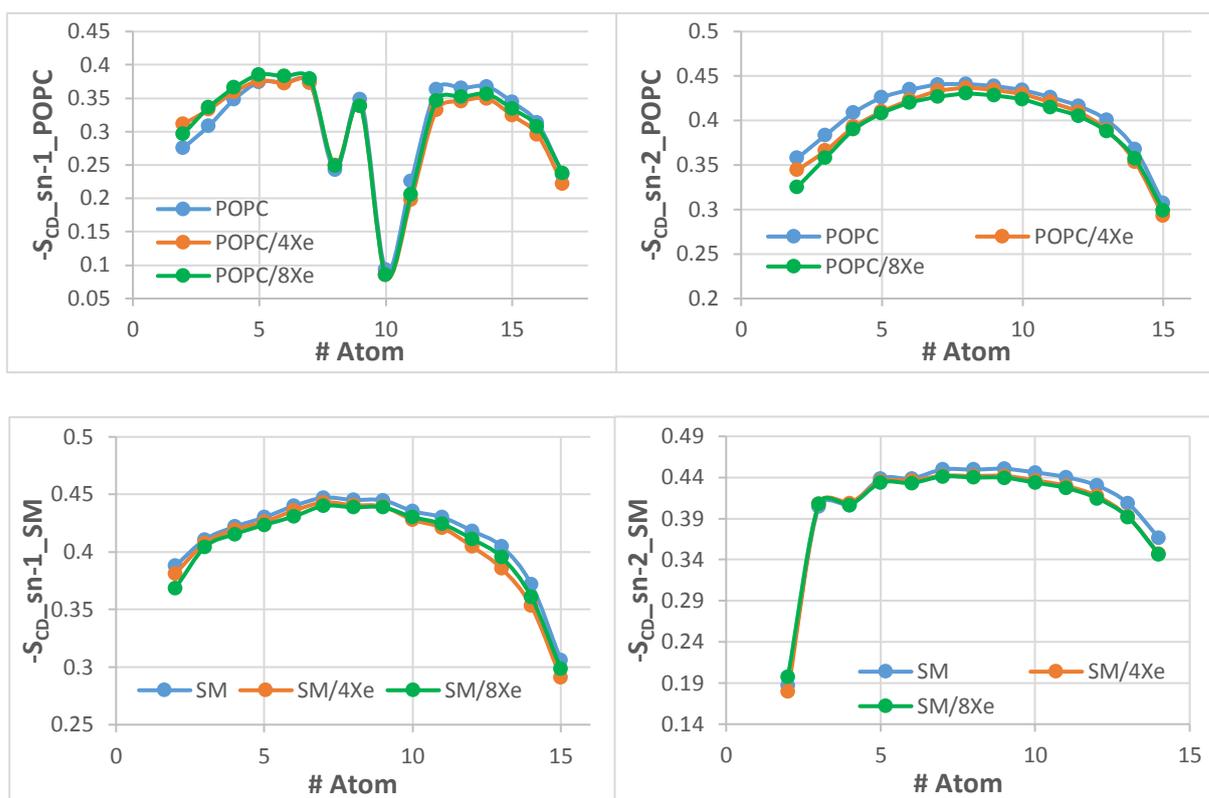


Figura 36: Parâmetros de Ordem ($-S_{CD}$) sn-1 e sn-2 de POPC/SM

Na figura acima mostrou que, $-S_{CD}$ ao longo das cadeias sn-1 e sn-2 nos sistemas POPC e POPC/SM/Chol. Aqui é visível o efeito descrito atrás: desordenação das membranas fluidas e de perturbação das mais ordenadas. Aparentamos, aqui que este efeito é diminuto o que se pode dever às baixas concentrações de Xe.

4.3.3. Densidade dos Lípidos

4.3.3.1. Densidade de POPC, POPC/4Xe e POPC/8Xe

A Fig. 37 mostra as densidades de massa de cada componente dos sistemas de POPC, POPC/4Xe e POPC/8Xe. A densidade de massa foi calculada para as moléculas presentes em cada sistema em estudo (média dos últimos 100 ns da simulação) ao longo da normal ao plano da membrana como mostrado na Fig. 37.

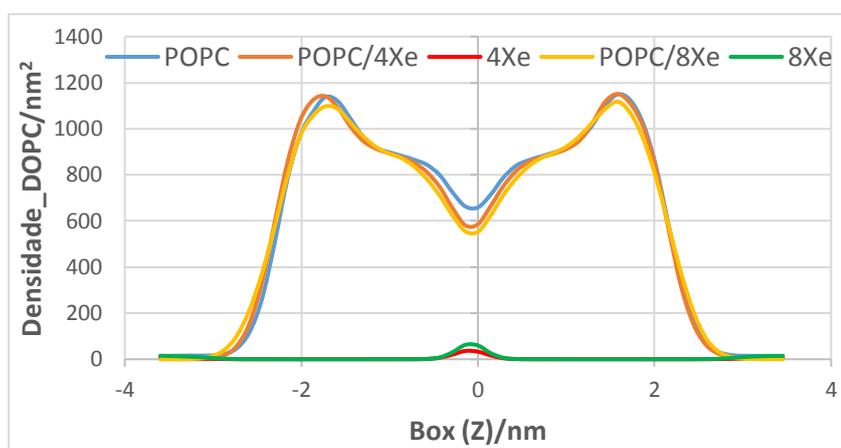


Figura 37: Densidade de POPC, POPC/4Xe e POPC/8Xe

No gráfico acima, em que as curvas parecem, na generalidade sobreponíveis, é de salientar a diminuição de densidade no centro do *core* hidrofóbico com a presença de Xe, que pode ser indicativa de uma separação maior entre os lípidos de cada monocamada causada pela presença de Xe nessa zona.

4.3.3.2. Densidade de POPC/SM/Chol, POPC/SM/Chol/4Xe e POPC/SM/Chol/8Xe

Densidade é a região que ocupada pelo solvente, membrana e a posição dos íons no interior da membrana de POPC/SM/Chol, pode se observar a interface e a posição de cada molécula no sistema de bicamada.

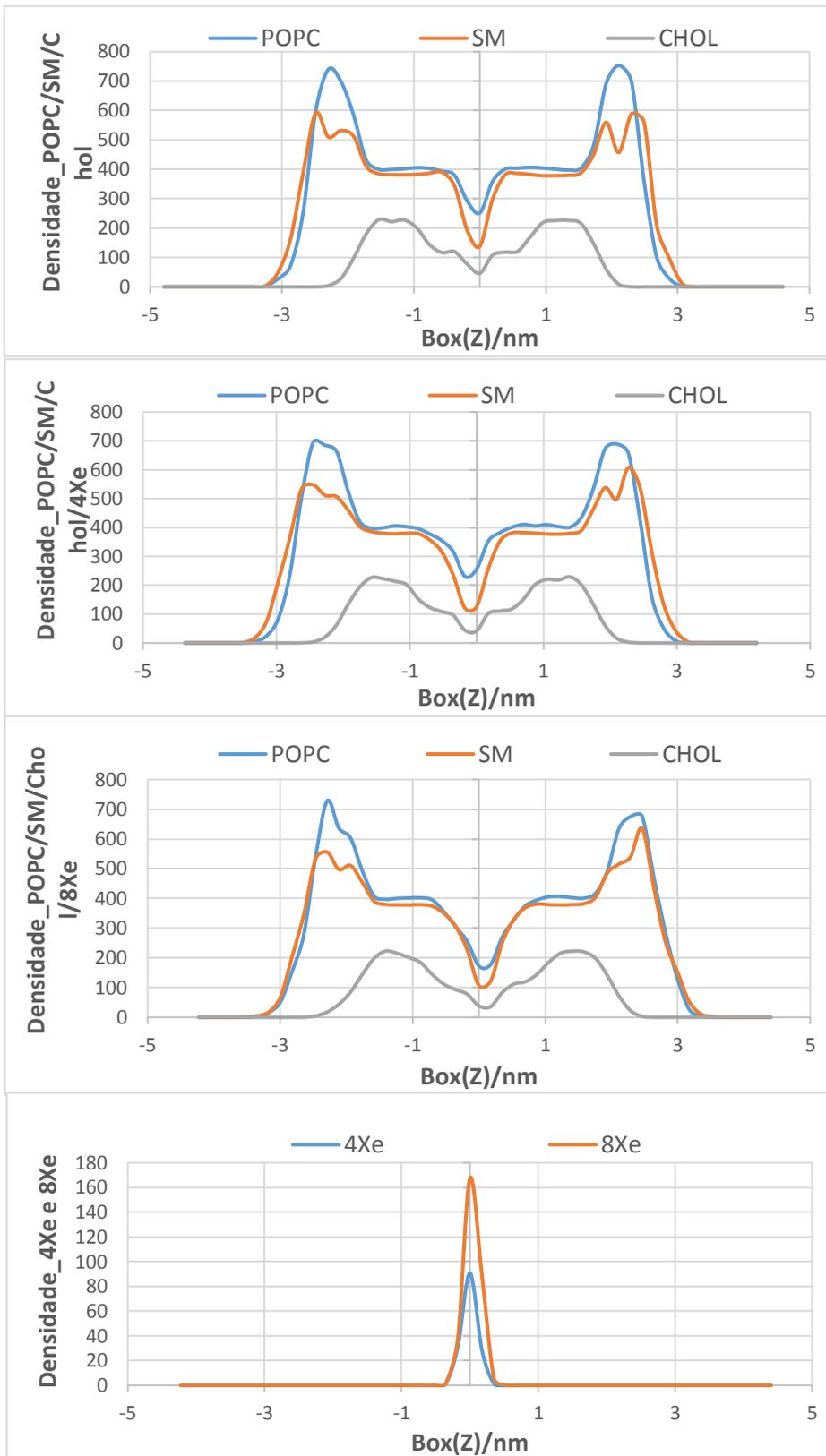


Figura 38: Densidade de POPC/SM/Chol, POPC/SM

No gráfico mostra, a densidade de POPC, SM e Chol no interior de água. A densidade de POPC ficaram pouco a distância com o xénon, o SM/4xe ficaram apertar o xénon e o SM/8Xe foi muito perto de zero e o xénon subiu com SM. Por outro lado, o valor de Chol foi muito diminuído e mais perto de zero mas o xénon oito é valor muito maior de Chol.

4.3.4. Pontos de Hidrogénio

A Tabela 16 apresenta a média do numero de pontes de hidrogénio de cada sistema.

Tabela 16: Pontos de Hidrogénio de POPC e o POPC/SM/Chol

Sistema	nXe	numHB		
		POPC-Sol	SM-Sol	Chol-Sol
POPC	0	6.19 ± 0.14		
	4	6.08 ± 0.13		
	8	6.17 ± 0.13		
SM	0		4.33 ± 0.08	
	4		4.49 ± 0.15	
	8		4.42 ± 0.09	
POPC/SM/Chol	0	4.10 ± 0.11	3.72 ± 0.10	0.09 ± 0.01
	4	4.13 ± 0.14	3.76 ± 0.14	0.22 ± 0.03
	8	4.23 ± 0.12	3.68 ± 0.11	0.20 ± 0.03

Nas membranas puras o POPC faz mais pontes de H com o solvente do que a SM uma vez que se trata de uma membrana mais fluida e como tal o POPC tem maior liberdade de movimentos e conformações podendo interagir com o solvente de uma forma mais eficiente e com menos rigidez. Na membrana de POPC/SM/Chol, membrana bastante ordenada, o POPC faz menos pontes de H com o solvente devido a essa mesma rigidez provocada pela presença de SM e Chol. O reverso acontece com a SM que parece mais disponível para fazer pontes de H, ou por estar mais exposta ao solvente ou por uma maior disponibilidade conformacional induzida pela presença do, mais fluido, POPC. A

presença de Xe parece não ter grande influencia nestas interações de interface uma vez que as pontes de H se mantêm, aproximadamente constantes (dentro dos limites dos desvios padrão), com a presença de Xe.

4.3.5. Dinâmica de Rotacional

Foi avaliada a dinâmica de rotacional de eixos selecionados: os eixos sn-1 e sn-2 (definidos entre os 2º e penúltimos carbonos acilo de cada cadeia) e o eixo P-N (definido entre o P do fosfato e o N da colina). Para tal, e como explicado anteriormente, foram calculadas as funções de autocorrelação dos movimentos rotacionais de cada um destes eixos para os últimos 100 ns das simulações (Fig. 39). Para facilitar a análise deste conjunto grande de curvas/resultados, calcularam-se as médias dos valores de $C(t)$ para cada eixo (Tabela 17), o que nos dá informação extra e auxilia a interpretação das curvas.

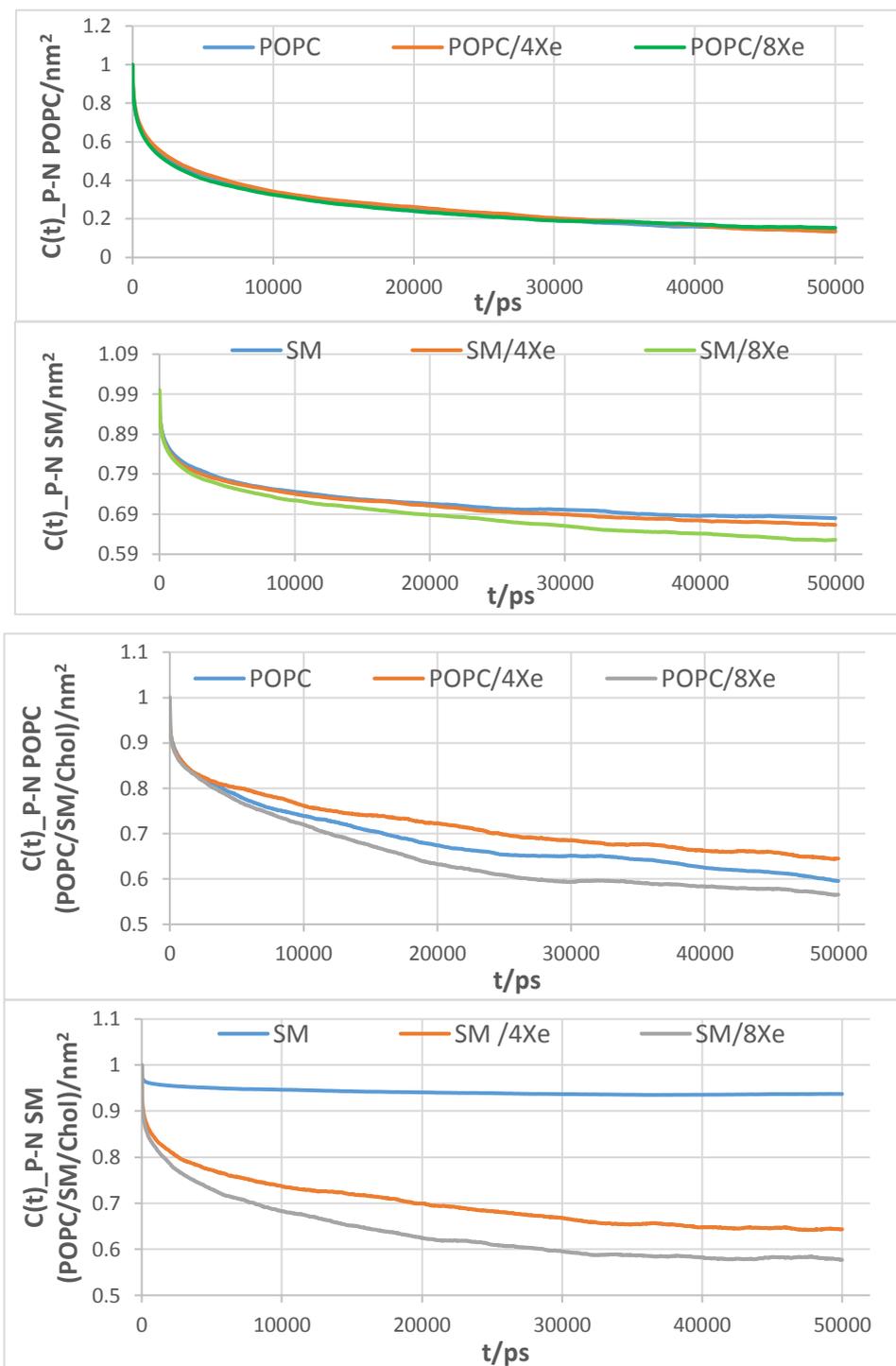


Figura 39: Dinâmica de Rotacional do eixo P-N

O eixo P-N do POPC na membrana pura, permanece inalterado com a presença de Xe ao contrário da membrana de SM onde a concentração mais alta de Xe evoca uma fluidização ainda que ligeira da membrana. (Fig. 39 e Tabela 17). No sistema POPC/SM/Chol observa-se uma fluidização da SM e uma

resposta dupla para o POPC (Fig. 39) uma ordenação para a primeira concentração de Xe e uma fluidização para a mais alta. A membrana de POPC/SM/Chol é bastante ordenada, mas possui ainda algum espaço vazio que à concentração mais baixa de Xe pode ser ocupado pelas moléculas de Xe não sendo isso possível na concentração mais alta, o Xe vai desestabilizar a estrutura ordenada da membrana, evocando, assim este efeito de fluidização.

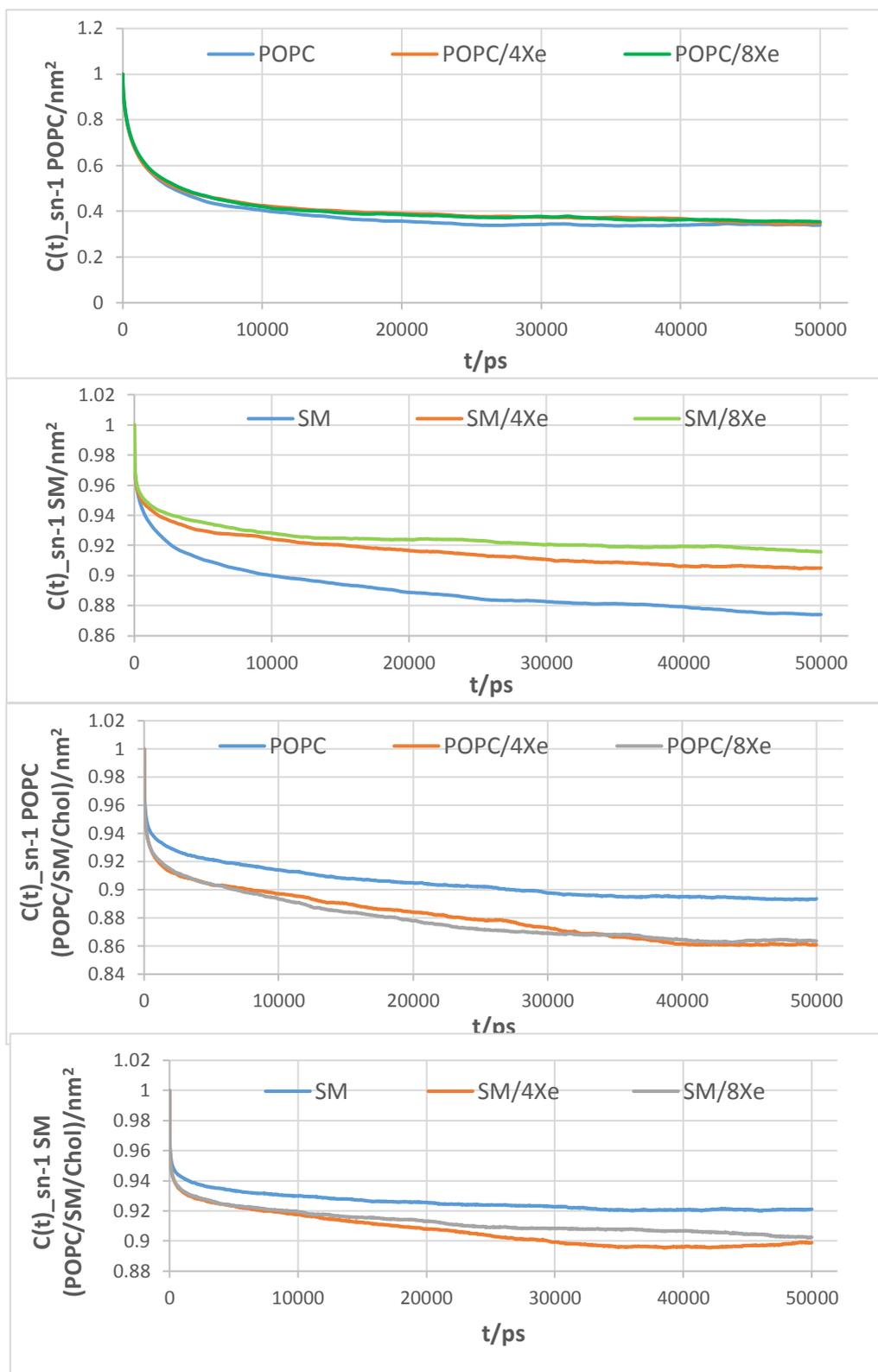


Figura 40: Dinâmica de Rotacional de sn-1

No sistema de POPC puro o Xe tem pouco efeito sobre a dinâmica rotacional dos eixos sn-1 e sn-2 (Fig. 40 e 41 e Tabela 17). A membrana de DOPC é bastante fluida com muito volume livre que o Xe pode ocupar sem interferir grandemente com o POPC. O mesmo não pode ser dito da membrana de SM que é muito ordenada e, como tal, tem pouco espaço livre e aqui o Xe provoca restrições ao movimento rotacional de ambos os eixos em estudo (Fig. 0 e 41 e Tabela 17). A membrana de POPC/SM/Chol é bastante rígida e ordenada de tal forma que a presença de Xe vai causar disrupção dessa ordem e rigidez tornando os eixos em estudo mais dinâmicos (Fig. 40 e 41 e Tabela 17).

Um efeito semelhante ao do eixo P-N do POPC vai sofrer a dinâmica do Chol que parece menos fluido com a concentração baixa de Xe e mais fluido com a mais alta. A SM parece interagir de forma diferente ou preferencial com o Xe, sendo que esta observação merece ser aprofundada no futuro.

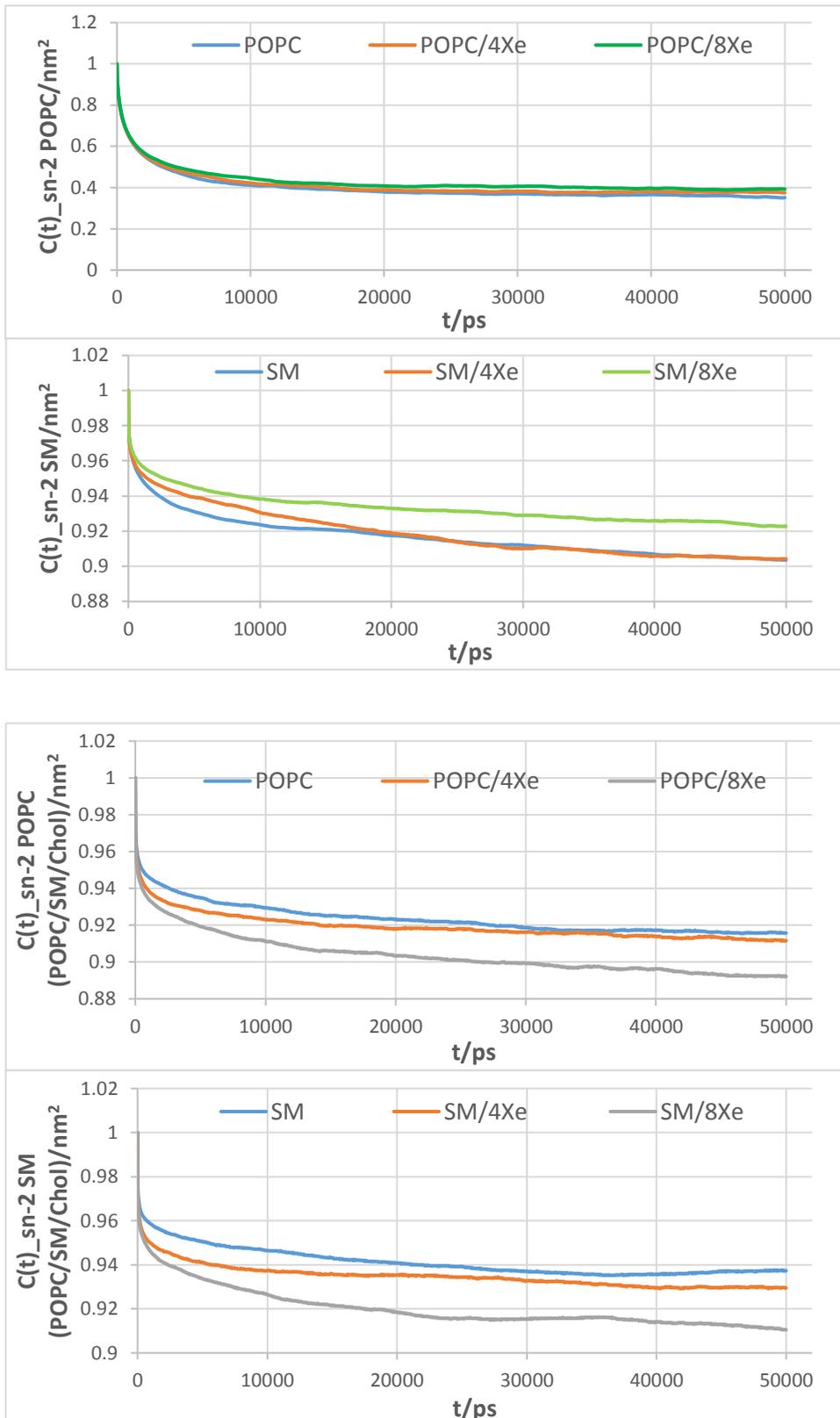


Figura 41: Dinâmica de Rotacional de sn-2 e Chol

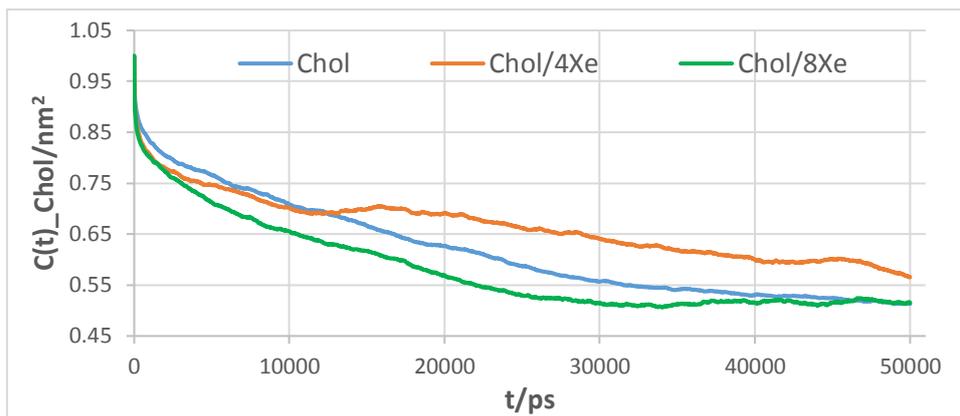


Figura 42: Dinâmica de Rotacional de sn-2 e Chol (cont)

Tabela 17: Dinâmica de Rotacional de Eixos de POPC e o POPC/SM/Chol

Lípidos	nXe	C(t)			Chol	
		sn-1	sn-2	P-N		
POPC	0	0.380 ± 0.080	0.398 ± 0.069	0.257 ± 0.121		
	4	0.405 ± 0.074	0.411 ± 0.066	0.266 ± 0.124		
	8	0.405 ± 0.075	0.429 ± 0.063	0.256 ± 0.115		
POPC	0	0.905 ± 0.012	0.923 ± 0.008	0.682 ± 0.067		
	4	0.881 ± 0.018	0.919 ± 0.007	0.716 ± 0.057		
	8	0.879 ± 0.017	0.904 ± 0.011	0.647 ± 0.080		
POPC/SM/ CHOL (2:2:1)	0	0.926 ± 0.006	0.941 ± 0.006	0.941 ± 0.006		
	SM	4	0.907 ± 0.011	0.935 ± 0.005	0.697 ± 0.053	
	8	0.913 ± 0.008	0.920 ± 0.009	0.635 ± 0.065		
	0				0.619 ± 0.095	
	CHOL	4			0.665 ± 0.060	
	8				0.581 ± 0.085	

4.3.6. Difusão de Lateral

Difusão lateral são os coeficientes que calculados a partir do deslocamento quadrático médio bidimensional. Os resultados da simulação estão nos seguintes tabela:

Tabela 18: Difusão de Lateral de POPC e POPC/SM/Chol

Sistema	nXe	$D_{lat}/10^{-8}cm^2s^{-1}$			
		POPC	SM	Chol	Xe
POPC	0	4.11 ± 0.01			
	4	2.66 ± 0.01			292.50 ± 0.94
	8	2.12 ± 0.01			250.00 ± 2.21
SM	0		0.12 ± 0.01		
	4		0.12 ± 0.01		29.69 ± 0.30
	8		0.10 ± 0.01		34.35 ± 0.26
POPC/SM/Chol (2:2:1)	0	0.22 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.35	
	4	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.12 ± 0.35	24.70 ± 0.21
	8	0.36 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.34 ± 0.35	452.50 ± 1.65

Na tabela 18 mostra, o valor de difusão lateral de POPC em estudo na simulação foi aumentada porque o aumento de espessura da membrana e área por lípidos no sistema. Também a adsorção de Xe na membrana foi aumento a rotacional e translacional e o valor de D_{lat} foi elevado mas os desvio padrão dos erros de POPC e SM são iguais. Isto é o coeficiente de difusão está bem definido apenas no limite de longo prazo onde o MSD é proporcional ao tempo (fig. 42). No sistema de SM os valores aumento na simulação 100 ns porque o Xe foi absorve no sistema, e por causa de aumento a área por lípidos e espessura da membrana. Por outro lado, quando a concentração de xénon mais elevada foi dar uma pressão na parte bidimensional da membrana e a estrutura bidimensional foi desordenados. Nestes sistemas o Xe difunde muito mais que os lípidos, devido às suas pequenas dimensões e apesar de se encontrar em concentração baixa evoca, ainda assim efeitos mensuráveis nestas membranas.

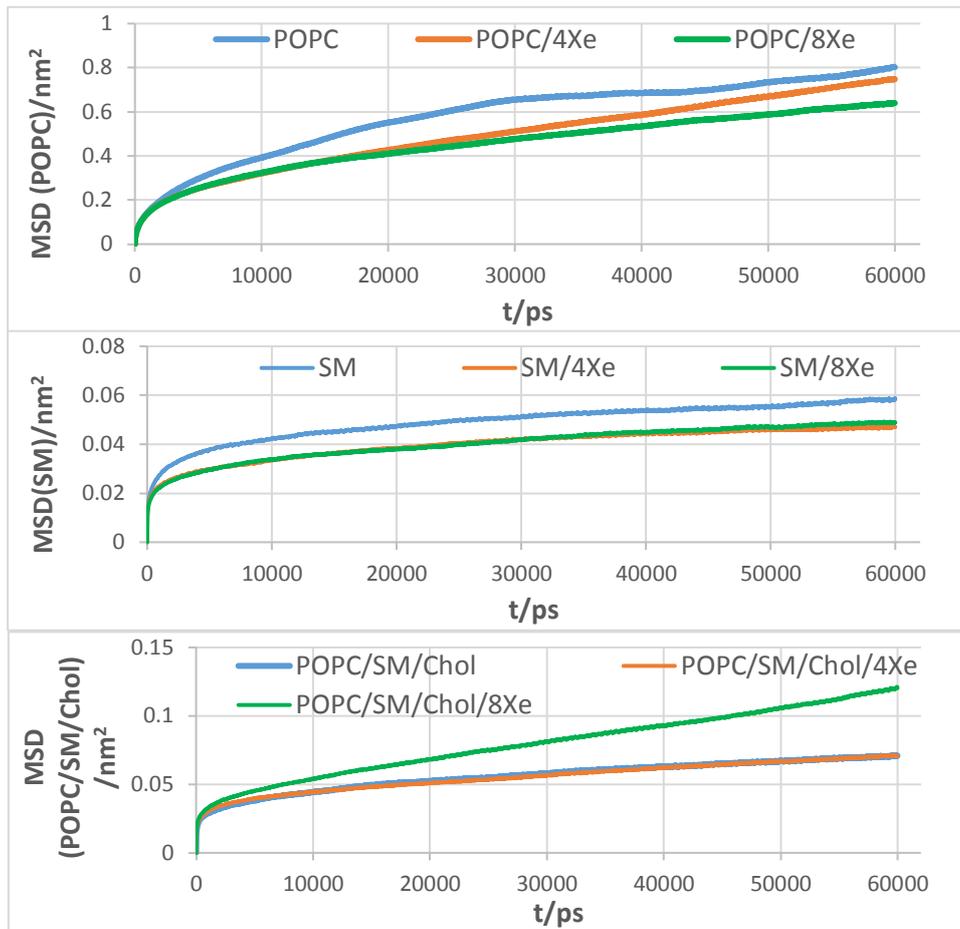


Figura 43: msd de POPC, SM e POPC/SM/Chol

5. Conclusão

É objetivo desta tese contribuir para a compreensão do comportamento das moléculas de xénon em interação com modelos de membranas. Observou-se que apesar de se encontrarem em concentrações baixas, as moléculas de xénon, induzem nas membranas alterações mensuráveis. Essas alterações são dependentes da composição membrana e da fase da própria membrana. De uma maneira geral o xénon induz um incremento na ordem de membranas mais fluidas e induz fluidização e desordem em membranas mais ordenadas.

Estas alterações, individualizadas, merecem agora um aprofundamento, principalmente ao nível do tipo e forma da interação do xenon com cada lípido, a sua proximidade e particularidades.

Bibliografia

- A.M.T., M. d., A.J., C., J.P., R., & Loura., L. (2013). Effect of Amphipathic HIV Fusion Inhibitor Peptides on POPC and POPC/Cholesterol Membrane Properties: A Molecular Simulation Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 14724-14743.
- Aittoniemi et al, J. (2007). Insight into the Putative Specific Interactions between Cholesterol, Sphingomyelin, and Palmitoyl-Oleoyl Phosphatidylcholine. *Biophys. J.*, Vol. 92, No. 4, pp. 1125–1137.
- Alder & Wainwright, B. J. (1959). Studies in Molecular Dynamics. 1.1 General Method. *J. Chem phys*, Vol. 31: 459 - 466.
- Allen & Tildesley, M. P. (1987). *Computer Simulation of Liquids*. England: Clarendon Press.
- Alves Branco, A. M. (2013). *Efeitos de Ocupação Molecular nas Propriedades Termotrópicas de diferentes Bicamadas Lipídicas*. Coimbra - Portugal: Universidade de Coimbra.
- Andrew, L. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications*. England: Pearson Education.
- António M.T.M.do Canto, Patrícia D. Santos, Jorge Martins, & Loura, L. M. (2014). Behavior of pyrene as a polarity probe in palmitoylsphingomyelin and palmitoylsphingomyelin/cholesterol bilayer: A molecular dynamics simulation study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 296 -306.
- Ben-Shaul, A. (1995. 361-362). *Chapter 7: Molecular Theory of Chain Packing, Elasticity and Lipid Protein Interaction in Lipid Bilayers*. Elsevier Science B.V.
- Berendsen et al, H. (1993). GROMACS: A parallel computer for molecular dynamics simulations. *Physics Computing 92*.
- Cantor, R. S. (2001). Breaking the Meyer-Overton Rule: Predicted Effects of Varying Stiffness and Interfacial Activity on the Intrinsic Potency of Anesthetics. *Biophysical Journal*, Vol. 80: 2284 –2297.
- Chinellato, D. D. (2003). *Dinâmica Molecular de Nanoosciladores Mecânicos Baseados em Nanotubos de Carbono*. UNICAMP, Campinas, SP: Relatório parcial de Progresso.
- Dales, R. &. (2012). *Pharmacology*. Elsevier, London: 7th.
- Dickson et al, C. J. (2012). GAFFlipid: a General Amber Force Field for the accurate molecular dynamics simulation of phospholipid. *Soft Matter*, 8: 9617.

- E. Gorter, F. G. (1925). On biomolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med*, 41: 439-443.
- Ecem Esencan, S. Y. (2013). XENON in medical area: emphasis on neuroprotection in hypoxia and anesthesia. *Medical Gas Research*, 3:4.
- Feller et al, S. E. (1997). Molecular Dynamics Simulation of Unsaturated Lipid Bilayers at Low Hydration: Parameterization and Comparison with Diffraction Studies. *Biophysical Journal*, Vol.73: 2269-2279.
- Fernandes Mendes F., W. G. (2003). Xenônio: Farmacologia e Uso Clínico. *Artigo de Revisão*, 52, 535-542.
- Figueira Paiva, J. G. (2010). *Interação entre anestésicos e sistemas biomembranares modelo*. Universidade Técnica de Lisboa: Saramago, B. J. V and Amadeu do Serro, A. P. V.
- Frenkel, D. B. (2002). *Understanding Molecular Simulations: from Algorithms to Applications*. Academic Press, London: 2nd edn.
- Gennis, R. B. (1988). *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. New York: Springer-Verlag.
- H. Flyvbjerg, H. P. (1989). Error estimates on averages of correlated data. *The Journal of Chemical Physics*, 91: 461-466.
- Harder, T. a. (1997). Caveolae, DIGS, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 9:534-542.
- Harvey R.P., B. F. (2007). Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. *Williams & Wilkins*.
- Heimburg, T. (2007). *Thermal Biophysics of Membranes*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Obtido de https://www.wiley-vch.de/books/sample/3527404716_c01.pdf
- Hess et al. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem*, 18:1463-1472.
- Hess, B. D. (2010). Gromacs: User Manual Version 4.5.4. *Gromacs*.
- Hironori Tsuchiya, M. M. (2008). Membrane interactivity of charged local anesthetic derivative and stereoselectivity in membrane interaction of local anesthetic enantiomers. *Local and Regional Anesthesia*, 1-9.
- Hofsass et al, C. (2003). Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. *Biophys J.*, 84 : 2192-2206.
- Holtje et al, M. (2001). Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol. *BBA-Biomembranes*, 1511: 156-167.
- Katz, Y. (1994). Anesthesia and the Meyer-Overton Rule. 1. Potencies and Perturbations. *J. Theor Biol*, 167: 93-97.

- Kechuan Tu, M. T. (1998). Effects of Anesthetics on the Structure of a Phospholipid Bilayer: Molecular Dynamics Investigation of Halothane in the Hydrated Liquid Crystal Phase of Dipalmitoylphosphatidylcholin. *Biophysical Journal*, 75, 2123–2134.
- Lakowicz, J. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy, second ed.* Dordrecht/New York: Kluwer/Plenum Press.
- Laurence L. Brunton, J. S. (2006). *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGrawHill: 11^a edição.
- Leach, R. (2001). *Molecular Modeling: Principles and applications 2nd ed.* England: Pearson-Prentice Hall.
- Lorna M. Stimson, I. V. (2005). Exploring the Effect of Xenon on Biomembranes. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10, 563-569.
- Luís M. S. Loura, António M. T. Martins do Canto, & Martins, J. (2012). Sensing hydration and behavior of pyrene in POPC and POPC/cholesterol bilayers: A molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1094 - 1101.
- Lynch C., B. J. (2000). Xenon anesthesia. *Anesthesiology*, 92: 865-870.
- Mahalka, A. K. (2013). *Control of Protein Oligomerization and Deoligomerization on Lipid Membranes*. Finland: Aalto University.
- Marrink S. J., H. J. (2007). The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B.*, Vol. 111, No. 27, pp. 7812–7824.
- Martins do Canto, A. (2007). *Tese: Estudo Teórico da Estrutura e Dinâmica de Péptido Inibidores da Fusão do HIV em água e membranas Biológicas*.
- Metzler, D. E. (2003). *Biochemistry: The Chemical Reaction of Living Cells*. London: Elsevier Academic Press.
- Monné, H. M.-S. (2010). *Theoretical Study of Phospholipid Membranes: the Complex Role of Cholesterol and Lipid Unsaturation*. Universitat de Barcelona: Facultat de Química.
- Moreira, C. (2014). Membrana celular. *Revista de Ciência Elementar*, Volume 2.
- Niemelä, P. (2007). *COMPUTATIONAL MODELLING OF LIPID BILAYERS WITH SPHINGOMYELIN AND STEROLS*. Finland: HELSINKI INSTITUTE OF PHYSICS INTERNAL REPORT SERIES.
- Nuno Santos Carvalho, P. P. (2008). Primeira Anestesia em Portugal com LENOXe - Xénon 100% nos HUC.
- Oren M. Becker, A. D. (2001). *Computational Biochemistry and Biophysics*. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Popescu, V. R. (2008). *Integrated Molecular and Cellular Biophysic*. Springer.
- Ricardo Morais, L. A. (2014). Como Funciona o Xénon: Mecanismo de Neuro e Cardioprotecção. *Acta Med Port*, 27, 259-265.
- Robalo et al, J. R. (2013). BEHAVIOR OF FLUORESCENT CHOLESTEROL ANALOGUES DEHYDROERGOSTEROL AND CHOLESTATRIENOL IN LIPID BILAYERS: A MOLECULAR DYNAMICS STUDY. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 117, 5806 - 5819.
- Robalo, J. R. (2013). Behavior of Fluorescent Cholesterol Analogues Dehydroergosterol and Cholestatrienol in Lipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical chemistry*, 117: 5806-5819.
- Ronald, D. M. (2011). *BASICS OF ANESTHESIA*. California - USA: Elsevier Saunders.
- Ryhänen, S. (2006). *Biophysical Studies on Cationic Liposomes*. Helsinki: University of Helsinki, Finland.
- Santos, S. I. (2010). *Cinética e Termodinâmica da Interação de Anfifilas Fluorescentes com Bicamadas Lipídicas na fase Líquido-Ordenado*. Coimbra - Portugal: Universidade de Coimbra.
- Satyvani Vemparala, L. S. (2006). Partitioning of Anesthetics into a Lipid Bilayer and their Interaction with Membrane-Bound Peptide Bundles. *Biophysical Journal*, 91, 2815-2825.
- Schlick, T. (2010). *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. Springer: 2nd edition.
- Simões, M. d. (1989). Química e Saúde: Anestésicos. *Boletim SPQ*, 35, 29-32.
- Teles Martins, P. A. (2013). *PASSIVE PERMEATION ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER: KINETICS AND THERMODYNAMICS OF CHLORPROMAZINE INTERACTION WITH LIPID BILAYERS REPRESENTATIVE OF ENDOTHELIAL CELL MEMBRANES*. Coimbra: Maria João Pedrosa Moreno Silvestre and Winchil Luís Cláudio Vaz.
- Urban, B. W. (2006). Interactions of anesthetics with their targets: Non-specific, specific or both? *Pharmacology & Therapeutics (ELSEVIER)*, 729-770.
- Van der Spoel & Lindahl, B. H. (2010). *Gromacs: user Manual Version 4.5.4*. Netherland.
- van Gunsteren et al, J. (1981). *Interaction models for water in relation to protein hydration*. Reidel Publishing Company, Dordrecht.
- Vaz, W. (2008). *Properties of Lipid Bilayers*. Wiley Encyclopedia of Chemical: John Wiley & Sons, Inc.
- Veiga et al, S. (2004). Putative role of membranes in the HIV fusion inhibitor enfuvirtide mode of action at the molecular level. *Biochem J*, 377:107-110.

Yeagle, P. L. (2004). *The Structure of Biological Membranes*. CRC Press.

Zoe Cournia, G. M. (2007). Differential Effects of Cholesterol, Ergosterol and Lanosterol on a Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Membrane: A Molecular Dynamics Simulation Study. *American Chemical Society*, 111, 1786 - 1801.