



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Guilherme de Matos Simões

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DA
RODAMINA B COM SISTEMAS MODELO DE
MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

Dissertação no âmbito do mestrado em Bioquímica, orientada pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e apresentada ao departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Luís Loura, por todo o apoio e paciência ao longo dos últimos meses. Gostaria também de agradecer ao Prof. João Paulo Ramalho (Departamento de Química, Universidade de Évora), por ter tratado dos cálculos físicos associados a este projeto e ao Alexandre Oliveira (Centro de Química de Coimbra) por me ter orientado na parte inicial do meu trabalho. Aprendi imenso com todos e agradeço toda a vossa disponibilidade neste percurso. A vocês, o meu mais sincero agradecimento.

À minha família, por nunca deixarem de acreditar em mim. Aos meus pais, por todo o apoio, pela comida caseira, por compreenderem cada passo do meu percurso. Aos meus irmãos, por serem os meus mini-génios e por me deixarem orgulhoso do quanto cresceram e dos adultos que se tornaram.

Aos amigos, que apesar de saberem de tudo o que se passava, nunca deixaram de me apoiar. Ao tampas, pelas noites de jogos, pelos cajus salgados e por estares cá desde sempre. À Ana Rita, por me acolheres sempre em tua casa, pelas sebatas que continuaram até agora, pela ajuda e apoio.

Aos meus afilhados, aos amigos de Coimbra e aos que a universidade me deu.

A todos vocês, o mais sincero obrigado. Sem o vosso apoio não existiria tese.

Neste trabalho foram utilizados recursos computacionais da plataforma BOB@MACC fornecidos pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I. P. (projeto CPCA/A2/7181/2020) e da plataforma Navigator, concedidos pelo Laboratório de Computação Avançada da Universidade de Coimbra (<https://www.uc.pt/lca>). Agradeço também pelo acesso a tais recursos sem os quais este trabalho não seria possível.

Resumo

A rodamina B (RhB) é um corante fluorescente pertencente à família dos xantenos. Dependendo do pH e das propriedades do solvente onde está inserida, esta pode assumir três formas moleculares: catiónica, zwitteriônica e lactônica. Devido às suas excelentes propriedades fotofísicas, tais como um elevado rendimento quântico de fluorescência, elevada fotoestabilidade e elevados comprimentos de onda de excitação, a RhB é frequentemente usada como sonda fluorescente. No entanto, inerente ao correto funcionamento da sonda, está a sua capacidade de particionar para a membrana, que pode ser definida como o seu coeficiente de partição membrana/água. Em trabalhos anteriores verificou-se que este era superior na RhB em três ordens de grandeza quando comparando com a rodamina 123 (Rh123), apesar de apresentarem estruturas semelhantes. Além disso, a informação fornecida por qualquer sonda fluorescente, está dependente da sua localização, orientação e perturbação causada na membrana, parâmetros complicados de medir experimentalmente. Para tal, o uso de simulações de dinâmica molecular (MD) demonstra-se vantajoso pois analisa tais parâmetros, permitindo perceber a sua relação com a estrutura da molécula em causa. Assim no presente trabalho, foram simuladas, recorrendo a simulações de MD, as três formas moleculares da RhB. Pela análise dos resultados pôde-se concluir que a RhB (lactona) de RhB preferiu localizações mais internas na bicamada e obteve um menor valor da barreira energética de translocação, impondo-se como a forma mais lipofílica das três. Por outro lado, a forma zwitteriônica apesar de possuir carga elétrica global nula, foi a que apresentou um comportamento mais polar, estabelecendo o maior número de ligações de hidrogénio com moléculas de água e destabilizando em maior grau a ordem da bicamada lipídica. Além disso, a interpretação dos resultados obtidos permitiu também confirmar que a RhB, quando comparada com a Rh123, apresenta maior facilidade de translocação na membrana.

Palavras-chave: Rodamina B, Dinâmica Molecular, POPC

Abstract

Rhodamine B (RhB) is a fluorescent dye that belongs to the Xanthene family. According to the pH and properties of the solvent RhB can adopt three different molecular forms: cationic, zwitterionic and lactonic. Due to its remarkable photostability and photophysical properties such as high fluorescence quantum yield and greater excitation wavelength, RhB is commonly used as a fluorescent probe. However, inherent to the correct functioning of the probe is its ability to partition into the membrane. This can easily be defined as the membrane/water partition coefficient of certain molecule. Former works have shown that, even though its structures are very similar, RhB membrane/water partition coefficient is superior by three orders of magnitude to that of Rh123. In addition, probe derived information is strongly affected by its location and orientation within the membrane, as well as the degree of perturbation caused by Rh translocation on the lipids, all these very hard to test experimentally. For that, the use of molecular dynamics simulations proves to be a reliable and powerful technique that is able to analyse these parameters and thus allows to understand their relations with the study molecules structure. So in this present work, the three molecular forms of RhB were simulated computationally resorting to MD simulations. Results obtained, demonstrate that RhB (lactonic) preferred deeper locations within the membrane and obtained the lowest translocation barrier value consequently suggesting this form as the most lipophilic one. On the other hand, RhB (zwitterionic), while possessing a net charge of zero, established the highest number of H bonds and perturbed the most membrane lipids, therefore behaving as the most polar form. Lastly, these results agree with the experimental observations regarding the partition coefficient of RhB and Rh123, confirming the former's greater ease regarding membrane translocation.

Keywords: Rhodamine B, Molecular Dynamics, POPC

Lista de Abreviaturas

COM – centro de massa

PMF – potencial de força média

POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina

Rh – Rodamina

Rh123 – Rodamina 123

Rh123 (+1) – forma ionizada da Rodamina 123

Rh123 (0) – forma neutra da Rodamina 123

RhB – Rodamina B

RhB (catião) – forma molecular catiónica da Rodamina B

RhB (lactona) – forma molecular lactónica da Rodamina B

RhB (zwitterião) – forma molecular zwitteriónica da Rodamina B

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas moleculares do xanteno (A) e das RhS (B). (Beija et al., 2009)	6
Figura 2. Estruturas moleculares da RhB (catião) (A), RhB (zwitterião) (B) e RhB (lactona) (C). O eixo longo da molécula está representado pela seta azul; o eixo curto está representado pela seta verde.	9
Figura 3. Estruturas moleculares da Rh123 (0) (A) e da Rh123 (+1) (B). O eixo longo da molécula está representado pela seta vermelha; o eixo curto está representado pela seta verde. (Magalhães et al., 2018)	10
Figura 4. Representação bidimensional das condições de fronteira periódicas. A cela central (preenchida a amarelo) representa a caixa de simulação. Os círculos coloridos representam as partículas do sistema e os círculos vazios representam a sua imagem periódica noutras células. As setas representam o movimento de duas partículas próximas dos limites. Assim que uma sai da caixa, entra a sua imagem pelo lado oposto da caixa. (Katiyar & Jha, 2018).....	14
Figura 5. Representação da molécula de 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) com diferentes níveis de detalhe. Representação do POPC atomística (A); átomos de hidrogénio, branco; átomos de carbono, amarelo; átomos de oxigénio, vermelho; átomos de azoto, azul; átomos de fósforo, castanho. Representação United-atom do POPC (B); moléculas de CH ₂ , amarelo; átomos de oxigénio, vermelho; átomos de azoto, azul; átomos de fósforo, castanho. Representação Coarse-Grained do POPC (C); cadeias acil, amarelo; glicerol, rosa; fosfato, castanho; colina, azul. (Cascella & Vanni, 2015).....	15
Figura 6. Comparação entre a média dos ângulos (A) ou diedros impróprios (B) ao longo da simulação (média - representado a azul), os valores gerados pelo servidor ATB (itp values – representado a vermelho) e os valores de referência obtidos com recurso a cálculos quânticos (opt – representado a verde) para a RhB (lactona) da RhB. Os números do eixo das abcissas correspondem aos índices atómicos da Fig. 1.....	25
Figura 7. Comparação entre a média dos ângulos (A) ou diedros impróprios (B) ao longo da simulação (média - representado a azul), os valores gerados pelo servidor ATB (itp values – representado a vermelho) e os valores de referência obtidos com recurso a cálculos quânticos (opt – representado a verde) para a forma zwitteriônica da RhB. Os números do eixo das abcissas correspondem aos índices atómicos da Fig. 1.....	26
Figura 8. Comparação entre a média dos ângulos (A) ou diedros impróprios (B) ao longo da simulação (média - representado a azul), os valores gerados pelo servidor ATB (itp values – representado a vermelho) e os valores de referência obtidos com recurso a cálculos quânticos (opt – representado a verde) para a RhB (catião) da RhB. Os números do eixo das abcissas correspondem aos índices atómicos da Figura 2	27
Figura 9. Configurações finais das simulações contendo a RhB (zwitterião) (A-C), RhB (Lactona) (D-F) ou RhB (Catião) (G-I) representadas com linhas mais espessas. Os átomos de C, O, N, H e P estão representados por azul ciano, vermelho, azul, branco e bronze, respetivamente.	28
Figura 10. Variação temporal do COM das quatro moléculas de Rh de cada simulação (representadas a cinzento, amarelo, azul e verde) em relação ao COM da bicamada (representado a vermelho. O gráfico A diz respeito à RhB (Catião), o gráfico B à RhB (Zwitterião) e o gráfico C à RhB (Lactona).....	30

Figura 11. Variação temporal do COM das quatro moléculas de Rh de cada simulação (representadas a cinzento, amarelo, azul e verde) em relação ao COM da bicamada (representado a vermelho. O gráfico A e B dizem respeito à RhB (Catião), o gráfico C e D à RhB (Zwitterião) e o gráfico E e F à RhB (Lactona).	32
Figura 12. Distribuição dos perfis de densidade do POPC, preto; água, cinzento; RhB (Lactona), amarelo; RhB (Zwitterião), verde; ; RhB (Catião), azul ao longo da normal ao plano da bicamada. Para cada corrida de cada forma molecular da RhB foram calculados os perfis de densidade, multiplicados por 16, para se visualizarem melhor e partindo destes foi feita a média para cada forma para se poder fazer uma comparação direta entre as formas.....	34
Figura 13. Representação gráfica da área por lípido numa membrana apenas com POPC, preto e numa membrana com RhB (Catião), RhB (Zwitterião) e RhB (Lactona), azul, verde e amarelo, respectivamente. Os valores aqui demonstrados obtiveram-se a partir da média das três corridas de cada forma molecular da RhB .	35
Figura 14. Posições transversais médias de átomos característicos do POPC, e das três formas moleculares da RhB.....	36
Figura 15. Distribuições das orientações angulares do eixo longo (A) e curto (B) relativamente à normal ao plano da bicamada.....	39
Figura 16. Frequências médias de ligações de hidrogénio envolvendo átomos de Rhb. O painel A diz respeito à molécula de RhB (Catião) como dador e o painel B diz respeito às ligações de hidrogénio feitas com a água como dadora de protões e as Rhs como aceitantes. Todos os valores estão normalizados de modo a que se a frequência traduza o número de ligações por átomo envolvido.	41
Figura 17. Parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-1 (A) e sn-2 (B) de POPC. .	43
Figura 18. Distribuição dos ângulos entre o eixo P-N da molécula de POPC e a normal à bicamada em POPC puro e após inserção de moléculas de Rh.....	45
Figura 19. Perfis das PMFs das duas espécies de Rhs em estudo: RhB (painél A) e Rh123 (painél B). Os perfis aqui demonstrados foram obtidos descartando os primeiros 20 ns da análise.	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Coeficientes de partição POPC/água “normalizados” obtidos através de experiências de espectroscopia de fluorescência e de simulações de MD.....	63
--	----

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	IV
Abstract	VI
Lista de Abreviaturas	VIII
Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas.....	XI
1. Introdução	1
1.1. Membranas Biológicas.....	1
1.1.1. Breve Perspetiva Histórica.....	1
1.1.2. Estrutura e Composição da Membrana Celular	2
1.1.3. Permeação de Membranas Celulares.....	3
1.2. Sondas Fluorescentes	5
1.2.1. Corantes Xanténicos.....	6
1.2.2. Vantagens das Rodaminas como Sondas Fluorescentes	7
1.2.3. Rodamina B.....	8
1.2.4. Rodamina B e Rodamina 123	9
1.3. Dinâmica Molecular	11
1.3.1. Fundamentos da Dinâmica Molecular.....	11
1.3.2. Simulações de MD com membranas	16
2. Métodos.....	18
2.1. Plano de Trabalhos.....	18
2.2. Preparação das Simulações	19
2.3. Detalhes das Simulações	20
2.4. Análise das Simulações.....	21
2.4.1. Em Água	21
2.4.2. Em Membrana.....	22
3. Resultados e Discussão	24
3.1. Análise das Simulações em Água.....	24
3.2. Análise das Simulações em Membrana.....	28
3.2.1. Snapshots Finais das Simulações.....	28
3.2.2. Variação Temporal do Centro de Massa	30
3.2.3. Perfis de Densidade	34
3.2.4. Área por Lípido.....	35
3.2.5. Localização Atómica	36

3.2.6. Orientação	39
3.2.7. Ligações de Hidrogénio.....	41
3.2.8. Parâmetros de Ordem Lipídicos	43
3.2.9. Eixo Fosfato-Colina.....	45
3.2.10. Perfis de Energia Livre	47
4. Conclusão	51
Referências.....	54
Anexos.....	61

1. Introdução

1.1. Membranas Biológicas

A membrana celular é composta por uma bicamada lipídica, diversas proteínas e carboidratos. Ela rodeia todo o conteúdo celular desempenhando assim um papel vital em todas as células, procariotas e eucariotas (Enkavi et al., 2019). A membrana celular não só separa o meio intracelular do meio extracelular como também apresenta permeabilidade seletiva, mediando o transporte de moléculas para dentro ou fora da célula, é responsável por emitir sinais para o meio extracelular assim como de receber sinais externos e tem também um papel relevante em certas vias metabólicas.

1.1.1. Breve Perspetiva Histórica

A importância da membrana celular atualmente é um facto incontestável. No entanto, no passado a sua estrutura e importância eram um tema que gerou diversos debates e controvérsias (Lombard, 2014).

Em 1839, Schwann e Schleiden propuseram a teoria celular, a qual derivou de observação de células vegetais, e que sugeria que todos os seres vivos são constituídos por uma ou mais células e que estas têm a capacidade de se originarem a partir de células pre-existentes (Schwann, 1993). Além disso, os autores sugeriram que teria de existir uma espécie de camada que separasse não só a célula do exterior como também delimitasse certos compartimentos celulares e que esta teria uma grande importância na criação de novas células a partir de células pré-existentes (Schwann, 1993). No entanto é de lembrar que na altura a distinção entre membrana celular e parede celular era impossível, pelo que Schwann e Schleiden terão observado a parede celular de células vegetais e a falta de um equivalente nas células animais levou muitos dos seus contemporâneos a assumir que tal membrana não seria uma característica obrigatória para as células (Lombard, 2014). Esta ideia manteve-se até ao final do século XIX, quando trabalhos de Overton, Chamber e Hober sugeriram a existência de uma camada lipídica com permeabilidade seletiva que teria de ser diferente do meio intracelular, pois reagia de forma diferente do protoplasma em resposta a certas

moléculas ou estímulos e apresentava uma permeabilidade diferente para moléculas polares e apolares (Chambers, 1922; Kleinzeller, 1999; Pethig & Ilka, 2012). Mais tarde, em 1925 Gorter e Grendel propuseram um modelo em que fosfolípidos adotam uma organização em bicamada, tendo a parte polar orientada para o meio aquoso e uma parte apolar orientada para o centro da bicamada (Gorter & Grendel, 1925). Estes estudos revelaram-se importantes pois impulsionaram o estudo mais aprofundado da estrutura da membrana durante os anos seguintes (Lombard, 2014).

Descobriu-se que as membranas continham quantidades substanciais de proteína, mas não se sabia a sua posição exata, pelo que Danielli e Davson, em 1935, sugeriram um modelo da membrana em que a bicamada lipídica está entre duas camadas externas de proteínas – modelo paucimolecular (Danielli & Davson, 1935). Este modelo tornou-se o primeiro modelo a ser amplamente aceite e durante os 30 anos seguintes foi usado como base para diversos estudos de membranas celulares (Lombard, 2014).

Posteriormente, em 1972, Singer e Nicolson apresentaram o modelo do mosaico fluido, o qual criou uma enorme referência para a nossa compreensão atual das membranas biológicas e da sua fisiologia (Singer & Nicolson, 1972). Neste modelo, a estrutura básica da membrana é semelhante aos anteriores, sendo esta composta por uma bicamada de fosfolípidos com a porção hidrofílica orientada para o exterior e a porção hidrofóbica orientada para o centro da bicamada (Singer & Nicolson, 1972). Mas, além disso, este modelo tem em consideração a dinâmica existente nas interações de lípidos e proteínas (Morange, 2013). Algumas proteínas interagem com a superfície da bicamada, enquanto outras conseguem difundir-se livremente na estrutura fluida da membrana, estando totalmente ou parcialmente embebidas, consoante a sua hidrofobicidade (Nicolson, 2014). Os autores sugeriram que a distribuição das proteínas pela membrana era essencialmente aleatória (Singer, 1974). No entanto, estes autores assumiram a possibilidade de formação de microdomínios e ofereceram uma explicação para a assimetria entre as duas monocamadas (Singer, 1974). Desde a sua criação, este modelo tem sido modernizado com base em observações subsequentes, mas raramente foi alterado e continua a ser a hipótese que melhor explica as membranas biológicas (Lombard, 2014).

1.1.2. Estrutura e Composição da Membrana Celular

Os lípidos mais abundantes nas membranas biológicas são os glicerofosfolípidos, que são compostos por uma cabeça hidrofílica com um grupo fosfato e duas cadeias acilo ligadas à cabeça por uma molécula de glicerol (Harayama & Riezman, 2018). Sendo moléculas

anfipáticas, a exposição das cadeias hidrofóbicas à água não é energeticamente favorável, pelo que, devido ao efeito hidrofóbico, estas moléculas tendem a organizar-se e agregar-se de modo a impedir que as porções hidrofóbicas contactem com água e minimizar a energia livre do sistema (Engelman, 2005). A estrutura típica de agregação de lípidos é a micela, um complexo esférico com as cadeias hidrocarbonadas orientadas para o interior da esfera, onde só contactam com outras cadeias hidrofóbicas e a cabeça polar orientada para a fase aquosa (Maibaum et al., 2004). O principal fator que define o tipo de estrutura formada é a área de superfície relativa da porção hidrofílica e hidrofóbica da molécula. Quando a área das caudas apolares é muito menor do que a porção hidrofílica formam-se micelas pequenas com um grande grau de curvatura. Partindo daqui, quanto mais se for aproximando a área da porção hidrofóbica da área da cabeça polar maior será a micela e com uma menor curvatura. No caso dos glicerofosfolípidos, a área das duas porções é muito semelhante pelo que a estrutura que se demonstra mais energeticamente favorável é uma bicamada com cerca de 5 nm de espessura na qual os seus grupos fosfato estão orientados para o exterior e as cadeias hidrocarbonadas orientadas para o interior(Enkavi et al., 2019).

Além dos glicerofosfolípidos, que perfazem cerca de 70% dos lípidos membranares, a membrana contém também esfingolípidos e colesterol. Este último funciona como tampão para a fluidez da membrana, impedindo que a altas temperaturas a membrana se torne demasiado fluida e a baixas temperaturas que a membrana se torne demasiado rígida (Subczynski et al., 2017). É de referir que a principal função da porção lipídica da membrana é estrutural (Enkavi et al., 2019). No entanto existem, embebidas na membrana ou à sua superfície, proteínas que desempenham funções essenciais para a célula (Enkavi et al., 2019). Proteínas na superfície extracelular da membrana estão associadas a funções de sinalização e junção intracelular e a transdução de sinais externos, enquanto proteínas embebidas na membrana frequentemente atuam como canais e poros transportadores (Cournia et al., 2015). Domínios proteicos virados para o interior da célula desempenham funções enzimáticas essenciais para certos passos de vias metabólicas, servem como âncora para proteínas do citoesqueleto, e desencadeiam vias de sinalização intracelulares (Cournia et al., 2015).

1.1.3. Permeação de Membranas Celulares

A biodisponibilidade e farmacocinética de um medicamento está dependente tanto da sua capacidade de penetração através da membrana como também da atividade de proteínas de

efluxo que são responsáveis por expelir pequenas moléculas, nomeadamente fármacos, para o exterior das células (Abdallah et al., 2015; Konings & Poelarends, 2002). Além disso, moléculas como indicadores de concentrações iónicas, de pH, corantes fluorescentes, substratos enzimáticos fluorogénicos, inibidores de proteínas, que são muito úteis para investigação biológica necessitam também de permear a membrana para exercerem a sua função corretamente e podem também ser expelidas por proteínas de efluxo (Gautier & Hinner, 2015). A permeação da membrana celular é então, em muitos casos, o fator que determina se certa molécula poderá ou não ser utilizada com um propósito clínico ou como ferramenta de investigação.

Um dos mecanismos de transporte celular é a difusão simples. Neste as moléculas dissolvem-se do meio aquoso, difundem-se através desta, e voltam a dissolver-se no meio aquoso oposto (Stillwell, 2016). Este tipo de transporte não envolve gasto de energia por parte da célula nem qualquer tipo de proteína transportadora (Gautier & Hinner, 2015). Ao invés disso, depende exclusivamente do gradiente de concentração da molécula dentro e fora da membrana. As moléculas deslocar-se-ão sempre de um compartimento de maiores concentrações para um de menores concentrações (Stillwell, 2016).

Outro mecanismo, no qual a direção do movimento das moléculas depende também exclusivamente do seu gradiente de concentração é a difusão facilitada (Stillwell, 2016). A diferença para o mecanismo referido no parágrafo anterior é que neste caso há o envolvimento de proteínas membranares que podem ser proteínas carreadoras/de transporte ou canais (Gautier & Hinner, 2015). A principal diferença entre estes dois tipos de proteínas é que as proteínas canal são capazes de transportar um maior número de moléculas diferentes e estão sempre abertos, enquanto que as proteínas de transporte são mais específicas para certos iões ou moléculas e necessitam de alterar a sua conformação após ligação do substrato para o transportarem (Gautier & Hinner, 2015; Sugano et al., 2010).

Por fim, existe também o transporte ativo. Este mecanismo consiste no transportar de moléculas através da membrana contra o seu gradiente de concentração, ou seja de uma região em que a molécula está presente em baixas concentrações para uma região em que a sua concentração é maior (Stillwell, 2016). Para o fazer a célula necessita fornecer energia às proteínas transportadoras. Esta energia pode ser originada pela hidrólise de ATP, ou pode ser obtido pelo acoplamento com o transporte espontâneo de outra molécula. A molécula a ser acoplada a este mecanismo é transportada através da membrana a favor do seu gradiente

de concentração e a energia assim disponibilizada é usada para transportar a molécula alvo contra o seu gradiente de concentração (Stillwell, 2016).

Atualmente é globalmente aceite que o transporte de fármacos e de pequenas moléculas com interesse para investigação é feito principalmente por difusão passiva, o que se torna tanto mais facilitado quanto menor for a barreira energética associada ao passo limitante do processo, que frequentemente é a translocação de uma monocamada lipídica da membrana para a oposta (Di et al., 2012; Jing et al., 2009). Aqui o uso de simulações de dinâmica molecular tem grande relevância pois permite o cálculo dos perfis de energia livre das moléculas quando inseridas na membrana (Fogolari et al., 2018). Estes perfis traduzem-se na barreira energética associada à translocação de uma monocamada para a outra. O facto de poderem ser calculados inteiramente computacionalmente, permite que se possa prever se certa molécula terá maior ou menor facilidade em atravessar a membrana antes sequer de se realizar qualquer tipo de trabalho experimental.

1.2. Sondas Fluorescentes

Fluorescência é uma forma de emissão de luz exibida por algumas substâncias após absorção de radiação com um determinado comprimento de onda (Wagh, Maslivetc, Clair, et al., 2021). Técnicas baseadas nesta propriedade e moléculas fluorescentes têm sido utilizadas em diversas áreas das ciências da vida, desde a genómica, proteómica, diagnóstico médico, descoberta de fármacos, microscopia, espectroscopia, entre outros (Wagh, Maslivetc, la Clair, et al., 2021). Em comparação com outros métodos analíticos usados para a identificação e quantificação de espécies químicas, a fluorescência é uma técnica rápida, com alta sensibilidade, e necessita de baixas concentrações de moléculas repórter o que potencia o seu uso para visualização de processos bioquímicos em células e organismos vivos (Lakowicz, 2006).

A uma molécula que é capaz de alterar a sua fluorescência após ligação a um alvo específico, ou em resposta a uma reação química ou a uma mudança no ambiente que a rodeia chama-se de sonda fluorescente (Fu & Finney, 2018). No entanto, é de reparar que apenas o fluoróforo é responsável pela fluorescência da sonda, sendo em muitos casos este conjugado com moléculas que permitam à sonda ser seletiva por determinados tecidos ou moléculas (Wagh, Maslivetc, la Clair, et al., 2021; Wysocki & Lavis, 2011). Foi desta maneira que surgiu uma das primeiras sondas fluorescentes, a sonda de actina. Esta sonda é composta por um fluoróforo, a fluoresceína, um composto orgânico sintético produzido pela primeira em 1871

por von Bayer, conjugada com a toxina faloidina, isolada do cogumelo venenoso *Amanita phalloides*, que se liga fortemente e impede a despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto (Wieland, 1977; Ziarani et al., 2018). Assim, a sonda é capaz de ser seletiva e de imobilizar o alvo, permitindo, com auxílio de microscopia de fluorescência, detetar a fluorescência da fluoresceína e, portanto, visualizar a estrutura dos filamentos de actina (Wieland, 1977).

1.2.1. Corantes Xanténicos

O xanteno (Figura 1A) é um composto orgânico formado por três anéis aromáticos dispostos linearmente, com um átomo de oxigénio no anel central. Esta molécula é a base da família dos corantes xanténicos, e é a porção responsável pela sua fluorescência (Beija et al., 2009). Corantes como a fluoresceína, eosinas e rodaminas (Rhs) derivam desta molécula, sendo sempre compostos pelo núcleo xanténico, mas possuindo um número e tipo de grupos funcionais distintos (Figura 1B) (Beija et al., 2009; Licha & Resch-Genger, 2014).

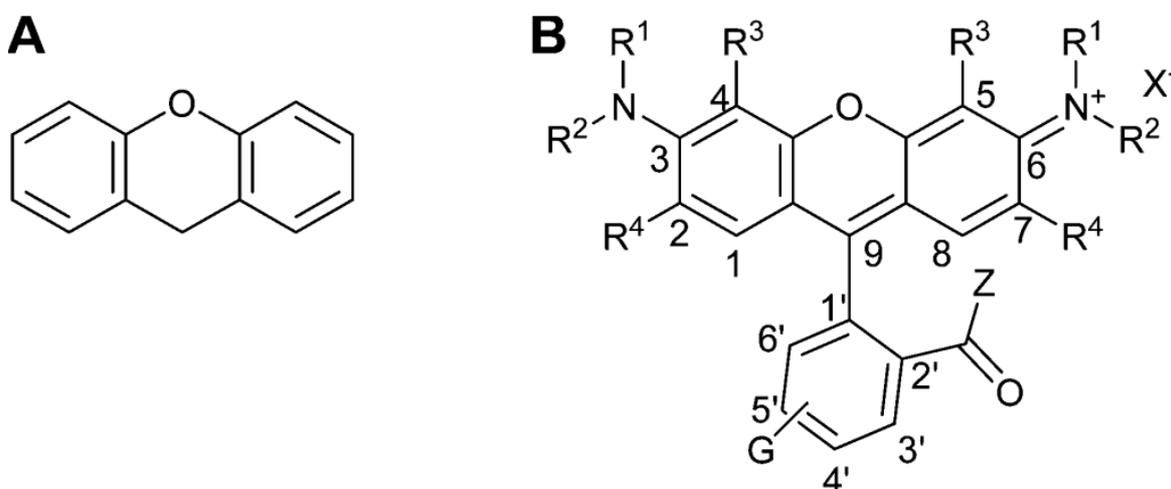


Figura 1. Estruturas moleculares do xanteno (A) e das Rhs (B). (Beija et al., 2009)

Devido à estrutura rígida destes anéis, os corantes xanténicos têm tipicamente um alto rendimento quântico de fluorescência (razão fotões emitidos/fotões absorvidos), um baixo desvio de Stokes (diferença entre os picos do espectro de absorção e de emissão) e um alto coeficiente de absorvidade molar (capacidade de uma molécula absorver radiação com um determinado comprimento de onda) (Licha & Resch-Genger, 2014). Assim nas últimas décadas, os corantes xanténicos têm sido alvo de grande interesse para diversas áreas, sendo utilizados como sondas e sensores fluorescentes para medir pH, concentração de iões metálicos, atividade de enzimas e espécies reativas de oxigénio, e tendo utilidade em técnicas

tais como PCR, PCR quantitativo, técnicas microscópicas para análise de células e citometria de fluxo (Licha & Resch-Genger, 2014).

1.2.2. Vantagens das Rodaminas como Sondas Fluorescentes

As Rhs são fluoróforos que pertencem à família dos xantenos. A sua estrutura base consiste na molécula de xanteno (Figura 1A), à qual se liga um anel benzoico e dois átomos de azoto (Figura 1B) (Beija et al., 2009). Exemplos de moléculas de Rh são a rodamina B, rodamina 6G, rodamina 123, que variam entre si consoante os grupos substituintes que possuem (Rajasekar, 2021). Estes grupos podem estar associados à molécula de xanteno, aos azotos ligados à mesma e ao anel benzoico e conferem a cada Rh propriedades distintas.

Elas são frequentemente utilizadas em investigação biológica como biomarcadores fluorescentes devido às suas excelentes propriedades óticas tais como um elevado rendimento quântico de fluorescência, elevada fotoestabilidade e maiores comprimentos de onda de excitação (Rajasekar, 2021). Esta última característica, que se deve às alterações à molécula base de xanteno, é especialmente relevante para o uso destas moléculas para imagiologia biológica. Tais alterações provocam um desvio do seu espectro de absorção e de emissão para comprimentos de onda maiores, pertencendo já à zona de radiação quase-infravermelha o que apresenta algumas vantagens significativas (Marshall et al., 2020). Nesta gama de comprimentos de onda os tecidos apresentam baixa absorvância, permitindo uma penetração mais profunda da radiação nos tecidos e uma menor autofluorescência dos tecidos circundantes ao mesmo tempo que evita os efeitos nefastos associados à radiação ionizante usada para imagiologia médica (Kosaka et al., 2009).

Tal como grande parte dos fluoróforos as moléculas de Rh raramente são usadas na sua forma livre. No entanto a síntese e purificação destes derivados é ainda pouco eficiente e muito dispendiosa (Fu & Finney, 2018). Apesar disso, dadas as características vantajosas das Rhs como sondas fluorescentes, nos últimos anos, a procura por novos derivados de Rhs e de novas técnicas para obter mais rendimento na sua síntese tem aumentado. Considerando que as Rhs ou derivados deverão ter de penetrar na membrana de modo a exercerem a sua função é importante também saber quais as interações entre estes e os lípidos da membrana (Filipe et al., 2020). Aqui técnicas de dinâmica molecular provam-se deveras úteis pois permitem, com custos relativamente reduzidos, estudar a localização e orientação da sonda na membrana, as interações sonda-membrana e também o nível de perturbação da membrana causado pela sonda (Filipe et al., 2020).

1.2.3. Rodamina B

Estruturalmente é composta por três anéis fundidos (núcleo xanténico) aos quais estão associados dois grupos etilo e um outro anel com um grupo funcional carboxílico, que pode apresentar diferentes estados de ionização. O pKa da RhB é cerca de 4 significando que abaixo de pH=4 a RhB adquire a sua RhB (catião) de carga global +1 (Figura 2A) e acima desse valor a molécula apresenta carga global 0 (Hinckley & Seybold, 1988; Yu et al., 2013). No entanto, com carga total 0, a molécula possui duas formas, o zwitterião (Figura 2B) e a lactona (Figura 1C), cujo equilíbrio entre as duas está dependente da temperatura e do solvente em que estão inseridas (Hinckley & Seybold, 1988; Yu et al., 2013). A forma zwitteriônica é favorecida por solventes polares próticos (possuem ligações O-H ou N-H, sendo capazes de participar em ligações de hidrogénio), enquanto que a RhB (lactona) domina em solventes não polares ou solventes polares apróticos, significando, potencialmente que esta forma molecular prefira ambientes mais hidrofóbicos na membrana (Karpiuk et al., 1994). A diferença a nível estrutural entre estas duas formas é que no zwitterião, apesar de a molécula apresentar carga geral neutra, há separação de cargas enquanto que na lactona há a formação de um anel adicional que evita a separação das cargas. Este anel

quebra a ressonância, conduzindo a absorção no ultra-violeta e a valores muito reduzidos de rendimento quântico de fluorescência (Beija et al., 2009).

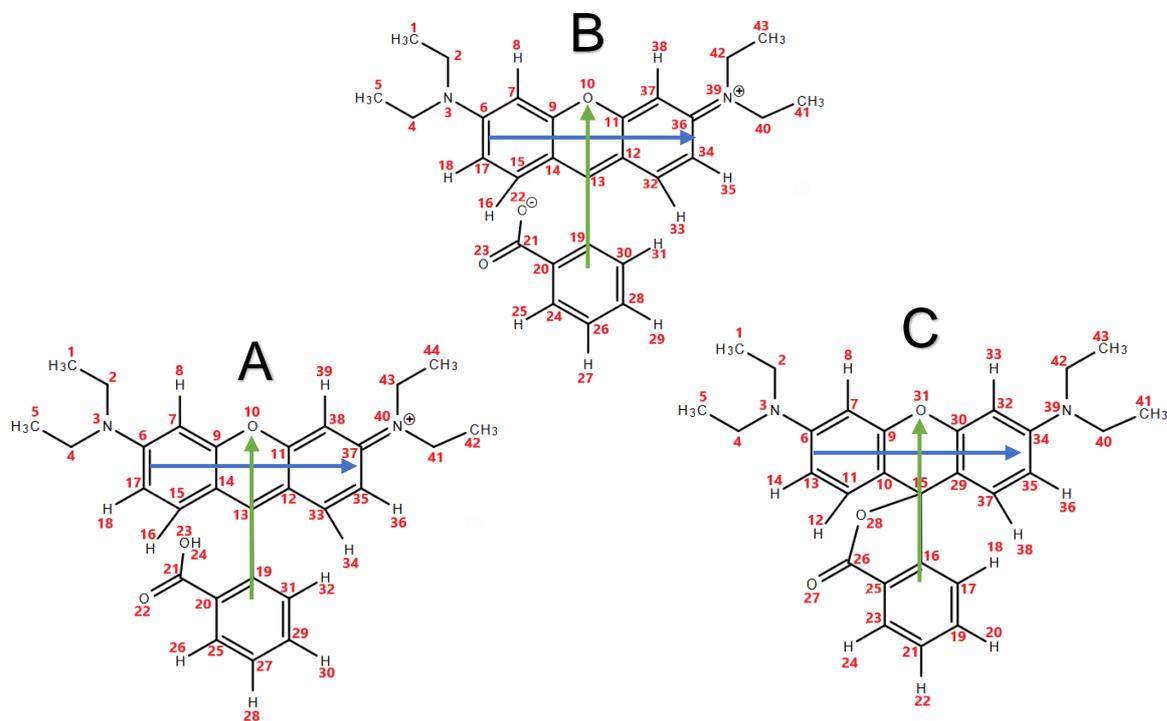


Figura 2. Estruturas moleculares da RhB (catião) (A), RhB (zwitterião) (B) e RhB (lactona) (C). O eixo longo da molécula está representado pela seta azul; o eixo curto está representado pela seta verde.

Estas diferenças a nível estrutural resultam em formas com polaridades diferentes, o catião será a forma mais polar pois tem carga = +1, o zwitterion terá uma polaridade intermédia e a lactona será das três formas a menos polar pois não tem separação de cargas.

Visto que as moléculas serão inseridas na membrana, composta por moléculas anfipáticas, será interessante observar as diferenças que há quanto à interação das três formas com os lípidos da membrana. Espera-se por exemplo que a lactona sendo uma molécula menos polar prefira localizações mais perto do centro da membrana (parte apolar) do que as duas outras formas. Além disso espera-se que as moléculas tenham orientações diferentes e que afetem de maneira diferente os lípidos da membrana.

1.2.4. Rodamina B e Rodamina 123

Outro ponto de interesse para se estudar a RhB surgiu quando, em trabalhos experimentais anteriores do grupo de química biológica do Centro de Química de Coimbra, se verificou que o coeficiente de partição (K_p) membrana-água desta molécula

($K_p = (1,10 \pm 0,06) \times 10^5$) era significativamente superior ao de moléculas fluorescentes com estruturas semelhantes (Moreno, M.J. comunicação pessoal). O coeficiente de partição traduz a razão entre as concentrações de uma substância dissolvida num sistema de duas fases, neste caso membrana e água e é definido por $K_p = [Rh]_l / [Rh]_w$ onde $[Rh]_l$ and $[Rh]_w$ representam a concentração da sonda na fase lipídica e aquosa, respectivamente.

Maiores valores deste coeficiente indicarão, portanto, que a molécula é mais hidrofóbica, que prefere a membrana à água. Durante as experiências realizadas anteriormente, o grupo verificou que a RhB apresentava a maior partição para a membrana entre diversas moléculas fluorescentes, entre elas a Rh123 (Figura 3; $K_p = (1,0 \pm 0,2) \times 10^3$), que o grupo já simulou previamente em membrana (Magalhães et al., 2018). O coeficiente de partição de RhB apresenta uma diferença de cerca de 3 ordens e grandeza em comparação com o da Rh123 apesar de as moléculas apresentarem estruturas semelhantes.

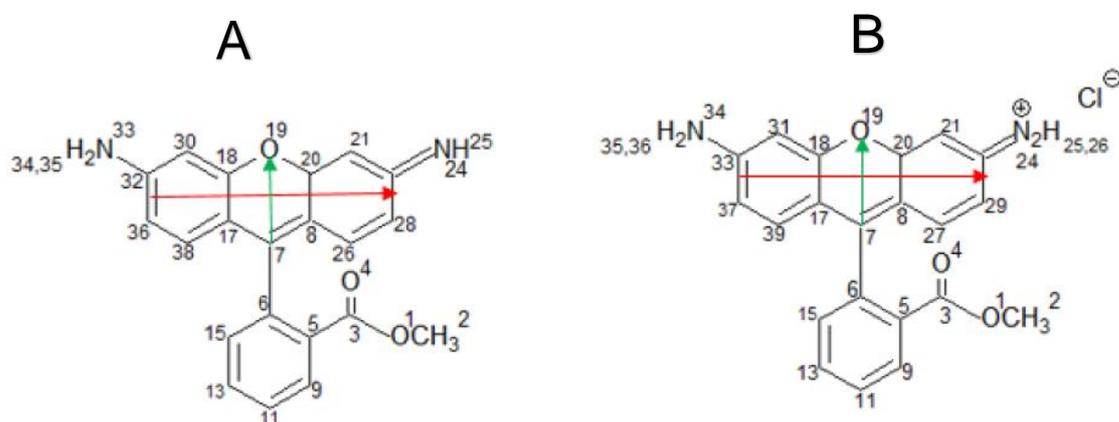


Figura 3. Estruturas moleculares da Rh123 (0) (A) e da Rh123 (+1) (B). O eixo longo da molécula está representado pela seta vermelha; o eixo curto está representado pela seta verde. (Magalhães et al., 2018)

Há duas diferenças estruturais relevantes entre as duas moléculas de Rh. Associado ao núcleo Xanténico, a RhB tem dois substituintes etilo, enquanto a Rh123 tem hidrogénios o que indicaria a RhB como mais hidrofóbica. No entanto, associado ao anel benzoico, a RhB tem o ácido carboxílico ionizável, enquanto que na Rh123 ele está esterificado com um grupo metilo, o que, por si só, sugeriria a 123 como mais hidrofóbica

Uma diferença entre estas duas moléculas que pode ajudar a explicar a disparidade entre os coeficientes de partição é o seu pK_a . A RhB, como referido anteriormente, tem um $pK_a=4$ enquanto que a Rh123 tem $pK_a=6$ (Wang et al., 2014). Isto significa que a pH neutro a RhB adquire as formas neutras de uma maneira estável, enquanto que a Rh123 pode oscilar entre a sua RhB (catião) e neutra, podendo alterar por completo a sua partição para a membrana. Sendo assim, o presente trabalho terá interesse como complemento a estes trabalhos

anteriores, permitindo que se entenda se de facto esta diferença de pK_a é suficiente para explicar esta diferença tão notável no coeficiente de partição, e também que outros fatores poderão estar por detrás de tal diferença.

1.3. Dinâmica Molecular

A vida tal como a conhecemos depende de uma série de processos e cadeias a nível molecular. O estudo destes processos tem sido maioritariamente feito experimentalmente, usando técnicas *in vivo* e *in vitro*. No entanto todo o conhecimento que descobrimos parte de teorias e hipóteses que se criam a partir de observações e estudos anteriores. O método científico é então um método de tentativa e erro, é necessário errar para refutar uma hipótese, sendo por isso também muito dispendioso investigar certos sistemas biológicos. Assim sendo, o uso de técnicas computacionais que complementem ou até que substituam algumas técnicas experimentais mostra-se uma ferramenta de grande valor. O aumento exponencial do poder computacional ao longo das últimas décadas contribuiu para que simulações de sistemas biológicos alcançasse um nível de detalhe e de qualidade que permite recriar com precisão a complexidade e natureza dinâmica dos mesmos. Consequentemente tais técnicas podem, sem gasto de bens materiais, testar e excluir hipóteses, poupando tempo e dinheiro para futuros estudos experimentais.

1.3.1. Fundamentos da Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular consiste numa técnica de simulação computacional que é capaz de, partindo de um determinado sistema, calcular o movimento e interações de todas as partículas do mesmo e a sua evolução ao longo de um determinado período de tempo (Roy et al., 2015). Este tipo de simulações pode também fornecer informação sobre a cinética molecular e termodinâmica das partículas e do sistema em que estão inseridas (Roy et al., 2015). Os requisitos base para uma simulação de MD envolvem definir as posições, velocidade e carga inicial de cada partícula assim como as forças intra e intermoleculares. De seguida, uma série de equações de movimento de Newton é aplicada de modo a prever a evolução do sistema ao longo do tempo.

Em dinâmica molecular todos os átomos são tratados como partículas clássicas. As interações atómicas entre eles podem ser divididas em interações ligantes e interações não ligantes. As interações ligantes dizem respeito às ligações, ângulos, diedros próprios e diedros

impróprios entre átomos que têm ligações covalentes entre eles e são calculadas através da adição dos termos energéticos respetivos:

$$E_B = \sum_{\text{ligações}} \frac{1}{4} K_b (b^2 - b_0^2)^2 \quad (1)$$

$$+ \sum_{\text{ângulos}} \frac{1}{2} K_\theta [\cos(\theta) - \cos(\theta_0)]^2 \quad (2)$$

$$+ \sum_{\substack{\text{diédros} \\ \text{impróprios}}} \frac{1}{2} K_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 \quad (3)$$

$$+ \sum_{\text{diédros}} K_{\phi,n} [1 + \cos(n\phi - \delta_n)] \quad (4)$$

As interações não ligantes dizem respeito às interações entre átomos da mesma molécula que não estão covalentemente ligados ou átomos de moléculas distintas dentro de um determinado raio de cutoff. Consideram-se para o cálculo da energia potencial das interações não ligantes os termos de Coulomb e de Van der Waals:

$$E_{NB} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi r_{ij}} + \sum_{i < j} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

De modo a calcular a força F que atua sobre cada uma das partículas é necessário calcular primeiro a sua energia potencial. Esta é a soma da contribuição das interações ligantes e não ligante:

$$V = E_B + E_{NB} \quad (6)$$

A força F que atua sobre cada partícula i é então calculada como o simétrico do gradiente da energia potencial V proveniente da equação anterior:

$$F_i = - \frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (7)$$

Este valor é posteriormente utilizado para determinar as posições e aceleração de todas as partículas através da integração da segunda lei de Newton do movimento para cada átomo i :

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = F_i, \quad i = 1, \dots, N \quad (8)$$

onde m é a massa, r_i a posição cartesiana do átomo i e F_i é a força que atua sobre esse átomo.

Estas equações são resolvidas simultaneamente em curtos passos de integração, e as coordenadas de cada partícula são escritas em ficheiros de saída em intervalos regulares. Juntando as coordenadas de todas as partículas em função do tempo obtém-se a trajetória do sistema. Esta trajetória permite depois analisar diversos parâmetros de interesse que variam consoante o sistema em estudo.

Apesar do aumento significativo do poder computacional e consequente melhoria da qualidade das simulações, há ainda alguns parâmetros e características das simulações nos quais pode ser vantajoso usar aproximações. Nalguns casos pode não ser possível definir tais parâmetros com precisão noutras apenas se tenciona reduzir a carga computacional e permitir simulações mais longas, de sistemas maiores e mais complexos.

Idealmente todos os átomos do sistema deveriam interagir uns com os outros. No entanto, o número de interações a ser processada seria muito elevado pelo que, em certas situações, se podem ignorar as interações entre átomos distantes sem perder muita precisão do sistema. Para tal é definido uma distância, raio de cutoff, à volta de cada partícula dentro do qual todas as interações com outras partículas são consideradas sendo qualquer interação fora desse raio descartada. Esta distância é escolhida cuidadosamente para que ao se aproximar do limite do raio a energia das interações tenda para zero, e assim se possa fazer esta aproximação sem prejudicar a qualidade da simulação (Diem & Oostenbrink, 2020).

Simular qualquer sistema implica a definição de limites, tipicamente uma caixa de certo volume. No entanto, deste modo partículas que se situassem nas bordas da caixa iriam apenas interagir com partículas mais internas o que não seria realista. Deste modo os sistemas biológicos devem ser simulados em condições de fronteira periódicas. Nestas cria-se uma caixa de simulação contendo todas as partículas do sistema e adjacente a cada face desta encontram-se outras caixas que são cópias idênticas da primeira (Figura 4). Assim o sistema exerce a força correta sobre cada partícula independentemente da sua posição e

quando uma partícula sai da caixa de simulação é substituída por uma cópia com a mesma velocidade na face oposta da caixa (Katiyar & Jha, 2018).

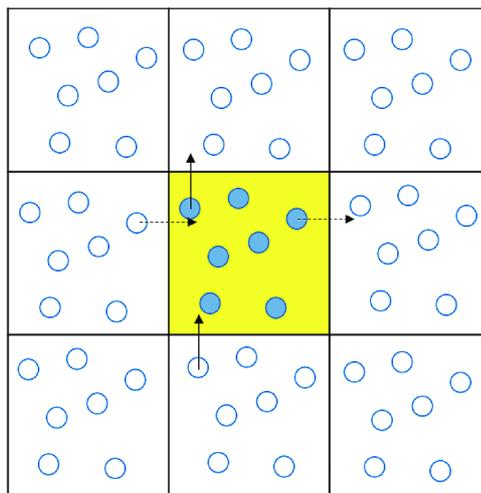


Figura 4. Representação bidimensional das condições de fronteira periódicas. A cela central (preenchida a amarelo) representa a caixa de simulação. Os círculos coloridos representam as partículas do sistema e os círculos vazios representam a sua imagem periódica noutras células. As setas representam o movimento de duas partículas próximas dos limites. Assim que uma sai da caixa, entra a sua imagem pelo lado oposto da caixa. (Katiyar & Jha, 2018)

Outra estratégia para reduzir a carga computacional é a aproximação de Born-Oppenheimer (Roy et al., 2015). Baseada no facto da massa do núcleo ser muito maior do que a massa dos eletrões, e da velocidade destes ser muito maior do que a do núcleo, esta aproximação considera que para os eletrões o núcleo está estático. Assim, teoricamente, os eletrões ajustam a sua dinâmica instantaneamente de cada vez que a posição dos átomos se altera, estando o seu movimento dependente apenas da posição do núcleo e não da sua velocidade. Desta forma, não se consideram separadamente núcleos e eletrões. Cada partícula elementar representa um átomo, ao qual se associa uma carga atómica que engloba contribuições nucleares e eletrónicas.

Quanto ao nível de detalhe possível pela dinâmica molecular há três tipos principais de simulações. Simulações atomísticas (explicit atom), simulações *United-atom* e simulações *Coarse-Grained* (Chen et al., 2006; Moqadam et al., 2021). As simulações atomísticas representam cada átomo de cada molécula como um local de interação. Este tipo de simulação é frequentemente usado para simulações de pequenas moléculas para as quais é importante recolher informação com o máximo de detalhe possível. Observando a Figura 5A vemos que o grupo de colina, na ponta superior da molécula de POPC, tem representado a azul o átomo de azoto, a amarelo os átomos de carbono e a branco os átomos de hidrogénio. No entanto um elevado poder computacional é requerido, para tratar moléculas com este detalhe, pelo que não é possível simular sistemas muito complexos. Nas simulações do tipo *Coarse-Grained* em vez de se representar explicitamente cada átomo do sistema, usam-se

“pseudo-átomos” que englobam um grupo de átomos definido (Chen et al., 2006; Moqadam et al., 2021). Como vemos na Figura 5C, a molécula de POPC tem uma representação muito mais simples, sendo o grupo colina representado apenas por uma partícula (azul). Este tipo de simulações, enquanto perde o detalhe atómico ganha a possibilidade de simular sistemas mais complexos, por exemplo bicamadas lipídicas de grandes dimensões (Huang et al., 2012). Por fim temos as simulações do tipo *United-atom*, estas apresentam detalhe um intermédio entre os outros dois tipos que permite reduzir o custo computacional sem prejudicar tanto a precisão do sistema como nas simulações *Coarse-Grained* (Chen et al., 2006; Moqadam et al., 2021). Como se observa na figura 5B, o grupo colina não tem todos os átomos representados, nem é representado apenas por uma partícula. Tal como nas simulações atomísticas o átomo de azoto é individualizado e representado a azul. No entanto não há distinção entre os átomos de carbono e de hidrogénios metílicos. Ligados ao átomo de azoto, representados a amarelo, estão três grupos de CH₃.

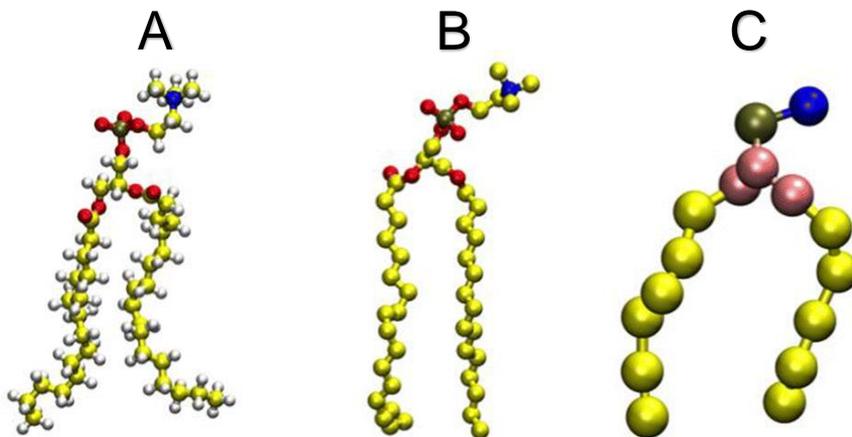


Figura 5. Representação da molécula de 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) com diferentes níveis de detalhe. Representação do POPC atomística (A); átomos de hidrogénio, branco; átomos de carbono, amarelo; átomos de oxigénio, vermelho; átomos de azoto, azul; átomos de fósforo, castanho. Representação *United-atom* do POPC (B); moléculas de CH₂, amarelo; átomos de oxigénio, vermelho; átomos de azoto, azul; átomos de fósforo, castanho. Representação *Coarse-Grained* do POPC (C); cadeias acil, amarelo; glicerol, rosa; fosfato, castanho; colina, azul. (Cascella & Vanni, 2015)

1.3.2. Simulações de MD com membranas

Pode-se afirmar que a era das simulações computacionais começou com o desenvolvimento do primeiro computador, em 1945. No entanto o poder computacional e os métodos de geração de números aleatórios, da altura eram ainda demasiado rudimentares para que se realizassem simulações de processos físico-químicos. O intervalo entre 1945 e 1957 foi um período de grande desenvolvimento de métodos que fossem capazes de gerar um grande número de sequências de números pseudoaleatórios. Estas sequências de números tornaram-se a base de vários métodos de simulação, estando a qualidade das mesmas dependente da eficiência dos geradores de números pseudoaleatórios em criar sequências de números que imitem comportamentos aleatórios com precisão (Enkavi et al., 2019).

Assim em 1957 surgem as primeiras simulações de dinâmica molecular no qual foram simulados modelos de átomos de esfera rígidas (Alder & Wainwright, 1957). No entanto, o facto das simulações de MD possuírem um grande grau de detalhe e um grande número de interações limita bastante o tempo total que se é capaz de simular. Assim a simulação de sistemas biológicos, que não só têm mais partículas como necessitam de tempos de simulação superiores, não foi possível durante duas décadas. Apenas em 1977 MacCammon simulou a primeira molécula biológica, um inibidor da tripsina de pâncreas de bovino durante 8,8 ps (McCammon et al., 1977). Pouco depois, em meados de 1980 surgiram as primeiras simulações de MD de lípidos. Começou por se simular modelos simplificados de monocamadas, bicamadas sem água, e pequenas micelas imergidas em água (Jönsson et al., 1986; Kox et al., 1980; van der Ploeg & Berendsen, 1982). Em meados de 1990 foram publicados uma série de artigos de bicamadas lipídicas hidratadas (Tu et al., 1996a, 1996b), o que aumentou consideravelmente o interesse em usar simulações de MD para simular membranas biológicas e assim potenciou o desenvolvimento de modelos de simulação mais precisos pelos quais nos baseamos atualmente (Berendsen & Marrink, 1993; Heller et al., 1993; Venable et al., 1993).

Com o aumento exponencial do poder computacional o número de sistemas possíveis de simular usando simulações de MD continua a crescer. A formação de domínios de lípidos membranares foi já simulada com detalhe atómico (simulação atomística) com mais de 1000 lípidos e com um tempo total de simulação de aproximadamente 10 μ s. Por outro lado, usando simulações de MD *coarse-grained* foi possível simular membranas lipídicas com proteínas

integrais, durante tempos totais de simulação desde 10 μ s até milissegundos (Enkavi et al., 2019). No entanto, há ainda um longo caminho a percorrer, como referência do patamar em que estamos, a simulação de bicamadas lipídicas com mais de 1000 moléculas de lípidos por mais do que 500 ns é ainda muito difícil de simular usando simulações de MD atômicas (Enkavi et al., 2019).

2. Métodos

2.1. Plano de Trabalhos

O foco do trabalho incidiu sobre o estudo, usando simulações de dinâmica molecular, da molécula RhB inserida numa bicamada lipídica. Tais simulações possuem detalhe quase atómico e permitiram avaliar vários parâmetros de interesse que caracterizam a molécula sob estudo, bem como o seu efeito sobre propriedades da bicamada com que interatua.

A modelação da RhB iniciou-se através da submissão de estruturas das três formas ilustradas na Fig.1 no servidor Automated Topology Builder (ATB; Malde et al.2018), para construção de topologias (Malde et al., 2011). Conforme descrito abaixo, as cargas resultantes destas topologias preliminares foram refinadas através de cálculos quânticos mais rigorosos.

De seguida para que as simulações da RhB em membrana fossem o mais rigorosas possível, planeou-se primeiro a realização de simulações teste das três formas da RhB numa caixa apenas com água. Tais simulações permitiram proceder à validação das topologias da RhB e nos casos em que se verificaram irregularidades no comportamento das moléculas durante a simulação estas topologias tiveram de ser refinadas antes de se prosseguir para as simulações em membrana.

As simulações em membrana foram planeadas de modo que cada forma molecular da RhB tenha três corridas, com 4 moléculas de Rh por corrida. Numa das corridas as 4 moléculas começam no exterior da membrana, 2 acima e 2 abaixo da membrana, enquanto nas outras duas corridas as 4 moléculas começam dentro da bicamada, 2 na monocamada de cima e 2 na monocamada de baixo. Estas simulações permitiram avaliar vários parâmetros de interesse relativos à RhB e à sua influência na membrana lipídica: Evolução temporal da posição da RhB relativamente ao COM da bicamada; Perfil de densidade da RhB, água e lípidos membranares; Posições dos átomos da Rh B relativamente ao COM da bicamada; Área por lípido; Orientação da Rh B; Ligações de hidrogénio; Orientação do eixo P-N; Parâmetros de ordem dos lípidos e Perfis de Energia Livre através da normal ao plano da bicamada.

2.2. Preparação das Simulações

Para que se pudesse começar a realização do trabalho ocorreu primeiro uma fase de aprendizagem e familiarização com os programas e métodos usados em simulações de dinâmica molecular, nomeadamente o GROMACS 2019.3 (M. J. Abraham et al., 2015). Esta ferramenta deve ser operada através de uma interface de linhas de comandos, neste trabalho foi o “Terminal” do sistema operativo Ubuntu, e consiste num conjunto de ficheiros e comandos, que permitem a preparação, realização e posterior análise de simulações de dinâmica molecular. Para cada simulação é preciso ter um conjunto de ficheiros que caracterizam detalhadamente todo o sistema: as moléculas envolvidas; os campos de forças que caracterizam as forças entre átomos da mesma molécula e átomos de diferentes moléculas; e também parâmetros da simulação tais como a temperatura, pressão, passo de integração, esquemas de cut-off, etc (M. J. Abraham et al., 2015).

Esta foi a primeira tarefa a realizar, obter todos os ficheiros que necessitaria para simular a RhB numa membrana lipídica. O campo de forças que foi usado no presente trabalho foi o “*United-atom Gromos 54a7 force field*” (Schmid et al., 2011), e o modelo da molécula de água foi o *Simple Point Charge* (SPC) (Berendsen et al., 1981; Mark & Nilsson, 2001), ambos disponíveis no GROMACS. O modelo da molécula de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (POPC) – lípido base para simulações de modelos de membranas celulares – foi obtido da base de dados online Lipidbook (Filipe et al., 2015; Poger & Mark, 2010; Domański & Beckstein, 2010). Este é um repositório público de dados relacionados com parâmetros dos campos de força com foco em lípidos e moléculas usadas para simulações com membranas cujos ficheiros são continuamente melhorados e otimizados por investigadores.

Quanto aos ficheiros que caracterizam a RhB necessitei de dois ficheiros para cada uma das suas formas (catião, zwitterion e lactona): um ficheiro de coordenadas/estrutura desta molécula que foi construído no servidor PRODRG (Schüttelkopf & van Aalten, 2004), e um ficheiro de topologia da molécula, que fornece informações tais como a massa e carga de cada átomo, o tipo e comprimento das ligações entre eles, os ângulos entre átomos, entre outras características, que após submissão da estrutura obtida com o PRODRG, foi construído no servidor ATB (Koziora et al., 2014; Malde et al., 2011; Malde et al.2018). Ambos são automaticamente reconhecidos pelo GROMACS como ficheiros de coordenadas e topologia, respetivamente. No entanto, devido ao tamanho relativamente grande (> 50 átomos) das moléculas de RhB, a construção da topologia usando o servidor ATB foi feita recorrendo apenas a cálculos semi-empíricos de campo auto-consistente, com cargas MOPAC, pelo que

estas últimas foram posteriormente refinados pelo colaborador Prof. João Paulo Ramalho (Departamento de Química, Universidade de Évora) com recurso a cálculos quânticos *ab-initio* usando o software Gaussian16.

2.3. Detalhes das Simulações

Todos os sistemas foram simulados em condições de número de partículas, pressão (1 bar) e temperatura (298 K) constantes (NPT) e com condições de fronteira periódicas. Conforme descrito na secção 1.3.1., estas tornam um pequeno sistema como a caixa de simulação numa célula unitária de um sistema infinito, evitando assim problemas associados às moléculas se deslocarem para os limites da caixa. Uma das características do campo de forças usado (*United-atom Gromos 54a7 force field*) é que alguns átomos pertencentes a grupos funcionais são representados por uma partícula apenas em vez de todo o conjunto de átomos individuais. Isto permite reduzir a carga computacional ao realizar a simulação enquanto se mantém uma boa aproximação das propriedades físicas e química de tal grupo.

As simulações numa caixa de água além da molécula de Rh tiveram cerca de 1200 moléculas de água, enquanto que os sistemas simulados na presença de lípido compuseram-se de 4 moléculas de Rh, 128 moléculas de POPC e cerca de 5100 moléculas de água. No caso das simulações do catião foram adicionados iões cloreto de modo a manter a carga geral do sistema neutra.

De modo a remover os contactos atómicos desfavoráveis todos os sistemas foram submetidos a uma minimização de energia por *steepest descent*, e de seguida a uma curta corrida de dinâmica molecular com 100 ps e com passo de integração de 1 fs (Filipe et al., 2015). No caso das simulações apenas em água estas tiveram duração de 10 ns com passo de integração de 2 fs enquanto que as corridas de produção em membrana tiveram inicialmente duração de 200 ns com passo de integração de 2 fs (Filipe et al., 2015). Após uma rápida análise das trajetórias das simulações em membrana verificou-se que nalgumas corridas, a posição do COM de certas moléculas não tinha ainda convergido (ver secção 3.2.2), pelo que se decidiu estender todas as corridas para uma duração total de 500 ns.

Os comprimentos de ligação foram restringidos aos seus respetivos valores de equilíbrio através dos algoritmos SETTLE (Miyamoto & Kollman, 1992) (água) e LINCS (Hess et al., 1997) (outras ligações). Para fazer o controlo da temperatura e pressão foram usados os esquemas de Berendsen (Berendsen et al., 1984), e o termóstato V-rescale (Bussi et al.,

2007) com tempos de acoplamento de 1,0 e 0,1 ps, respectivamente. Recorreu-se a um controlo semi-isotrópico da pressão, regulando de forma independente as componentes segundo as direções xy (no plano da membrana) e z (normal a este plano). Foi efetuado o tratamento Particle Mesh Ewald (Essmann et al., 1995) para interações eletrostáticas de longo alcance, enquanto que as interações de Van Der Waals e de Coloumb de curto alcance foram truncadas a 1,0 nm.

Para visualização das estruturas e das trajetórias da simulação foi usado o software VMD (Yamada et al., 1996).

2.4. Análise das Simulações

2.4.1. Em Água

O foco das simulações em caixa de água é avaliar a qualidade dos ficheiros de topologia da RhB. Estes ficheiros foram gerados pelo ATB e têm informação sobre os ângulos que se devem manter entre cada grupo de três átomos de modo que a simulação seja rigorosa, assim como de ângulos diedros torsionais ou impróprios (isto é, respeitante a torsões fora do plano em carbonos com hibridização sp^2), definidos a partir de quartetos atômicos. Caso, no decurso destas simulações, se verificarem desvios excessivos entre os valores de equilíbrio indicados na topologia e os valores observados, superiores ao desvio-padrão obtido durante a simulação considera-se que a topologia não representa a realidade corretamente. Partindo do ficheiro de trajetória que obtivemos após as simulações em água e usando a ferramenta `gmx angles` do GROMACS conseguimos obter a média e distribuição dos valores dos ângulos ao longo da simulação. Assim comparando tais valores com os valores de equilíbrio da topologia e com aqueles resultantes da estrutura otimizada por recurso a cálculos quânticos *ab initio* conseguimos verificar se as topologias são rigorosas. Caso haja discrepâncias significativas as topologias terão de ser refinadas antes de se prosseguir para as simulações em membrana.

As geometrias otimizadas da RhB nas três formas moleculares foram obtidas por teoria funcional da densidade (DFT) usando o funcional híbrido de correlação e troca B3LYP (Perdew, 1986) em conjunto com o conjunto base $6-31G(d,p)$. os efeitos dos solventes foram tidos em conta pelo modelo *polarized continuum* (PMC) (Amovilli et al., 1999; Cossi & Barone, 2001). A análise de frequência, realizada subsequentemente, confirmou cada geometria otimizada como um mínimo de energia pela ausência de frequências imaginárias.

As cargas parciais para as Rhs otimizadas foram calculadas usando o método dos mínimos quadrados adaptado ao potencial eletrostático obtido no mesmo nível de teoria, de acordo com os esquemas de Kollman e Singh (Besler et al., 1990; Singh & Kollman, 1984). Todos os cálculos de química quântica foram feitos usando o pacote de software GAMESS-US (Gordon & Schmidt, 2005; Schmidt et al., 1993).

2.4.2. Em Membrana

A análise das simulações em membrana foi também feita com recurso a ferramentas do GROMACS. Partindo da trajetória resultante das simulações e usando os programas adequados do pacote GROMACS, pôde-se prosseguir à análise de vários parâmetros de interesse (L. Abraham et al., 2021). Em particular, usaram-se os seguintes programas de análise neste trabalho:

- **gmx energy**: cálculo das dimensões da caixa de simulação, a partir das quais se obtém a área média no plano da bicamada, por molécula de lípido;
- **gmx traj**: permite a escrita das coordenadas de grupos selecionados ao longo da trajetória, usada no cálculo da sua posição transversa relativamente ao centro da bicamada;
- **gmx bundle**: permite o cálculo de ângulos/distribuições angulares de vetores relativamente a um eixo de referência (normal à bicamada), usado para estudar as orientações de eixos moleculares da RhB e do eixo P-N dos grupos polares do lípido POPC;
- **gmx density**: cálculo de perfis de densidade de diferentes espécies, em função da sua localização na direção normal ao plano da bicamada;
- **gmx order**: permite o cálculo dos parâmetros de ordem das cadeias acilo do lípido POPC;
- **gmx hbond**: usado no estudo das ligações de hidrogénio envolvendo grupos/átomos dadores ou aceitantes de Rh;
- **gmx wham**: cálculo de perfis de energia livre em função da coordenada reacional escolhida (distância local do COM da Rh ao COM da bicamada de POPC, segundo a direção normal ao plano da bicamada), através do *Weighted Histogram Analysis Method*, usando simulações de amostragem por *umbrella sampling* (Hub et al., 2010).

Cada uma das secções seguintes, que descrevem os vários resultados obtidos, ilustram a utilização destes programas para obtenção de informação à escala atómica da interação da RhB com bicamadas de POPC.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise das Simulações em Água

Após as simulações em água, como referi na secção 2.4.1, fui avaliar o rigor das topologias comparando os ângulos entre átomos durante a simulação com valores de referência. Para o caso da lactona a topologia aparentou representar corretamente a molécula, não havendo diferenças significativas e podendo ser usada posteriormente para as simulações em membrana (Figura 6A) sem mais alterações. Já no caso da RhB (catião) e RhB (zwitterião) não foi o caso. Nestas encontraram-se diferenças significativas entre alguns ângulos e diedros impróprios durante as corridas e valores de referência. O procedimento adotado para minimizar estas discrepâncias passou por:

- 1) Idealmente, o servidor ATB teria gerado parâmetros idênticos para átomos conservados nas três formas estudadas (por exemplo, aqueles pertencentes aos anéis xanténicos, especialmente os mais distantes da ligação ao anel benzoico). Contudo, nem sempre tal ocorreu. Assim, para parâmetros envolvendo átomos com correspondência completa com a RhB (lactona), substitui-se os parâmetros gerados pelo ATB para a RhB (catião) e RhB (zwitterião) pelos criados para a forma lactónica, o que tem a vantagem adicional de uniformizar as parametrizações e aumentar a sua consistência interna;

- 2) Aumentar a constante de força dos diedros impróprios que estavam a causar problemas, até que estes tomem um valor médio próximo de zero.

Deste modo, a maioria das discrepâncias relativas a estas duas formas ficou resolvida, estando os parâmetros medidos próximos (geralmente a menos de um desvio padrão das respetivas distribuições) daqueles introduzidos no ficheiro de topologia e/ou dos correspondentes às estruturas otimizadas (Figuras 7 e 8).

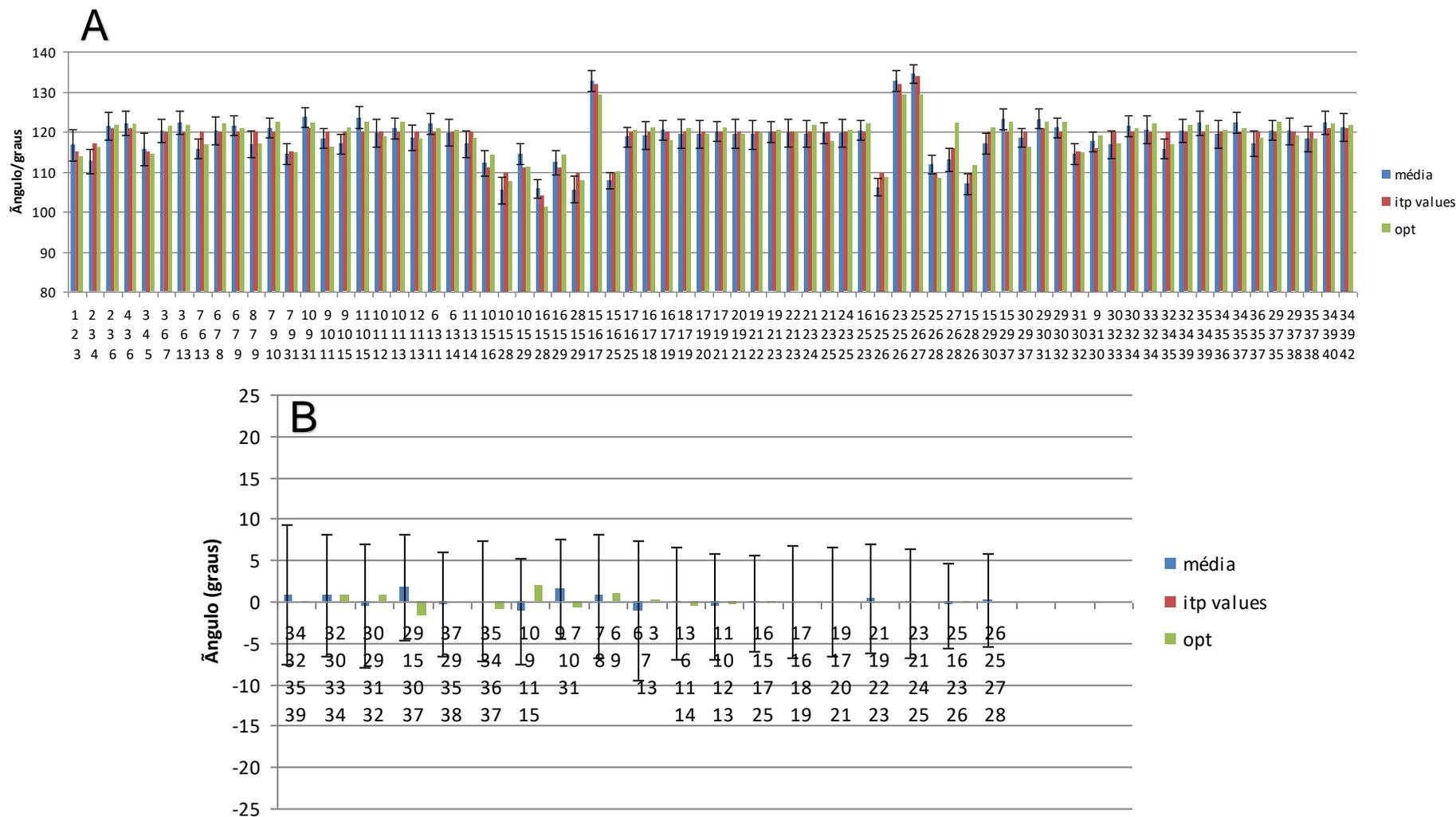


Figura 6. Comparação entre a média dos ângulos (A) ou diedros impróprios (B) ao longo da simulação (média - representado a azul), os valores gerados pelo servidor ATB (itp values - representado a vermelho) e os valores de referência obtidos com recurso a cálculos quânticos (opt - representado a verde) para a RhB (lactona) da RhB. Os números do eixo das abcissas correspondem aos índices atômicos da Fig. 1.

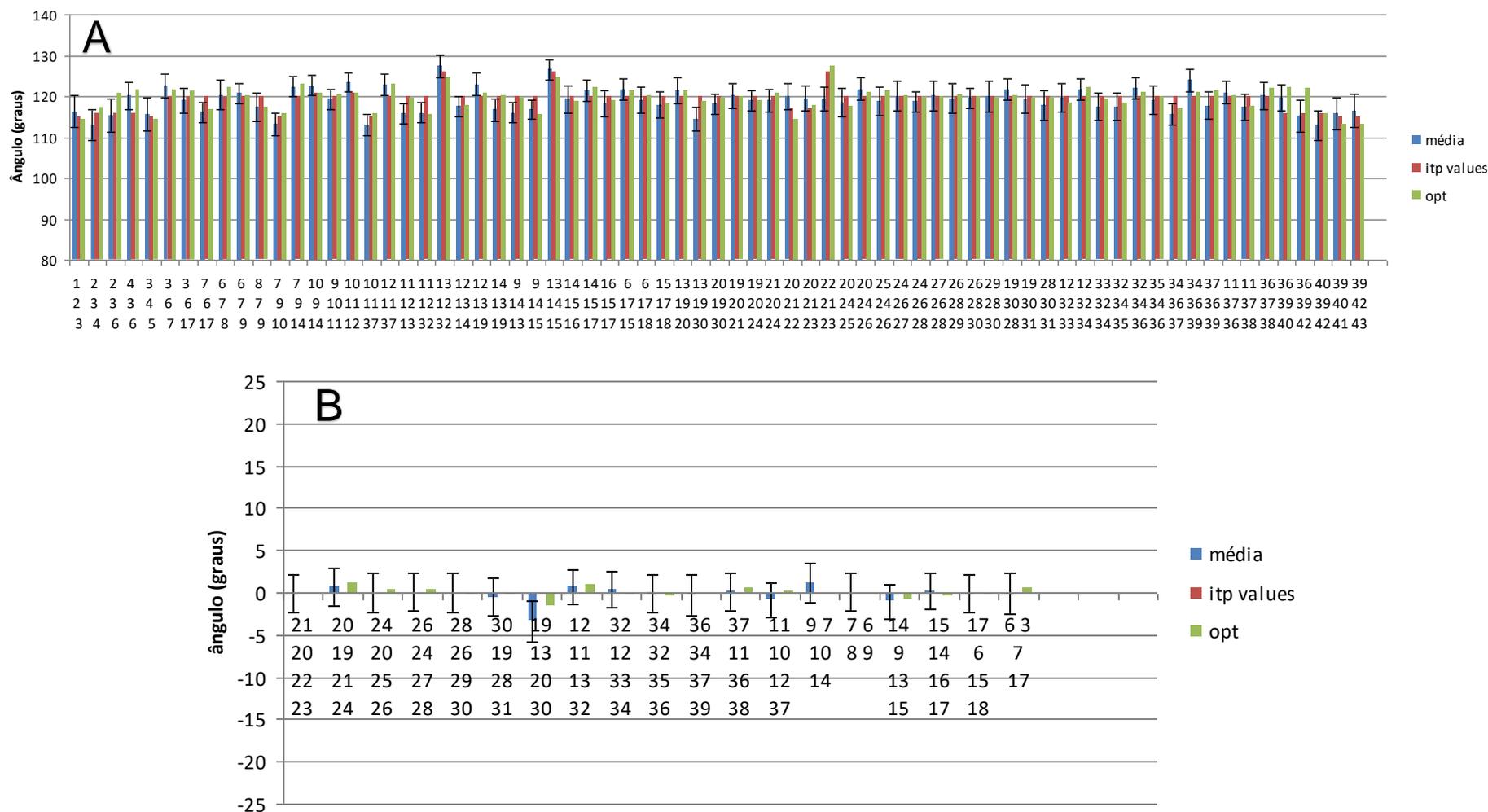


Figura 7. Comparação entre a média dos ângulos (A) ou diedros impróprios (B) ao longo da simulação (média - representado a azul), os valores gerados pelo servidor ATB (itp values - representado a vermelho) e os valores de referência obtidos com recurso a cálculos quânticos (opt - representado a verde) para a forma zwitteriônica da RhB. Os números do eixo das abcissas correspondem aos índices atômicos da Fig. 1.

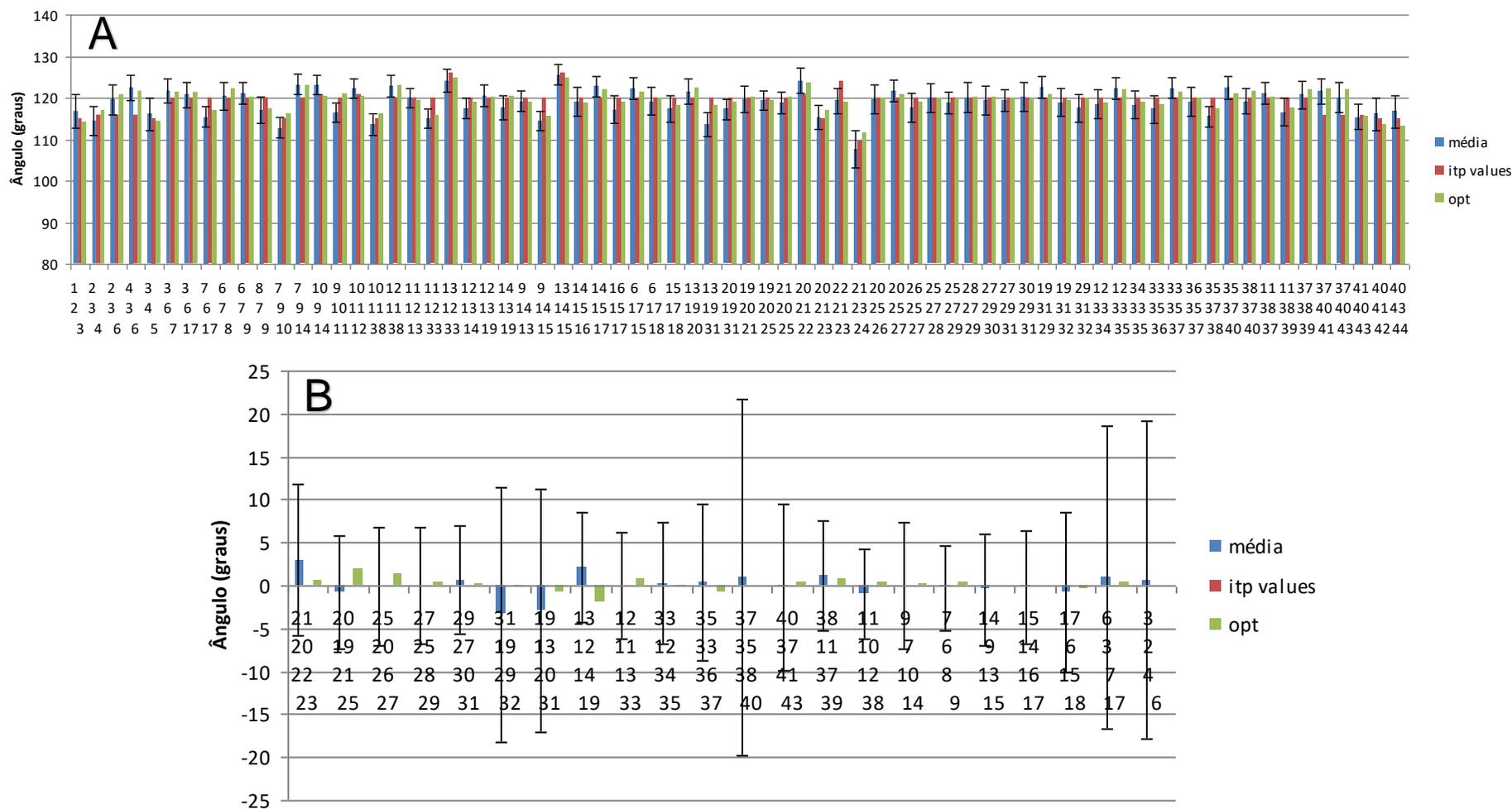


Figura 8. Comparação entre a média dos ângulos (A) ou diedros impróprios (B) ao longo da simulação (média - representado a azul), os valores gerados pelo servidor ATB (itp values - representado a vermelho) e os valores de referência obtidos com recurso a cálculos quânticos (opt - representado a verde) para a RhB (catião) da RhB. Os números do eixo das abcissas correspondem aos índices atômicos da Figura 2

3.2. Análise das Simulações em Membrana

3.2.1. Snapshots Finais das Simulações

Partindo dos ficheiros de coordenadas finais obtidos após as simulações e usando o programa VMD criaram-se *snapshots* das posições finais de todas as simulações das três formas moleculares da Rh (Figura 9).

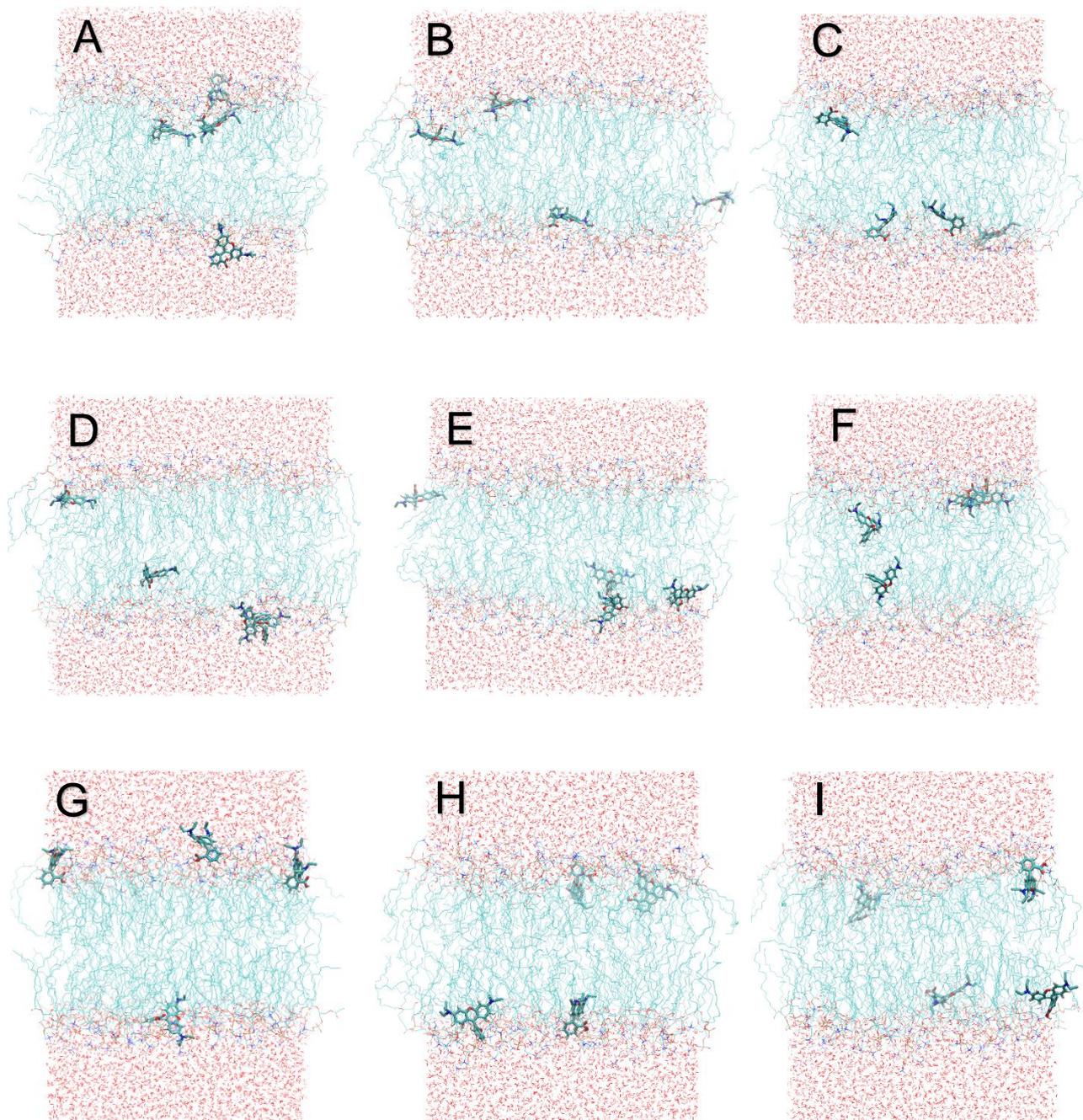


Figura 9. Configurações finais das simulações contendo a RhB (zwitterião) (A-C), RhB (Lactona) (D-F) ou RhB (Catião) (G-I) representadas com linhas mais espessas. Os átomos de C, O, N, H e P estão representados por azul ciano, vermelho, azul, branco e bronze, respetivamente.

A análise dos snapshots finais não permite fazer conclusões definitivas, no entanto, ainda permite fazer algumas observações. Reparámos logo, nos gráficos A, D e G da Figura 9 (referentes às corridas em que as moléculas começam de fora da membrana) que, por exemplo, duas moléculas de RhB (zwitterião) e de RhB (lactona) finalizaram a corrida dentro da membrana, tendo sido capazes de a penetrar. Já no caso da RhB (Catião) parece que nenhuma das suas moléculas se inseriu na membrana, acabando esta forma molecular numa região interfacial. Da análise dos outros painéis da Figura 9 (referentes às corridas em que as moléculas começam no interior da membrana), consegue-se afirmar que a maioria das Rh tende a preferir posições relativamente perto dos grupos polares do POPC. Além disso, apenas se consegue reparar na corrida 3 da RhB (lactona) que duas moléculas finalizaram a corrida em posições mais próximas do COM da bicamada lipídica do que o resto das moléculas de todas as simulações.

3.2.2. Variação Temporal do Centro de Massa

Começou-se por se avaliar a variação temporal da posição dos centros de massa de cada molécula de RhB em relação ao COM da bicamada. Esta primeira análise permite logo uma observação preliminar do comportamento de cada sistema. Consegue-se ver se as 4 moléculas de cada corrida se deslocam de maneira semelhante ou se têm trajetórias diferentes. Consegue-se ainda averiguar aproximadamente o tempo que o sistema demorou a equilibrar. É também possível fazer uma comparação preliminar entre as três formas da RhB de modo a verificar se, no estado de equilíbrio, alguma tem preferência por localizações mais próximas ou distantes do COM da bicamada.

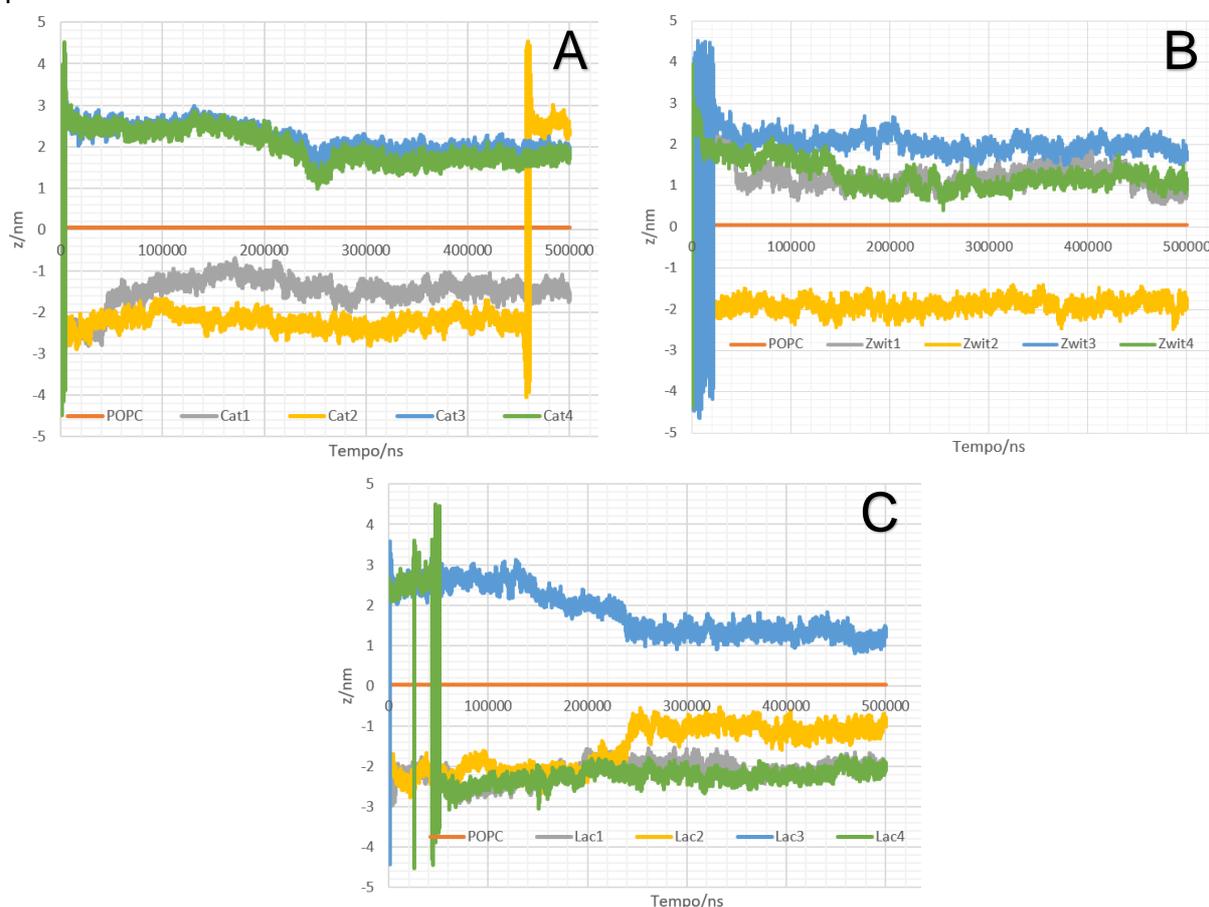


Figura 10. Variação temporal do COM das quatro moléculas de Rh de cada simulação (representadas a cinzento, amarelo, azul e verde) em relação ao COM da bicamada (representado a vermelho). O gráfico A diz respeito à RhB (Catião), o gráfico B à RhB (Zwitterião) e o gráfico C à RhB (Lactona).

Analisando em primeiro lugar as corridas em que as moléculas de Rh começam fora da membrana (Figura 10), nota-se rapidamente a existência de condições de fronteira periódica. Em todas as corridas se podem observar Rhs que começam de um lado da membrana, deslocam-se até aos limites da caixa de simulação, aproximadamente 4.5 nm do COM da bicamada, e aparecem no lado oposto da membrana. A Rh 2 da RhB (catião) trocou de baixo

para cima bastante tarde na simulação. No entanto todas as outras moléculas que trocaram de lado fizeram-no nos primeiros instantes da simulação. Nas três corridas todas as Rhs parecem ter encontrado a sua posição de equilíbrio o mais tardar por volta dos 200 a 300 ns de simulação, com exceção de uma que, aos 150 ns, todas as moléculas se encontram perto da sua posição final sem sofrerem grandes alterações durante o resto da corrida.

Como se pode observar, durante os 500 ns de simulação nem todas as moléculas foram capazes de se inserir na membrana. É de referir que os grupos mais externos da bicamada, o fosfato e a colina, localizam-se entre 1,8 a 2 nm do COM da bicamada, como se poderá observar na figura 14 da secção 3.2.5.. No caso da RhB (catião) apenas a Rh 1 penetrou na membrana, oscilando a sua posição entre 1 a 2 nm do centro. As restantes moléculas dessa corrida (Rhs 2,3 e 4) parecem nunca ter conseguido entrar na membrana, permanecendo numa região interfacial, a cerca de 2 nm do centro da bicamada. Já no caso da RhB (zwitterião) e RhB (lactona) duas Rhs em cada corrida penetraram a membrana (Rhs 1 e 4 e Rhs 2 e 3, respetivamente) e estabilizaram a sua posição um pouco mais internamente do que na corrida da RhB (catião), a cerca de 1 nm do centro. As restantes Rhs nestas duas últimas corridas permaneceram, de maneira semelhante à corrida da RhB (catião), na interface água/membrana, a cerca de 2 nm do centro da bicamada.

Apesar de não se poderem retirar resultados conclusivos apenas pela análise destes gráficos (Figura 10), é aparente que as Rhs na RhB (catião) têm menos facilidade para se inserirem na membrana do que as duas outras formas, visto apenas uma Rh catiónica ter penetrado na bicamada. Além disso esta única molécula que se introduziu na membrana, estabilizou a sua posição ligeiramente mais longe do centro da bicamada ($\sim(1,5 \pm 0,5)$ nm) do que as moléculas que penetraram a membrana nas corridas da RhB (zwitterião) e RhB (lactona) ($\sim(1 \pm 0,5)$ nm)). Pode-se afirmar que estes resultados confirmam o que já era espectável pois o Catião é a forma mais polar da Rh, pelo que será normal que tenha maior dificuldade em se introduzir na membrana. Não é de surpreender também que quando se internaliza na membrana esta forma prefira localizações mais exteriores, junto ao grupo fosfato polar do POPC e mais afastada das cadeias acilo apolares do POPC. Apesar da RhB (lactona) ser a menos polar das três, no caso da corrida 1, não se verificaram diferenças significativas entre esta forma e a Zwitteriônica nem no número de moléculas que penetrou na membrana nem na localização preferencial das mesmas relativamente ao centro da bicamada.

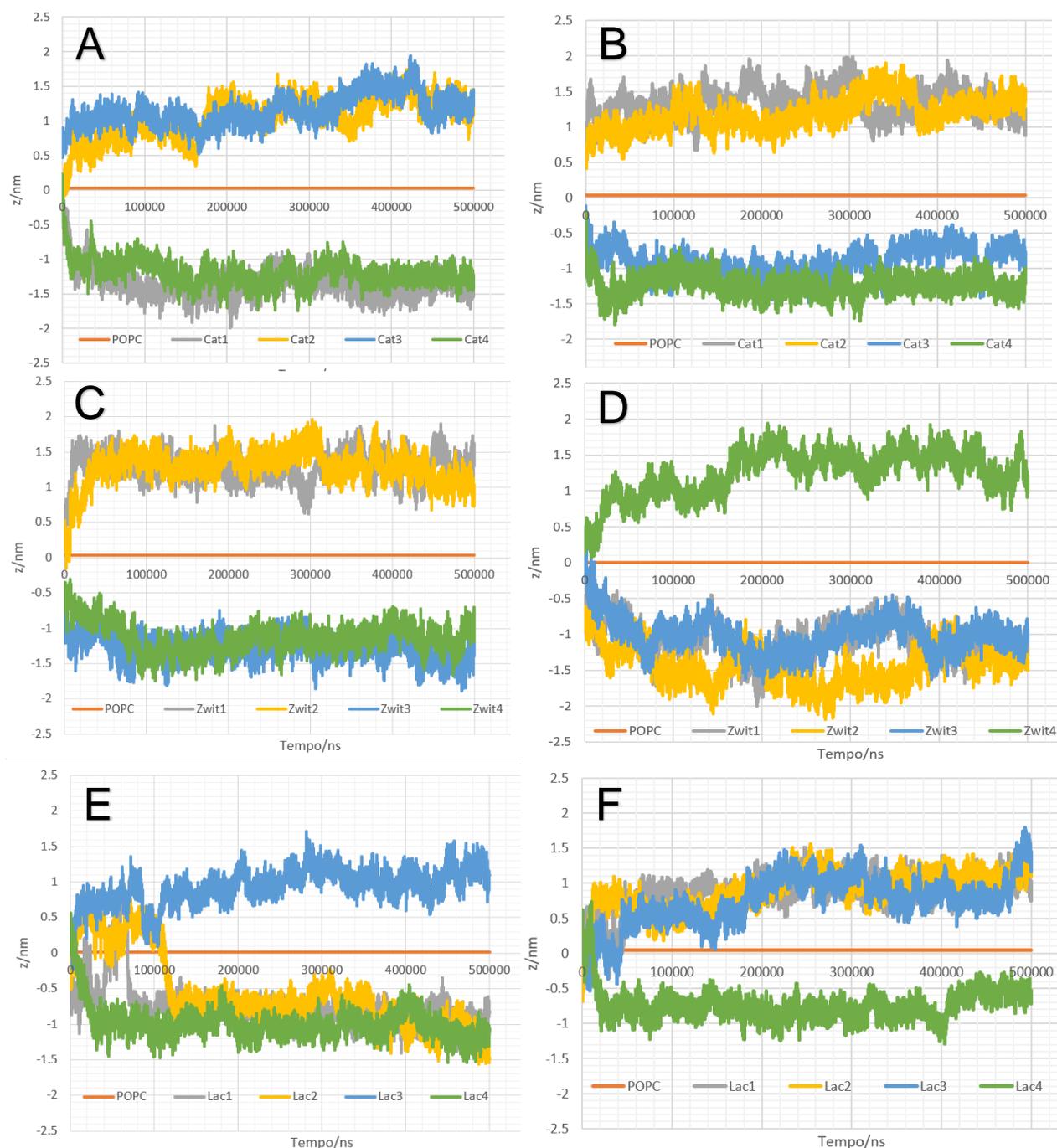


Figura 11. Variação temporal do COM das quatro moléculas de Rh de cada simulação (representadas a cinzento, amarelo, azul e verde) em relação ao COM da bicamada (representado a vermelho). O gráfico A e B dizem respeito à RhB (Catião), o gráfico C e D à RhB (Zwitterião) e o gráfico E e F à RhB (Lactona).

Quanto às corridas em que as Rhs começam dentro da membrana (Figura 11), numa primeira observação repara-se logo que na RhB (lactona) as Rhs atravessam o centro da bicamada muito mais frequentemente do que as duas outras formas. Três moléculas em cada corrida atravessam o centro. Na corrida 2 a Rh 1 e 2 fazem-no duas vezes, deslocando-se para a monocamada oposta e retornando à monocamada de onde começaram aos 60 e 110 ns de simulação, respetivamente. Pelo contrário, apenas duas Rhs na corrida 2 da RhB (catião) e

uma Rh na corrida 3 da RhB (zwitterião) atravessam o centro da membrana nos instantes iniciais.

No caso da RhB (catião) e RhB (zwitterião) a maioria das Rhs, após o período de estabilização, tende a estabilizar entre 1 a 1,5 nm do centro da membrana. Exceções são a Rh 3 da corrida 3 do catião que nos últimos 200 ns de simulação se deslocou para posições mais internas (entre 0,5 a 1 nm do centro) e a Rh 1 e 3 da corrida 3 da RhB (zwitterião) cujas posições variam substancialmente nos últimos 300 ns de simulação, chegando a estar a 0,5 nm do centro aos 350 ns mas voltando a afastar-se até ficarem a cerca de 1 nm.

No entanto, a situação para a RhB (lactona) é diferente. A maior parte das moléculas tende a estabilizar não entre 1 a 1,5 nm do centro mas em posições ligeiramente mais internas, por volta de 1 nm do centro. Pode não parecer uma diferença significativa mas de facto na RhB (catião) e RhB (zwitterião) é comum as Rhs assumirem posições a 1,5 nm do centro enquanto que na Lactona isso raramente ocorreu. As Rhs da RhB (lactona) aparentam ter uma tendência para assumir posições mais internas na bicamada. Enquanto que nas outras duas formas apenas três moléculas se aproximaram do intervalo 0,5 a 1 nm, nas simulações da RhB (lactona) 4 Rhs (1 e 2 da corrida 2; 3 e 4 da corrida 3) assumiram posições nesse intervalo. A Rh 4 da corrida 3 no final da simulação deslocou-se para ainda mais perto do centro, ficando a cerca de 0,5 nm do centro da membrana. Contudo algo que se repara com facilidade é que algumas Rhs da RhB (lactona) (2 e 4 da corrida 2; 3 da corrida 3) se afastam do centro da membrana nas fases finais da simulação, por essa altura seria de esperar que o sistema já estivesse num estado de equilíbrio em que todas as moléculas encontraram a posição que lhes é mais energeticamente favorável.

Com estes resultados, pode-se dizer com alguma segurança que a RhB (lactona) aparenta preferir posições mais internas na membrana lipídica, e que as Rhs desta forma possuem mobilidade na direção normal ao plano da bicamada maior do que as duas outras formas. Analisando ambos os resultados das simulações em que as Rhs começam dentro e fora da membrana vemos que durante os primeiros 200 ns ocorrem variações sistemáticas da posição das moléculas. Assim, como compromisso de modo a considerar janelas temporais adequadas para estabilização e amostragem, para efeitos das análises seguintes consideram-se apenas os últimos 300 ns de simulação, nos quais a posição das Rhs está mais equilibrada, com menos exceções individuais, oscilando à volta de um valor médio.

3.2.3. Perfis de Densidade

Os perfis de densidade das moléculas de POPC, de água e de RhB mostram a densidade de cada uma destas moléculas ao longo de um eixo normal ao plano da membrana e que a atravessa. Por exemplo o perfil de densidade da água no centro da bicamada deverá ser zero, mas fora da membrana deverá ser alto tal como demonstrado na Figura 12. O perfil de densidade do POPC é mais baixo no centro da bicamada, onde estão apenas as cadeias acilo, um pouco desorganizadas, é máximo nas bordas da bicamada onde há maior organização lipídica e tende para zero fora da membrana. Partindo dos perfis de densidade do POPC e tendo o das RhB conseguimos perceber qual a localização mais comum das RhB relativamente ao centro da bicamada e se há diferenças entre as três formas.

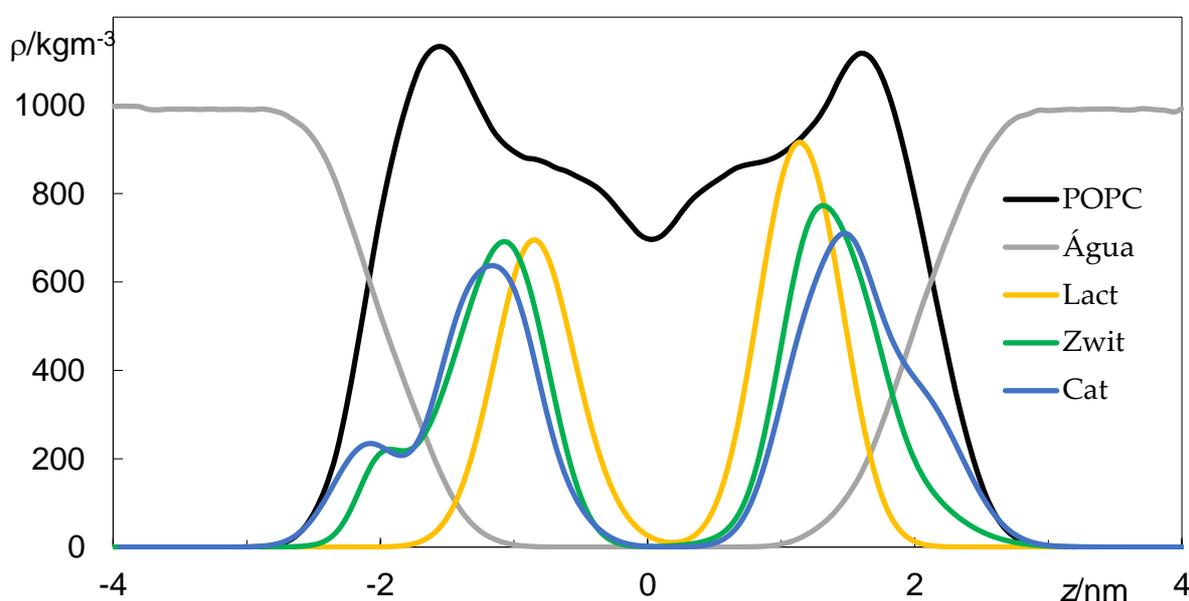


Figura 12. Distribuição dos perfis de densidade do POPC, preto; água, cinzento; RhB (Lactona), amarelo; RhB (Zwitterião), verde; ; RhB (Catião), azul ao longo da normal ao plano da bicamada. Para cada corrida de cada forma molecular da RhB foram calculados os perfis de densidade, multiplicados por 16, para se visualizarem melhor e partindo destes foi feita a média para cada forma para se poder fazer uma comparação direta entre as formas.

A análise do gráfico da Figura 12 permite confirmar os resultados obtidos na secção anterior. A média de todas as moléculas de todas as corridas demonstra que de facto a RhB (lactona) prefere localizações mais internas na membrana, seguida da forma zwitteriónica que tem tendência a ficar em localizações intermédias e a RhB (catião) é a que se localiza mais externamente relativamente ao COM da membrana. Estes resultados estão de acordo com o que se esperava do comportamento das moléculas tendo em conta a sua polaridade relativa. Isto é, a RhB (lactona), a forma menos polar das três, prefere localizações mais internas, afastada dos grupos polares dos fosfolípidos e a RhB (catião), a mais polar, prefere localizações mais externas.

3.2.4. Área por Lípido

A área por lípido é um dos parâmetros mais usados para descrever membranas biológicas, mais especificamente a área por lípido tem servido para testar a precisão dos campos de forças usados nas simulações (Moradi et al., 2019). Este valor obtém-se simplesmente dividindo a área da caixa de simulação pelo número de lípidos numa monocamada, 64 no caso do meu trabalho. Comparando os valores obtidos numa bicamada contendo apenas POPC com valores de referência podemos verificar a qualidade do campo de forças escolhido. Comparando os valores do POPC com a média da área por lípido das três corridas de cada forma molecular consegue-se averiguar quanto é que a introdução de moléculas na bicamada afeta este parâmetro.

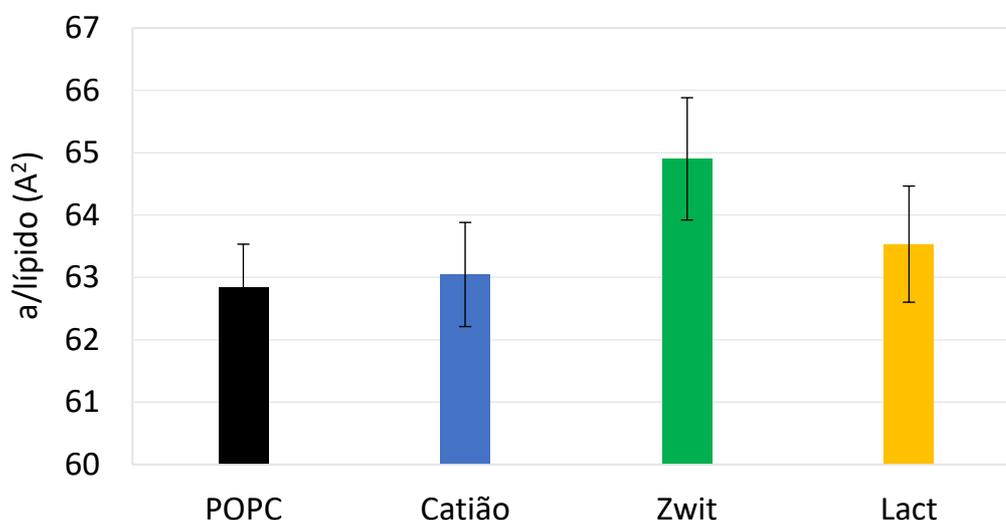


Figura 13. Representação gráfica da área por lípido numa membrana apenas com POPC, preto e numa membrana com RhB (Catião), RhB (Zwitteriã) e RhB (Lactona), azul, verde e amarelo, respectivamente. Os valores aqui demonstrados obtiveram-se a partir da média das três corridas de cada forma molecular da RhB

O valor que se obteve apenas para a bicamada de POPC foi de $(62,8 \pm 0,7) \text{ \AA}^2$, o que está de acordo com resultados obtidos em trabalhos anteriores em que para bicamadas de POPC a área por lípido varia entre 62 e 65 \AA^2 (Filipe et al., 2011).

Com a inserção da RhB (catiã) e RhB (lactona) na membrana a área por lípido aumentou ligeiramente para $(63,0 \pm 0,8) \text{ \AA}^2$ e $(63,5 \pm 0,9) \text{ \AA}^2$, respetivamente. Estas diferenças não são significativas. No entanto, o caso não é o mesmo para a RhB (zwitteriã), nesta obteve-se um valor da área por lípido de $(64,9 \pm 1,0) \text{ \AA}^2$. Apesar deste valor se encontrar dentro dos valores de referência de trabalhos anteriores, apresenta diferenças significativas quando comparado com as outras formas da rodamina e com o POPC o que pode indicar que esta forma molecular da rodamina afeta mais a organização das moléculas de POPC.

3.2.5. Localização Atômica

Outro parâmetro relevante a analisar são as distâncias atômicas relativamente ao centro da bicamada. Assim consegue-se verificar se há alguns átomos que têm preferência por posições mais internas ou externas na membrana, ou se a localização dos mesmos é algo aleatória. Sabendo a localização na molécula de cada átomo conseguimos também obter uma visão preliminar relativamente à orientação da rodamina e fazer uma nova comparação entre as três formas da rodamina.

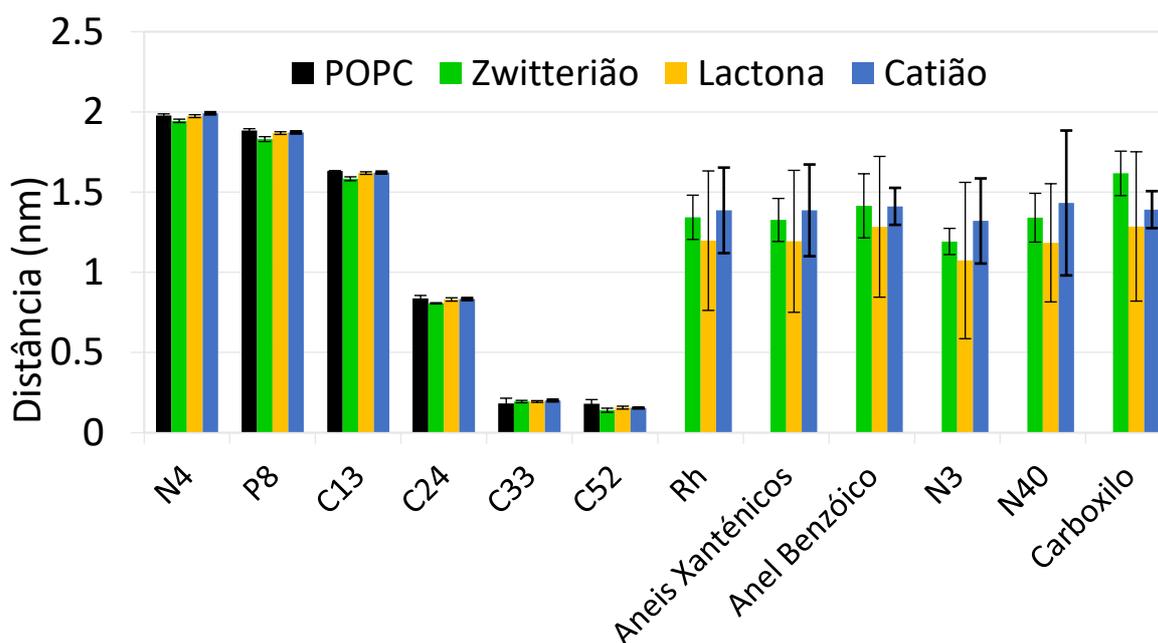


Figura 14. Posições transversais médias de átomos característicos do POPC, e das três formas moleculares da RhB.

Quanto à localização atômica dos átomos de POPC (primeiros 6 grupos de colunas do gráfico da Figura 14), esta aparenta ter sido pouco afetada pela inserção da RhB (lactona) e catiônica da RhB. No entanto, a forma zwitteriônica altera mais a posição atômica dos átomos do POPC, principalmente o átomo de fósforo, P8, do grupo fosfato, aproximando-o do centro da bicamada. Este resultado está de acordo com o obtido na secção anterior, quanto maior a área por lípido, menor é a espessura da bicamada: menos “esticados” estão as cadeias lipídicas e assim menores serão os valores da distância destes átomos ao centro da membrana.

De modo geral pode-se afirmar que as moléculas de POPC não são significativamente afetadas pela inserção de moléculas de rodamina no que respeita às localizações atômicas relativamente ao centro da bicamada, o que não significa que outras propriedades da

membrana (ordem das cadeias acilo e orientação dos grupos polares, discutidas na secção 3.2.8 e 3.2.9, respectivamente) não possam ser modificadas.

Quanto à localização atómica dos átomos das rodaminas (últimas 6 grupos de colunas do gráfico da Figura 14), observamos logo que a RhB (lactona) como também se verificou nas duas secções anteriores, é a que apresenta localizações atómicas mais internas ($1,20 \pm 0,43$ nm), enquanto que a forma zwitteriónica e catiónica se localizam mais externamente ($1,34 \pm 0,13$ nm e $1,38 \pm 0,27$ nm, respectivamente).

Para as três formas moleculares, os anéis xanténicos estão ligeiramente mais próximos do COM da membrana do que o anel benzoico o que indica que a molécula de rodamina estará deitada, não totalmente paralela ao plano da bicamada mas com uma ligeira inclinação estando o anel benzoico numa posição mais superior. No caso da RhB (lactona) e RhB (zwitterião) esta diferença é aproximadamente de 0,09 nm, enquanto que na RhB (catião) há apenas 0,02 nm de diferença. Este facto aliado ao resto dos átomos desta forma molecular terem posições mais próximas entre si quando comparando com as duas outras formas indicam que a RhB, quando na forma carregada terá uma orientação quase horizontal, com menor ângulo relativamente ao plano da bicamada. Num estudo anterior do grupo de Química Biológica com a Rh123 obtiveram-se resultados opostos, o anel benzoico assumia posições relativamente mais internas do que do núcleo xanténico (Magalhães et al., 2018). No entanto, é de relembrar que o anel benzoico da Rh123 se apresenta esterificado com um grupo metilo (tal como foi referido na secção 1.2.4) o que o torna significativamente mais hidrofóbico, menos polar do que o anel benzoico da RhB. Assim faz sentido que no caso da Rh123 este anel prefira localizações mais internas na membrana, mais afastadas dos grupos polares do POPC.

Também para as três formas moleculares se verifica que o azoto N3 se posiciona substancialmente mais próximo do centro da bicamada do que o azoto N40, sugerindo que o plano dos anéis xanténicos terá também uma inclinação. Estas diferenças já são mais significativas, estando nas três formas o azoto N40 aproximadamente 0,1 nm acima do azoto N3. Estas diferenças não eram de todo esperadas, visto os átomos de azoto serem largamente equivalentes do ponto de vista químico. Ainda assim, não são significativas.

No caso da RhB (zwitterião) da RhB, o grupo carboxílico assume posições substancialmente mais afastadas do centro da bicamada do que o resto da molécula, estando inclusive, cerca de 0,2 nm acima do COM do anel benzoico a que se liga. Nas duas outras formas moleculares da RhB, este grupo está praticamente ao nível do resto da molécula. Tal fenómeno pode ser

explicado pois o grupo carboxílico, no caso da RhB (zwitterião), está ionizado, tendo um teor mais polar e interagindo melhor com o solvente. A molécula sofre assim uma reorientação de modo a aumentar a exposição do grupo COO^- ao solvente. Por outro lado, este grupo no caso da RhB (lactona) está esterificado, ocorrendo a formação de um anel, enquanto na RhB (catião) ele está protonado. Estas alterações estruturais tornam estes grupos significativamente menos polares do que no caso da RhB (zwitterião) o que ajuda a explicar porque é que ao contrário do COO^- desta forma, os grupos carboxílicos da lactona e do catião se mantêm relativamente alinhados com o resto do anel benzoico.

3.2.6. Orientação

A análise da orientação das rodaminas relativamente ao plano da bicamada vem ajudar a interpretar os resultados da secção anterior. Para tal foram escolhidos dois eixos da molécula de rodamina, o eixo longo que pertence ao plano do núcleo xanténico, atravessando os três anéis a meio, e o eixo curto que se pode considerar um vetor que começa no centro do anel de baixo e acaba no oxigénio central do núcleo Xanténico.

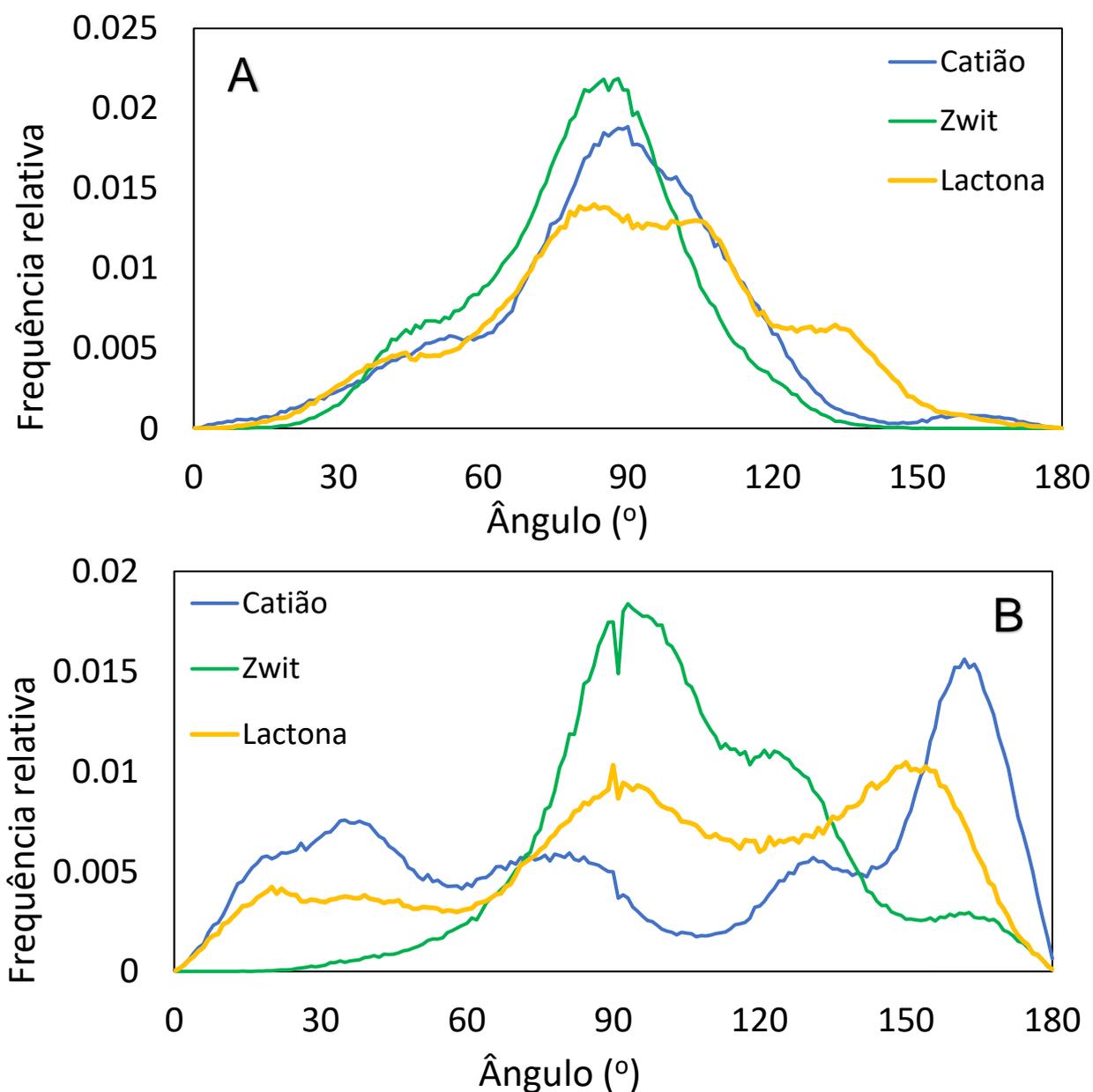


Figura 15. Distribuições das orientações angulares do eixo longo (A) e curto (B) relativamente à normal ao plano da bicamada.

A Figura 15 mostra as distribuições dos ângulos formados entre estes eixos e a normal à bicamada, considerando, para cada sistema, todas as moléculas dos vários replicados.

O gráfico alusivo ao eixo longo (Figura 15A) demonstra a predominância de ângulos próximos de 90° para todas as formas (valores médios $\langle\theta\rangle = 85,7^\circ$, $80,3^\circ$ e $90,6^\circ$ para catião, zwitterião e lactona, respetivamente), indicando orientações perpendiculares deste eixo relativamente à normal à bicamada. Daqui se infere, em concordância com o sugerido na análise das localizações atómicas, que as três formas moleculares têm uma orientação preferencial do eixo longo paralela ao plano da membrana. Já no que toca ao eixo curto (Figura 15B), o zwitterião apresenta uma distribuição com clara predominância de orientações também próximas do plano da bicamada. Deste modo, para esta forma, a configuração molecular predominante caracteriza-se por uma disposição do sistema planar de anéis xanténicos "deitada" paralelamente à bicamada. Tendo em atenção este facto, juntamente com a localização mais externa do carboxilato relativamente ao centro do anel benzoico no zwitterião (Figura 14), depreende-se ainda que, nesta forma, o anel benzoico encontra-se rodado de modo a expor este grupo polar à fase aquosa, conforme comentado na secção anterior.

Em contraste, as distribuições do catião e lactona são muito largas e multimodais, indicando que, para estas formas, há uma maior liberdade conformacional, entre configurações em que o oxigénio xanténico (O10 no catião, O31 na lactona) se encontra orientado para o exterior à bicamada (ângulos agudos na Figura 15B) com outras com a orientação contrária (ângulos obtusos na Figura 15B). Globalmente estas últimas são predominantes ($\langle\theta\rangle = 102-103^\circ$ para estas formas), o que significa que a molécula tende a internalizar o lado do sistema de anéis xanténicos onde se localizam os átomos de azoto e o oxigénio, ao mesmo tempo apontando o anel benzoico para posições mais externas em comparação com os anéis xanténicos (o que é visível, embora não significativamente, nas distâncias ao centro da bicamada da Figura 14 da secção anterior). Curiosamente, este comportamento é diferente do previamente observado para a Rh123, em que preferencialmente o eixo curto tomava valores perpendiculares à normal ($\langle\theta\rangle = 87^\circ$ para a RhB (catião)) ou orientado para o exterior à bicamada ($\langle\theta\rangle = 74^\circ$ para a forma neutra), neste último caso expondo os grupos aminados, mais polares do que na RhB, ao meio aquoso (Magalhães et al., 2018).

3.2.7. Ligações de Hidrogénio

A afinidade da rodamina com a membrana pode ser influenciada pela formação de pontes de hidrogénio entre esta e lípidos da membrana ou moléculas de água. Na molécula de RhB podem ser átomos aceitantes de protões (provenientes de moléculas de água), para a RhB (zwitterião)/catiónica, os oxigénios do ácido carboxílico/carboxilato ligado ao anél benzoico (O22 e O23), e para a RhB (lactona) os oxigénios pertencentes ao carbonilo e ao anél esterificado (O27 e O28). Também o átomo de oxigénio central do núcleo xanténico (O10 para a RhB (zwitterião) e RhB (catião); O31 para a RhB (lactona) representado por “O xanteno” na figura 16B) e os átomos de azoto ligados aos substituintos etilo e ao núcleo xanténico podem atuar como aceitantes. No entanto apenas a RhB (catião) pode ser dadora de protões. O oxigénio do grupo OH pertencente ao ácido carboxílico pode formar ligações de hidrogénio doando protões para moléculas de água, moléculas de POPC ou até outras moléculas de rodamina.

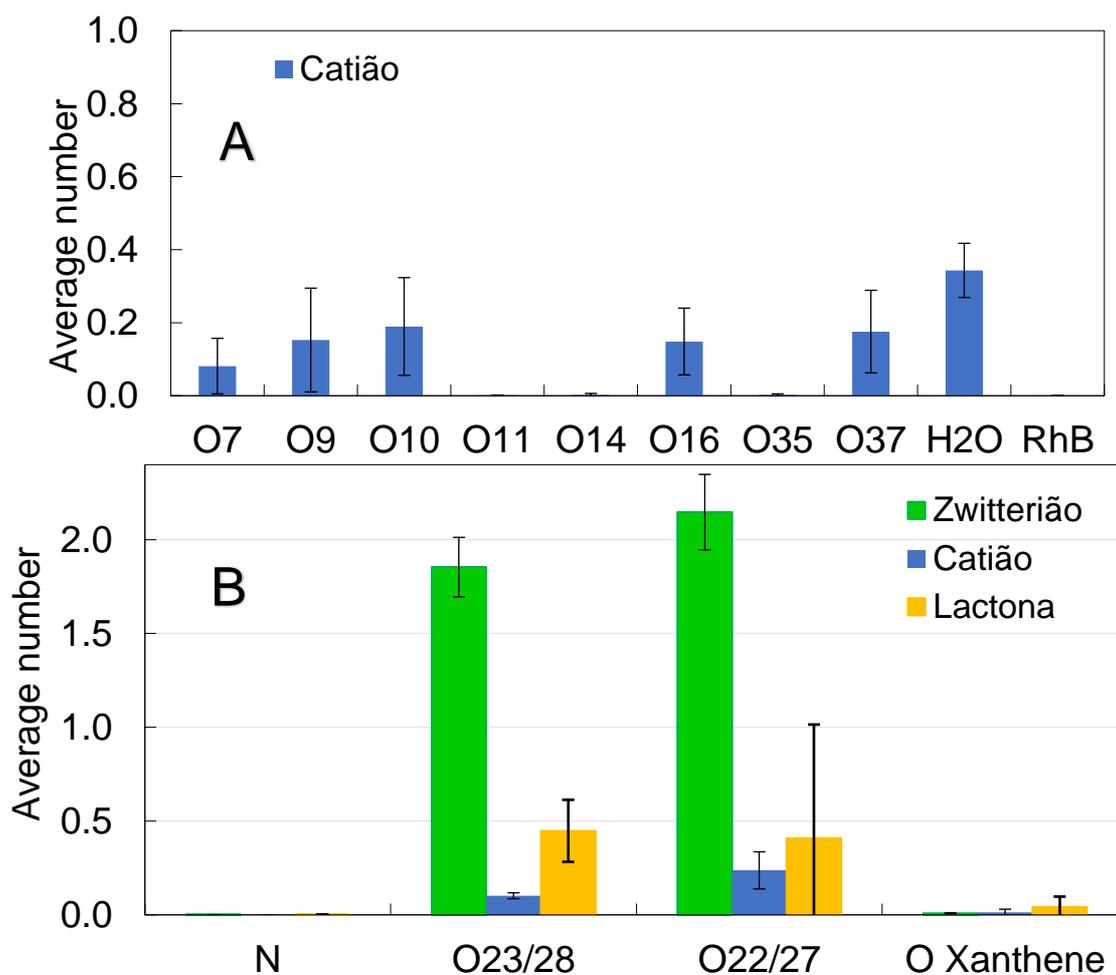


Figura 16. Frequências médias de ligações de hidrogénio envolvendo átomos de Rhb. O painel A diz respeito à molécula de RhB (Catião) como dador e o painel B diz respeito às ligações de hidrogénio feitas com a água como dadora de protões e as Rhs como aceitantes. Todos os valores estão normalizados de modo a que se a frequência traduza o número de ligações por átomo envolvido.

Através do gráfico A da figura 16 conseguimos perceber que cerca de um terço das ligações de hidrogénio em que o grupo OH da RhB (catião) atua como dador são para a água e que o resto são ligações de hidrogénio com átomos pertencentes ao POPC. Durante as três corridas nunca se formaram ligações de hidrogénio entre duas rodaminas. A RhB apresenta um número geral de ligações de hidrogénio menor, mas um padrão semelhante ao padrão verificado em trabalhos anteriores com a Rh123.

No que toca a átomos da RhB como aceitantes (Figura 16B), nenhuma ligação de hidrogénio foi feita com os átomos de azoto nem com o oxigénio central do núcleo xanténico. Comparando tais resultados com os resultados obtidos para a Rh 123 (Magalhães et al., 2018) reparamos que esta foi capaz de estabelecer ligações de hidrogénio com os seus átomos de azoto como aceitantes. A ausência de tais ligações no caso da Rh B pode ser explicada pela localização mais interna destes átomos nesta molécula. Como se pode observar pela figura 3 da secção 1.2.4 os átomos de azoto da Rh 123 apenas estão ligados a dois átomos de Hidrogénio enquanto que na Rh B (Figura 2 da secção 1.2.3) cada átomo de azoto está ligado a um grupo etilo.

No entanto, os átomos de oxigénio pertencentes aos grupos funcionais associados ao anel benzoico foram capazes de formar ligações de hidrogénio como aceitantes de prótons de moléculas de água. Nota-se que há uma frequência muito maior de ligações no caso da RhB (zwitterião). Os seus átomos de oxigénio estão permanentemente saturados, estabelecendo em média quase 2 ligações de hidrogénio com moléculas de água, valor máximo de ligações que cada um destes oxigénios pode estabelecer. Este valor elevado pode ser explicado pela análise das localizações atómicas na secção 3.2.5 (Figura 14). Observou-se então que a RhB (zwitterião) apresentava, em média, o grupo carboxilato substancialmente mais afastado do centro da bicamada do que os átomos correspondentes da Rh123 (Magalhães et al., 2018), das outras formas moleculares da Rh B e também mais afastado do resto da própria molécula. Assim os oxigénios ligados a este grupo dispõem-se também mais externamente, ficando mais expostos e propensos a estabelecer ligações de hidrogénio com moléculas de água. Além disso cada oxigénio do grupo carboxílico da RhB (zwitterião) está ligado apenas a um átomo da molécula de rodamina, tornando estes átomos só por si estereoquimicamente mais acessíveis.

3.2.8. Parâmetros de Ordem Lipídicos

Os parâmetros de ordem lipídicos permitem uma noção do impacto que as rodaminas têm na bicamada lipídica ao serem inseridas na mesma. Estes parâmetros são calculados, para cada átomo de carbono C_i da cadeia, com base no ângulo formado entre o vetor que liga os carbonos precedente e seguinte (C_{i-1} e C_{i+1} , respetivamente) e a direção normal à bicamada. Se o POPC estivesse totalmente esticado, com as cadeias acilo perpendiculares ao plano da membrana o valor dos parâmetros de ordem seria 0,5. Quanto mais próximo do grupo fosfato dos lípidos maior é a ordem das cadeias e à medida que se aumenta o índice dos átomos de carbono, ou seja, à medida que nos aproximamos do extremo da cadeia acilo a ordem vai diminuindo. Este fenómeno pode-se verificar na Figura 17 e já foi observado tanto experimentalmente como por simulação numerosas vezes (Ferreira et al., 2013). Comparando a ordem das cadeias acil de uma simulação de POPC com a ordem das cadeias acilo após inserção de rodaminas conseguimos averiguar quanto é que estas moléculas perturbam a membrana.

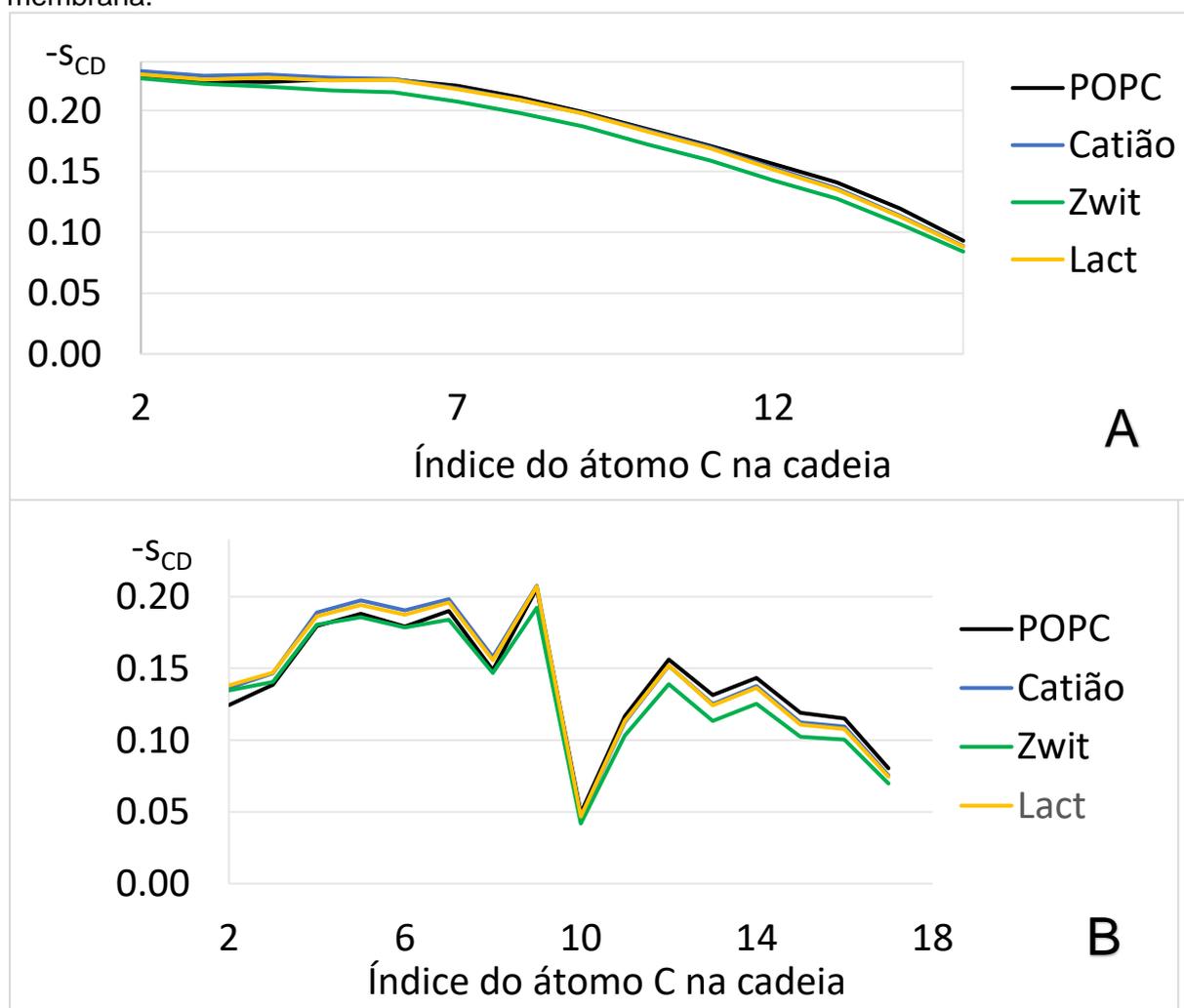


Figura 17. Parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-1 (A) e sn-2 (B) de POPC.

No gráfico A da Figura 17 observamos os parâmetros de ordem das cadeias acilo *sn*-1 de palmitoílo, um resíduo de ácido gordo saturado que faz parte do POPC. No gráfico B temos representados os parâmetros de ordem para a cadeia *sn*-2 de oleoílo do POPC, um resíduo de ácido gordo mono-insaturado com uma ligação dupla no carbono 10, que provoca a diminuição drástica da ordem que vemos no gráfico. Como esperado à medida que nos aproximamos do extremo da molécula a desordem aumenta. No entanto é claro que este aumento é mais abrupto no caso da RhB (zwitterião), tanto para a cadeia *sn*-1 como para *sn*-2, o que vai de acordo aos resultados obtidos na secção 3.2.4., comprovando que de facto esta forma foi a que mais afetou a membrana. Esta diferença é mais notória no segmento inferior das cadeias, sendo que nos primeiros carbonos das cadeias esta forma aparenta seguir o perfil do POPC sem diferenças significativas. As rodaminas sob a RhB (catião) e lactónica provocaram, para o segmento superior das cadeias acil, um aumento ligeiro dos parâmetros de ordem. Os resultados das três formas no segmento superior podem ser explicados pela preferência das moléculas em assumir posições mais próximas dos grupos polares do POPC do que do centro da membrana. Assim, a presença do sistema rígido de anéis xanténicos poderá induzir um ligeiro aumento de ordem local naquela região da bicamada, gerando parâmetros de ordem semelhantes ou até maiores do que numa membrana sem solutos inseridos. Este fenómeno aplica-se mais ao caso das formas lactónica e catiónica, pois como se observou na Figura 15 da secção 3.2.6, estas moléculas não estão inteiramente paralelas ao plano da bicamada, pelo que o ligeiro ângulo que formam pode ajudar a promover o alinhamento das cadeias acilo nessa região. No entanto, a RhB (zwitterião) deverá estar efetivamente alinhada quase horizontalmente, não facilitando minimamente o empacotamento das cadeias. Por outro lado, o facto de as rodaminas preferirem localizações mais externas na membrana faz com que se crie um vazio na zona mais interna a estas, perto do centro da bicamada. Tal vazio tem depois de ser preenchido pelos segmentos inferiores de cadeias acilo de moléculas de POPC adjacentes reduzindo os parâmetros de ordem das mesmas.

3.2.9. Eixo Fosfato-Colina

A possível perturbação das rodaminas na bicamada pode também ser avaliada pela análise da orientação do eixo fosfato-colina (eixo P-N). Os grupos da “cabeça” dos lípidos membranares não se encontram alinhados na vertical, mas apresentam uma inclinação característica que alcança valores próximos de 90° relativamente à normal da membrana, estando praticamente paralelos ao plano da bicamada (Ulmschneider & Ulmschneider, 2009). Estes valores obtêm-se calculando a média das distribuições dos vetores que conectam o fósforo do fosfato e o azoto da colina ao longo da simulação para todas as moléculas de lípidos (Figura 18). Apesar do eixo P-N poder variar bastante de molécula para molécula e ao longo do tempo e da distribuição que membranas de POPC apresentam ser bastante ampla, a curva de distribuição e o valor médio da mesma é bastante semelhante de sistema para sistema. Assim é possível fazer uma comparação entre a curva de distribuição do eixo P-N em membranas com POPC puro e em membranas com moléculas inseridas e detetar diferenças causadas pela inserção destas moléculas, da qual se poderá inferir a eventual perturbação que estas causam na região interfacial da bicamada.

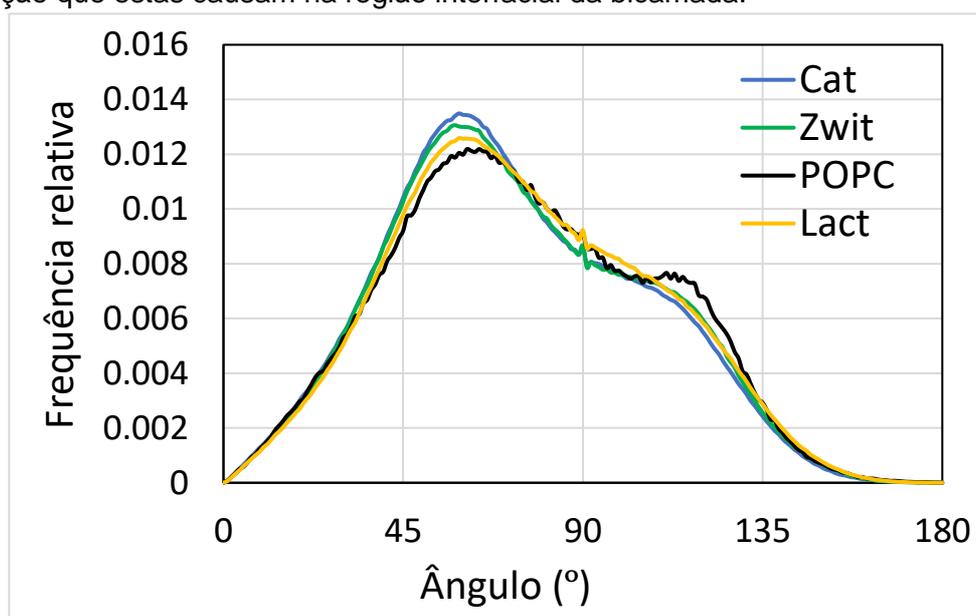


Figura 18. Distribuição dos ângulos entre o eixo P-N da molécula de POPC e a normal à bicamada em POPC puro e após inserção de moléculas de Rh.

O ângulo médio do eixo P-N em relação à normal da bicamada em bicamadas de POPC puro é de 75,79°, tendo um máximo a cerca de 65°. Analisando o gráfico da Figura 18 notamos logo que nas corridas com rodaminas a distribuição parece sofrer um ligeiro desvio para ângulos mais agudos. O ângulo médio do eixo para as corridas da RhB (catião) foi de 73,15°, para a RhB (zwitterião) foi de 74,08° e para a RhB (lactona) foi de 75,29°. Este fenómeno ocorre pois as moléculas de rodamina situando-se em posições relativamente perto do grupo

fosfato e da molécula de colina, conseguem interagir com estes grupos forçando a diminuição do ângulo do eixo P-N em relação à normal da bicamada. Repara-se também que este efeito é mais acentuado para a RhB (catião) e RhB (zwitterião) que exibem posições mais externas na membrana e que a RhB (lactona) tem um valor médio do ângulo muito próximo do valor do POPC puro. Estes resultados reforçam que a RhB (lactona) afeta em menor grau as propriedades da membrana do que as duas outras formas.

3.2.10. Perfis de Energia Livre

Os perfis de energia livre das rodaminas são calculados usando duas moléculas, uma no centro da bicamada e a outra a cerca de 4 nm do centro. Em ambas as moléculas é aplicada uma força de *pulling* na mesma direção (com velocidade de 0.5 nm/ns), e obtém-se um ficheiro com as coordenadas de cada uma das moléculas ao longo do tempo. Desta simulação foram extraídos 41 frames em que a molécula estava aproximadamente em cada uma das posições transversas entre $z = 0$ e $z = 4,0$ nm. Cada um destes frames foi depois simulado durante 120 ns com uma penalização energética elevada (através da imposição dum potencial harmónico, com constante de força $3000 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$) que impede a molécula de sair livremente da sua posição (restrição harmónica, *umbrella sampling*) de modo a se medir a força sentida pela molécula em cada posição da coordenada reacional. Das distribuições++ de forças calculadas ao longo das várias trajetórias, o programa gmx wham, que implementa o método WHAM (*Weighted Histogram Analysis Method*) (Hub et al., 2010), reconstitui o potencial de força média (PMF), que dá o perfil de energia livre em função da coordenada reacional. Este perfil de energia livre acaba por descrever, para cada posição em relação ao centro da bicamada, a “vontade” que a molécula tem de permanecer em tal posição ou de se deslocar.

Como discutido na literatura, os perfis de PMF obtidos através de simulações *umbrella sampling* são susceptíveis a problemas de convergência que invalidariam os resultados (Filipe et al., 2014). Para testar tal hipótese, obtiveram-se perfis PMF usando diferentes regiões do intervalo de tempo $0 < t < 120$ ns usado para simulação. As Figuras Sx-Sy mostram a variação dos perfis obtidos descartando porções iniciais (B) ou finais (C) do intervalo de tempo, ou usando diferentes intervalos de amostragem de 20-ns (D) para cada forma molecular de cada espécie de rodamina. Apesar de, à medida que o intervalo de tempo considerado para análise é aumentado as curvas de PMF começarem a convergir verifica-se alguma variabilidade. No caso da RhB (lactona) e da Rh123 (0), as curvas PMF obtidas usando diferentes intervalos de amostragem de 20-ns (painéis D) não demonstram um comportamento sistemático, levando a variações pequenas e não-monotónicas das barreiras de energia livre para a translocação e dessorção (painéis E). No caso da RhB (zwitterião) verifica-se uma evolução principalmente monotónica. Observando os painéis B e C da Figura Sx verificamos que à medida que o tempo considerado para análise é estendido, descartando menos tempo no início ou no fim, respetivamente, as curvas de PMF resultantes demonstram uma tendência descendente e ascendente, respetivamente. Nestes casos poderia-se afirmar que os perfis não atingiram uma convergência completa. No entanto decidiu-se não se estender as simulações pois mesmo nos piores casos verificam-se sinais de início da convergência. Foi

decidido que para efeitos de comparação dos PMFs se descartariam os 20 ns iniciais, pois esta parte da simulação frequentemente levou a discrepâncias nos resultados (provavelmente devidos ao facto de os sistemas ainda estarem a equilibrar após a perturbação induzida pelo *pulling*). Na Figura 19A e 19B podem ser visualizados os perfis resultantes, dos quais não se descarta a possibilidade de haver convergência incompleta. No entanto as sobreposições razoáveis entre as distribuições do z em simulações com posições adjacentes (Figura Sxx) não revelam problemas numéricos sérios no cálculo dos PMFs pelo que achamos que há algumas conclusões que podem ser retiradas desta análise com alguma segurança.

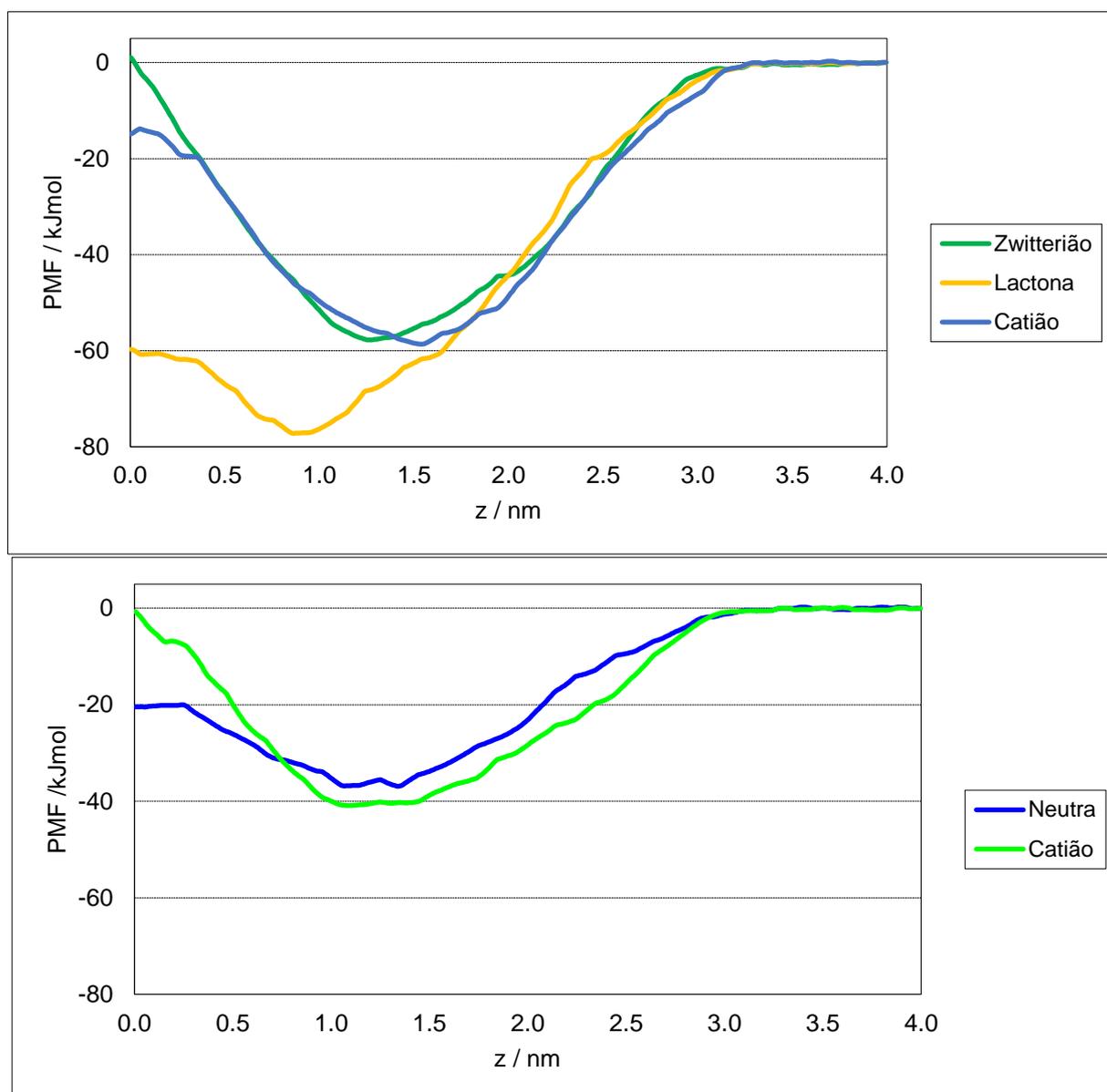


Figura 19. Perfis das PMFs das duas espécies de Rhs em estudo: RhB (painél A) e Rh123 (painél B). Os perfis aqui demonstrados foram obtidos descartando os primeiros 20 ns da análise.

O gráfico B da Figura 19, relativo ao perfil de energia livre da Rh123 está presente apenas como termo de comparação com o perfil de energia livre da RhB, pelo que não irei fazer uma análise tão aprofundada do mesmo. Numa primeira observação do gráfico (B), repara-se logo numa diferença notável na localização e nos valores dos mínimos de energia livre. A RhB (lactona) apresenta o valor mais baixo do mínimo de energia livre (quase 80 kJmol^{-1}), a RhB (zwitterião) e RhB (catião) têm valores intermédios (cerca de 60 kJmol^{-1}) e ambas as formas moleculares da Rh123 apresentam os valores mais baixos (cerca de 40 kJmol^{-1}). Os mínimos de energia livre estão localizados a $z \sim 1.0 \text{ nm}$ para a RhB (lactona) e a $z \sim 1.5 \text{ nm}$ para as outras formas moleculares da RhB, o que está em concordância com as posições transversais médias dos seus centros de massa da Fig. x da secção 3.2.5.. Tais resultados aliados ao facto de a RhB (lactona) também possuir o menor valor de energia livre de translocação ($< 20 \text{ kJmol}^{-1}$ facilmente observado no painel E da figura Sx) confirmam-na como a forma molecular da RhB mais lipofílica. As diferenças nos valores de energia livre de translocação entre a RhB (zwitterião) e RhB (catião) foram interessantes. A RhB (+1) que globalmente seria a mais polar apresenta uma barreira de translocação menor do que a RhB (zwitterião). Existe uma hipótese que pode ajudar a explicar tal resultado. A RhB (zwitterião), embora tenha carga global 0, apresenta separação de cargas bem definida ((+1) nos anéis xanténico e (-1) no carboxilato) enquanto que a RhB (+1) apesar de manter a carga positiva no núcleo xanténico tem a carga negativa do carboxilato neutralizada. Tendo isto em conta, e simplificando o processo de translocação, podemos afirmar que o transporte de duas cargas no caso da RhB (zwitterião) comparando com o transporte de apenas uma carga no caso da RhB (catião) implica um custo de energia livre adicional.

No que diz respeito à comparação entre as duas espécies de rodamina, mesmo excluindo a RhB (lactona), os perfis de energia livre da RhB apresentam mínimos consideravelmente mais baixos do que os da Rh123, o que aponta a RhB como a espécie mais lipofílica. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com a diferença entre as duas espécies de rodamina no que diz respeito aos seus coeficientes de partição membrana/água calculados experimentalmente. Tal como referido na secção 1.2.4., a RhB apresenta um coeficiente de partição superior em três ordens de grandeza ao da Rh123, confirmando de novo a RhB como a espécie mais lipofílica.

De seguida, foram-se calcular os coeficientes de partição, não experimentalmente, mas a partir dos dados da simulação. Este pode ser calculado, seguindo os passos de trabalhos anteriores (Kiametis et al., 2018) resolvendo a seguinte equação

$$K_p \propto \int_0^a \exp(-\Delta G(z)/RT) dz \quad (9)$$

onde a representa um valor de z numa localização na fase aquosa (4.0 nm neste caso) e ΔG representa a energia livre de cada molécula, obtida através do cálculo dos perfis de PMF. Podem-se então calcular os integrais da Eq. (nº) para as diferentes espécies de Rh e comparar os seus valores normalizados (divididos pelo valor de integral mais baixo). A tabela 1 engloba tais resultados:

Tabela 1. Coeficientes de partição POPC/água “normalizados” obtidos através de experiências de espectroscopia de fluorescência e de simulações de MD.

Experimental	Rh123		RhB		
K_p Experimental	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^2$		$(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$		
“ K_p normalizado”	1		1.1×10^3		
Computational	neutra	catião	lactona	zwit.	catião
Integral normalizado	1.0	5.6	7.4×10^6	3.5×10^3	4.6×10^3

Para a Rh123 obteve-se um valor de K_p normalizado ~ 1 (K_p experimental = $(1.0 \pm 0.2) \times 10^2$) e para a RhB obteve-se um valor de K_p normalizado $\sim 1.1 \times 10^3$ (K_p experimental = $(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$). É de relembrar que os valores obtidos experimentalmente combinam as contribuições dos vários estados de ionização das rodaminas enquanto que as estimativas por simulação calculam os coeficientes de partição para cada forma molecular independente. Apesar disso verificam-se ainda assim diferenças de três ordens de grandeza entre os coeficientes das duas espécies de Rh. Tal como referido na secção 1.2.4. uma hipótese que poderia explicar esta diferença seria o facto de a pH neutro a RhB se manter, de forma estável, no estado de ionização neutro enquanto que a a Rh123 poderia oscilar entre a sua RhB (catião) e neutra podendo alterar por completo a sua partição para a membrana. Dado que os valores do K_p obtidos computacionalmente são calculados inicialmente para cada uma das formas da RhB e Rh123 separadas, e que as moléculas não oscilam entre duas formas, as diferenças aqui obtidas não poderão estar relacionadas com os diferentes pK_a . Provavelmente, a diferença entre as duas formas deve-se sobretudo ao facto de, na RhB, os átomos de azoto estarem globalmente substituídos com grupos etilo, enquanto na Rh123, os substituintes são átomos de hidrogénio. Isto faz aumentar a hidrofobicidade desta região da molécula na RhB, elimina a possibilidade de estabelecimento de ligações de H com dadores NH e reduz mesmo dramaticamente a possibilidade destes átomos de N atuarem como aceitantes de H de moléculas de água. Presumivelmente, estes fatores serão os determinantes principais para a partição acrescida da RhB face à Rh123.

4. Conclusão

Neste trabalho simularam-se as três formas moleculares da RhB em bicamadas de POPC. Com as ferramentas devidas, calcularam-se diversos parâmetros de interesse que, após uma análise detalhada de cada um e comparação entre si, nos permitiram perceber o comportamento e interferência destas moléculas na membrana.

Primeiramente, pode-se concluir que as três formas moleculares da Rh se localizam em posições relativamente externas na membrana. Este facto é apoiado não só pela análise dos perfis de densidade e localizações atómicas, como também pela diminuição que causam no ângulo médio do eixo P-N, indicador que as Rh interagem com o fosfato e a colina do POPC obrigando-os a assumir posições mais verticais, alinhadas com a normal à bicamada. No entanto, a RhB (lactona) tem tendência para se localizar mais internamente que as duas outras formas. Além disso, é também a forma que apresenta o valor mais baixo do mínimo de energia livre e menor barreira energética de translocação, confirmando-a como a RhB mais lipofílica. O facto do carboxilato da RhB (zwitterião) estar ionizado, parece afetar intensamente o comportamento desta molécula. Salienta-se que o anel benzoico da RhB (zwitterião) parece sofrer uma rotação sobre o seu eixo curto de modo a expor este substituinte ao solvente e assim maximizar o seu potencial para estabelecer ligações de hidrogénio com moléculas de água. Além disso esta forma aparenta ser a que mais afeta a membrana, tendo-se obtido o maior valor de área por lípido e, a diminuição mais acentuada dos parâmetros de ordem das cadeias acilo. Outro resultado que é de salientar é que a RhB (catião), apesar de ser a única forma molecular de RhB globalmente carregada, apresenta uma barreira de translocação inferior à da RhB (zwitterião). Isto deve-se à separação de cargas que se verifica na RhB (zwitterião). Assim a translocação da molécula neste caso envolve o transporte de duas cargas, enquanto que na RhB (catião) envolve apenas uma, implicando um custo de energia livre superior para a translocação da RhB (zwitterião).

A análise da orientação das moléculas revelou que as três formas da RhB assumem posições em que estão quase paralelas ao plano da bicamada, estando o núcleo xanténico ligeiramente mais interno do que o anel benzoico. Este facto contrasta com o que se verificou para a Rh123, que tem o seu anel benzoico esterificado com um grupo metilo, tornando-o mais hidrofóbico, levando a que este se localize em posições mais internas. Verificou-se também que a RhB apresenta valores mais baixos dos mínimos de energia livre do que a Rh123. Estes resultados

estão em concordância com o maior valor do coeficiente de partição POPC/água da RhB relativamente à Rh123, obtido experimentalmente.

Este estudo faz parte de um trabalho maior em que se pretendia avaliar diversas características de sondas fluorescentes. Assim os resultados aqui obtidos poderão servir como uma útil ferramenta de comparação entre a molécula de RhB e outras sondas fluorescentes. Adicionalmente, este trabalho permite que, caso se queira estudar experimentalmente a RhB, já se tenha um melhor contexto sobre a molécula e algumas propriedades da mesma.

Referências

- Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., & El-Halawany, A. M. (2015). P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 45–62. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.11.008>
- Abraham, L., Hess, & Spoel. (2021). *GROMACS 2021.3 Manual*.
- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindah, E. (2015). Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics*, 27(5), 1208–1209. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>
- Beija, M., Afonso, C. A. M., & Martinho, J. M. G. (2009). Synthesis and applications of rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2410–2433. <https://doi.org/10.1039/b901612k>
- Berendsen, H. J. C., & Marrink, S. J. (1993). Molecular dynamics of water transport through membranes: Water from solvent to solute. *Pure and Applied Chemistry*, 65(12), 2513–2520. <https://doi.org/10.1351/pac199365122513>
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., Dinola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., & Hermans, J. (1981). Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. *Intramolecular Forces*, 53(9), 331–342. http://www.in.gov/idem/stormwater/files/stormwater_manual_chap_04.pdf%0Ahttps://books.google.com.pk/books?hl=en&lr=&id=khiyTWMHEv4C&oi=fnd&pg=PR1&dq=work+principle+in+material+handling&ots=2r32c4kZCw&sig=skADwKMzfLEY1p7tjOoUEDuUZTg&redir_esc=y#v=onepage&q
- Besler, B. H., Jr., K. M. M., & Kollman, P. A. (1990). Atomic charges derived from semiempirical methods. *Journal of Chemical Physics*, 11, 431–439.
- Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*, 126(1). <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
- C, A., V, B., R., C., E, C., M, C., B, M., CS, P., & J, T. (1999). Recent advances in the description of solvent effects with the polarizable continuum model. *Advances in Quantum Chemistry*, 32, 227–261.
- Cascella, M., & Vanni, S. (2015). Toward accurate coarse-graining approaches for protein and membrane simulations. *Chemical Modelling*, 12, 1–52.
- Chambers, R. (1922). A MICRO INJECTION STUDY ON THE P E R M E A B I L I T Y. *The Journal of General Physiology*, 5(2), 189–193.
- Chen, C., Depa, P., Sakai, V. G., Maranas, J. K., Lynn, J. W., Peral, I., & Copley, J. R. D. (2006). A comparison of united atom, explicit atom, and coarse-grained simulation models for poly(ethylene oxide). *Journal of Chemical Physics*, 124(23). <https://doi.org/10.1063/1.2204035>

- Cossi, M., & Barone, V. (2001). Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions. *Journal of Chemical Physics*, *115*(10), 4708–4717. <https://doi.org/10.1063/1.1394921>
- Cournia, Z., Allen, T. W., Andricioaei, I., Antony, B., Baum, D., Brannigan, G., Buchete, N. V., Deckman, J. T., Delemotte, L., del Val, C., Friedman, R., Gkeka, P., Hege, H. C., Hénin, J., Kasimova, M. A., Kolocouris, A., Klein, M. L., Khalid, S., Lemieux, M. J., ... Bondar, A. N. (2015). Membrane Protein Structure, Function, and Dynamics: a Perspective from Experiments and Theory. *Journal of Membrane Biology*, *248*(4), 611–640. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9802-0>
- Danielli, J., & Davson, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, *5*(4), 495–508. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(83\)85098-4](https://doi.org/10.1016/0022-2860(83)85098-4)
- Di, L., Artursson, P., Avdeef, A., Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Houston, J. B., Kansy, M., Kerns, E. H., Krämer, S. D., Lennernäs, H., & Sugano, K. (2012). Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport. *Drug Discovery Today*, *17*(15–16), 905–912. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.015>
- Diem, M., & Oostenbrink, C. (2020). The effect of different cutoff schemes in molecular simulations of proteins. *Journal of Computational Chemistry*, *41*(32), 2740–2749. <https://doi.org/10.1002/jcc.26426>
- Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, *438*, 578–580. <https://doi.org/10.1038/nature04394>
- Enkavi, G., Javanainen, M., Kulig, W., Róg, T., & Vattulainen, I. (2019). *Multiscale Simulations of Biological Membranes: The Challenge To Understand Biological Phenomena in a Living Substance*. Chemical Reviews. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00538>
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, *103*(19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Ferreira, T. M., Coreta-Gomes, F., Samuli Ollila, O. H., Moreno, M. J., Vaz, W. L. C., & Topgaard, D. (2013). Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: Solid state 1H-13C NMR and MD simulation studies. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *15*(6), 1976–1989. <https://doi.org/10.1039/c2cp42738a>
- Filipe, H. A. L., Moreno, M. J., & Loura, L. M. S. (2011). Interaction of 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled fatty amines with 1-palmitoyl, 2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayers: A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*, *115*(33), 10109–10119. <https://doi.org/10.1021/jp203532c>
- Filipe, H. A. L., Moreno, M. J., & Loura, L. M. S. (2020). The secret lives of fluorescent membrane probes as revealed by molecular dynamics simulations. *Molecules*, *25*(15), 1–43. <https://doi.org/10.3390/molecules25153424>
- Filipe, H. A. L., Moreno, M. J., Róg, T., Vattulainen, I., & Loura, L. M. S. (2014). How to tackle the issues in free energy simulations of long amphiphiles interacting with lipid membranes: Convergence and local membrane deformations. *Journal of Physical Chemistry B*, *118*(13), 3572–3581. <https://doi.org/10.1021/jp501622d>
- Filipe, H. A. L., Santos, L. S., Prates Ramalho, J. P., Moreno, M. J., & Loura, L. M. S. (2015). Behaviour of NBD-head group labelled phosphatidylethanolamines in POPC bilayers: a molecular dynamics study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *17*(31), 20066–20079. <https://doi.org/10.1039/c5cp01596k>

- Fogolari, F., Corazza, A., & Esposito, G. (2018). Free energy, enthalpy and entropy from implicit solvent end-point simulations. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *5*, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00011>
- Fu, Y., & Finney, N. S. (2018). Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Advances*, *8*(51), 29051–29061. <https://doi.org/10.1039/c8ra02297f>
- Gautier, A., & Hinner, M. J. (2015). Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols*, *1266*, 1–267. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7>
- Gordon, M. S., & Schmidt, M. W. (2005). *Theory and Applications of Computational Chemistry*.
- Gorter, E., & Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, *41*(4), 439–444. <https://doi.org/10.1084/jem.41.4.439>
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Heller, H., Scafer, M., & Schulten, K. (1993). Molecular Dynamics simulation of a bilayer membrane of 200 Lipids in Gel and in the Liquid-Crystal Phases. *J. Chem. Phys.*, *97*, 8343–8360.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *18*(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- Hinckley, D. A., & Seybold, P. G. (1988). A spectroscopic/thermodynamic study of the rhodamine B lactone \rightleftharpoons zwitterion equilibrium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, *44*(10), 1053–1059. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(88\)80227-7](https://doi.org/10.1016/0584-8539(88)80227-7)
- Huang, M. J., Kapral, R., Mikhailov, A. S., & Chen, H. Y. (2012). Coarse-grain model for lipid bilayer self-assembly and dynamics: Multiparticle collision description of the solvent. *Journal of Chemical Physics*, *137*(5). <https://doi.org/10.1063/1.4736414>
- Hub, J. S., de Groot, B. L., & van der Spoel, D. (2010). G-whams-a free Weighted Histogram Analysis implementation including robust error and autocorrelation estimates. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *6*(12), 3713–3720. <https://doi.org/10.1021/ct100494z>
- Jing, P., Rodgers, P. J., & Amemiya, S. (2009). High lipophilicity of perfluoroalkyl carboxylate and sulfonate: Implications for their membrane permeability. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(6), 2290–2296. <https://doi.org/10.1021/ja807961s>
- Jönsson, B., Edholm, O., & Teleman, O. (1986). Molecular dynamics simulations of a sodium octanoate micelle in aqueous solution. *The Journal of Chemical Physics*, *85*(4), 2259–2271. <https://doi.org/10.1063/1.451122>
- Karpiuk, J., Grabowski, Z. R., & de Schryver, F. C. (1994). Photophysics of the lactone form of rhodamine 101. *Journal of Physical Chemistry*, *98*(13), 3247–3256. <https://doi.org/10.1021/j100064a001>
- Katiyar, R. S., & Jha, P. K. (2018). Molecular simulations in drug delivery: Opportunities and challenges. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *8*(4), 1–18. <https://doi.org/10.1002/wcms.1358>

- Kiametis, A. S., Stock, L., Cirqueira, L., & Treptow, W. (2018). Atomistic Model for Simulations of the Sedative Hypnotic Drug 2,2,2-Trichloroethanol. *ACS Omega*, 3(11), 15916–15923. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02017>
- Kleinzeller, A. (1999). Charles Ernest Overton's Concept of a Cell Membrane. *Current Topics in Membranes and Transport*, 48(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)61039-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)61039-4)
- Konings, W. N., & Poelarends, G. J. (2002). Bacterial multidrug resistance mediated by a homologue of the human multidrug transporter P-glycoprotein. *IUBMB Life*, 53(4–5), 213–218. <https://doi.org/10.1080/15216540212646>
- Kosaka, N., Ogawa, M., Choyke, P. L., & Kobayashi, H. (2009). Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer. *Future Oncology*, 5(9), 1501–1511. <https://doi.org/10.2217/fon.09.109>
- Kox, A. J., Michels, J. P. J., & Wiegel, F. W. (1980). Simulation of a lipid monolayer using molecular dynamics. *Nature*, 287(5780), 317–319. <https://doi.org/10.1038/287317a0>
- Koziara, K. B., Stroet, M., Malde, A. K., & Mark, A. E. (2014). Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: Prediction of hydration free enthalpies. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 28(3), 221–233. <https://doi.org/10.1007/s10822-014-9713-7>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principals of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition*.
- Licha, K., & Resch-Genger, U. (2014). Fluorescent Reporters and Optical Probes. In *Comprehensive Biomedical Physics* (Vol. 4, pp. 85–109). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.00402-0>
- Lombard, J. (2014). Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biology Direct*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13062-014-0032-7>
- Magalhães, N., Filipe, H. A. L., & Loura, L. M. S. (2018). Estudo do comportamento de moléculas anfifílicas em membranas por dinâmica molecular. *Relatório de Estágio Da Licenciatura Em Química Medicinal, Universidade de Coimbra. Disponível Online Em* <https://Apps.Uc.Pt/MyPage/Files/Lloura/2298>.
- Maibaum, L., Dinner, A. R., & Chandler, D. (2004). *Micelle Formation and the Hydrophobic Effect*. 108(21), 6778–6781.
- Malde, A. K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P. C., Oostenbrink, C., & Mark, A. E. (2011). An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(12), 4026–4037.
- Mark, P., & Nilsson, L. (2001). Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>
- Marshall, M. v., Rasmussen, J. C., Tan, I.-C., Aldrich, M. B., Adams, K. E., Wang, X., Fife, C. E., Maus, E. A., Smith, L. A., & Sevick-Muraca, E. M. (2020). Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update. *The Open Surgical Oncology Journal*, 2(2), 12–25. <https://doi.org/10.2174/1876504101002010012>
- McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), 585–590.
- Miyamoto, S., & Kollman, P. A. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8), 952–962. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>

- Moqadam, M., Tubiana, T., Moutoussamy, E. E., & Reuter, N. (2021). Membrane models for molecular simulations of peripheral membrane proteins. *Advances in Physics: X*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/23746149.2021.1932589>
- Moradi, S., Nowroozi, A., & Shahlaei, M. (2019). Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study. *RSC Advances*, 9(8), 4644–4658. <https://doi.org/10.1039/C8RA08441F>
- Morange, M. (2013). What history tells us XXX. the emergence of the fluid mosaic model of membranes. *Journal of Biosciences*, 38(1), 3–7. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9301-3>
- Nicolson, G. L. (2014). The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(6), 1451–1466. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2013.10.019>
- Perdew, J. P. (1986). Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Journal of Chemical Physics*, 33(12), 8822–8824. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.34.7406>
- Pethig, R., & Ilka, S. (2012). Marking 100 years since Rudolf Höber's discovery of the insulating envelope surrounding cells and of the β -dispersion exhibited by tissue. *Journal of Electrical Bioimpedance*, 3, 74–79.
- Poger, D., & Mark, A. E. (2010). On the validation of molecular dynamics simulations of saturated and cis-monounsaturated phosphatidylcholine lipid bilayers: A comparison with experiment. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(1), 325–336. <https://doi.org/10.1021/ct900487a>
- Rajasekar, M. (2021). Recent Trends in Rhodamine derivatives as fluorescent probes for biomaterial applications. *Journal of Molecular Structure*, 1235, 130232. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130232>
- Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). Computational Chemistry. In *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment* (pp. 151–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801505-6.00005-3>
- Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A. E., & van Gunsteren, W. F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*, 40(7), 843–856. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>
- Schmidt, M. W., Baldrige, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., Jensen, J. H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K. A., Su, S., Windus, T. L., Dupuis, M., & Montgomery, J. A. (1993). General atomic and molecular electronic structure system. *Journal of Computational Chemistry*, 14(11), 1347–1363. <https://doi.org/10.1002/jcc.540141112>
- Schüttelkopf, A. W., & van Aalten, D. M. F. (2004). PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(8), 1355–1363. <https://doi.org/10.1107/S09074444904011679>
- Schwann, T. H. (1993). Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants. 1847. *Obesity Research*, 1(5), 408–418. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1993.tb00021.x>
- Singer, S. J. (1974). The molecular organization of membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 43(1), 805–833. https://doi.org/10.1007/978-3-642-48939-6_6

- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. In *Science: Vol. 175(4023)* (pp. 720–731).
- Singh, U. C., & Kollman, P. A. (1984). An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, *5*(2), 129–145. <https://doi.org/10.1002/jcc.540050204>
- Stillwell, W. (2016). Membrane Transport. *An Introduction to Biological Membranes*, 423–451. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63772-7.00019-1>
- Subczynski, W. K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., & Raguz, M. (2017). High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *75*(3–4), 369–385. <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0792-7>
- Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., & Senner, F. (2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews Drug Discovery*, *9*(8), 597–614. <https://doi.org/10.1038/nrd3187>
- Tu, K., Tobias, D. J., Blasie, J. K., & Klein, M. L. (1996a). Constant pressure and temperature molecular dynamics simulation of a fully hydrated liquid crystal phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophysical Journal*, *69*, 2558–2562. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79623-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79623-6)
- Tu, K., Tobias, D. J., Blasie, J. K., & Klein, M. L. (1996b). Molecular dynamics investigation of the structure of a fully hydrated gel-phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophysical Journal*, *70*, 595–608. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79623-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79623-6)
- Ulmschneider, J. P., & Ulmschneider, M. B. (2009). United atom lipid parameters for combination with the optimized potentials for liquid simulations all-atom force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *5*(7), 1803–1813. <https://doi.org/10.1021/ct900086b>
- van der Ploeg, P., & Berendsen, H. J. C. (1982). Molecular dynamics simulation of a bilayer membrane. *The Journal of Chemical Physics*, *76*(6), 3271–3276. <https://doi.org/10.1063/1.443321>
- Venable, R. M., Zhang, Y., Hardy, B. J., & Pastor, R. W. (1993). Molecular dynamics simulations of a lipid bilayer and of hexadecane: An investigation of membrane fluidity. *Science*, *262*(5131), 223–226. <https://doi.org/10.1126/science.8211140>
- Wagh, S. B., Maslivetc, V. A., Clair, J. J. la, & Kornienko, A. (2021). Lessons in Organic Fluorescent Probe Discovery. *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/CBIC.202100171>
- Wagh, S. B., Maslivetc, V. A., la Clair, J. J., & Kornienko, A. (2021). Lessons in Organic Fluorescent Probe Discovery. *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100171>
- Wang, P., Cheng, M., & Zhang, Z. (2014). On different photodecomposition behaviors of rhodamine B on laponite and montmorillonite clay under visible light irradiation. *Journal of Saudi Chemical Society*, *18*(4), 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2013.11.006>
- Wieland, T. (1977). Modification of actins by phallotoxins. *Naturwissenschaften*, *64*(6), 303–309. <https://doi.org/10.1007/BF00446784>
- Wysocki, L. M., & Lavis, L. D. (2011). Advances in the chemistry of small molecule fluorescent probes. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 752–759). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.10.013>

- Yamada, Y., Gohda, S., Abe, K., Togo, T., Shimano, N., Sasaki, T., Tanaka, H., Ono, H., Ohba, T., Kubo, S., Ohkubo, T., & Sato, S. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.07.012>
- Yu, Y., Murthy, B. N., Shapter, J. G., Constantopoulos, K. T., Voelcker, N. H., & Ellis, A. v. (2013). Benzene carboxylic acid derivatized graphene oxide nanosheets on natural zeolites as effective adsorbents for cationic dye removal. *Journal of Hazardous Materials*, *260*, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.041>
- Ziarani, G. M., Moradi, R., Lashgari, N., & Kruger, H. G. (2018). Fluorescein Dyes. *Metal-Free Synthetic Organic Dyes*, 165–170. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815647-6.00010-8>

Anexos/Informação suplementar

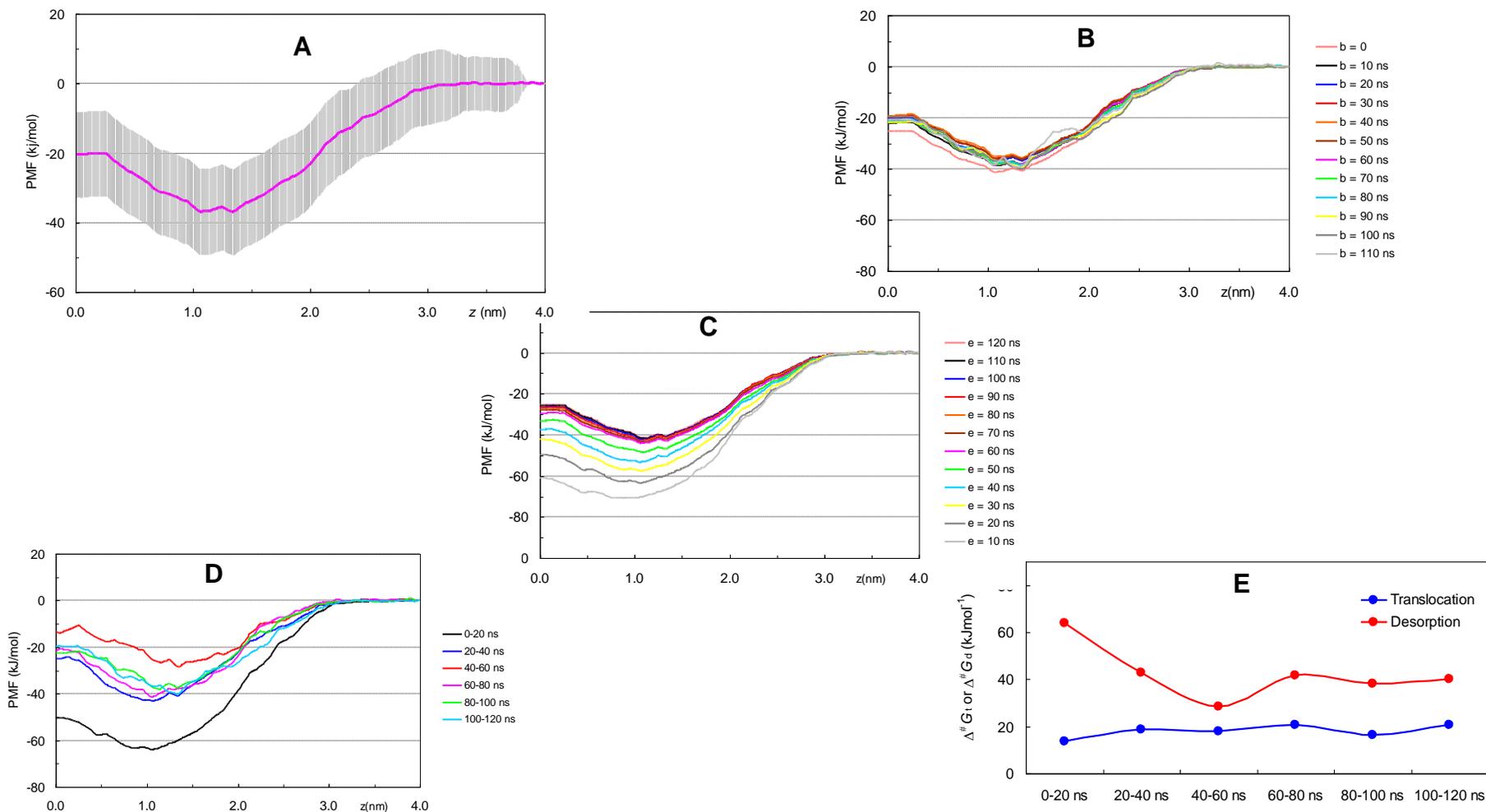


Figura suplementar S1 – Análise de convergência e do erro de PMF para a Rh123 (0). (A) a curva de PMF é calculada usando os últimos 100 ns dos 120 ns das corridas de amostragem. (B) Convergência dos perfis de PMF obtidos descartando tempos iniciais de simulação. $b=t$ sendo que tempos anteriores a t não foram considerados para análise. (C) Convergência dos perfis de PMF obtidos descartando tempos finais de simulação. $e=t$ sendo que os tempos a seguir a t não foram considerados para análise. (D) PMFs obtidas considerando diferentes intervalos de tempo de 20 ns. (E) Energias livres de translocação e dessorção ($\Delta^\#G_t$ e $\Delta^\#G_d$, respectivamente) calculadas a partir de cada curva de PMF do painel D.

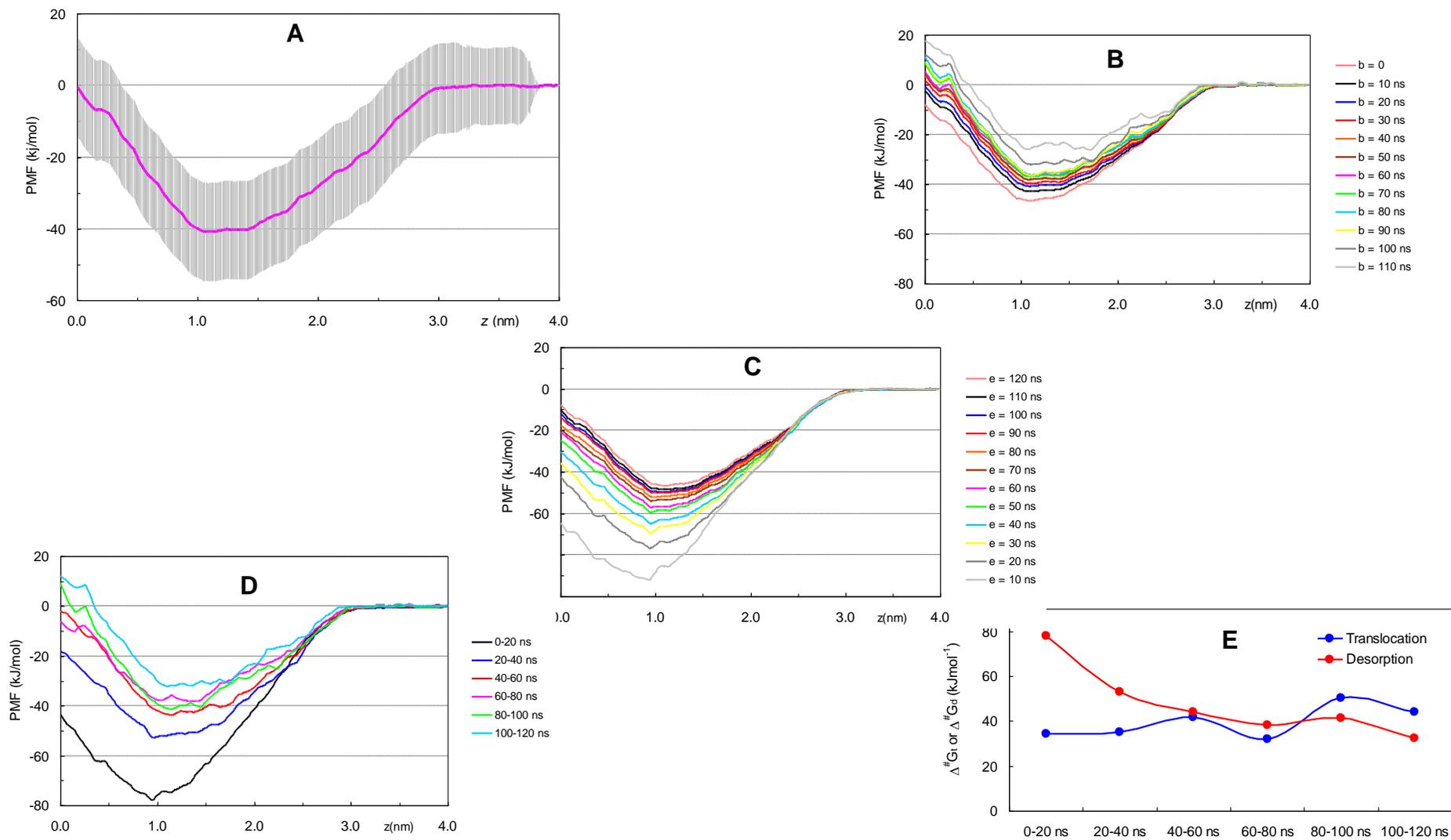


Figura Suplementar S2 – Análise de convergência e do erro de PMF para a Rh123 (+1). Os painéis A-E têm o mesmo significado do que na figura S1.

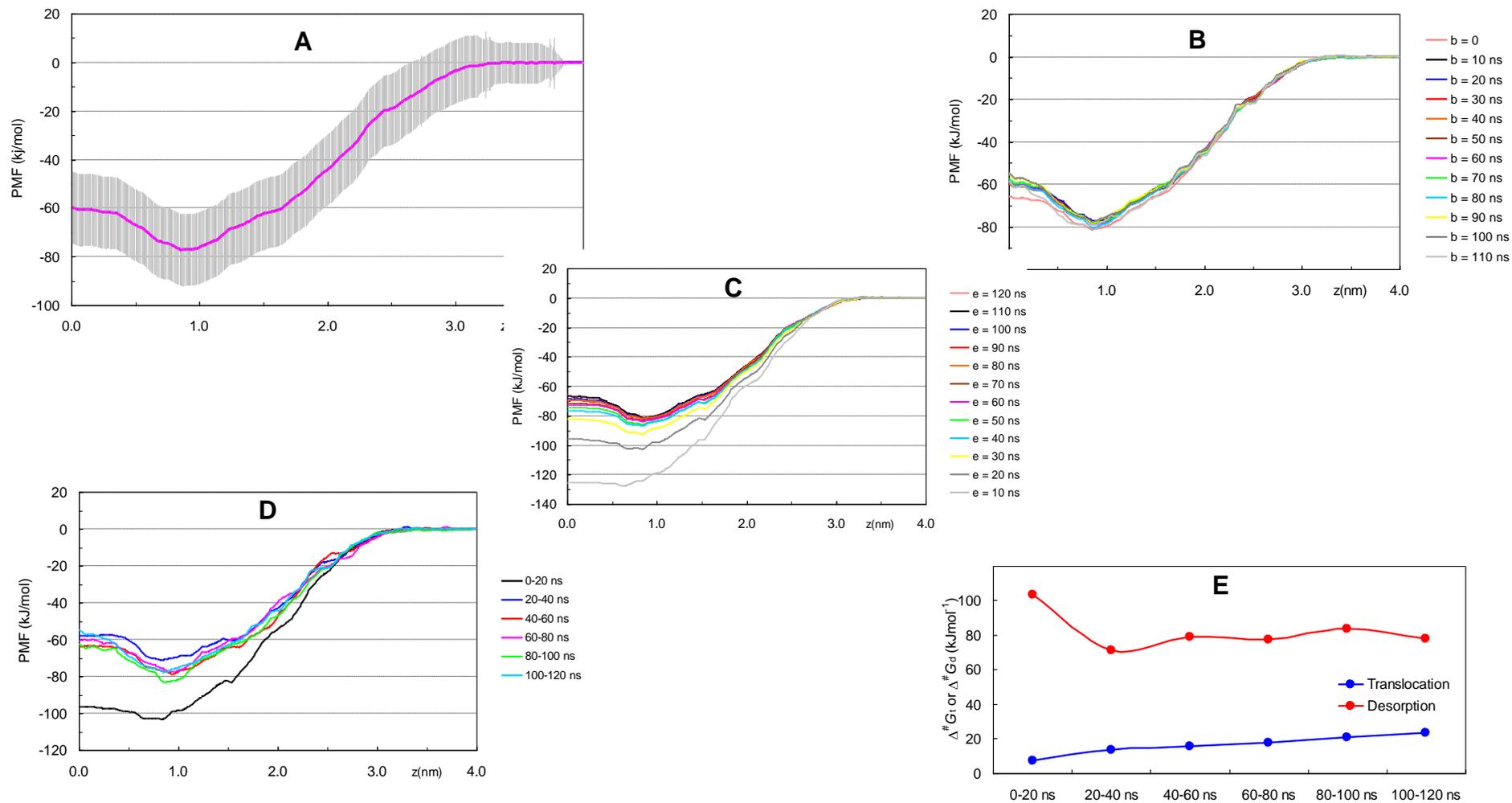


Figura suplementar S3 – Análise da convergência e do erro de PMF para a RhB (Lactona). Os painéis A-E têm o mesmo significado que na figura S1.

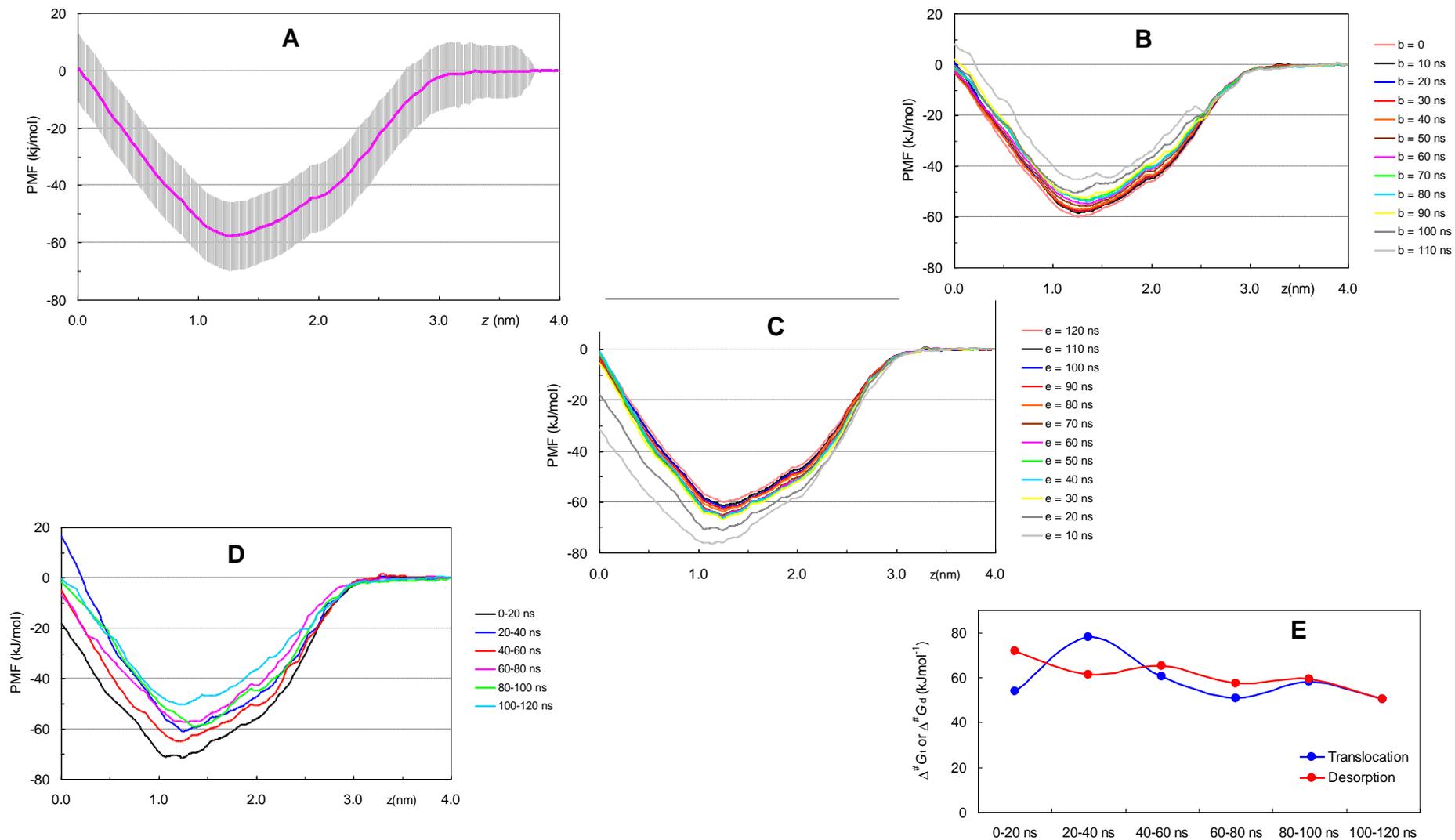


Figura suplementar S4 – Análise da convergência e do erro de PMF para a RhB (Zwit). Os painéis A-E têm o mesmo significado que na figura S1.

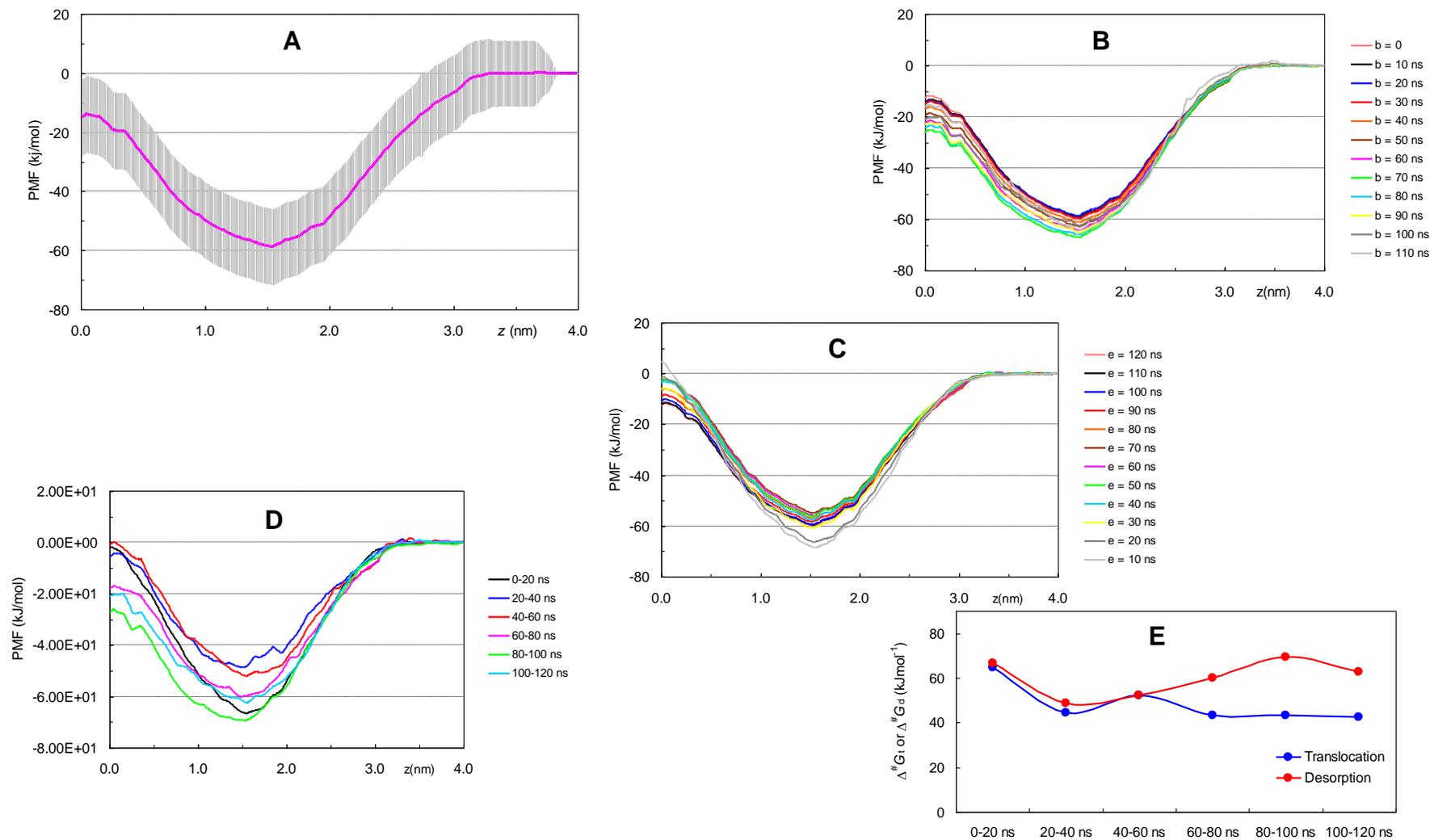
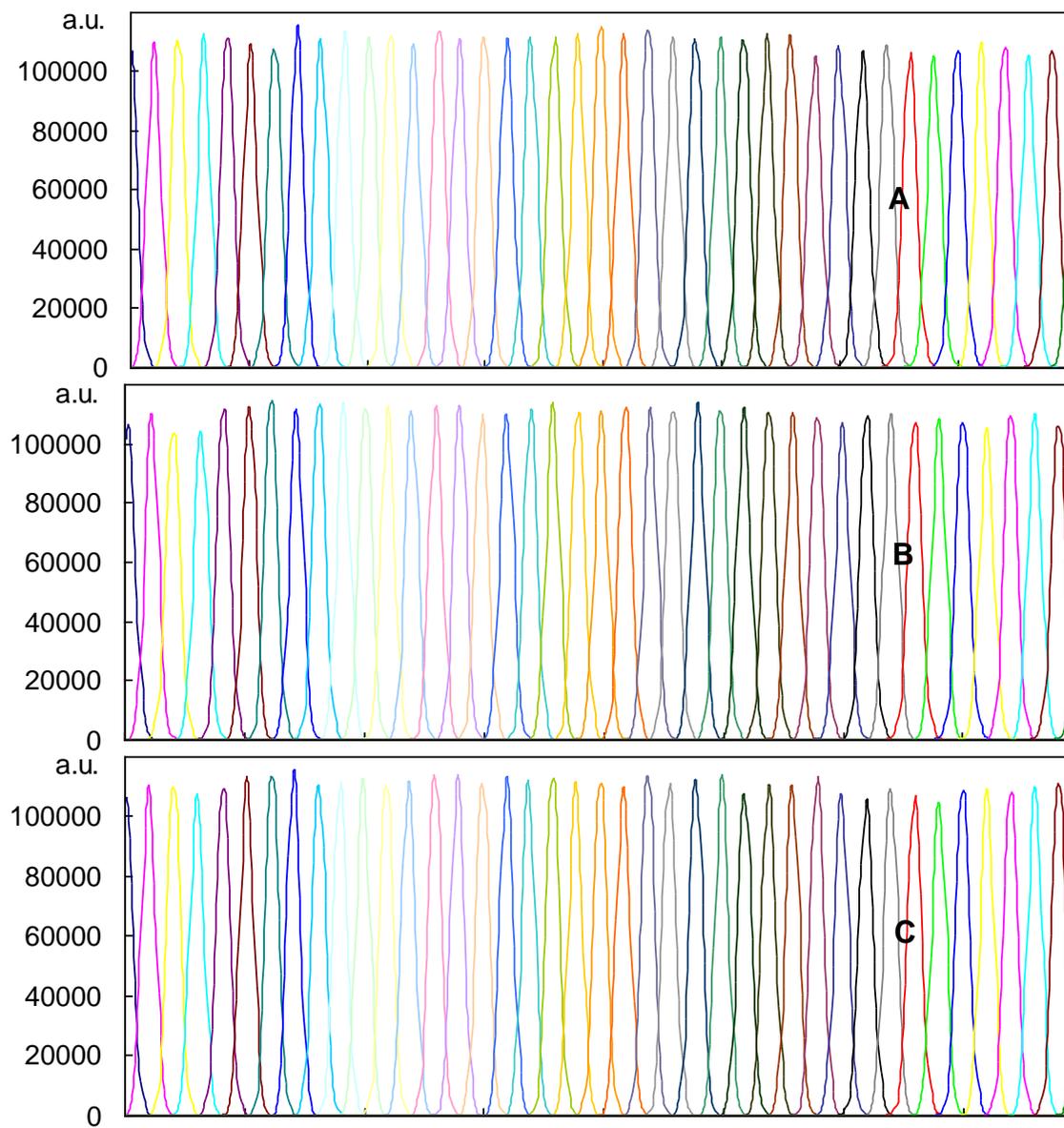


Figura suplementar S5 - Análise da convergência e do erro de PMF para a RhB (Catião). Os painéis A-E têm o mesmo significado que na figura S1.



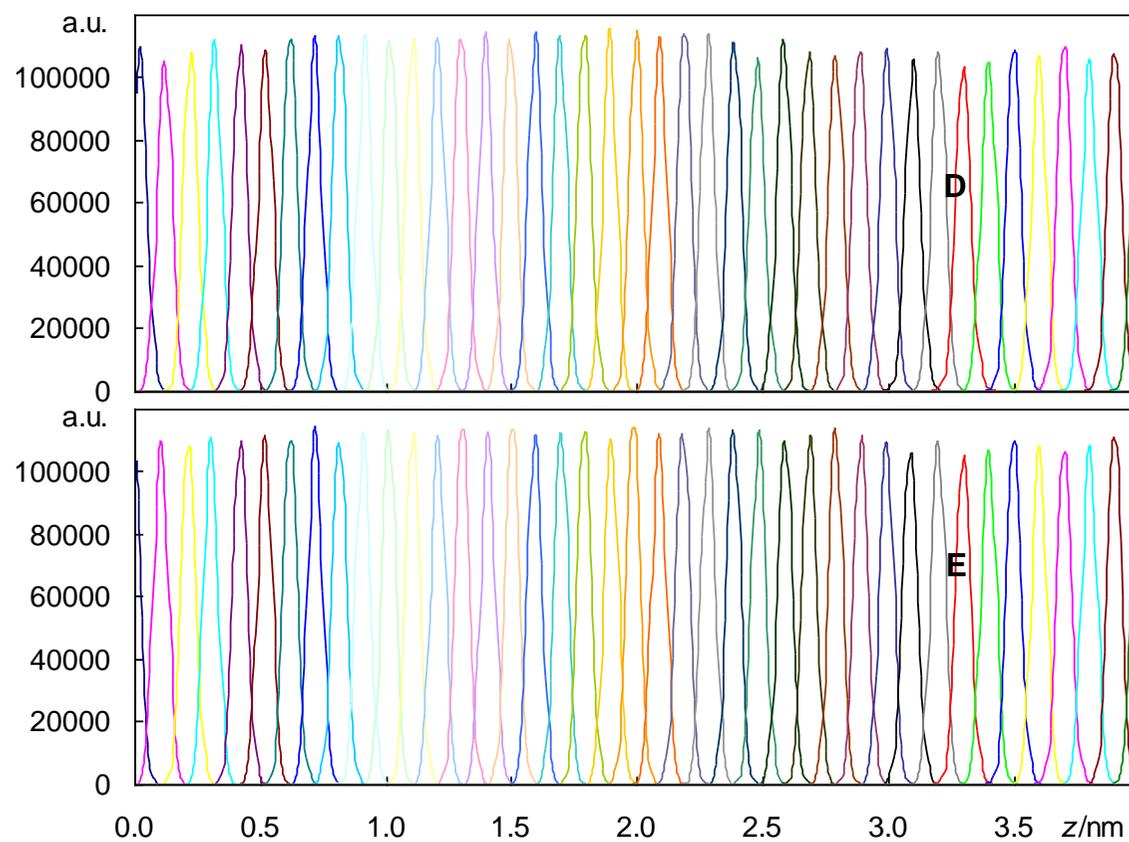


Figura suplementar S6 – Histogramas das coordenadas z para as 41 simulações de *umbrella sampling* usadas para calcular os perfis de PMF da Rh123 (0) – painel A; da Rh123 (+1) – painel B; da RhB (lactona) - painel C; da RhB (zwitterião) – painel D; e da RhB (catião).

Topologia da RhB (catião):

;

[moleculetype]

; Name nrexcl

OXWR 3

[atoms]

; nr type resnr resid atom cgnr charge mass

1	CH3	1	OXWR	CAE	1	-0.019	15.0350	;
2	CH2	1	OXWR	CAF	2	0.244	14.0270	;
3	NTer	1	OXWR	NAG	3	-0.334	14.0067	;
4	CH2	1	OXWR	CAB	4	0.244	14.0270	;
5	CH3	1	OXWR	CAA	5	-0.019	15.0350	;
6	CAro	1	OXWR	CAH	6	0.475	12.0110	;
7	CAro	1	OXWR	CAI	7	-0.572	12.0110	;
8	HC	1	OXWR	HAP	8	0.247	1.0080	;
9	CAro	1	OXWR	CAJ	9	0.520	12.0110	;
10	OE	1	OXWR	OAK	10	-0.365	15.9994	;
11	CAro	1	OXWR	CAL	11	0.520	12.0110	;
12	CAro	1	OXWR	CAV	12	-0.077	12.0110	;
13	CAro	1	OXWR	CAU	13	-0.114	12.0110	;
14	CAro	1	OXWR	CAT	14	-0.077	12.0110	;
15	CAro	1	OXWR	CAS	15	-0.132	12.0110	;
16	HC	1	OXWR	HAX	16	0.156	1.0080	;
17	CAro	1	OXWR	CAR	17	-0.318	12.0110	;

18 HC 1 OXWR HAW 18 0.211 1.0080 ;
19 CAro 1 OXWR CAZ 19 0.341 12.0110 ;
20 CAro 1 OXWR CBA 20 -0.259 12.0110 ;
21 CPos 1 OXWR CBB 21 0.708 12.0110 ;
22 OEOpt 1 OXWR OBC 22 -0.500 15.9994 ;
23 OA 1 OXWR OBD 23 -0.588 15.9994 ;
24 HS14 1 OXWR HAN1 24 0.446 1.0080 ;
25 CAro 1 OXWR CBG 25 -0.105 12.0110 ;
26 HC 1 OXWR HBG 26 0.147 1.0080 ;
27 CAro 1 OXWR CBF 27 -0.124 12.0110 ;
28 HC 1 OXWR HBF 28 0.151 1.0080 ;
29 CAro 1 OXWR CBE 29 -0.079 12.0110 ;
30 HC 1 OXWR HBE 30 0.149 1.0080 ;
31 CAro 1 OXWR CAY 31 -0.227 12.0110 ;
32 HC 1 OXWR HA0 32 0.167 1.0080 ;
33 CAro 1 OXWR CAW 33 -0.132 12.0110 ;
34 HC 1 OXWR HAY 34 0.156 1.0080 ;
35 CAro 1 OXWR CAX 35 -0.318 12.0110 ;
36 HC 1 OXWR HAZ 36 0.211 1.0080 ;
37 CAro 1 OXWR CAN 37 0.475 12.0110 ;
38 CAro 1 OXWR CAM 38 -0.572 12.0110 ;
39 HC 1 OXWR HAQ 39 0.247 1.0080 ;
40 NTer 1 OXWR NAO 40 -0.334 14.0067 ;
41 CH2 1 OXWR CAC 41 0.244 14.0270 ;

```
42 CH3 1 OXWR CAD 42 -0.019 15.0350 ;
43 CH2 1 OXWR CAP 43 0.244 14.0270 ;
44 CH3 1 OXWR CAQ 44 -0.019 15.0350 ;
```

```
; total charge of the molecule: 1.000
```

```
[ bonds ]
```

```
; ai aj funct c0 c1
 1 2 2 0.1520 5.4300e+06
 2 3 2 0.1450 5.2319e+06
 3 4 2 0.1450 5.2319e+06
 3 6 2 0.1360 1.0200e+07
 4 5 2 0.1520 5.4300e+06
 6 7 2 0.1410 6.5389e+06 ;0.1420 3.2236e+06
 6 17 2 0.1435 6.1000e+06 ;0.1450 5.2319e+06
 7 8 2 0.1090 1.2300e+07 ;0.1100 1.2100e+07
 7 9 2 0.1390 8.6600e+06
 9 10 2 0.1360 1.0200e+07 ;0.1380 1.1000e+07
 9 14 2 0.1430 8.1800e+06
10 11 2 0.1360 1.0200e+07 ;0.1380 1.1000e+07
11 12 2 0.1430 8.1800e+06
11 38 2 0.1390 8.6600e+06
12 13 2 0.1410 6.5389e+06
12 33 2 0.1430 8.1800e+06
13 14 2 0.1410 6.5389e+06
13 19 2 0.1500 8.3700e+06 ;0.1470 8.7100e+06
```

14	15	2	0.1430	8.1800e+06		
15	16	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
15	17	2	0.1360	1.0200e+07		
17	18	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
19	20	2	0.1410	6.5389e+06		
19	31	2	0.1400	8.5400e+06		
20	21	2	0.1480	5.7300e+06		
20	25	2	0.1400	8.5400e+06		
21	22	2	0.1230	1.6600e+07		
21	23	2	0.1360	1.0200e+07		
23	24	2	0.0971	7.9547e+06		
25	26	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
25	27	2	0.1395	8.6600e+06	;0.1400	8.6600e+06
27	28	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
27	29	2	0.1390	8.6600e+06		
29	30	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
29	31	2	0.1395	8.6600e+06	;0.1390	8.6600e+06
31	32	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
33	34	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
33	35	2	0.1360	1.0200e+07		
35	36	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
35	37	2	0.1440	6.1000e+06	;0.1450	5.2319e+06
37	38	2	0.1420	3.2236e+06		
37	40	2	0.1360	1.0200e+07		

```
38 39 2 0.1090 1.2300e+07 ;0.1100 1.2100e+07
40 41 2 0.1450 5.2319e+06
40 43 2 0.1450 5.2319e+06
41 42 2 0.1520 5.4300e+06
43 44 2 0.1520 5.4300e+06
```

[pairs]

; ai aj funct ; all 1-4 pairs but the ones excluded in GROMOS itp

```
1 4 1
1 6 1
2 5 1
2 7 1
2 17 1
3 8 1
3 9 1
3 15 1
3 18 1
4 7 1
4 17 1
5 6 1
6 10 1
6 16 1
7 11 1
7 13 1
7 18 1
```

8 10 1
8 14 1
8 17 1
9 16 1
9 19 1
9 38 1
10 15 1
10 33 1
10 37 1
10 39 1
11 19 1
11 34 1
11 40 1
12 15 1
12 20 1
12 31 1
12 36 1
12 39 1
13 16 1
13 17 1
13 21 1
13 25 1
13 29 1
13 32 1

13 34 1
13 35 1
13 38 1
14 18 1
14 20 1
14 31 1
14 33 1
15 19 1
16 18 1
19 22 1
19 23 1
19 26 1
19 30 1
19 33 1
20 24 1
20 28 1
20 32 1
21 26 1
21 27 1
21 31 1
22 24 1
22 25 1
23 25 1
25 30 1

26 28 1
26 29 1
27 32 1
28 30 1
28 31 1
30 32 1
33 40 1
34 36 1
34 37 1
35 39 1
35 41 1
35 43 1
36 38 1
36 40 1
37 42 1
37 44 1
38 41 1
38 43 1
39 40 1
41 44 1
42 43 1

[angles]

; ai aj ak funct angle fc
1 2 3 2 115.00 610.00

2	3	4	2	116.00	620.00	'117.00	635.00
2	3	6	2	116.00	620.00	'121.00	685.00
4	3	6	2	116.00	620.00	'121.00	685.00
3	4	5	2	115.00	610.00		
3	6	7	2	120.00	560.00		
3	6	17	2	120.00	560.00		
7	6	17	2	120.00	560.00		
6	7	8	2	120.00	505.00		
6	7	9	2	120.00	560.00		
8	7	9	2	120.00	505.00		
7	9	10	2	115.00	610.00		
7	9	14	2	120.00	560.00	'126.00	640.00
10	9	14	2	121.00	685.00		
9	10	11	2	120.00	780.00	'118.00	7474.41
10	11	12	2	121.00	685.00		
10	11	38	2	115.00	610.00		
12	11	38	2	120.00	560.00	'126.00	640.00
11	12	13	2	120.00	560.00		
11	12	33	2	120.00	560.00		
13	12	33	2	126.00	640.00		
12	13	14	2	120.00	560.00		
12	13	19	2	120.00	560.00		
14	13	19	2	120.00	560.00		
9	14	13	2	120.00	560.00		

9	14	15	2	120.00	560.00		
13	14	15	2	126.00	640.00		
14	15	16	2	120.00	505.00		
14	15	17	2	120.00	560.00		
16	15	17	2	120.00	505.00		
6	17	15	2	120.00	560.00		
6	17	18	2	120.00	505.00		
15	17	18	2	120.00	505.00		
13	19	20	2	120.00	560.00		
13	19	31	2	120.00	560.00		
20	19	31	2	120.00	560.00		
19	20	21	2	120.00	560.00		
19	20	25	2	120.00	560.00		
21	20	25	2	120.00	560.00		
20	21	22	2	121.00	685.00	'126.00	640.00
20	21	23	2	115.00	610.00	'120.00	560.00
22	21	23	2	124.00	730.00	'114.00	1559.41
21	23	24	2	109.50	450.00		
20	25	26	2	120.00	505.00		
20	25	27	2	120.00	560.00		
26	25	27	2	120.00	505.00		
25	27	28	2	120.00	505.00		
25	27	29	2	120.00	560.00		
28	27	29	2	120.00	505.00		

27	29	30	2	120.00	505.00		
27	29	31	2	120.00	560.00		
30	29	31	2	120.00	505.00		
19	31	29	2	120.00	560.00		
19	31	32	2	120.00	505.00		
29	31	32	2	120.00	505.00		
12	33	34	2	120.00	505.00		
12	33	35	2	120.00	560.00		
34	33	35	2	120.00	505.00		
33	35	36	2	120.00	505.00		
33	35	37	2	120.00	560.00		
36	35	37	2	120.00	505.00		
35	37	38	2	120.00	560.00		
35	37	40	2	120.00	560.00		
38	37	40	2	120.00	560.00		
11	38	37	2	120.00	560.00		
11	38	39	2	120.00	505.00		
37	38	39	2	120.00	505.00		
37	40	41	2	116.00	620.00	'121.00	685.00
37	40	43	2	116.00	620.00	'121.00	685.00
41	40	43	2	116.00	620.00	'117.00	635.00
40	41	42	2	115.00	610.00		
40	43	44	2	115.00	610.00		

[dihedrals]

; GROMOS improper dihedrals

```
; ai aj ak al funct angle fc
 21 20 22 23 2 0.00 167.36
 20 19 21 25 2 0.00 1673.6 ;k 10 vezes
 25 20 26 27 2 0.00 167.36
 27 25 28 29 2 0.00 167.36
 29 27 30 31 2 0.00 167.36
 31 19 29 32 2 0.00 167.36
 19 13 20 31 2 0.00 1673.6 ;k 10 vezes
 13 12 14 19 2 0.00 1673.6 ;k 10 vezes
 12 11 13 33 2 0.00 167.36
 33 12 34 35 2 0.00 167.36
 35 33 36 37 2 0.00 167.36
 37 35 38 40 2 0.00 167.36
;40 37 41 43 2 0.00 167.36
 38 11 37 39 2 0.00 167.36
 11 10 12 38 2 0.00 167.36
 9 7 10 14 2 0.00 167.36
 7 6 8 9 2 0.00 167.36
 14 9 13 15 2 0.00 167.36
 15 14 16 17 2 0.00 167.36
 17 6 15 18 2 0.00 167.36
 6 3 7 17 2 0.00 167.36
;3 2 4 6 2 0.00 167.36
```

[dihedrals]

; ai	aj	ak	al	funct	ph0	cp	mult
1	2	3	6	1	0.00	3.77	6
4	3	6	7	1	180.00	33.50	2
6	3	4	5	1	0.00	3.77	6
6	7	9	14	1	180.00	41.80	2
7	6	17	15	1	180.00	41.80	2
7	9	14	15	1	180.00	41.80	2
9	10	11	12	1	180.00	24.00	2; 41.80 2
9	14	15	17	1	180.00	41.80	2
11	12	13	14	1	180.00	41.80	2
11	12	33	35	1	180.00	41.80	2
12	11	38	37	1	180.00	41.80	2
12	13	14	9	1	180.00	41.80	2
12	13	19	20	1	180.00	41.80	2
12	33	35	37	1	180.00	41.80	2
14	9	10	11	1	180.00	24.00	2; 41.80 2
14	15	17	6	1	180.00	41.80	2
17	6	7	9	1	180.00	41.80	2
19	20	25	27	1	180.00	41.80	2
20	19	31	29	1	180.00	41.80	2
20	25	27	29	1	180.00	41.80	2
22	21	23	24	1	180.00	7.11	2
25	20	21	22	1	180.00	41.80	2

```
25 27 29 31 1 180.00 41.80 2
27 29 31 19 1 180.00 41.80 2
31 19 20 25 1 180.00 41.80 2
33 35 37 38 1 180.00 41.80 2
35 37 38 11 1 180.00 41.80 2
35 37 40 41 1 180.00 33.50 2
37 40 41 42 1 0.00 3.77 6 ;180.00 1.00 6
37 40 43 44 1 0.00 3.77 6
38 11 12 33 1 180.00 41.80 2
```

[exclusions]

; ai aj funct ; GROMOS 1-4 exclusions

6 14

7 15

9 12

9 17

10 13

11 14

11 35

12 37

19 27

20 29

25 31

33 38

Topologia da RhB (zwitterião):

[moleculetype]

; Name nrexcl

16VJ 3

[atoms]

```
; nr type resnr resid atom cgnr charge mass
  1 CH3  1  16VJ  CAE  1 -0.033 15.0350 ;
  2 CH2  1  16VJ  CAF  2  0.266 14.0270 ;
  3 NTer  1  16VJ  NAG  3 -0.409 14.0067 ;
  4 CH2  1  16VJ  CAB  4  0.266 14.0270 ;
  5 CH3  1  16VJ  CAA  5 -0.033 15.0350 ;
  6 CAro  1  16VJ  CAH  6  0.537 12.0110 ;
  7 CAro  1  16VJ  CAI  7 -0.592 12.0110 ;
  8  HC  1  16VJ  HAP  8  0.246  1.0080 ;
  9 CAro  1  16VJ  CAJ  9  0.537 12.0110 ;
 10  OE  1  16VJ  OAK 10 -0.379 15.9994 ;
 11 CAro  1  16VJ  CAL 11  0.537 12.0110 ;
 12 CAro  1  16VJ  CAV 12 -0.280 12.0110 ;
 13 CAro  1  16VJ  CAU 13  0.343 12.0110 ;
 14 CAro  1  16VJ  CAT 14 -0.280 12.0110 ;
 15 CAro  1  16VJ  CAS 15 -0.014 12.0110 ;
 16  HC  1  16VJ  HAX 16  0.136  1.0080 ;
 17 CAro  1  16VJ  CAR 17 -0.400 12.0110 ;
```

18 HC 1 16VJ HAW 18 0.212 1.0080 ;
19 CAro 1 16VJ CAZ 19 -0.062 12.0110 ;
20 CAro 1 16VJ CBA 20 0.051 12.0110 ;
21 CPos 1 16VJ CBB 21 0.614 12.0110 ;
22 OM 1 16VJ OBC 22 -0.691 15.9994 ;
23 OM 1 16VJ OBD 23 -0.691 15.9994 ;
24 CAro 1 16VJ CBG 24 -0.204 12.0110 ;
25 HC 1 16VJ HBG 25 0.133 1.0080 ;
26 CAro 1 16VJ CBF 26 -0.102 12.0110 ;
27 HC 1 16VJ HBF 27 0.130 1.0080 ;
28 CAro 1 16VJ CBE 28 -0.152 12.0110 ;
29 HC 1 16VJ HBE 29 0.143 1.0080 ;
30 CAro 1 16VJ CAY 30 -0.134 12.0110 ;
31 HC 1 16VJ HA0 31 0.123 1.0080 ;
32 CAro 1 16VJ CAW 32 -0.014 12.0110 ;
33 HC 1 16VJ HAY 33 0.136 1.0080 ;
34 CAro 1 16VJ CAX 34 -0.400 12.0110 ;
35 HC 1 16VJ HAZ 35 0.212 1.0080 ;
36 CAro 1 16VJ CAN 36 0.537 12.0110 ;
37 CAro 1 16VJ CAM 37 -0.592 12.0110 ;
38 HC 1 16VJ HAQ 38 0.246 1.0080 ;
39 NTer 1 16VJ NAO 39 -0.409 14.0067 ;
40 CH2 1 16VJ CAC 40 0.266 14.0270 ;
41 CH3 1 16VJ CAD 41 -0.033 15.0350 ;

```

42 CH2 1 16VJ CAP 42 0.266 14.0270 ;
43 CH3 1 16VJ CAQ 43 -0.033 15.0350 ;
; total charge of the molecule: -0.000
[ bonds ]
; ai aj funct c0 c1
1 2 2 0.1520 5.4300e+06
2 3 2 0.1450 5.2319e+06
3 4 2 0.1450 5.2319e+06
3 6 2 0.1360 1.0200e+07 ;0.1400 8.5400e+06
4 5 2 0.1520 5.4300e+06
6 7 2 0.1410 6.5389e+06 ;OK
6 17 2 0.1435 6.1000e+06 ;0.1420 3.2236e+06
7 8 2 0.1090 1.2300e+07
7 9 2 0.1390 8.6600e+06 ;OK
9 10 2 0.1360 1.0200e+07 ;0.1390 8.6600e+06
9 14 2 0.1430 8.1800e+06 ;0.1400 8.5400e+06
10 11 2 0.1360 1.0200e+07 ;0.1390 8.6600e+06
11 12 2 0.1430 8.1800e+06 ;0.1400 8.5400e+06
11 37 2 0.1390 8.6600e+06 ;OK
12 13 2 0.1410 6.5389e+06 ;0.1500 8.3700e+06
12 32 2 0.1430 8.1800e+06 ;0.1390 8.6600e+06
13 14 2 0.1410 6.5389e+06 ;0.1500 8.3700e+06
13 19 2 0.1500 8.3700e+06 ;0.1520 5.4300e+06
14 15 2 0.1430 8.1800e+06 ;0.1390 8.6600e+06

```

15	16	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
15	17	2	0.1360	1.0200e+07	;0.1390	8.6600e+06
17	18	2	0.1090	1.2300e+07		
19	20	2	0.1410	6.5389e+06	;0.1420	3.2236e+06
19	30	2	0.1400	8.5400e+06	;0.1390	8.6600e+06
20	21	2	0.1470	8.7100e+06		
20	24	2	0.1400	8.5400e+06	;0.1390	8.6600e+06
21	22	2	0.1230	1.6600e+07		
21	23	2	0.1230	1.6600e+07		
24	25	2	0.1090	1.2300e+07		
24	26	2	0.1395	8.6600e+06	;0.1400	8.5400e+06
26	27	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
26	28	2	0.1390	8.6600e+06		
28	29	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
28	30	2	0.1395	8.6600e+06	;0.1400	8.5400e+06
30	31	2	0.1090	1.2300e+07		
32	33	2	0.1090	1.2300e+07	;0.1100	1.2100e+07
32	34	2	0.1360	1.0200e+07	;0.1390	8.6600e+06
34	35	2	0.1090	1.2300e+07		
34	36	2	0.1440	6.1000e+06	;0.1420	3.2236e+06
36	37	2	0.1420	3.2236e+06	;0.1410	6.5389e+06
36	39	2	0.1360	1.0200e+07	;0.1400	8.5400e+06
37	38	2	0.1090	1.2300e+07		
39	40	2	0.1450	5.2319e+06		

```
39 42 2 0.1450 5.2319e+06
40 41 2 0.1520 5.4300e+06
42 43 2 0.1520 5.4300e+06
```

[pairs]

; ai aj funct ; all 1-4 pairs but the ones excluded in GROMOS itp

```
1 4 1
1 6 1
2 5 1
2 7 1
2 17 1
3 8 1
3 9 1
3 15 1
3 18 1
4 7 1
4 17 1
5 6 1
6 10 1
6 16 1
7 11 1
7 13 1
7 18 1
8 10 1
8 14 1
```

8 17 1
9 12 1
9 16 1
9 19 1
9 37 1
10 13 1
10 15 1
10 32 1
10 36 1
10 38 1
11 14 1
11 19 1
11 33 1
11 39 1
12 15 1
12 20 1
12 30 1
12 35 1
12 38 1
13 16 1
13 17 1
13 21 1
13 24 1
13 28 1

13 31 1
13 33 1
13 34 1
13 37 1
14 18 1
14 20 1
14 30 1
14 32 1
15 19 1
16 18 1
19 22 1
19 23 1
19 25 1
19 29 1
19 32 1
20 27 1
20 31 1
21 25 1
21 26 1
21 30 1
22 24 1
23 24 1
24 29 1
25 27 1

25 28 1
26 31 1
27 29 1
27 30 1
29 31 1
32 39 1
33 35 1
33 36 1
34 38 1
34 40 1
34 42 1
35 37 1
35 39 1
36 41 1
36 43 1
37 40 1
37 42 1
38 39 1
40 43 1
41 42 1

[angles]

```
; ai aj ak funct angle fc  
  1  2  3  2 115.00 610.00  
  2  3  4  2 116.00 620.00
```

2	3	6	2	116.00	620.00		
4	3	6	2	116.00	620.00		
3	4	5	2	115.00	610.00		
3	6	7	2	120.00	560.00		
3	6	17	2	120.00	560.00		
7	6	17	2	120.00	560.00		
6	7	8	2	120.00	505.00		
6	7	9	2	120.00	560.00		
8	7	9	2	120.00	505.00		
7	9	10	2	115.00	610.00		
7	9	14	2	120.00	560.00		
10	9	14	2	121.00	685.00		
9	10	11	2	120.00	780.00	'116.00	465.00
10	11	12	2	121.00	685.00		
10	11	37	2	115.00	610.00		
12	11	37	2	120.00	560.00		
11	12	13	2	120.00	560.00		
11	12	32	2	120.00	560.00		
13	12	32	2	126.00	640.00	'120.00	560.00
12	13	14	2	120.00	560.00	'111.00	530.00
12	13	19	2	120.00	560.00	'111.00	530.00
14	13	19	2	120.00	560.00	'111.00	530.00
9	14	13	2	120.00	560.00		
9	14	15	2	120.00	560.00		

13	14	15	2	126.00	640.00	'120.00	560.00
14	15	16	2	120.00	505.00		
14	15	17	2	120.00	560.00		
16	15	17	2	120.00	505.00		
6	17	15	2	120.00	560.00		
6	17	18	2	120.00	505.00		
15	17	18	2	120.00	505.00		
13	19	20	2	120.00	560.00	'109.50	520.00
13	19	30	2	120.00	560.00	'132.00	760.00
20	19	30	2	120.00	560.00		
19	20	21	2	120.00	560.00	'109.50	520.00
19	20	24	2	120.00	560.00		
21	20	24	2	120.00	560.00	'132.00	760.00
20	21	22	2	117.00	635.00	'109.50	520.00
20	21	23	2	117.00	635.00	'134.00	2525.43
22	21	23	2	126.00	770.00	'116.00	465.00
20	24	25	2	120.00	505.00		
20	24	26	2	120.00	560.00		
25	24	26	2	120.00	505.00		
24	26	27	2	120.00	505.00		
24	26	28	2	120.00	560.00		
27	26	28	2	120.00	505.00		
26	28	29	2	120.00	505.00		
26	28	30	2	120.00	560.00		

29	28	30	2	120.00	505.00
19	30	28	2	120.00	560.00
19	30	31	2	120.00	505.00
28	30	31	2	120.00	505.00
12	32	33	2	120.00	505.00
12	32	34	2	120.00	560.00
33	32	34	2	120.00	505.00
32	34	35	2	120.00	505.00
32	34	36	2	120.00	560.00
35	34	36	2	120.00	505.00
34	36	37	2	120.00	560.00
34	36	39	2	120.00	560.00
37	36	39	2	120.00	560.00
11	37	36	2	120.00	560.00
11	37	38	2	120.00	505.00
36	37	38	2	120.00	505.00
36	39	40	2	116.00	620.00
36	39	42	2	116.00	620.00
40	39	42	2	116.00	620.00
39	40	41	2	115.00	610.00
39	42	43	2	115.00	610.00

[dihedrals]

; GROMOS improper dihedrals

; ai aj ak al funct angle fc

21	20	22	23	2	0.00	167.36
20	19	21	24	2	0.00	1673.6 ;k 10 vezes
24	20	25	26	2	0.00	167.36
26	24	27	28	2	0.00	167.36
28	26	29	30	2	0.00	167.36
30	19	28	31	2	0.00	167.36
19	13	20	30	2	0.00	1673.6 ;k 10 vezes
13	12	14	19	2	0.00	1673.6 ; ATB nao tinha posto
12	11	13	32	2	0.00	167.36
32	12	33	34	2	0.00	167.36
34	32	35	36	2	0.00	167.36
36	34	37	39	2	0.00	167.36
37	11	36	38	2	0.00	167.36
11	10	12	37	2	0.00	167.36
9	7	10	14	2	0.00	167.36
7	6	8	9	2	0.00	167.36
14	9	13	15	2	0.00	167.36
15	14	16	17	2	0.00	167.36
17	6	15	18	2	0.00	167.36
6	3	7	17	2	0.00	167.36

[dihedrals]

	ai	aj	ak	al	funct	ph0	cp	mult		
	1	2	3	6	1	0.00	3.77	6 ;180.00	1.00	6
	4	3	6	7	1	180.00	33.50	2		

6	3	4	5	1	0.00	3.77	6
6	7	9	14	1	180.00	41.80	2
7	6	17	15	1	180.00	41.80	2
7	9	10	11	1	180.00	24.00	2
7	9	14	15	1	180.00	41.80	2
9	10	11	12	1	180.00	24.00	2
9	14	15	17	1	180.00	41.80	2
11	12	32	34	1	180.00	41.80	2
12	11	37	36	1	180.00	41.80	2
12	13	19	20	1	180.00	41.80	2
12	32	34	36	1	180.00	41.80	2
14	15	17	6	1	180.00	41.80	2
17	6	7	9	1	180.00	41.80	2
19	13	14	9	1	180.00	41.80	2
19	20	24	26	1	180.00	41.80	2
20	19	30	28	1	180.00	41.80	2
20	24	26	28	1	180.00	41.80	2
24	20	21	22	1	180.00	41.80	2
24	26	28	30	1	180.00	41.80	2
26	28	30	19	1	180.00	41.80	2
30	19	20	24	1	180.00	41.80	2
32	12	13	19	1	180.00	41.80	2
32	34	36	37	1	180.00	41.80	2
34	36	37	11	1	180.00	41.80	2

```
34 36 39 40 1 180.00 33.50 2
36 39 40 41 1 0.00 3.77 6;180.00 1.00 6
36 39 42 43 1 0.00 3.77 6;180.00 1.00 6
37 11 12 32 1 180.00 41.80 2
```

[exclusions]

; ai aj funct ; GROMOS 1-4 exclusions

6 14

7 15

9 17

11 34

12 36

19 26

20 28

24 30

32 37

Topologia da RhB (lactona):

[moleculetype]

; Name nrexcl

YV3K 3

[atoms]

```
; nr type resnr resid atom cgnr charge mass
  1 CH3  1  YV3K  C24  1 -0.044 15.0350 ;
  2 CH2  1  YV3K  C23  2  0.208 14.0270 ;
  3 NTer  1  YV3K  N20  3 -0.310 14.0067 ;
  4 CH2  1  YV3K  C21  4  0.208 14.0270 ;
  5 CH3  1  YV3K  C22  5 -0.044 15.0350 ;
  6 CAro  1  YV3K  C17  6  0.411 12.0110 ;
  7 CAro  1  YV3K  C16  7 -0.540 12.0110 ;
  8  HC   1  YV3K  H47  8  0.226  1.0080 ;
  9 CAro  1  YV3K  C14  9  0.539 12.0110 ;
 10 CAro  1  YV3K  C13 10 -0.477 12.0110 ;
 11 CAro  1  YV3K  C19 11 -0.017 12.0110 ;
 12  HC   1  YV3K  H49 12  0.117  1.0080 ;
 13 CAro  1  YV3K  C18 13 -0.397 12.0110 ;
 14  HC   1  YV3K  H48 14  0.201  1.0080 ;
 15 CAro  1  YV3K  C12 15  0.714 12.0110 ;
 16 CAro  1  YV3K  C25 16  0.066 12.0110 ;
 17 CAro  1  YV3K  C26 17 -0.226 12.0110 ;
```

18 HC 1 YV3K H60 18 0.149 1.0080 ;
19 CAro 1 YV3K C27 19 -0.059 12.0110 ;
20 HC 1 YV3K H61 20 0.136 1.0080 ;
21 CAro 1 YV3K C28 21 -0.151 12.0110 ;
22 HC 1 YV3K H62 22 0.145 1.0080 ;
23 CAro 1 YV3K C29 23 -0.105 12.0110 ;
24 HC 1 YV3K H63 24 0.136 1.0080 ;
25 CAro 1 YV3K C30 25 -0.134 12.0110 ;
26 CPos 1 YV3K C31 26 0.635 12.0110 ;
27 OEOpt 1 YV3K O32 27 -0.560 15.9994 ;
28 OE 1 YV3K O33 28 -0.472 15.9994 ;
29 CAro 1 YV3K C9 29 -0.477 12.0110 ;
30 CAro 1 YV3K C8 30 0.539 12.0110 ;
31 OE 1 YV3K O15 31 -0.436 15.9994 ;
32 CAro 1 YV3K C7 32 -0.540 12.0110 ;
33 HC 1 YV3K H44 33 0.226 1.0080 ;
34 CAro 1 YV3K C6 34 0.411 12.0110 ;
35 CAro 1 YV3K C11 35 -0.397 12.0110 ;
36 HC 1 YV3K H46 36 0.201 1.0080 ;
37 CAro 1 YV3K C10 37 -0.017 12.0110 ;
38 HC 1 YV3K H45 38 0.117 1.0080 ;
39 NTer 1 YV3K N3 39 -0.310 14.0067 ;
40 CH2 1 YV3K C2 40 0.208 14.0270 ;
41 CH3 1 YV3K C1 41 -0.044 15.0350 ;

```
42 CH2 1 YV3K C4 42 0.208 14.0270 ;  
43 CH3 1 YV3K C5 43 -0.044 15.0350 ;
```

```
; total charge of the molecule: 0.000
```

```
[ bonds ]
```

```
; ai aj funct c0 c1  
1 2 2 0.1520 5.4300e+06  
2 3 2 0.1450 5.2319e+06  
3 4 2 0.1450 5.2319e+06  
3 6 2 0.1400 8.5400e+06  
4 5 2 0.1520 5.4300e+06  
6 7 2 0.1420 3.2236e+06  
6 13 2 0.1420 3.2236e+06  
7 8 2 0.1090 1.2300e+07  
7 9 2 0.1390 8.6600e+06  
9 10 2 0.1400 8.5400e+06  
9 31 2 0.1390 8.6600e+06  
10 11 2 0.1390 8.6600e+06  
10 15 2 0.1500 8.3700e+06  
11 12 2 0.1100 1.2100e+07  
11 13 2 0.1390 8.6600e+06  
13 14 2 0.1090 1.2300e+07  
15 16 2 0.1520 5.4300e+06  
15 28 2 0.1480 5.7300e+06  
15 29 2 0.1500 8.3700e+06
```

16	17	2	0.1390	8.6600e+06
16	25	2	0.1420	3.2236e+06
17	18	2	0.1090	1.2300e+07
17	19	2	0.1400	8.5400e+06
19	20	2	0.1100	1.2100e+07
19	21	2	0.1390	8.6600e+06
21	22	2	0.1100	1.2100e+07
21	23	2	0.1400	8.5400e+06
23	24	2	0.1090	1.2300e+07
23	25	2	0.1390	8.6600e+06
25	26	2	0.1470	8.7100e+06
26	27	2	0.1230	1.6600e+07
26	28	2	0.1390	8.6600e+06
29	30	2	0.1400	8.5400e+06
29	37	2	0.1390	8.6600e+06
30	31	2	0.1390	8.6600e+06
30	32	2	0.1390	8.6600e+06
32	33	2	0.1090	1.2300e+07
32	34	2	0.1420	3.2236e+06
34	35	2	0.1420	3.2236e+06
34	39	2	0.1400	8.5400e+06
35	36	2	0.1090	1.2300e+07
35	37	2	0.1390	8.6600e+06
37	38	2	0.1100	1.2100e+07

```
39 40 2 0.1450 5.2319e+06
39 42 2 0.1450 5.2319e+06
40 41 2 0.1520 5.4300e+06
42 43 2 0.1520 5.4300e+06
```

[pairs]

; ai aj funct ; all 1-4 pairs but the ones excluded in GROMOS itp

```
1 4 1
1 6 1
2 5 1
2 7 1
2 13 1
3 8 1
3 9 1
3 11 1
3 14 1
4 7 1
4 13 1
5 6 1
6 12 1
6 31 1
7 14 1
7 15 1
7 30 1
8 10 1
```

8 13 1
8 31 1
9 12 1
9 16 1
9 28 1
9 29 1
9 32 1
10 14 1
10 17 1
10 25 1
10 26 1
10 30 1
10 37 1
11 16 1
11 28 1
11 29 1
11 31 1
12 14 1
12 15 1
13 15 1
15 18 1
15 19 1
15 23 1
15 27 1

15 31 1
15 32 1
15 35 1
15 38 1
16 20 1
16 24 1
16 27 1
16 30 1
16 37 1
17 22 1
17 26 1
17 28 1
17 29 1
18 20 1
18 21 1
18 25 1
19 24 1
20 22 1
20 23 1
21 26 1
22 24 1
22 25 1
23 27 1
23 28 1

24 26 1
25 29 1
26 29 1
28 30 1
28 37 1
29 33 1
29 36 1
30 38 1
30 39 1
31 33 1
31 34 1
31 37 1
32 36 1
32 40 1
32 42 1
33 35 1
33 39 1
34 38 1
34 41 1
34 43 1
35 40 1
35 42 1
36 38 1
36 39 1

37 39 1
40 43 1
41 42 1

[angles]

```
; ai aj ak funct angle fc  
1 2 3 2 115.00 610.00  
2 3 4 2 117.00 635.00  
2 3 6 2 121.00 685.00  
4 3 6 2 121.00 685.00  
3 4 5 2 115.00 610.00  
3 6 7 2 120.00 560.00  
3 6 13 2 120.00 560.00  
7 6 13 2 120.00 560.00  
6 7 8 2 120.00 505.00  
6 7 9 2 120.00 560.00  
8 7 9 2 120.00 505.00  
7 9 10 2 120.00 560.00  
7 9 31 2 115.00 610.00  
10 9 31 2 121.00 685.00  
9 10 11 2 120.00 560.00  
9 10 15 2 120.00 560.00  
11 10 15 2 120.00 560.00  
10 11 12 2 120.00 505.00  
10 11 13 2 120.00 560.00
```

12	11	13	2	120.00	505.00
6	13	11	2	120.00	560.00
6	13	14	2	120.00	505.00
11	13	14	2	120.00	505.00
10	15	16	2	111.00	530.00
10	15	28	2	109.50	520.00
10	15	29	2	111.00	530.00
16	15	28	2	104.00	490.00
16	15	29	2	111.00	530.00
28	15	29	2	109.50	520.00
15	16	17	2	132.00	760.00
15	16	25	2	109.50	520.00
17	16	25	2	120.00	560.00
16	17	18	2	120.00	505.00
16	17	19	2	120.00	560.00
18	17	19	2	120.00	505.00
17	19	20	2	120.00	505.00
17	19	21	2	120.00	560.00
20	19	21	2	120.00	505.00
19	21	22	2	120.00	505.00
19	21	23	2	120.00	560.00
22	21	23	2	120.00	505.00
21	23	24	2	120.00	505.00
21	23	25	2	120.00	560.00

24	23	25	2	120.00	505.00
16	25	23	2	120.00	560.00
16	25	26	2	109.50	520.00
23	25	26	2	132.00	760.00
25	26	27	2	134.00	2525.43
25	26	28	2	109.50	520.00
27	26	28	2	116.00	465.00
15	28	26	2	109.50	450.00
15	29	30	2	120.00	560.00
15	29	37	2	120.00	560.00
30	29	37	2	120.00	560.00
29	30	31	2	121.00	685.00
29	30	32	2	120.00	560.00
31	30	32	2	115.00	610.00
9	31	30	2	116.00	465.00
30	32	33	2	120.00	505.00
30	32	34	2	120.00	560.00
33	32	34	2	120.00	505.00
32	34	35	2	120.00	560.00
32	34	39	2	120.00	560.00
35	34	39	2	120.00	560.00
34	35	36	2	120.00	505.00
34	35	37	2	120.00	560.00
36	35	37	2	120.00	505.00

29	37	35	2	120.00	560.00
29	37	38	2	120.00	505.00
35	37	38	2	120.00	505.00
34	39	40	2	121.00	685.00
34	39	42	2	121.00	685.00
40	39	42	2	117.00	635.00
39	40	41	2	115.00	610.00
39	42	43	2	115.00	610.00

[dihedrals]

; GROMOS improper dihedrals

; ai aj ak al funct angle fc

34	32	35	39	2	0.00	167.36
32	30	33	34	2	0.00	167.36
30	29	31	32	2	0.00	167.36
29	15	30	37	2	0.00	167.36
37	29	35	38	2	0.00	167.36
35	34	36	37	2	0.00	167.36
10	9	11	15	2	0.00	167.36
9	7	10	31	2	0.00	167.36
7	6	8	9	2	0.00	167.36
6	3	7	13	2	0.00	167.36
13	6	11	14	2	0.00	167.36
11	10	12	13	2	0.00	167.36
16	15	17	25	2	0.00	167.36

17	16	18	19	2	0.00	167.36
19	17	20	21	2	0.00	167.36
21	19	22	23	2	0.00	167.36
23	21	24	25	2	0.00	167.36
25	16	23	26	2	0.00	167.36
26	25	27	28	2	0.00	167.36

[dihedrals]

; ai	aj	ak	al	funct	ph0	cp	mult
1	2	3	6	1	0.00	3.77	6
4	3	6	7	1	180.00	33.50	2
6	3	4	5	1	0.00	3.77	6
6	7	9	10	1	180.00	41.80	2
7	6	13	11	1	180.00	41.80	2
7	9	10	11	1	180.00	41.80	2
9	10	11	13	1	180.00	41.80	2
9	10	15	29	1	0.00	1.00	6
10	9	31	30	1	180.00	24.00	2
10	11	13	6	1	180.00	41.80	2
10	15	29	30	1	0.00	1.00	6
13	6	7	9	1	180.00	41.80	2
16	17	19	21	1	180.00	41.80	2
16	25	26	27	1	180.00	41.80	2
17	16	25	23	1	180.00	41.80	2
17	19	21	23	1	180.00	41.80	2

19	21	23	25	1	180.00	41.80	2
21	23	25	16	1	180.00	41.80	2
25	16	17	19	1	180.00	41.80	2
25	26	28	15	1	180.00	24.00	2
29	15	16	17	1	180.00	1.00	6
29	15	28	26	1	180.00	1.00	3
29	30	32	34	1	180.00	41.80	2
30	29	37	35	1	180.00	41.80	2
30	32	34	35	1	180.00	41.80	2
32	30	31	9	1	180.00	24.00	2
32	34	35	37	1	180.00	41.80	2
32	34	39	40	1	180.00	33.50	2
34	35	37	29	1	180.00	41.80	2
37	29	30	32	1	180.00	41.80	2
40	39	42	43	1	0.00	3.77	6
42	39	40	41	1	0.00	3.77	6

[exclusions]

; ai aj funct ; GROMOS 1-4 exclusions

6 10

7 11

9 13

16 21

17 23

19 25

29 34

30 35

32 37