

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rui Miguel Simões Santos

**INTERAÇÃO DO ANTIBIÓTICO RIFAMPICINA
COM MEMBRANAS LIPÍDICAS
CARACTERIZAÇÃO EXPERIMENTAL E SIMULAÇÕES
DE DINÂMICA MOLECULAR**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal
orientada pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e pela
Professora Doutora Maria João Pedrosa Ferreira Moreno Silvestre
e apresentada ao Departamento de Química da Universidade de
Coimbra

Outubro de 2021

Rui Miguel Simões Santos

**INTERAÇÃO DO ANTIBIÓTICO RIFAMPICINA
COM MEMBRANAS LIPÍDICAS
CARACTERIZAÇÃO EXPERIMENTAL E SIMULAÇÕES
DE DINÂMICA MOLECULAR**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal
orientada pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e pela
Professora Doutora Maria João Pedrosa Ferreira Moreno Silvestre
e apresentada ao Departamento de Química da Universidade de
Coimbra**

Outubro de 2021

*"I am the master of my failure...
If I never fail how will I ever learn"*

Chandrasekhara Raman

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto “Summer School in Computational Biology”, através de “Skills 4 post-Covid”, com o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), em colaboração com a Direção Geral de Ensino Superior (DGES). Foram também 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>).

Chegou ao fim mais uma etapa, marcada pela inevitável menção à pandemia, mas sobretudo marcada por um conjunto de pessoas e meios excecionais sem os quais nada do que aqui se descreve seria possível. A todas essas pessoas, que vão desde os professores a amigos, colegas de laboratório, passando pelos funcionários, fica aqui o meu sentido agradecimento por tornarem tudo isto possível.

Ao Professor Doutor Luís Loura, meu orientador, com o qual tive o maior gosto em trabalhar, tanto pelo rigor como pela contínua disponibilidade. Agradeço sobretudo por me ter acolhido e ajudado a desenvolver este projeto, pela incessante partilha de conhecimento e pela confiança que demonstrou.

À Professora Doutora Maria João Moreno, minha coorientadora, que prontamente se disponibilizou a embarcar neste desafio, sem a qual este projeto não seria possível. Agradeço pela confiança depositada e espírito crítico positivo que tanto me influenciou, pelas discussões de possíveis rumos a seguir até à ajuda essencial para fazer sentido daquilo que parecia não o ter.

A todo o grupo de Química Biológica do Centro de Química de Coimbra, agradeço pelo ambiente saudável, pelas horas de almoço bem passadas, companheirismo e a ajuda sempre presente. Ao Alexandre e ao Hugo, agradeço por me ter introduzido à Dinâmica Molecular e por todo o tempo que despenderam em minha causa. À Cristiana Ramos, por me ter ajuda na fase inicial do projeto, agradeço pelo acompanhamento e por me mostrar os cantos à casa. Ao Jaime, à Cristiana Pires, à Margarida Cordeiro e à Inês Silva,

agradeço por toda a ajuda, mesmo quando envolvia tirar uma alíquota às seis da tarde de uma sexta.

Aos “meus” de Coimbra, a família que esta cidade me deu. Ao Amílcar, ao Frias, ao João, ao Tiago, amigos de todos os dias, do BM ao Moelas, passando mesmo por cima daquela escavadora, obrigado por todas as histórias nestes últimos anos, muitas delas tão épicas que já nem me lembro, mas que vai ficar comigo. Mas, sobretudo, obrigado pela ajuda que mesmo inadvertidamente me deram, essa que não era pedida, mas que estava lá. À Maria, à Joana e ao Pedro, o *gang* onde tudo começou, connosco ficam os almoços à última da hora no Fórum, as noites passadas a falar de mais do que devíamos, aquela jardineira que a Joana começava e eu acabava e, acima de tudo, todos os risos e gargalhadas, umas mais características que as outras. À Rita e à Carolina, agradeço pela boa disposição, pelas gargalhadas demasiado altas e não tanto pelas otites que possa vir a ter. A todos vocês, por todas as memórias que ficam, por aquelas que ainda estão para vir e principalmente pela amizade, obrigado.

E, por fim, o mais importante, a minha família, o meu porto seguro. Àqueles que cá estão, quer perto quer longe, e àqueles que já não. Obrigado principalmente aos meus pais, por me terem ensinado a ser humilde, verdadeiro e resiliente. Obrigado sobretudo pelo apoio, mesmo – especialmente - quando envolvia sacrifícios da vossa parte para que nunca me faltasse nada, ainda que por vezes eu não fosse merecedor. Ao meu irmão, que sempre me ajudou, mesmo quando provavelmente não devia, agradeço pela preocupação e apoio constante. À Mónica e à Chica, agradeço igualmente pelo apoio e por tornarem tudo mais alegre. Aos meus tios, obrigado pelo animo e incentivo ao longo destes anos. Obrigado também àqueles que já não estão, mas que acredito que estariam felizes por saber onde cheguei.

A todos, um enorme Obrigado, por me terem tornado aquilo que sou agora. Esta conquista também vos pertence.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XXI
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS	3
1.1. <i>Evolução do modelo de bicamada lipídica</i>	3
1.2. <i>Estrutura e organização</i>	5
1.2.1. Comportamento e coexistência de fases	5
1.2.2. Características químicas da superfície da membrana	6
1.3. <i>Permeação através de membrana celular</i>	7
1.4. <i>Lipossomas</i>	8
2. DINÂMICA MOLECULAR	9
2.1. <i>Fundamentos</i>	10
2.1.1. Interações ligantes	11
2.1.2. Interações não-ligantes	12
2.1.3. Campos de força e modelo de solvente	13
2.1.4. <i>Ensembles</i> e Condições de Fronteira Periódicas	14
2.2. <i>Limitações</i>	15
3. RIFAMPICINA	16
4. OBJETIVO	17
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. COMPOSTOS QUÍMICOS	21
2. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	21
3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	22
4. PREPARAÇÃO DE LUVs POR EXTRUSÃO	23

5. ENSAIO DE PERMEAÇÃO	25
5.1. <i>Cromatografia de exclusão – separação de CBF livre</i>	25
5.2. <i>Incubação dos LUVs com Rifampicina</i>	25
5.3. <i>Fracionamento das alíquotas</i>	26
5.3.1. <i>Otimização do fracionamento</i>	26
6. DINÂMICA MOLECULAR	32
6.1. <i>Simulações unrestrained</i>	33
6.2. <i>Umbrella sampling e cálculo de PMF</i>	34
CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
1. DINÂMICA MOLECULAR	39
1.1. <i>Posições Atômicas</i>	39
1.2. <i>Funções de Distribuição Radial</i>	44
1.3. <i>Ligações de Hidrogénio</i>	47
1.4. <i>Potenciais de Força Média</i>	51
1.5. <i>Constantes de partição</i>	56
2. CARACTERIZAÇÃO EXPERIMENTAL: ENSAIO DE PERMEAÇÃO	58
CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FUTURAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de POPC (A), POPE (B) e POPS (C).....	7
Figura 2. Representação dos diversos tipos de lipossomas. ³³	9
Figura 3. Representação bidimensional de condições de fronteira periódicas. ⁶⁶	15
Figura 4. Estrutura química da RIF e respetiva representação tridimensional.....	16
Figura 5. Esquema típico do diagrama de Jablonski (adapatado de ⁷⁸)......	22
Figura 6. Estrutura química da fluoresceína (A) e 6-carboxifluoresceína (B).	23
Figura 7. Perfil de separação de amostras com LUVs e 5% CBF livre (v/v). No gráfico estão descritos valores de Intensidade de fluorescência de CBF em função do volume de eluição (μl).	28
Figura 8. Perfil de Separação de amostras com LUVs com CBF encapsulado (A) e CBF livre (B). No gráfico estão descritos valores de Intensidade de fluorescência de CBF em função do volume de eluição (μl).	30
Figura 9. Perfil de Separação de uma amostra de LUVs com CBF encapsulada e CBF livre. No gráfico estão descritos valores de Intensidade de fluorescência de CBF em função do volume de eluição (μl).	31
Figura 10. Estrutura química da forma aniónica da RIF (esquerda) e da forma zwitteriónica (direita).	32
Figura 11. Estrutura da RIF com grupos de referência destacados. Representado a vermelho está a piperazina, a verde os anéis aromáticos e a azul a cadeia.	39
Figura 12. Posição transversal do centro de massa das moléculas de RIF em função do tempo de simulação. Para cada simulação, as diferentes curvas dizem respeito a moléculas distintas. A linhas a cinzento representam a posições médias dos átomos de fósforo em cada uma das monocamadas. A e B dizem respeito à espécie aniónica, C e D à espécie zwitteriónica. A e C dizem respeito a simulações para o caso WC, B e D para o caso CW.	40
Figura 14. <i>Snapshots</i> finais das simulações unrestrained da espécie aniónica (A e B) e da espécie zwitteriónica (C e D). A e C são <i>snapshots</i> para o caso CW, B e D para o caso WC. As moléculas de RIF estão representadas com linhas mais grossas, a água a ciano, as caudas do POPC a cinza e os pontos vermelhos representam átomos de fósforo.....	41

Figura 13. Perfis de densidade da espécie aniônica (A e B) e da espécie zwitteriônica (C e D). A e C são relativos ao caso CW, C e D para o caso WC. A vermelho está representada a densidade das moléculas de RIF, a azul escuro da água, a azul claro e a verde o do fosfato e do azoto do POPC, respetivamente. Para efeitos de visualização a densidade das moléculas de RIF foi multiplicada por um fator de 5. Os valores apresentados têm em conta o descarte dos 500 ns iniciais.	41
Figura 15. Estrutura da RIF com identificação de átomos de referência.....	42
Figura 16. Variação da distância transversal entre átomos de referência em função da distância de N2 ao centro da bicamada. A-D retratam a distribuição do anião, E-H do zwitterião. A coluna da esquerda diz respeito às simulações WC e a esquerda às CW. As cores representam as diferentes moléculas, sendo vermelho, verde, azul-escuro e azul claro associadas a molécula número 1, 2 3, 4, respetivamente. Os valores apresentados têm em conta toda a duração da simulação.	43
Figura 17. RDF do grupo piperazina do anião (A-D) e do zwitterião (E-H) em torno do átomo de fósforo do POPC (A e B, E e F) e me torno do azoto (C e D, G e H). A coluna da esquerda diz respeito às simulações WC e a esquerda às CW. As cores representam as diferentes moléculas, sendo vermelho, verde, azul-escuro e azul claro associadas a molécula número 1, 2 3, 4, respetivamente. Os valores apresentados têm em conta o descarte dos 500 ns iniciais.	45
Figura 18. RDF dos anéis aromáticos do anião (A, B) e do zwitterião (C, D) em torno do fósforo (A, C) e do azoto (B, D) do POPC. As cores representam as moléculas inseridas no sistema, sendo vermelho, verde, azul-escuro e azul claro associadas a molécula número 1, 2 3, 4, respetivamente. Os dados apresentados dizem respeito ao sistema WC. Os valores apresentados têm em conta o descarte dos 500 ns iniciais.	46
Figura 19. Estrutura da RIF com a identificação de átomos de referência para estabelecimento de ligações de hidrogénio.....	47
Figura 20. Número médio de ligações de hidrogénio intramoleculares da RIF e entre a água e grupos aceitantes da RIF nas simulações WC (A) e CW (B). As barras de erro correspondem ao desvio padrão.....	48
Figura 21. Estrutura da RIF com conformação adequada para a ocorrência de interações de hidrogénio (linha tracejado) entre os átomos identificados.....	49

Figura 22. Ligações de hidrogénio entre diversos grupos da molécula de RIF, o grupo fosfato e éster do POPC. O painel A diz respeito ao caso WC e o B ao CW. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.....	50
Figura 23. <i>Snapshots</i> das configurações iniciais, pós- <i>pulling</i> , para o anião (A, B, C) e zwitterião (D, E, F). A e D dizem respeito às configurações de moléculas 1 e 2 a 4 e a 0 nm do centro da bicamada, respetivamente, B e E a ambas as moléculas a 2 nm do centro da bicamada, C e F às moléculas 1 e 2 a 0 e a 4 nm do centro da bicamada, respetivamente. As moléculas de RIF estão representadas com linhas mais grossas, a água a ciano, as caudas do POPC a cinza e os pontos vermelhos representam átomos de fósforo.	52
Figura 24. <i>Snapshots</i> das configurações finais, pós- <i>sampling</i> , para o anião (A, B, C) e zwitterião (D, E, F). A e D dizem respeito às configurações de moléculas 1 e 2 a 4 e a 0 nm do centro da bicamada, respetivamente, B e E a ambas as moléculas a 2 nm do centro da bicamada, C e F às moléculas 1 e 2 a 0 e a 4 nm do centro da bicamada, respetivamente. As moléculas de RIF estão representadas com linhas mais grossas, a água a ciano, as caudas do POPC a cinza e os pontos vermelhos representam átomos de fósforo.	53
Figura 25. PMF da espécie aniónica (A e B) e zwitteriónica (C e D) para intervalos crescentes de 20 ns até ao máximo de 120 ns. A e C dizem respeito a simulações CW, B e D a simulações WC. As setas vermelhas indicam a tendência de evolução.	54
Figura 26. Valores de ΔG para o processo de translocação (A, B) e dessorção (C, D) calculados tendo em conta intervalos de 20 ns, para simulações CW (laranja) e WC (azul). A e B dizem respeito à espécie aniónica e C e D à zwitteriónica.	55
Figura 27. PMF calculado tendo em conta os últimos 20 ns de simulação para simulações CW (vermelho) e WC (preto). A diz respeito ao anião e B ao zwitterião. ΔG_t e ΔG_d indicam as barreiras energéticas para o processo de translocação e dessorção, respetivamente.....	56
Figura 28. Comparação entre PMF calculados tendo em conta a direção WC (preto) e CW (vermelho) para o anião (linha) e zwitterião (tracejado). Cálculo tendo em conta os últimos 20 ns de simulação.	58

Figura 29. Percentagem de CBF libertada dos LUVs incubados a diferentes concentrações de RIF, em função do tempo de incubação. Os dados apresentados (pontos) foram adaptados a um ajuste monoexponencial (linhas). 59

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1. Compostos utilizados e respectivas informações.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 2. Valores de ΔG de translocação e desorção.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 3. Valores de K_p calculados.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 4. Constante de velocidade de permeação para as várias concentrações de RIF.</i>	<i>59</i>

ABREVIATURAS

AA – *All-Atom*

ABFE - *Absolute Binding Free Energy*

ADN – *Ácido Desoxirribonucleico*

An - *Aniã*

BI – *Bonded Interactions, Interações Ligantes*

CBF – *6-Carboxifluoresceína*

COM – *Center of Mass, Centro de Massa*

CG – *Coarse-Grained*

CW – *Center to Water*

FEP - *Free Energy Perturbation*

GUVs – *Giant Unilamellar Vesicles, Vesículas Unilamelares Gigantes*

ITC - *Isothermal Titration Calorimetry*

LUVs – *Large Unilamellar Vesicles, Vesículas Unilamelares Grandes*

MC – *Monte Carlo*

MD – *Molecular Dynamics, Dinâmica Molecular*

MLVs – *Multilamellar Vesicles, Vesículas Multilamelares*

nBI – *non Bonded Interactions, Interações não Ligantes*

PE - *Fosfatidiletanolamina*

PME – *Particle Mesh Ewald*

PMF – *Potential of Mean Force*

POPC - *1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina*

PS - Fosfatidilserina

RIF – Rifampicina

SPC – *Single Point Charge*

SUVs – *Small Unilamellar Vesicles*, Vesículas Unilamelares Pequenas

UA – *United-Atom*

WC – *Water to Center*

WHAM - *Weighted Histogram Analysis Method*

Zw - Zwitteriño

RESUMO

A interação de uma molécula com o organismo tem por base as suas características físico-químicas. Foi assim que Lipinski desenvolveu um conjunto de regras que permite prever uma das mais importantes características de uma molécula candidata a fármaco, a sua absorção. Todas aquelas que não sejam abrangidas por este conjunto de regras é previsível que apresentem uma baixa eficiência de absorção, e consequentemente não serão bons candidatos a desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica. Existem, ainda assim, diversas moléculas que não respeitam as regras de Lipinski e são prontamente absorvidas pelo organismo. É com esta exceção em mente que são estudadas as espécies aniónicas e zwitteriónica da molécula Rifampicina, princípio ativo de um antibiótico de largo espectro que, mesmo sendo uma molécula altamente complexa e com elevado peso molecular, é absorvida pelo organismo humano e os seus efeitos são vantajosos para o combate de infeções como, por exemplo, a tuberculose.

Para a elucidação do mecanismo de absorção da Rifampicina foram efetuados estudos utilizando a técnica de Dinâmica Molecular, o que fornece informação sobre as suas interações intramoleculares e as estabelecidas com uma bicamada de POPC. Foram realizados dois tipos de simulação, onde as moléculas foram inicialmente colocadas no centro da bicamada ou no meio aquoso. Ambos os sistemas foram deixados sem qualquer restrição e as corridas foram estendidas até a um máximo de 2 μ s. Em adição a este tipo de simulações também foram realizadas outro tipo de simulações para o cálculo dos perfis de energia livre, através de *umbrella sampling*.

A caracterização computacional permitiu definir que a interação da RIF com uma bicamada lipídica, como seria de esperar dada a sua complexidade, ocorre através de diversas formas. De facto, a maioria das moléculas inseridas em todos os sistemas apresenta um comportamento distinto. Ainda assim, a orientação específica paralela à normal da bicamada que o grupo piperazina adota, em função do grau de internalização na bicamada, é transversal à maioria dos sistemas. Foi também caracterizada a interação entre a Rifampicina e alguns grupos de referência do POPC, onde foi possível distinguir

a interação particular com o grupo fosfato, mais bem definida quanto maior o grau de protonação da piperazina.

O cálculo de perfis de energia livre das moléculas tem a si associado a constante perturbação da bicamada devido ao método de *pulling* usado para a obtenção de configurações para o *sampling*. Quantitativamente os valores são bastante dispares do contexto experimental, mas comparativamente entre si é possível distinguir a forma aniónica com maior constante de partição para a bicamada e menor barreira energética de translocação.

Experimentalmente, foi caracterizada a permeação através de membranas de lipossomas, de uma pequena molécula fluorescente, 6-carboxifluoresceína, na presença de diversas concentrações de Rifampicina. Os resultados obtidos indicam que a interação do antibiótico com a membrana compromete as propriedades da membrana como barreira, conduzindo a um aumento na velocidade de permeação de 6-carboxifluoresceína. A perturbação da membrana, e consequente aumento da permeabilidade de 6-carboxifluoresceína, é tanto maior quanto mais elevada a concentração de Rifampicina.

ABSTRACT

A molecule's interaction with the organism is based on its physicochemical characteristics. That's how Lipinski developed a set of rules that predict one of the most important characteristics of a drug candidate molecule, its absorption. All those that do not obey this set of rules are expected to have a low absorption efficiency, and consequently will not be good candidates for the development of new molecules with biological activity. There are, even so, several molecules that do not respect Lipinski's rules and are readily absorbed by the body. It is with this exception in mind that the anionic and zwitterionic species of the Rifampicin molecule were studied. Rifampicin is the active principle of a broad-spectrum antibiotic that, despite being a highly complex molecule with a high molecular weight, is absorbed by the human body and its effects are beneficial for combating infections such as tuberculosis.

To elucidate the mechanism of absorption of Rifampicin, studies were carried out using the Molecular Dynamics technique, which provides information about its intramolecular interactions and those established with a POPC bilayer. Two types of simulation were performed, where the molecules were initially placed in the center of the bilayer or in the aqueous medium. Both systems were left unrestricted, and runs were extended to a maximum of 2 μ s. In addition to this type of simulation, another type of simulation was also carried out to calculate the free energy profiles, through umbrella sampling.

Computational characterization allowed us to define that the interaction of RIF with a lipid bilayer, as expected given its complexity, occurs in several ways. In fact, most molecules inserted in all systems show a different behaviour. Even so, the specific orientation parallel to the normal bilayer that the piperazine group adopts, depending on the degree of internalization in the bilayer, is common to most systems. The interaction between Rifampicin and some POPC reference groups was also characterized, where it was possible to distinguish the particular interaction with the phosphate group, better defined for higher degrees of piperazine protonation.

The calculation of free energy profiles of molecules is associated with constant perturbation of the bilayer due to the pulling method used to obtain sampling

configurations. Quantitatively the values are quite different from the experimental context, but compared to each other it is possible to distinguish the anionic form with the highest partition constant for the bilayer and the lowest energy translocation barrier.

Experimentally, the permeation through liposome membranes of a small fluorescent molecule, 6-carboxyfluorescein, in the presence of different concentrations of Rifampicin was characterized. The results obtained indicate that the interaction of the antibiotic with the membrane compromises the properties of the membrane as a barrier, leading to an increase in the permeation rate of 6-carboxyfluorescein. The membrane disturbance, and consequent increase in the permeability of 6-carboxyfluorescein, is greater the higher the concentration of Rifampicin.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. Membranas Biológicas

As membranas celulares são constituintes indispensáveis de células procarióticas e eucarióticas, tendo como principal função definir limites celulares entre o ambiente celular e o meio aquoso, entre outras células e dentro da própria célula, onde constituem organelos celulares.¹ Para além das suas funções estruturais e definir os limites celulares, as membranas funcionam como um meio essencial para comunicação celular, quer através de proteínas associadas à membrana ou através da capacidade de permeação seletiva.

São constituídas maioritariamente por lípidos, tais como os fosfolípidos, e proteínas, que, no seu conjunto determinam as características físico-químicas da membrana, principalmente através da sua composição lipídica. A função biológica, em conjunto com a fração lipídica e outras moléculas, é o principal papel das proteínas que podem revestir mais de metade da superfície membranar.^{1,2}

1.1. Evolução do modelo de bicamada lipídica

A formulação do modelo de bicamada lipídica por Gorter e Grendel em 1925 significou o início da descrição moderna das estruturas da membrana celular.³ Mais tarde, com o desenvolvimento de técnicas microscópicas, descobriu-se que a bicamada lipídica englobava também uma série de proteínas. Com base nestas descobertas, em 1972 Singer e Nicolson propuseram o influente modelo de “mosaico fluido”, que caracteriza as membranas celulares como um líquido formado por lípidos misturados aleatoriamente no qual as proteínas estão incorporadas.^{4,5} No entanto, misturas de moléculas distintas não tendem a se distribuir aleatoriamente num líquido, mas mostram preferências por agregados de composição distinta associados a conformações energeticamente favoráveis. Assim, enquanto a entropia funciona de acordo a uma mistura aleatória, as energias de interação entre diferentes tipos de moléculas vizinhas favorecem distribuições não aleatórias. Embora os primeiros modelos de membrana assumissem que os lípidos da membrana estavam uniformemente misturados, evidências experimentais que foram surgindo sugeriram que os lípidos poderiam segregar lateralmente e formar domínios com características estruturais distintas.⁶⁻⁸

Para reconciliar estas novas descobertas, em 1976, o modelo de mosaico fluido foi estendido por forma a acomodar a possível existência de zonas estáticas ou semi-estáticas de lípidos menos móveis num mar de lípidos fluidos.⁹

Foi já no final do séc. XX que o conceito de *lipid rafts* foi introduzido, descrevendo-as como sendo nano-domínios membranares heterogéneos e dinâmicos formados após interações entre proteínas e lípidos.^{10,11} A hipótese de *lipid rafts* propõe que o agrupamento seletivo de certos lípidos leva à formação de domínios de membrana relativamente ordenados que podem incorporar outras proteínas e lípidos. O conceito de *lipid rafts* fornece uma base para a compreensão sobre a forma como as membranas realizam diversas funções biológicas: por meio de incorporação seletiva de determinadas proteínas em detrimento de outras, as interações proteína-proteína podem ser controladas, facilitando a formação de complexos funcionais proteína-proteína ou proteína-lípido nas membranas. Além disso, as propriedades físicas distintas das *rafts* e de domínios *non-raft*, como a curvatura da membrana, a espessura hidrofóbica e a tensão podem também modular os estados funcionais de certas proteínas associadas à membrana. Desta forma, acredita-se que as *lipid rafts* sejam importantes mediadoras de uma série de processos celulares.

São ainda muitas as questões que permanecem por esclarecer acerca de *lipid rafts*, incluindo o seu tamanho, composição e natureza física. No cerne dessas questões estão por exemplo as forças moleculares subjacentes à sua formação e estabilidade, cuja caracterização é necessária para uma compreensão mecanística dos princípios da organização da membrana e seus efeitos modulatórios sobre a função da membrana e proteínas associadas à membrana que estão envolvidas em processos de sinalização celular. Essas forças moleculares incluem forças de Van der Waals, interações eletrostáticas, solvatação e efeitos estéreos que atuam sobre moléculas localizadas em *rafts*, domínios *non-raft* ou limites de domínio.²

No entanto, mesmo depois de mais de duas décadas desde a apresentação da hipótese de *lipid rafts*, ainda é necessário compreender ao nível molecular como as *lipid rafts* se formam e como contribuem para processos de sinalização celular, presumivelmente por meio do controlo da função das proteínas de membrana.

1.2. Estrutura e organização

Quando expostos a água, os fosfolípidos organizam-se numa folha de duas camadas com uma orientação bem definida, em que as caudas hidrofóbicas apontam para o centro da folha, onde a presença de água é essencialmente nula. Este arranjo resulta na criação de dois "folhetos" que constituem, cada um, uma monocamada lipídica.^{12,13}

Na base do processo de organização da bicamada está um conjunto de interações ao quais se dá o nome de efeito hidrofóbico. É devido a este efeito que moléculas anfifílicas, como os fosfolípidos, se organizam lado a lado, por modo a que as interações entre eles sejam entre zonas com o mesmo perfil polar, i.e., as caudas hidrofóbicas tendem a dispor-se lado a lado, diminuindo interações desfavoráveis com a água.¹²

Transversalmente, as regiões em cada extremo da bicamada são as cabeças hidrofílicas dos lípidos. Esta porção da membrana está completamente hidratada e tem normalmente cerca de 0.8-0.9 nm de espessura. Em bicamadas de fosfolípidos, o grupo fosfato está localizado dentro desta região hidratada, aproximadamente a 0.5 nm do núcleo hidrofóbico. Em alguns casos, esta região hidratada pode estender-se para lá dos 0,8 nm, por exemplo, em lípidos com proteínas ou hidratos de carbono associados.¹⁴ Um exemplo comum de tal modificação é o revestimento de lipopolissacarídeos na membrana externa da bactéria, que ajuda a reter uma camada de água ao redor da bactéria para prevenir a desidratação.¹⁵

Para lá da região hidratada está uma região intermediária, apenas parcialmente hidratada, com aproximadamente 0,3 nm de espessura. É nesta zona que a concentração de água cai drasticamente, desde concentrações locais de 2 M na zona da cabeça polar dos lípidos para quase zero na zona das caudas apolares.^{16,17} O núcleo hidrofóbico da bicamada tem tipicamente 3-4 nm de espessura, mas esse valor varia com o comprimento e composição da cadeia. A espessura do núcleo também varia significativamente com a temperatura, particularmente perto de uma zona de transição de fase.¹⁸⁻²⁰

1.2.1. Comportamento e coexistência de fases

A uma dada temperatura, uma bicamada lipídica composta por um determinado tipo de componente lipídico pode existir numa fase líquida ou de gel (sólida). Todos os

lípidos têm uma temperatura característica na qual ocorre transição da fase de gel para a fase líquida. Em ambas as fases, o processo de troca de folheto (*flip-flopping*) por moléculas de lípidos é um processo altamente moroso, mas na sua fase líquida um determinado lípido poderá trocar de localização com seu vizinho milhões de vezes por segundo. Essa troca aleatória de caminhada permite que os lípidos difundam e, portanto, possam vagar pela superfície da membrana.²¹

O comportamento de fase de bicamadas lipídicas é amplamente determinado por interações de Van der Waals, atrativas entre lípidos adjacentes. Lípidos com cauda mais longa têm maior área de contacto, aumentando a força dessa interação e, conseqüentemente, diminuindo a sua mobilidade.¹⁹

A temperatura de transição também pode ser afetada pelo grau de insaturação das caudas. Uma ligação dupla insaturada pode produzir uma torção na cadeia de alcano, “interrompendo” de certa forma o empacotamento de lípidos. Essa interrupção cria espaço livre adicional dentro da bicamada, que permite flexibilidade adicional nas cadeias adjacentes.¹⁹ Um exemplo deste efeito pode ser observado em duas gorduras comumente utilizadas, a manteiga e o óleo vegetal, onde a manteiga, que tem uma grande percentagem de gorduras saturadas, é sólida à temperatura ambiente, enquanto que o óleo vegetal, constituído principalmente por lípidos insaturados, é líquido.

É também o facto de que lípidos diferentes possam apresentar comportamentos de fase diferentes à mesma temperatura que faz com que coexistam diversos domínios em fases distintas na mesma membrana. Esta coexistência de diversas fases desempenha em zonas espacialmente distantes um papel crítico em fenómenos bioquímicos, como o caso de processos de sinalização celular.²²

1.2.2. Características químicas da superfície da membrana

Enquanto que as caudas lipídicas têm um papel importante na modulação do comportamento de fase da bicamada, é o grupo principal que determina o perfil químico da superfície da bicamada. A maioria das bicamadas naturais são sobretudo compostas por fosfolípidos, mas esfingolípidos e esteróis também são componentes importantes, que podem estar presentes em concentrações mais baixas.²³ Do conjunto de fosfolípidos, o grupo principal mais comum é a fosfatidilcolina (PC), presente em

fosfolípidos como o 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) (Figura 1A), responsável por cerca de metade dos fosfolípidos presentes na maioria das células de mamíferos.²⁴ PC é um grupo zwitteriônico, tem uma carga negativa no grupo fosfato e uma carga positiva na amina, apresentando carga global neutra.

Outros grupos comuns também presentes em bicamadas associados a vários fosfolípidos podem incluir fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS), associados ao POPE e POPS, respetivamente (Figura 1B e 1C). Estes grupos alternativos estão muitas vezes associadas a funcionalidades biológicas específicas. Um exemplo é a presença de PS na face extracelular da membrana dos eritrócitos que consiste num marcador de apoptose celular, enquanto o PS nas vesículas da placa de crescimento é necessário para a nucleação de cristais de hidroxiapatite e subsequente mineralização óssea.^{25,26} Ao contrário do PC, alguns dos outros grupos principais têm carga global não neutra, mediando as interações eletrostáticas de pequenas moléculas com a bicamada.²⁷

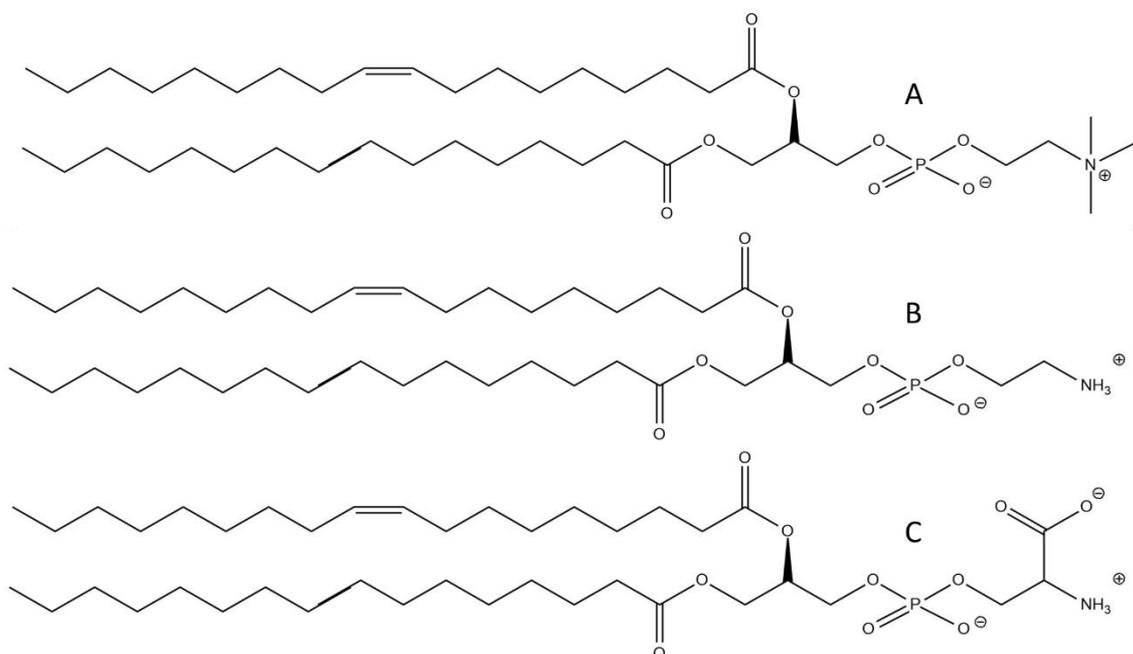


Figura 1. Estrutura química de POPC (A), POPE (B) e POPS (C).

1.3. Permeação através de membrana celular

O transporte de solutos através da membrana regula a captação e libertação de diversas substâncias, existindo diferentes vias para uma molécula passar através de uma membrana lipídica. Processos de transporte incluem permeação por difusão passiva e

canais ou bombas de íões ou de outras pequenas moléculas. Pequenos solutos e moléculas semelhantes a fármacos também podem permear a matriz lipídica através de processos de difusão conduzido por um gradiente de concentração entre as regiões aquosas em ambos os lados de uma bicamada.^{28,29}

Overton descobriu que solutos lipossolúveis penetraram mais rapidamente na membrana celular, e adotou o modelo de que o determinante para a permeação do soluto através da membrana barreira é sua própria solubilidade na membrana. O modelo também assume que a difusão através da região hidrofóbica é o passo limitante da velocidade do processo geral, constituído por três etapas³⁰:

- i. partição para a região hidrofóbica da membrana;
- ii. difusão através da membrana;
- iii. partição para a fase aquosa do outro lado da membrana

1.4. Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas que encapsulam no seu interior um núcleo aquoso, circundado por, pelo menos, uma camada lipídica. São comumente utilizados para encapsular fármacos ou como modelos de membranas celulares, utilizados em contexto de investigação.³¹

Existem diversos tipos de lipossomas, incluindo vesículas multilamelares (MLVs), estruturalmente pouco definidas e por isso negligenciadas em favor de outros modelos mais bem descritos como o caso de vesículas unilamelares.

As vesículas unilamelares podem ser usualmente descritas em pequenas vesículas unilamelares (SUV), com diâmetros entre 200 Å e 500 Å, e grandes vesículas unilamelares (LUV), com diâmetros que vão desde 500 Å a 500 nm (Figura 2). Existem também vesículas unilamelares gigantes (GUV), cujo diâmetro pode ascender até 300 µm.³²

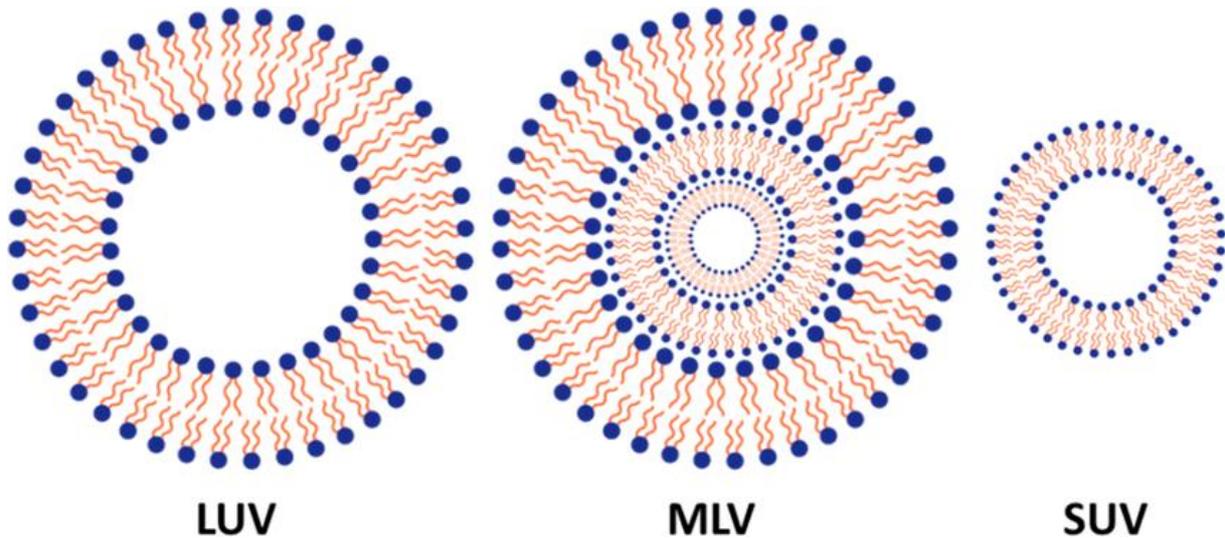


Figura 2. Representação dos diversos tipos de lipossomas.³³

2. Dinâmica Molecular

É comum uma descoberta fundamentalmente nova demorar décadas até se tornar globalmente difundida. No que toca a avanços ao nível computacional, mais especificamente, ao nível de simulação computacional, o caso toma outras proporções.

Foi após a Segunda Guerra Mundial, no início da década de cinquenta, que os computadores se tornaram parcialmente disponíveis para uso não militar, marcando assim o início da simulação computacional. Com esta disponibilidade de computação, a comunidade científica inevitavelmente começou a sua exploração, como foi o caso de Metropolis et al. que começaram por simular um sistema líquido, introduzindo o método de Metropolis Monte Carlo (MC).³⁴ A primeira simulação de Dinâmica Molecular (MD) veio alguns anos mais tarde, em 1956, com Alder e Wainwright, que estudaram a dinâmica de um conjunto de esferas rígidas.³⁵

É desta forma e acompanhando o contínuo avanço e disponibilidade de computadores com poder de computação cada vez superior que se torna acessível estudar sistemas químicos e biológicos. Torna-se então possível descrever e compreender propriedades microscópicas com o último objetivo de prever propriedades macroscópicas, tendo sempre em conta medidas de todo o sistema. No contexto de modelação molecular, este facto torna-se mais relevante uma vez que as

propriedades de uma única estrutura não tornam possível a extrapolação desta informação para uma escala macroscópica.³⁶

O uso de simulações de MD para obter informação detalhada de sistemas biológicos ao nível atômico tem sido cada vez mais considerado como uma técnica importante. Também com os contínuos avanços tecnológicos, a técnica de MD tem sofrido avanços significativos, desde o seu uso para o estudo de dinâmica de fluidos de esferas sólidas e partículas de Lennard-Jones até a um método versátil para a simulação de diversos sistemas com maior resolução.³⁷ Na década de 1980, a disponibilidade de diversos campos de forças para moléculas de água, proteínas e ácido desoxirribonucleico (ADN) e o aparecimento de estudos em sistemas lipídicos tornou os métodos de MD ainda mais relevantes, particularmente para estudos biofísicos.^{38,39}

2.1. Fundamentos

No sentido literal, Dinâmica Molecular é o movimento simultâneo de vários núcleos e elétrões que, no seu conjunto, formam uma entidade molecular. Estritamente falando, uma descrição completa de tal sistema iria requer a resolução integral da equação de Schrödinger dependente do tempo, incluindo todos os graus de liberdade eletrónicos e nucleares. Esta, no entanto, é uma tarefa com elevado peso computacional e inviável para sistemas com mais de três átomos ou mais que um estado eletrónico. É por isso necessário impor algumas aproximações.^{40,41}

É com a visão de diminuir custos computacionais que se assume que os movimentos de graus de liberdade lentos e movimentos de graus de liberdade rápidos são separáveis (aproximação de Born-Oppenheimer). No contexto molecular, isto significa que a nuvem de elétrões se ajusta instantaneamente a mudanças na configuração nuclear e, como consequência, o movimento nuclear evolui sobre uma única superfície de energia potencial, associada a um único estado quântico eletrónico. Na prática, a maioria das simulações de MD são realizadas com as moléculas no seu estado eletrónico fundamental.⁴²

Sendo o método de MD um método clássico, todos os átomos do sistema são considerados através de uma perspectiva clássica, assumindo que a aproximação de

Born-Oppenheimer é aplicável e desta forma não se consideram separadamente núcleos e elétrons. Cada partícula elementar representa um átomo, ao qual se associa uma carga atômica que engloba contribuições nucleares e eletrônicas.^{43,44} As interações atômicas estão categorizadas em dois termos: interações entre átomos ligados diretamente por ligações químicas (BI, *bonded interactions*) e interações entre átomos não ligados por ligações químicas (nBI, *non-bonded interactions*). As últimas correspondem normalmente a interações entre um par de átomos que se localizem a uma distância menor que um raio específico (*cutoff radius*).

2.1.1. Interações ligantes

A expressão para o cálculo das BI inclui todos os termos das ligações, ângulos e diedros, dando a energia do sistema tal como descrito na Equação 1.

$$\begin{aligned}
 E_{BI} = & \sum_{\text{ligações}} \frac{1}{4} K_b (b^2 - b_0^2)^2 \\
 & + \sum_{\text{ângulos}} \frac{1}{2} K_\theta [\cos(\theta) - \cos(\theta_0)]^2 \\
 & + \sum_{\substack{\text{diedros} \\ \text{impróprios}}} \frac{1}{2} K_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{diedros}} K_{\phi,n} [1 + \cos(n\phi - \delta_n)]
 \end{aligned} \tag{1}$$

Os termos de ligações, ângulos e diedros impróprios são modelados como osciladores harmônicos, onde b é o valor do comprimento da ligação, θ e φ são os valores dos ângulos de ligação e diedros impróprios, respetivamente, b_0 , θ_0 e φ_0 são os respetivos valores de referência ou de equilíbrio. Para este tipo de aproximação, para além dos parâmetros de referência é apenas necessário o valor das constantes de força K_b , K_θ e K_φ , associadas às ligações, ângulos e diedros impróprios, respetivamente. O termo de ângulos diedros, também respeitante à torção, é representado como uma expansão do cosseno com multiplicidade n e amplitude $K_{\phi,n}$, onde ϕ diz respeito ao ângulo e δ_n à fase.^{45,46}

2.1.2. Interações não-ligantes

Relativamente às nBI, estas têm em conta dois tipos de interação: interações de Coulomb e de Van der Waals, descritas na Equação 2. As parcelas electrostáticas desta componente, coerentes com as interações de Coulomb, são descritas como interações entre dois pontos com carga fixa, centrados nos átomos. O tratamento de interações electrostáticas é muitas vezes referido como sendo “aditivo”, uma vez que as cargas não se afetam mutuamente e todas as interações electrostáticas átomo-átomo podem ser simplesmente descritas como a soma total de todas as energias electrostáticas correspondentes a cada átomo do sistema.⁴⁷ A componente de interações de Van der Waals entre dois átomos é tipicamente definida como um potencial de Lennard-Jones, fornecendo um bom compromisso entre exatidão e custo computacional.⁴⁵

$$E_{NB} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi r_{ij}} + \sum_{i < j} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2)$$

Na equação 2, na primeira parcela relativa às interações de Coulomb, q_i e q_j são duas cargas pontuais fixas, centrados nos átomos i e j e r a distância entre estes dois átomos. Na parcela que incide sobre as interações de Van der Waals, ε_{ij} é o mínimo do poço potencial, σ_{ij} a distância inter-atômica na qual o valor de energia potencial é nulo e r a distância entre os átomos.^{45,48} Estas definições estão na base de uma das mais importantes aproximações de MD: entre todas as nBI, apenas são consideradas aquelas que envolvem pares de átomos, i.e. interações que envolvam três ou mais átomos são negligenciadas.⁴⁹

Na sua essência, uma simulação de MD é a resolução numérica das equações de Newton do movimento para todas as partículas de um sistema em estudo.^{37, 48,50} A aplicação das equações de Newton permite calcular a evolução do sistema molecular, ditada pela interação de todos os átomos presentes no sistema.⁵¹ De facto, o conjunto de equações descritas anteriormente permite o cálculo da energia potencial do sistema, V , a partir da soma das duas componentes energéticas E_{BI} e E_{NB} . É com base nessa função de energia potencial, também chamado campo de forças, que é resolvida a seguinte equação de Newton para todos os N átomos:

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = \mathbf{F}_i, \quad i = 1, \dots, N \quad (3)$$

onde m é a massa, r a posição cartesiana do átomo i e F é a força, calculada como o simétrico do gradiente da energia potencial V :

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (4)$$

A força F que atua sobre cada uma das partículas do sistema calculada através do campo de forças é posteriormente utilizada para determinar as posições de todas as partículas do sistema através da integração da segunda lei de Newton do movimento. Este cálculo é feito constantemente durante o decorrer da simulação, em pequenos passos temporais na ordem dos femtosegundos (tipicamente 1 a 4 fs).^{15,17-19}

MD estuda a evolução temporal das coordenadas e do momento linear de cada partícula de um determinado sistema. A esta evolução, o resultado propriamente dito de uma simulação de MD, dá-se o nome de trajetória, incluída num ficheiro dado como output do software.⁵³

2.1.3. Campos de força e modelo de solvente

Os campos de forças já descritos anteriormente podem ser categorizados de acordo com o nível de descrição. Campos de força do tipo *all-atom* (AA) têm em conta todos os átomos do sistema. Apesar de bastante úteis, uma vez que têm em conta todo o sistema, acarretam mais complexidade e por isso maior custo computacional. Assim, mais uma vez como forma de compromisso entre exatidão e custo computacional, são frequentemente utilizados campos de força onde os grupos CH, CH₂ e CH₃ são considerados como uma única partícula. A estes campos de força dá-se o nome de *united-atom* (UA) e são muito usados para sistemas com elevado número de partículas, onde a descrição detalhada de todos os átomos não é necessária.⁵⁴⁻⁵⁶ Existe outro tipo de campos de força, designados como *coarse-grained* (CG), onde, de forma semelhante aos UA, considera grupos de átomos em partículas individuais, sendo que, neste caso, este efeito é considerado para todo o sistema.⁵⁷

Especificamente para a água, o solvente relevante em contexto de sistemas biológicos, existem diversos modelos de campos de força disponíveis. Especialmente considerando sistemas com misturas água/lípido, é usado o modelo SPC (*Single Point Charge*).⁵⁸

De forma que os cálculos sejam corretamente executados, o software de simulação deverá ter em conta os diversos grupos sobre os quais as respetivas contribuições devem atuar. Essa informação está incluída no ficheiro de topologia, fornecido ao software pelo utilizador.³⁶

Considerando os campos de forças disponibilizados, apenas alguns átomos presentes em sistemas biológicos, alguns metais e iões estão parametrizados. Todas as restantes partículas que sejam introduzidas no sistema como objeto de estudo que não sejam inerentes ao campo de forças têm que ser parametrizadas externamente, quer pelo utilizador ou por recurso a bases de dados.^{59,60} Em ambos os casos, a informação deve ser criteriosamente verificada previamente a ser utilizada.

2.1.4. Ensembles e Condições de Fronteira Periódicas

Simulações de MD sujeitas a métodos de integração padrão usam um *ensemble* onde o número de partículas (N), volume (V) e a energia total (E) são mantidas constantes - ensemble NVE. Apesar de bastante usado, este ensemble não traduz verdadeiramente condições realísticas. É então útil simular sistemas com condições de volume e temperatura (T) constantes – ensemble NVT – ou pressão (P) e temperatura constantes – ensemble NPT.^{36,61,62}

Com o avanço de poder computacional, já referido anteriormente, aumenta também a capacidade de simular sistemas cada vez maiores e mais complexos. Ainda assim, independentemente do número de partículas, este número será sempre finito e algumas destas partículas estariam inevitavelmente sujeitas a condições com uma fronteira não natural, o vácuo. O modo clássico para eliminar estas condições de fronteira é a aplicação de condições de fronteira periódicas. Os átomos do sistema são inseridos no interior de uma caixa virtual, que compõe uma célula unitária, rodeada por vinte e seis cópias dela mesma, como ilustrado na Figura 3. Assim, o sistema em estudo desfaz-se de fronteiras, i.e. partículas que saiam da célula unitária serão substituídas pela sua cópia ao entrarem pelo lado oposto.^{58,63–65}

A inclusão de condições de fronteira periódicas substitui o problema de fronteiras não naturais por condições de periodicidade artificial. Esta condição não toma proporções relevantes no caso de sistemas relativamente grandes, o que já não acontece para sistemas mais pequenos onde a periodicidade pode causar interações que podem dar origem a artefactos.⁶⁴

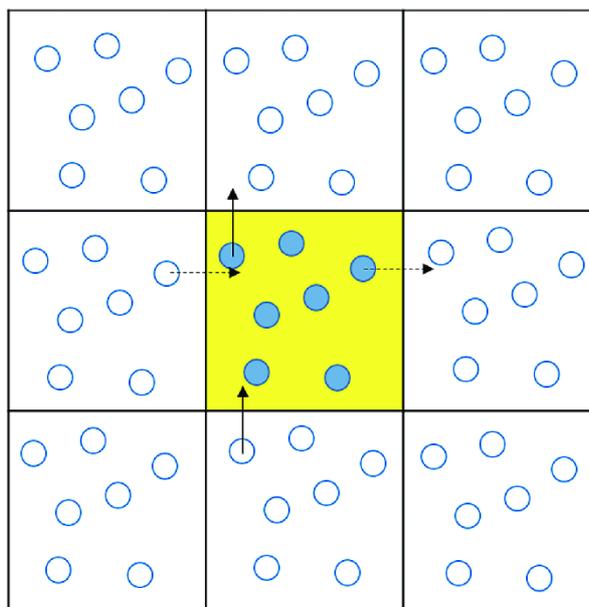


Figura 3. Representação bidimensional de condições de fronteira periódicas.⁶⁶

2.2. Limitações

Paralelamente a todos os avanços tecnológicos e vantagens de MD, existem ainda assim algumas limitações que podem apresentar-se como condicionantes em alguns casos. Para a maioria dos sistemas, este método apresenta dois grandes desafios: i) os campos de forças utilizados ainda requerem algum refinamento para melhor poderem representar condições realísticas com menos erros associados e ii) simulações mais longas na ordem dos microssegundos, com sistemas relativamente pequenos, ainda apresentam elevados custos computacionais, podendo demorar até alguns meses a serem concluídas.^{66,67}

A aproximação de Born-Oppenheimer, que interpreta o sistema como um sistema de partículas clássicas, para além de ser uma das vantajosas aproximações neste método por consideravelmente diminuir o peso computacional dos cálculos, é também uma das suas limitações. Esta visão clássica sobre o sistema significa que todos os efeitos

quânticos não serão considerados para o cálculo da energia. A falta da componente quântica não é um fator decisivo na maioria dos casos, mas pode sê-lo no ponto de vista de sistemas dinâmicos, onde a posição dos elétrons deva ser considerada. Impede, por exemplo, que reações que envolvam transferência de elétrons, efeito túnel ou estados eletrônicos não fundamentais sejam simulados por técnicas de MD clássicas.⁶⁷⁻⁶⁹ De modo a ultrapassar esta limitação é possível introduzir a componente quântica e estudar sistemas onde efeitos quânticos são relevantes, processo já implementado em diversas técnicas como *ab initio* MD.⁷⁰

3. Rifampicina

A Rifampicina (RIF), ilustrada na Figura 4, foi inicialmente desenvolvida em 1960 e foi o primeiro derivado da Rifamicina B, produzida pela bactéria *Amycolatopsis rifamycinica*. É um antibiótico bactericida de largo espectro, utilizado maioritariamente para o tratamento da tuberculose.^{71,72}

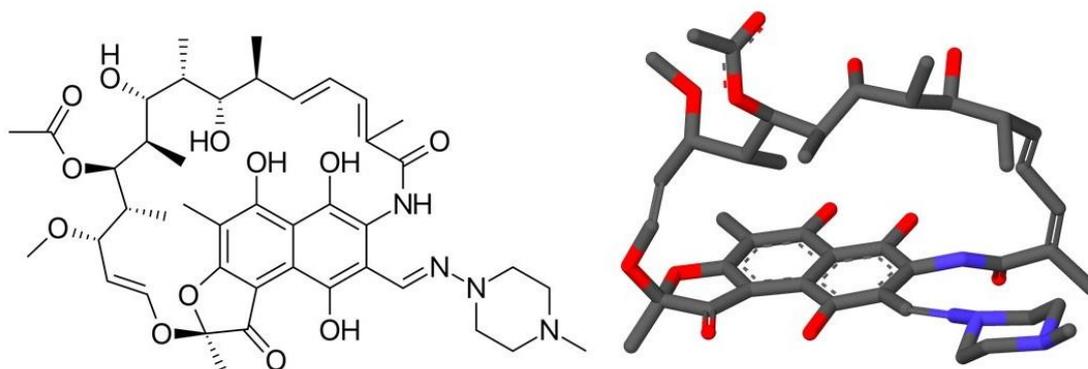


Figura 4. Estrutura química da RIF e respetiva representação tridimensional.

O seu mecanismo de ação centra-se no impedimento do processo de alongação de RNA através da inibição da enzima RNA polimerase das células alvo.⁷³

A RIF é uma molécula estruturalmente complexa, apresenta um tamanho considerável e tem diversos grupos polares, como álcoois e aminas. Ainda assim, contra algumas regras amplamente estabelecidas, consegue permear bicamadas lipídicas através de um mecanismo que não se conhece inteiramente.

Lipinski prevê que moléculas que não cumpram os quatro parâmetros a seguir descritos irão apresentar baixa absorção: menos de 5 grupos doadores de ligações por ponte de hidrogénio, menos de 10 grupos aceitantes de ligações por ponte de hidrogénio, peso molecular inferior a 500 g/mol e LogP menor que 5.⁷⁴ Este é um conjunto de regras que a molécula RIF parcialmente viola, tendo peso molecular, grupos aceitantes e doadores de ligações de hidrogénio para além do estabelecido.⁷⁵ O logP é o parâmetro que está dentro do estabelecido por Lipinski, com o valor de 3.85.⁷⁶

As já mencionadas regras de Lipinski preveem que a RIF tenha associada uma baixa permeação através de membranas lipídicas, contra o que ocorre na prática. Juntamente com outros fármacos, a RIF faz parte de um grupo de *outliers* que estão para além das regras de Lipinski.⁷⁵ É por isso relevante o esclarecimento do mecanismo de permeação da RIF.

4. Objetivo

Tendo em conta a complexidade estrutural e as particularidades da molécula RIF, sejam estruturais ou relacionadas com a sua capacidade de permeação, o objetivo deste estudo recai sobre a caracterização computacional e experimental da interação da RIF com modelos simples de membranas biológicas, para que daí possam ser retiradas características e propriedades que sejam posteriormente passíveis de ser aplicadas à descoberta de novos fármacos, para além das regras de Lipinski.

Foram realizadas simulações de MD para caracterizar ao nível atómico a interação da RIF com uma bicamada lipídica de POPC, assim como o seu perfil energético ao longo da coordenada reacional para a permeação (direção normal ao plano da bicamada). Ao nível experimental, o efeito da RIF em bicamadas lípidicas foi estudado através da monitorização da permeação de 6-carboxifluoresceína (CBF) encapsulado em LUVs.

Capítulo II

Materiais e Métodos

1. Compostos Químicos

Todos os compostos químicos para a preparação e desenvolvimento da componente experimental deste trabalho estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos utilizados e respetivas informações.

Composto	Origem	M / g mol⁻¹	Pureza
Na₂HPO₄	Sigma-Aldrich	141.96	≥ 99.0 %
NaCl	BioXtra	58.44	≥ 99.5 %
NaN₃	Fluka	65.01	≥ 99.5 %
POPC	Avanti	760.08	> 99.0 %
CBF	Sigma-Aldrich	376.32	> 97.0 %
Rifampicina	Sigma-Aldrich	822.94	> 99.7 %
Metanol	Sigma-Aldrich	32.04	99.9 %
Clorofórmio	Sigma-Aldrich	119.38	≥ 99.0 %

2. Preparação de soluções

A componente experimental tem por base a utilização de solução tampão fosfato (Phosphate Buffer Solution, PBS), Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 0,02% (m/v). A solução de PBS foi preparada em água destilada, o pH da solução equilibrado a 7.4 e mantida a 4 °C.

O composto antibiótico Rifampicina foi dissolvido em tampão fosfato para uma concentração de stock de 4 mM.

A 6-carboxifluoresceína (CBF) foi também dissolvida em solução tampão, de modo a perfazer uma concentração final de 1 mM. Foi retirada uma alíquota da solução anterior para determinar a concentração e verificar que não varia em relação à concentração prevista. Para esse fim, a alíquota foi diluída 1000 vezes em PBS e a absorção foi obtida através de um espectrofotómetro UV-Visível Spectronic Unicam UV 500, tendo em conta a absorvidade molar de 83000 cm⁻¹ M⁻¹⁷⁷, de acordo com a equação de Beer-Lambert.

As soluções stock de lípidos foram preparadas através dissolução do composto em pó numa mistura azeotrópica de clorofórmio:metanol 87.4:12.6 (v/v) para a concentração de 66 mM e mantidas a -20°C .

3. Espectroscopia de Fluorescência

A luminescência é a emissão de luz por parte de uma substância e ocorre a partir de estados eletronicamente excitados. É formalmente dividida em duas categorias - fluorescência e fosforescência - dependendo da natureza do estado excitado. Ocorre fluorescência quando o estado excitado é singleto e fosforescência quando o estado excitado é tripleto.

Na fluorescência, a espécie é primeiro excitada, ao absorver um fóton, do seu estado eletrónico fundamental para um dos vários estados vibracionais no estado eletrónico excitado. As colisões com diversas moléculas fazem com que a espécie excitada perca energia vibracional até atingir o estado vibracional de menor energia, ainda no estado eletrónico excitado. A espécie excitada decai para um dos vários níveis vibracionais do estado eletrónico fundamental novamente, emitindo um fóton no processo. Este processo é frequentemente visualizado através de um diagrama de Jablonski, ilustrado na Figura 5.⁷⁸

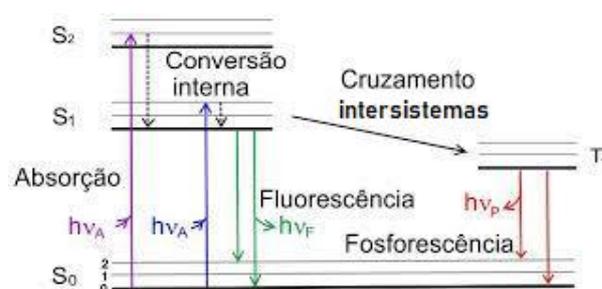


Figura 5. Esquema típico do diagrama de Jablonski (adaptado de ⁷⁸).

Uma característica importante da fluorescência é a alta sensibilidade à sua deteção. Esta característica foi usada em 1877 para demonstrar que os rios Danúbio e Reno estavam conectados por correntes subterrâneas.⁷⁹ Essa conexão foi demonstrada

colocando fluoresceína (Figura 6A) no Danúbio. Cerca de sessenta horas depois, a sua fluorescência verde característica apareceu num pequeno rio que conduzia ao Reno.

Ainda hoje a fluoresceína é utilizada como marcador para localizar indivíduos perdidos no mar. Alguns dos derivados da fluoresceína, como a 6-carboxifluoresceína (CBF) (Figura 6B), são utilizados em contexto bioquímico para, por exemplo, detetar lise de lipossomas.^{78,80} A CBF é também utilizada neste trabalho como marcador fluorescente para medir possíveis efeitos da RIF na integridade de uma bicamada lipídica.

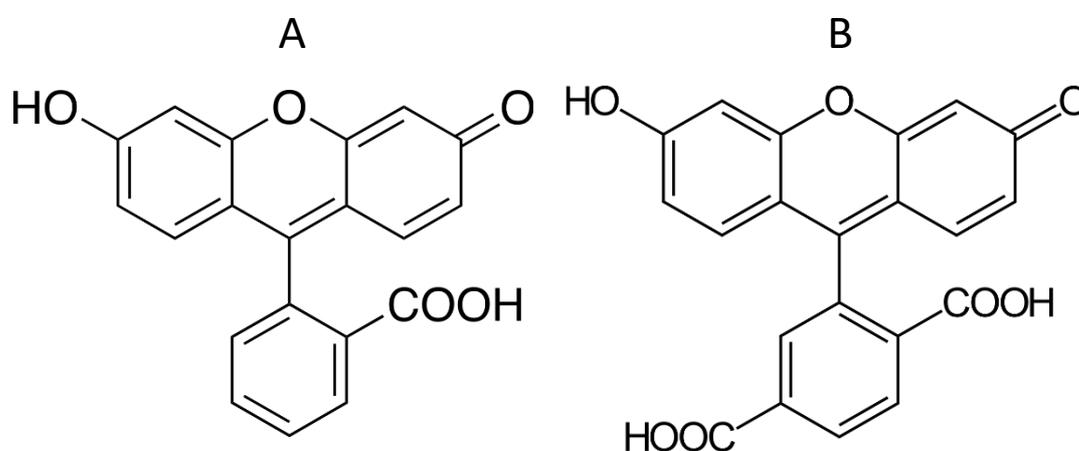


Figura 6. Estrutura química da fluoresceína (A) e 6-carboxifluoresceína (B).

4. Preparação de LUVs por extrusão

O protocolo aqui exposto tem por base o método de extrusão proposto por Samelo et al.⁸¹ Inicia-se com a preparação de uma solução aquosa de POPC em mistura azeotrópica de clorofórmio:metanol preparada anteriormente, retirando o volume necessário para perfazer a concentração final pretendida. Este volume é colocado num tubo de vidro e deixado em repouso por aproximadamente 30 minutos, com mistura ocasional com recurso a *vortex*. Findos os 30 minutos, o tubo é aquecido e o solvente é evaporado sob um fluxo de azoto com agitação constante em *vortex*. O filme obtido é deixado em repouso num exsiccador sob vácuo à temperatura ambiente pelo menos durante 4 horas e não mais que 16 horas.

O filme de POPC é então colocado em banho quente a 40 °C (mínimo de 10 °C acima da temperatura de transição de fase para aumentar a fluidez do lípido e facilitar a sua

hidratação) durante cerca de 5 minutos e é depois hidratado e agitado suavemente com a solução de CBF, previamente aquecida à mesma temperatura que o banho. O tubo com o filme hidratado é deixado no banho por cerca de 30 minutos, ou até o filme ter sido todo suspenso. Durante este período a mistura é agitada ocasionalmente em *vortex*.

Enquanto o filme é suspenso é introduzida uma pequena quantidade de tampão no interior de tubos de plástico (*Falcons*) e procede-se à sua limpeza. Os tubos com o tampão são congelados em azoto líquido, posteriormente descongelados e o tampão no interior é descartado. Este procedimento é repetido por três vezes, sendo necessário para remover ftalatos e outras pequenas moléculas do plástico, para que não contaminem os lipossomas.

Após limpeza, procede-se à transferência da solução de lipossomas (que nesta fase se tratam ainda de vesículas multilamelares) para os tubos previamente limpos. A solução de lipossomas é congelada em azoto líquido e colocada no banho a 40 °C, permitindo o seu descongelamento. A este processo dá-se o nome de *freeze and thaw* e é importante para que na solução final estejam apenas presentes vesículas unilamelares, quebrando vesículas grandes e consequentemente aumentando o volume de solução aquosa entre camadas lipídicas. Estas alterações facilitam a obtenção de vesículas unilamelares quando os MLVs são sujeitos ao processo de extrusão.

O extrusor (Lipex Biomembranes) é preparado com dois filtros de policarbonato com poros de 100 nm (Whatman Nucleopore) e posteriormente é passada pelo extrusor uma pequena quantidade de tampão, de modo a verificar a correta montagem do sistema.

Após o descongelamento completo da solução de lipossomas, esta é agitada e passada pelo extrusor. A solução é depois novamente sujeita ao processo de *freeze and thaw* e posterior extrusão mais duas vezes, sempre com agitação após extrusão. Depois das duas repetições, a solução é passada pelo extrusor mais dez vezes, com agitação entre passagens. No total, a solução de lipossomas é passada pelo extrusor treze vezes, para assegurar que todas as vesículas apresentam um tamanho coerente.

5. Ensaio de permeação

5.1. Cromatografia de exclusão – separação de CBF livre

A solução de lipossomas, que provém do procedimento descrito na secção anterior, para além dos LUVs com a CBF encapsulada no seu interior tem ainda CBF livre no meio aquoso externo. No contexto de estudos de permeação é francamente importante que a análise recaia apenas na permeação do soluto em estudo, na direção pretendida, tendo em conta o gradiente de concentração. Neste caso em particular o soluto é a CBF e a direção de permeação do interior do lipossoma para o meio externo. Assim, há que separar toda a CBF não encapsulada dos lipossomas com CBF encapsulada.

Para este efeito utilizou-se cromatografia de exclusão com colunas HiTrap Desalting 5 ml (GE Healthcare) com fase estacionária G-25 superfine, em que partículas de pequenas dimensões têm maior tempo de retenção na coluna, permitindo a sua separação de partículas maiores.⁸²

Foram colocadas duas colunas Hitrap Desalting 5 ml em série, perfazendo 10 ml no total. As duas colunas são condicionadas com solução tampão fazendo atravessar o volume correspondente a dez vezes o volume total das colunas, ou seja, 100 ml.

Uma vez equilibradas com tampão é adicionado 1 ml da solução de LUVs com CBF às colunas e procede-se à passagem de mais eluente até que toda a amostra seja eluída e posteriormente recolhida. A fração de interesse e que inclui os LUVs com CBF encapsulada, é recolhida assim que a solução que sai da coluna e apresenta coloração esbranquiçada, devida à presença de LUVs.

5.2. Incubação dos LUVs com Rifampicina

Para estudar a interação da Rifampicina com bicamadas lipídicas e consequentes efeitos foram realizados ensaios de permeação de CBF encapsulada previamente na presença de diversas concentrações do antibiótico no meio aquoso.

A solução obtida após a cromatografia descrita anteriormente foi diluída para 16 ml com tampão fosfato e posteriormente dividida em quatro condições experimentais dissintas. A três das quatro condições foi adicionada uma determinada quantidade de RIF para perfazer concentrações específicas:

- Condição A – 0 μM RIF
- Condição B – 12 μM RIF
- Condição C – 24 μM RIF
- Condição D – 40 μM RIF
- Condição E – 80 μM RIF

A condição A tem efeito como controlo, medindo-se apenas a permeação da CBF em condições padrão, na ausência de RIF.

De cada uma das frações foram retiradas doze alíquotas colocadas em banho a 37 °C durante toda a duração do ensaio, retirando uma alíquota de cada condição a cada tempo previamente definido.

5.3. Fracionamento das alíquotas

Concluído o processo de incubação para cada alíquota, é necessária a separação da CBF no meio aquoso - que permeou a membrana lipídica - da CBF que permanece no interior do lipossoma. Para tal é necessário submeter novamente as amostras a um método de separação cromatográfico, semelhante ao exposto na secção V.I., com a exceção do tipo de colunas utilizado.

5.3.1. Otimização do fracionamento

A separação das alíquotas com recurso a colunas cromatográficas foi otimizada de modo que seja possível separar a amostra em duas frações distintas de LUVs e CBF livre, com a finalidade de calcular a quantidade de CBF que permeou durante o período de incubação com o antibiótico. O processo foi otimizado em termos de adição de eluente e velocidade de centrifugação para duas colunas distintas: colunas Zeba Spin Desalting Columns 7K MWCO de 2 ml (Thermo Scientific) e Zeba Spin Desalting Columns 7K MWCO de 0.5 ml (Thermo Scientific). Ambas as colunas têm uma fase estacionária com limite de exclusão de 7 kDa.

Colunas Zeba Spin Desalting 2ml

O protocolo disponibilizado pelo fornecedor para uso com este tipo de colunas estava prescrito para uso com trocas de tampão em estudos com proteínas. Não estava, portanto, de acordo com o objetivo deste trabalho, sendo necessário otimizar o protocolo para o objetivo de separar LUVs de CBF livre.

A primeira iteração na otimização do protocolo consistiu na mudança de volume de amostra e eluente adicionado à coluna, assim com a velocidade a que era feita a centrifugação. O protocolo obtido nesta fase é o seguinte:

- Condicionamento da coluna com 1 ml de tampão fosfato. Centrifugar durante 6 min a 10 *g*. Repetir duas vezes.
- Aplicar 600 µl de amostra na coluna. Centrifugar durante 3 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 1.
- Aplicar 300 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 1.
- Aplicar 300 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 2.
- Aplicar 900 µl de tampão. Centrifugar durante 5 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 3.
- Aplicar 900 µl de tampão. Centrifugar durante 5 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 4.
- Aplicar 900 µl de tampão. Centrifugar durante 5 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 5.
- Aplicar 300 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 6.
- Aplicar 300 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 7.

Com base neste protocolo foi preparada uma solução de LUVs com CBF encapsulada e foi adicionada 5% (v/v) de CBF. Após separação e obtenção de todas as frações de ambas as alíquotas, foram retirados 150 µl de cada fração, adicionado Triton X-100 a uma concentração final de 1% (v/v), e analisada a fluorescência com recurso a um leitor de placas SpectraMax iD5 (Molecular Devices). Através da análise dos valores de

fluorescência da CBF (Ex=460 nm, Em=520 nm) é possível criar o perfil de separação descrito na Figura 7.

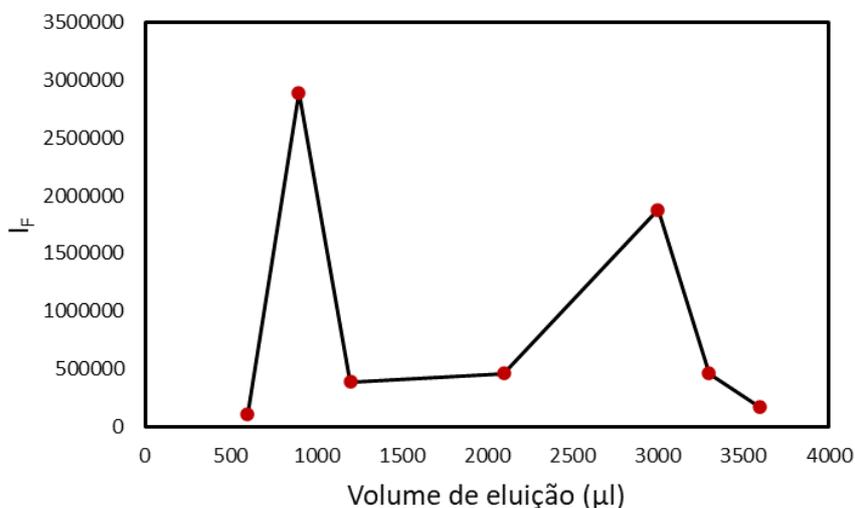


Figura 7. Perfil de separação de amostras com LUVs e 5% CBF livre (v/v). No gráfico estão descritos valores de Intensidade de fluorescência de CBF em função do volume de eluição (μl).

Com este protocolo foi possível a obtenção de um intervalo de eluição entre a passagem de 1200 μl e 2100 μl pela coluna (correspondentes às frações 3 e 4, respetivamente), em que não há saída de LUVs com CBF encapsulado nem CBF livre. No entanto, a repetição deste protocolo de separação não conduzia a resultados fidedignos, uma vez que as colunas não mantinham um comportamento de separação estável entre separações de amostras distintas. Desta forma, este protocolo foi considerado impraticável e uma nova iteração foi realizada como tentativa de obter perfis de separação estáveis e reproduzíveis:

- Condicionamento da coluna com 1 ml de tampão fosfato. Centrifugar durante 6 minutos a 10 g. Repetir duas vezes.
- Aplicar 50 μl de amostra na coluna. Centrifugar durante 1 minutos a 10 g. Recolher para o tubo da Fração 1.
- Aplicar 300 μl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 10 g. Recolher para o tubo da Fração 1.
- Aplicar 600 μl de tampão. Centrifugar durante 3 minutos a 10 g. Recolher para o tubo da Fração 2.

- Aplicar 300 μ l de tampão. Centrifugar durante 2 min a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 3.
- Aplicar 300 μ l de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 4.
- Aplicar 1000 μ l de tampão. Centrifugar durante 6 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 5.
- Aplicar 1000 μ l de tampão. Centrifugar durante 6 minutos a 10 *g*. Recolher para o tubo da Fração 6.

Por forma a assegurar a separação eficiente das amostras foi comparada uma alíquota de uma amostra de LUVs apenas com CBF encapsulada, com uma alíquota de CBF, ambas sujeitas ao processo descrito acima.

Após a realização do procedimento pós-separação já descrito acima é possível criar o perfil de separação descrito na Figura 8A para os LUVs com CBF encapsulada e Figura 8B para a CBF livre.

Na Figura 8A é possível observar dois picos de fluorescência mais intensa, após passagem de 400 μ L e 700 μ L, correspondentes às Frações 1 e 2, respetivamente. Estes máximos de fluorescência são relativos aos LUVs com CBF encapsulada. A CBF, como tem maior tempo de retenção, sai da coluna com a adição de um volume maior de eluente, após a passagem de 1300 μ l e 2300 μ l (frações 5 e 6, respetivamente), como é visível na Figura 8B. Existe entre a saída dos LUVs com CBF encapsulada e a saída de CBF uma fração de intervalo em que não é detetada CBF encapsulada nem CBF livre, enfatizando a eficácia da separação destas colunas.

De facto, a separação aparentava ser eficaz nas condições da segunda iteração do protocolo, mas quando analisadas todas as amostras do estudo de permeação as colunas apresentavam comportamentos díspares, dando origem a frações distintas daquelas obtidas do processo de otimização. A variação na capacidade de separação das colunas tem por base o facto de que as suas características variaram ao longo do ensaio. Após centrifugações sucessivas, a compactação da resina aumentava, dando origem a separações distintas para cada coluna. É possível observar essa variação quando, por exemplo, se compara o máximo de deteção de CBF livre entre os dois protocolos: na primeira iteração ocorre após a passagem de cerca de 3000 μ l, enquanto na segunda

ocorre após a passagem de apenas 1300 μ l. Este método, com estas colunas foi, por estes motivos, descartado como método de separação de LUVs com CBF encapsulada de CBF livre.

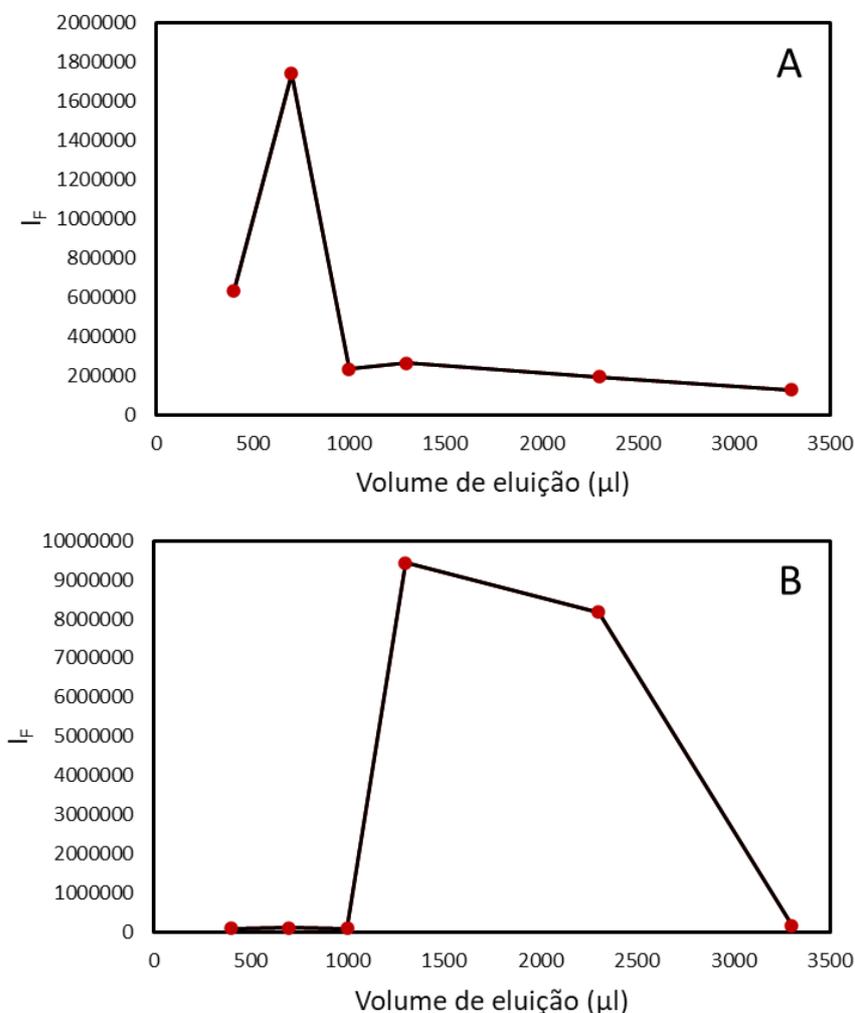


Figura 8. Perfil de Separação de amostras com LUVs com CBF encapsulado (A) e CBF livre (B). No gráfico estão descritos valores de Intensidade de fluorescência de CBF em função do volume de eluição (μ l).

Colunas Zeba Spin Desalting 0.5 ml

Sendo que o processo de separação com as colunas de 2 ml não conduz a resultados fidedignos, foi necessário desenvolver outro método de separação. Para este efeito, foram utilizadas as colunas Zeba Spin Desalting 0,5 ml, cujo protocolo de separação também foi otimizado de forma a servir o objetivo deste trabalho. O protocolo otimizado é o seguinte:

- Condicionamento da coluna com 120 μ l de tampão fosfato. Centrifugar durante 2 minutos a 1500 g. Repetir duas vezes.

- Aplicar 120 µl de amostra na coluna. Centrifugar durante 2 minutos a 1500 g. Recolher para o tudo da Fração 1.
- Aplicar 70 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 1500 g. Recolher para o tubo da Fração 2.
- Aplicar 200 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 1500 g. Recolher para o tubo da Fração 3.
- Aplicar 200 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 1500 g. Recolher para o tubo da Fração 4.
- Aplicar 200 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 1500 g. Recolher para o tubo da Fração 5.
- Aplicar 200 µl de tampão. Centrifugar durante 2 minutos a 1500 g. Recolher para o tubo da Fração 6.

De forma a obter um perfil de separação fidedigno, foi usado uma solução com uma mistura de LUVs com CBF encapsulada e CBF livre. A aplicação desta solução na coluna e consequente separação conduziu ao perfil de separação da Figura 9.

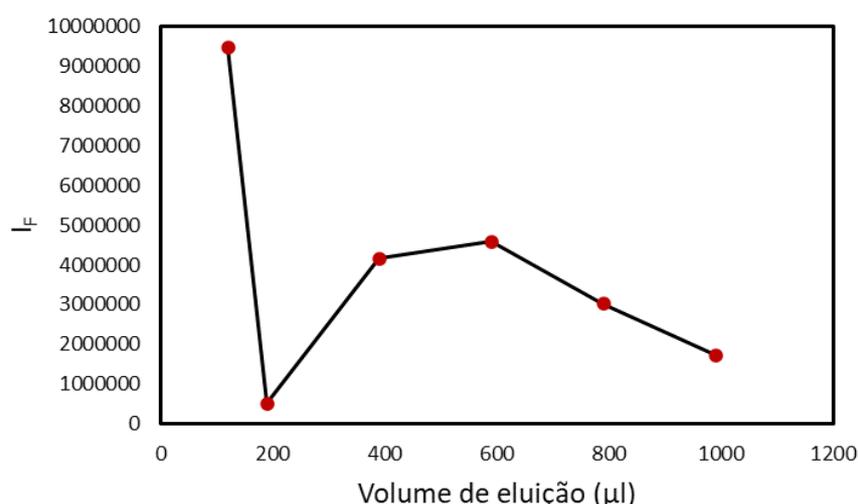


Figura 9. Perfil de Separação de uma amostra de LUVs com CBF encapsulada e CBF livre. No gráfico estão descritos valores de Intensidade de fluorescência de CBF em função do volume de eluição (µl).

A análise do perfil de separação demonstra que existem duas zonas distintas, a primeira associada à fração 1, na qual estão incluídos os LUVs com CBF encapsulada, a segunda associada às frações 3, 4, 5 e 6 onde está incluída a CBF livre. Existem entre

estas duas zonas a fração 2, uma fração de intervalo que não contém CBF, quer encapsulada quer livre.

Este perfil, à semelhança do observado na Figura 8 para as colunas de 2 ml é o ideal para a separação de CBF livre dos LUVS com CBF encapsulada. Contrariamente ao ocorrido com as colunas de 2 ml, as amostras separadas com estas colunas e com o protocolo aqui descrito conduziram a resultados concordantes entre si, afirmando o comportamento idêntico de todas as colunas em todas as utilizações. Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos através de cromatografia de exclusão com colunas Zeba Spin Desalting 0.5 ml.

A avaliação da fluorescência da CBF encapsulada foi feita após a adição de Triton X-100 a uma concentração final de 1% (v/v), suficiente para que os LUVs sejam desintegrados e não ocorra perda de sinal da CBF por extinção de fluorescência devido à sua elevada concentração local quando encapsulada nos LUVs.

6. Dinâmica Molecular

Foram feitas simulações de dinâmica molecular para a molecular de Rifampicina em dois estados de ionização, zwitterião e anião, ilustrados na Figura 10.

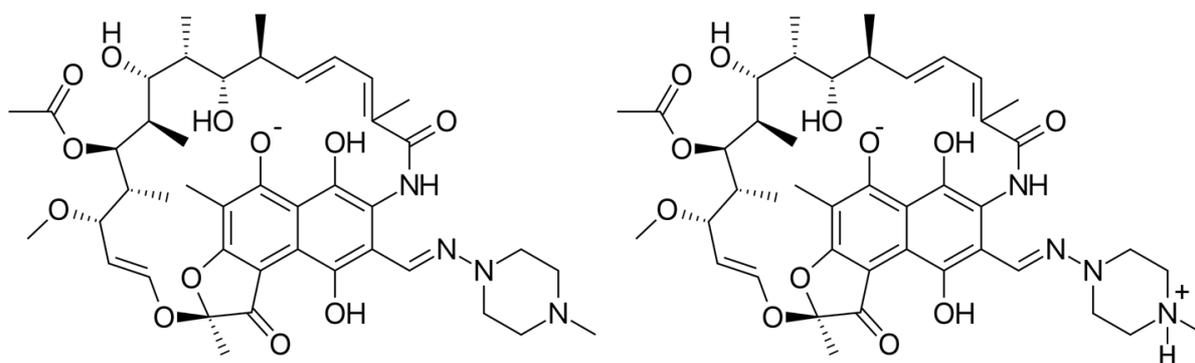


Figura 10. Estrutura química da forma aniônica da RIF (esquerda) e da forma zwitteriônica (direita).

A topologia para ambas formas iónicas foi obtida através da plataforma ATB⁵⁹ para o campo de forças GROMOS 54A7.⁸³ Os parâmetros de cargas parciais foram obtidos por métodos de mecânica quântica *ab initio* usando o software Gamess-US.⁸⁴ O modelo de água SPC foi utilizado em todas as simulações.⁸⁵ As bicamadas de POPC foram geradas a partir da plataforma CHARMM-GUI.⁸⁶ As simulações foram executadas sob um tempo de integração de 2 fs. Para todos os sistemas contactos desfavoráveis foram

previamente removidos por minimização de energia pelo método de *steepest descent*. A temperatura foi estabilizada através de equilíbrio com *ensemble* isotérmico-isocórico e a pressão com *ensemble* isotérmico-isobárico. Para ambos os processos de equilíbrio foi utilizado 1 fs como passo de integração, durante 100 ps. O controlo de temperatura foi feito para o solvente e iões, POPC e RIF. Todas as simulações foram feitas sob constante número de partículas, pressão (1 bar) e temperatura (298 K) em condições de fronteira periódica. O controlo de pressão e temperatura foi mantido com os algoritmos Nosé-Hoover⁸⁷ e Parrinello-Rahman⁸⁸, respetivamente, com constantes de acoplamento de 0.5 ps e 2.0 ps, respetivamente. Os comprimentos de todas as ligações foram constrangidos aos valores de referência através do algoritmo LINCS⁸⁹. Interações de Van der Waals e de Coulomb de curto alcance foram ambas consideradas com *cut-off* de 1 nm, enquanto que para interações eletrostáticas de longo alcance foi aplicado o método *Particle Mesh Ewald* (PME)⁹⁰.

6.1. Simulações unrestrained

As simulações *unrestrained* foram executadas no software GROMACS versão 2019.4, num sistema de 200 moléculas de POPC hidratado com 50 moléculas de água por lípido. As análises destas simulações foram realizadas no software GROMACS 2019.4 e as ferramentas disponibilizadas pelo mesmo software.

Foram realizadas duas simulações distintas para cada uma das espécies iónicas, uma em que foram colocadas duas moléculas de RIF em cada lado da bicamada lipídica, no meio aquoso (direção *water to center*, WC), outra em que duas moléculas de RIF foram puxadas (método *pulling*) para o centro da bicamada a uma velocidade de 0,0001 nm/ps e sob uma força de potencial harmónico de 500 kJ mol⁻¹ nm⁻². Após o *pulling* o potencial harmónico que atuava sobre as moléculas foi removido e estas passaram a movimentar-se livremente, em direção à interface com o meio aquoso (direção *center to water*, CW). Os sistemas *unrestrained* WC foram simulados até 2 µs e o *unrestrained* CW até 1 µs.

6.2. Umbrella sampling e cálculo de PMF

A energia livre do sistema (ΔG), em função da coordenada reacional z (definida como a distância entre os centros de massa da rifampicina e da bicamada de POPC) é derivada do Potencial de Força Médio (*Potential of Mean Force*, PMF), extraído de uma série de simulações de *umbrella sampling*. Simula-se uma série de corridas de dinâmica molecular, cada uma correspondendo a um local em que a molécula de interesse é harmonicamente restringida a distâncias fixas do centro da bicamada, com intervalos de 0.1 nm até a uma distância máxima de 4 nm. Esta restrição permite que a molécula faça uma amostragem do espaço configuracional para o cálculo de forças nesse intervalo.⁴⁶ Para este caso, essas configurações foram obtidas a partir do *pulling* de uma molécula de RIF para o centro da bicamada, processo após o qual foi adicionada outra molécula no meio aquoso seguido de *pulling* de ambas as moléculas na mesma direção, de modo a que RIF agora inserida na água percorra em direção ao centro da bicamada e a RIF já inserida no centro da bicamada em direção ao meio aquoso. Foram depois extraídas configurações do sistema a cada 0.1 nm

Cada uma destas configurações dá origem a uma janela de amostragem, simulada independentemente durante 120 ns. As simulações de *umbrella sampling* foram executadas no software GROMACS versão 2019.3 num sistema de 200 moléculas de POPC hidratado com 80 moléculas de água por lípido. As análises foram feitas na totalidade na versão 2019.4 do software GROMACS com recurso à ferramenta de *Weighted Histogram Analysis Method* (WHAM).⁹¹

Capítulo III

Resultados e Discussão

1. Dinâmica Molecular

1.1. Posições Atômicas

Na Figura 11 estão representados grupos de referência para a análise da orientação e interações da RIF ao longo desta secção.

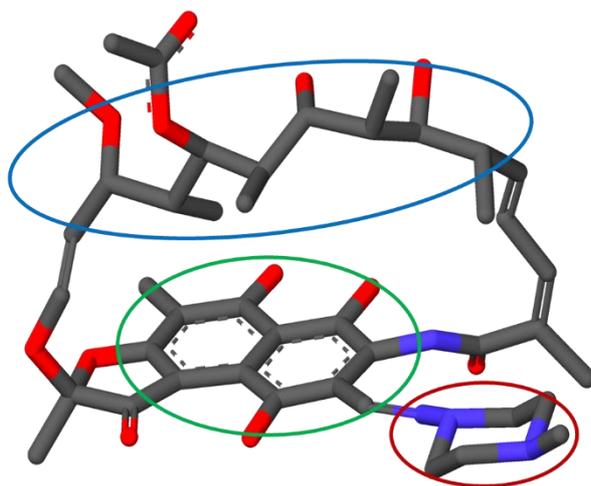


Figura 11. Estrutura da RIF com grupos de referência destacados. Representado a vermelho está a piperazina, a verde os anéis aromáticos e a azul a cadeia.

A primeira análise e a mais simples de interpretar é a variação do centro de massa (Center of Mass, COM) das moléculas inseridas no sistema em função do tempo de simulação, exibida nas Figuras 12A-D.

A partir da variação é possível afirmar que os COM de todas as moléculas de RIF, em todas as formas de ionização caracterizadas, tendem a aproximar-se da interface da bicamada. Este comportamento acontece tanto quando a RIF é colocada inicialmente no meio aquoso (gráficos A e C) como quando o é no interior da bicamada lipídica, por recurso a método de *pulling* (gráficos B e D). Observam-se, no entanto, pequenas diferenças entre as duas espécies iónicas e entre as localizações iniciais do COM da RIF. Por vezes a localização transversal do COM indica que a RIF está menos internalizada que o fósforo do POPC, como é o caso do zwitterião inicialmente colocado no meio aquoso (Zw-WC), enquanto que no sistema em que o anião partiu do centro da bicamada (An-CW), o COM indica que se mantém em posições mais internalizadas. A variabilidade pode também ser observado dentro do mesmo sistema, quando moléculas que estão sujeitas às mesmas condições apresentam comportamento distinto (Figura 12A). De facto, a posição do COM pode ser idêntica entre moléculas do mesmo sistema,

mas a posição de cada uma individualmente é distinta, como é ilustrado nos *snapshots* retirados no final de cada uma das simulações, apresentados na Figura 13.

As configurações adotadas no final da simulação, aparentam indicar que algumas das moléculas apresentam comportamentos semelhantes. O grupo piperazina do anião proveniente do meio aquoso (An-WC, gráfico B) e do zwitterião proveniente do centro da bicamada (Zw-CW, gráfico C) estão alinhados com o centro da bicamada, bem internalizados para lá dos grupos fosfato do POPC. Comparando a origem das moléculas, sistemas em que as moléculas tenham sido inicialmente colocadas no meio aquoso, apresentam uma posição geralmente mais externa à bicamada, quando comparado com sistemas em que as moléculas partem do centro da membrana. Associado à análise da variação dos COM e como forma de compreender detalhes quantitativos relativos à forma como as moléculas se posicionam em relação a alguns grupos referência da bicamada, é calculado o perfil de densidade. Neste cálculo são descartados os primeiros 500 ns de cada simulação para efeitos de equilíbrio, para os diferentes componentes do sistema, como descrito na Figura 14.

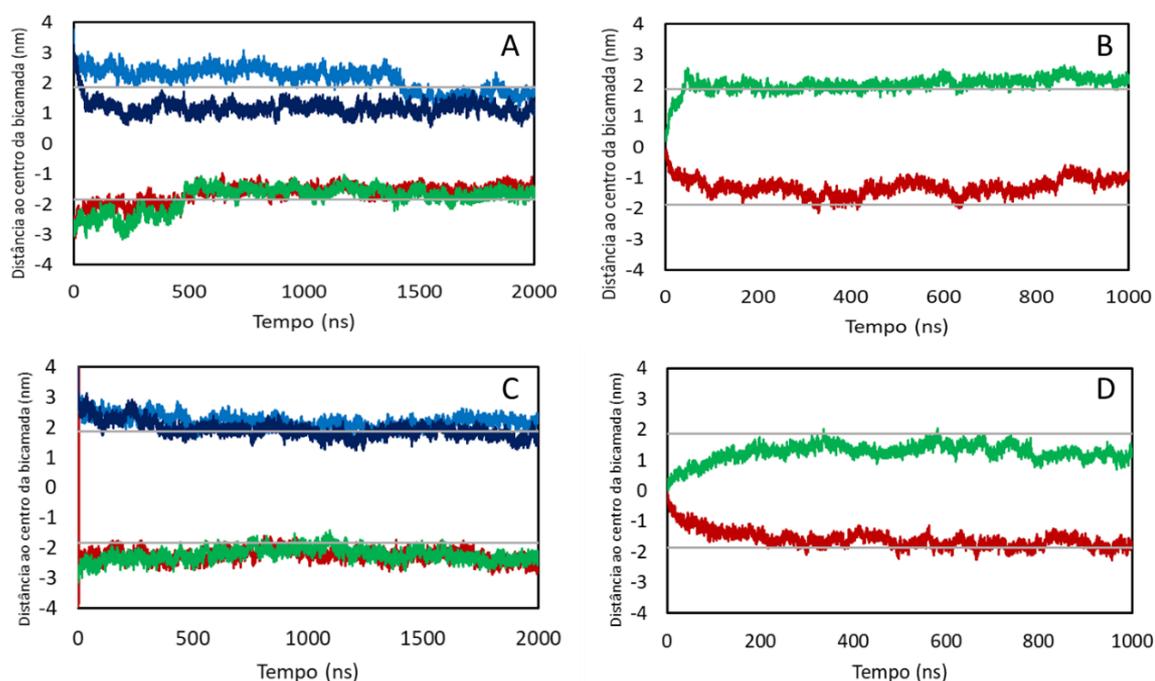


Figura 12. Posição transversal do centro de massa das moléculas de RIF em função do tempo de simulação. Para cada simulação, as diferentes curvas dizem respeito a moléculas distintas. As linhas cinzentas representam as posições médias dos átomos de fósforo em cada uma das monocamadas. A e B dizem respeito à espécie aniônica, C e D à espécie zwitteriônica. A e C dizem respeito a simulações para o caso WC, B e D para o caso CW.

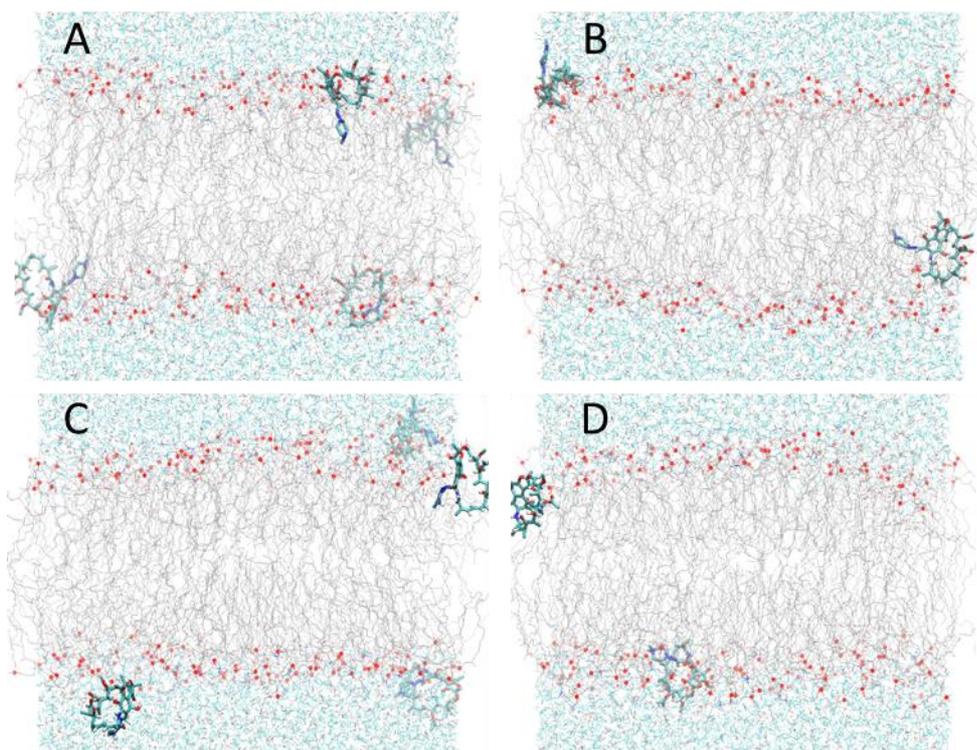


Figura 13. *Snapshots* finais das simulações *unrestrained* da espécie aniônica (A e B) e da espécie zwitteriônica (C e D). A e C são *snapshots* para o caso CW, B e D para o caso WC. As moléculas de RIF estão representadas com linhas mais grossas, a água a ciano, as caudas do POPC a cinza e os pontos vermelhos representam átomos de fósforo.

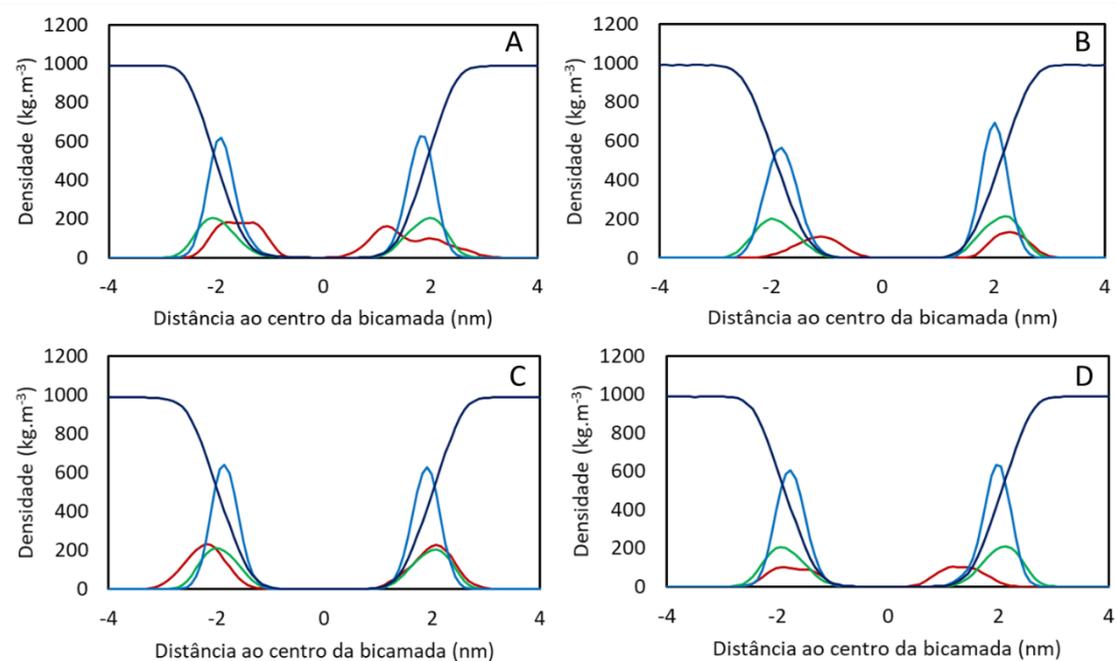


Figura 14. Perfis de densidade da espécie aniônica (A e B) e da espécie zwitteriônica (C e D). A e C são relativos ao caso CW, C e D para o caso WC. A vermelho está representada a densidade das moléculas de RIF, a azul escuro da água, a azul claro e a verde o do fosfato e do azoto do POPC, respetivamente. Para efeitos de visualização a densidade das moléculas de RIF foi multiplicada por um fator de 5. Os valores apresentados têm em conta o descarte dos 500 ns iniciais.

Os perfis de densidade confirmam a análise da variação dos COM e dos *snapshots*. A RIF tende a localizar-se na interface lípido/água, por vezes internalizando para lá da zona do grupo fosfato do POPC, evidente para o caso An-WC (Figura 13A) e o Zw-CW (Figura 13D).

O perfil de densidade é útil para sondar as zonas preferenciais de localização global das moléculas. Para investigar a configuração que a molécula tende a adquirir, as informações dadas pelos perfis de densidade não são suficientes. Para isso foram considerados dois átomos, N2 e N6, ambos constituintes da piperazina, e C12, um dos carbonos que inicia a cadeia (Figura 15). Foi analisada a variação temporal da posição transversal *z* destes átomos, e da posição relativa ao átomo N2 em função da internalização do grupo piperazina. Esta última avaliada pela distância do N2 ao centro da bicamada. Esta informação está apresentada na Figura 16 para todos os sistemas.

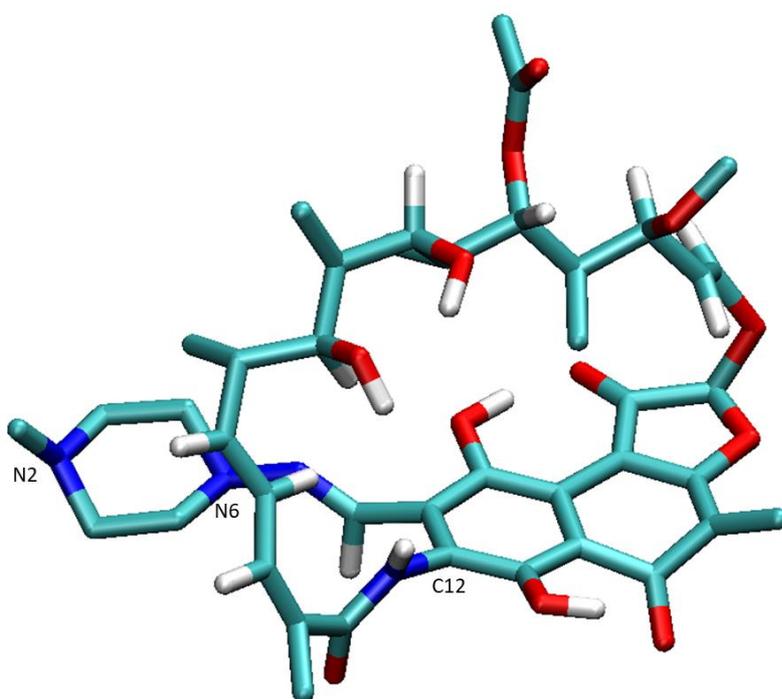


Figura 15. Estrutura da RIF com identificação de átomos de referência.

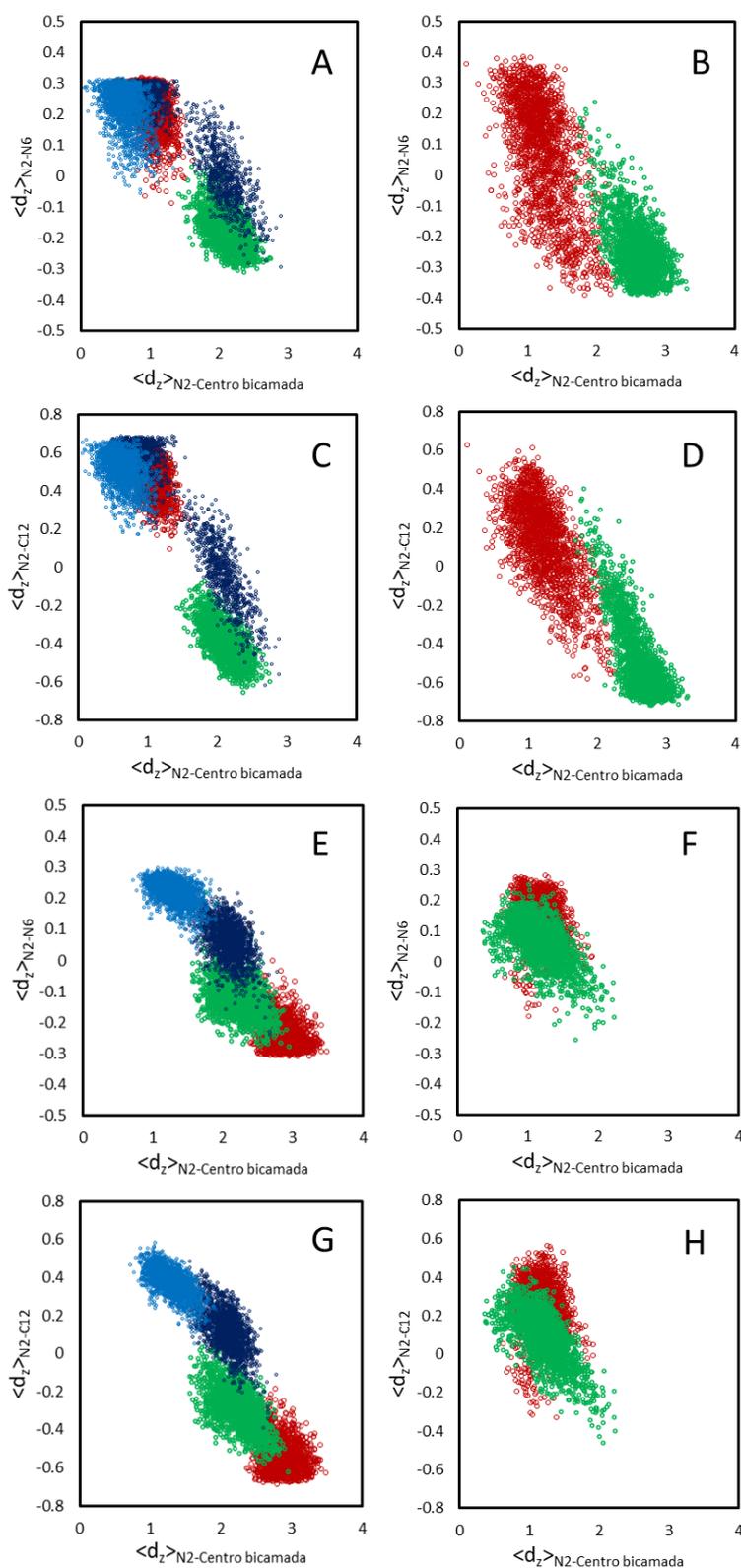


Figura 16. Variação da distância transversal entre átomos de referência em função da distância de N2 ao centro da bicamada. A-D retratam a distribuição do anião, E-H do zwitterião. A coluna da esquerda diz respeito às simulações WC e a esquerda às CW. As cores representam as diferentes moléculas, sendo vermelho, verde, azul-escuro e azul claro associadas a molécula número 1, 2 3, 4, respectivamente. Os valores apresentados têm em conta toda a duração da simulação.

A análise mais específica da orientação das moléculas de RIF, mais especificamente da piperazina, revela uma tendência difundida por todos os sistemas, tanto quando considerada a diferença da posição transversal $\langle z \rangle$ do N2-N6 como de N2-C12. Com a diminuição da distância do átomo N2 ao centro da bicamada, consequência direta da internalização da piperazina, existe uma clara propensão para este grupo se alinhar com a normal da bicamada (correspondendo a um aumento da distância transversal N2-N6 e N2-C12). É comum observar-se dentro do mesmo sistema graus de internalização distintos entre as várias moléculas, por vezes sem sobreposição entre si. Esta variabilidade nos resultados pode estar associada a uma falta de mobilidade rotacional da molécula.

Moléculas menos internalizadas e, por isso, com um $\langle d_z \rangle_{\text{N2-Centro bicamada}}$ maior, apresentam $\langle d_z \rangle$ menores para ambos os eixos N2-N6 e N2-C12 (indicando que a piperazina se encontra perpendicular ao eixo z) podendo mesmo apresentar valores negativos (indicando uma orientação anti-paralela em relação à normal da membrana, ou seja que a piperazina está numa posição mais externa que a cadeia da RIF). Com a diminuição da diferença de $\langle z \rangle$ entre estes grupos de referência, a tendência é o aumento de $\langle d_z \rangle_{\text{N2-N6}}$ e $\langle d_z \rangle_{\text{N2-C12}}$, indicando uma tendência para alinhamento paralelo entre a piperazina eo eixo normal à bicamada. De uma forma geral, este comportamento é observado para todas as moléculas em todas as condições estudadas, embora para cada molécula só se verifique uma pequena região do espaço possível de localização e orientação do grupo piperazina.

1.2. Funções de Distribuição Radial

Uma Função de Distribuição Radial (*Radial Distribution Function*, RDF) define a probabilidade relativa $g(r)$ de encontrar uma partícula em função da sua distância r a outra partícula de referência. É particularmente útil para determinar interações específicas entre partículas.

Na Figura 17 estão descritas as RDF para o átomo de fósforo e azoto do POPC em torno do grupo piperazina da RIF.

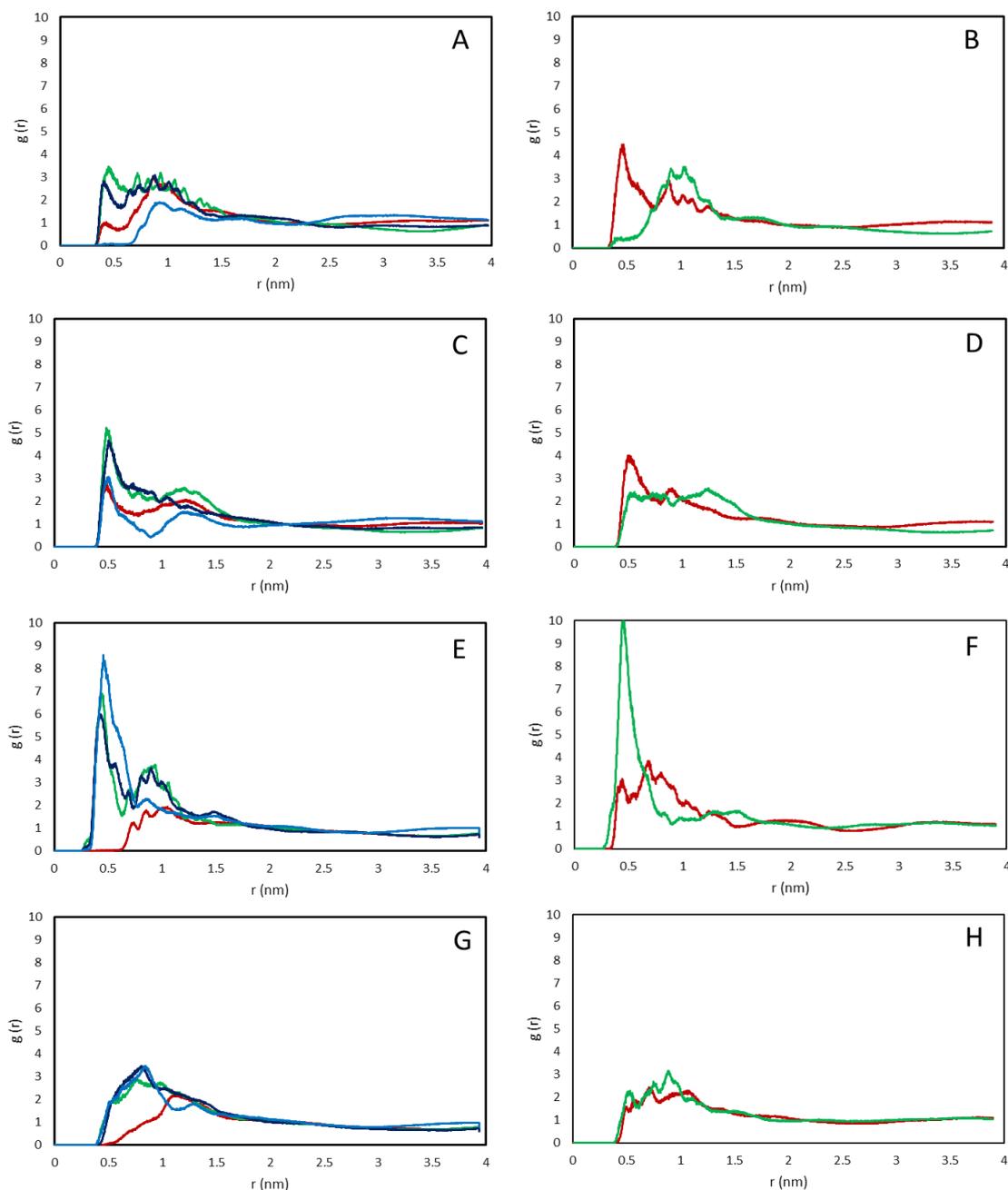


Figura 17. RDF do grupo piperazina do anião (A-D) e do zwitterião (E-H) em torno do átomo de fósforo do POPC (A e B, E e F) e me torno do azoto (C e D, G e H). A coluna da esquerda diz respeito às simulações WC e a esquerda às CW. As cores representam as diferentes moléculas, sendo vermelho, verde, azul-escuro e azul claro associadas a molécula número 1, 2 3, 4, respetivamente. Os valores apresentados têm em conta o descarte dos 500 ns iniciais.

A partir dos RDF é possível desenvolver várias conclusões. Comparando a interação das várias moléculas de RIF com o fosfato do POPC (gráficos A, B, E e F), observa-se que apesar de existir alguma variabilidade entre as moléculas de cada condição, a interação é mais forte para o caso da piperazina da espécie zwitteriônica (E e F). Este resultado era esperado pois na espécie zwitteriônica a piperazina está protonada no azoto N6 apresentando uma carga positiva que interage

electrostaticamente com a carga negativa do grupo fosfato. Para além disso devido à protonação do azoto da piperazina pode estabelecer ligações de hidrogénio com os oxigénios do fosfato. Este efeito é generalizado para todas as moléculas da espécie zwitteriónica, à exceção de moléculas mais internalizadas, como é o caso da molécula número 1 da espécie zwitteriónica (Figura 17E e F).

O perfil de interação da espécie aniónica é semelhante ao da espécie zwitteriónica, apenas com menor amplitude e menor definição. De facto, o perfil de interação da piperazina da forma aniónica torna-se inclusivamente superior e mais bem definido em interações com o azoto do POPC, quando comparado com o zwitterião, sugerindo maior grau de interação entre estes dois grupos. Esta diferença deve-se à protonação da piperazina do zwitterião, que torna a interação com o fosfato do POPC desfavorável, sendo o fosfato um grupo com carga negativa.

Transversal a todos os sistemas é também a interação entre os anéis aromáticos e os átomos de fósforo e azoto do POPC, mais pronunciada para a espécie aniónica, onde a interação é mais bem definida para distâncias menores (ilustrado na Figura 18 para os sistemas WC). Este perfil sugere uma interação eletrostática entre os anéis aromáticos da RIF e os átomos de fósforo e azoto do lípido.

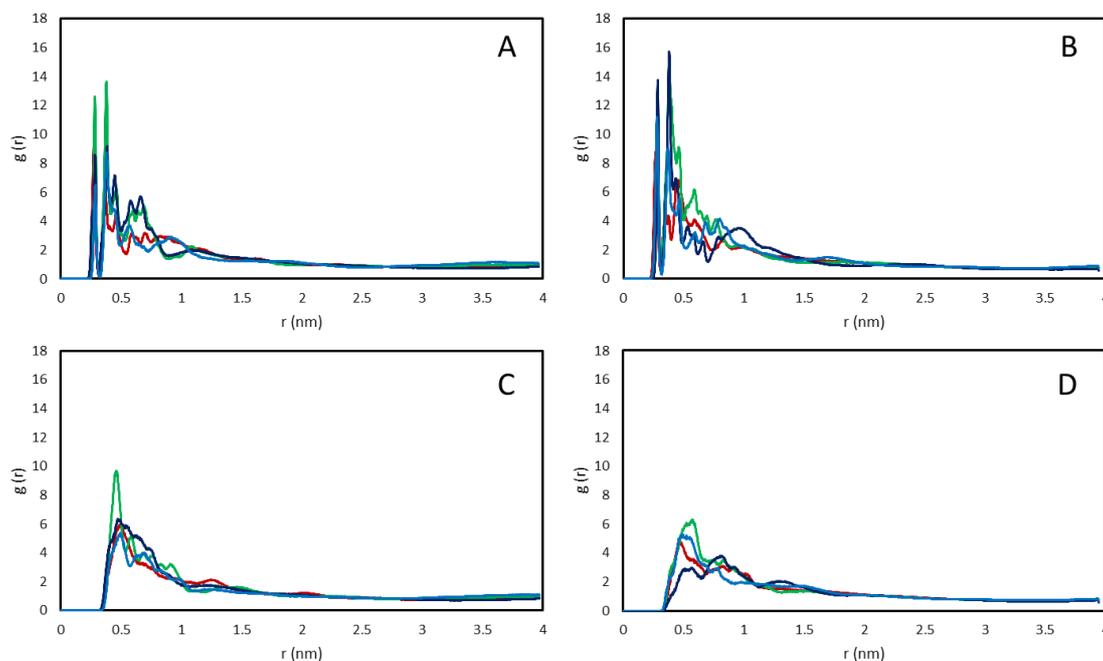


Figura 18. RDF dos anéis aromáticos do anião (A, B) e do zwitterião (C, D) em torno do fósforo (A, C) e do azoto (B, D) do POPC. As cores representam as moléculas inseridas no sistema, sendo vermelho, verde, azul-escuro e azul claro associadas a molécula número 1, 2, 3, 4, respetivamente. Os dados apresentados dizem respeito ao sistema WC. Os valores apresentados têm em conta o descarte dos 500 ns iniciais.

1.3. Ligações de Hidrogénio

Ambas as formas iónicas da RIF têm diversos grupos capazes de participar em ligações por ponte de hidrogénio. A diferença entre as duas espécies iónicas está na piperazina, que está protonada na espécie zwitteriónica e por isso capaz de estabelecer este tipo de ligações como dadora. Em dinâmica molecular as ligações de hidrogénio são facilmente monitorizadas, sendo considerado um grupo de três átomos dador-H-aceitante cada vez que a distância entre dador e aceitante seja menor que 0,35 nm e o ângulo H-dador-aceitante seja menor que 30°. Para a análise incluída nesta secção foram considerados diversos átomos, estando os mais relevantes e aqui mencionados identificados na Figura 19.

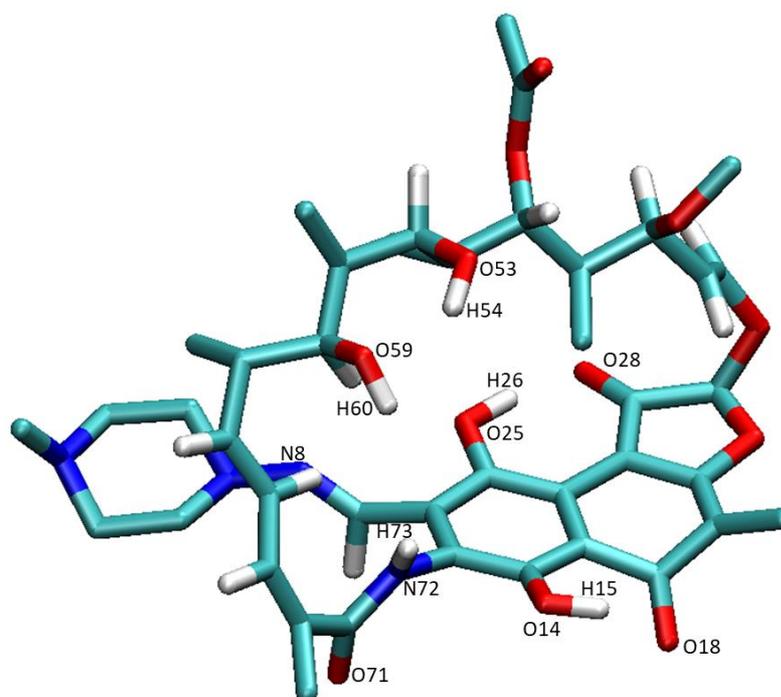


Figura 19. Estrutura da RIF com a identificação de átomos de referência para estabelecimento de ligações de hidrogénio.

Na Figura 20 estão descritos os números médios de ligações de hidrogénio entre grupos dadores e aceitantes entre a mesma molécula de RIF (intramoleculares) e entre a água e grupos aceitantes das diferentes moléculas de RIF.

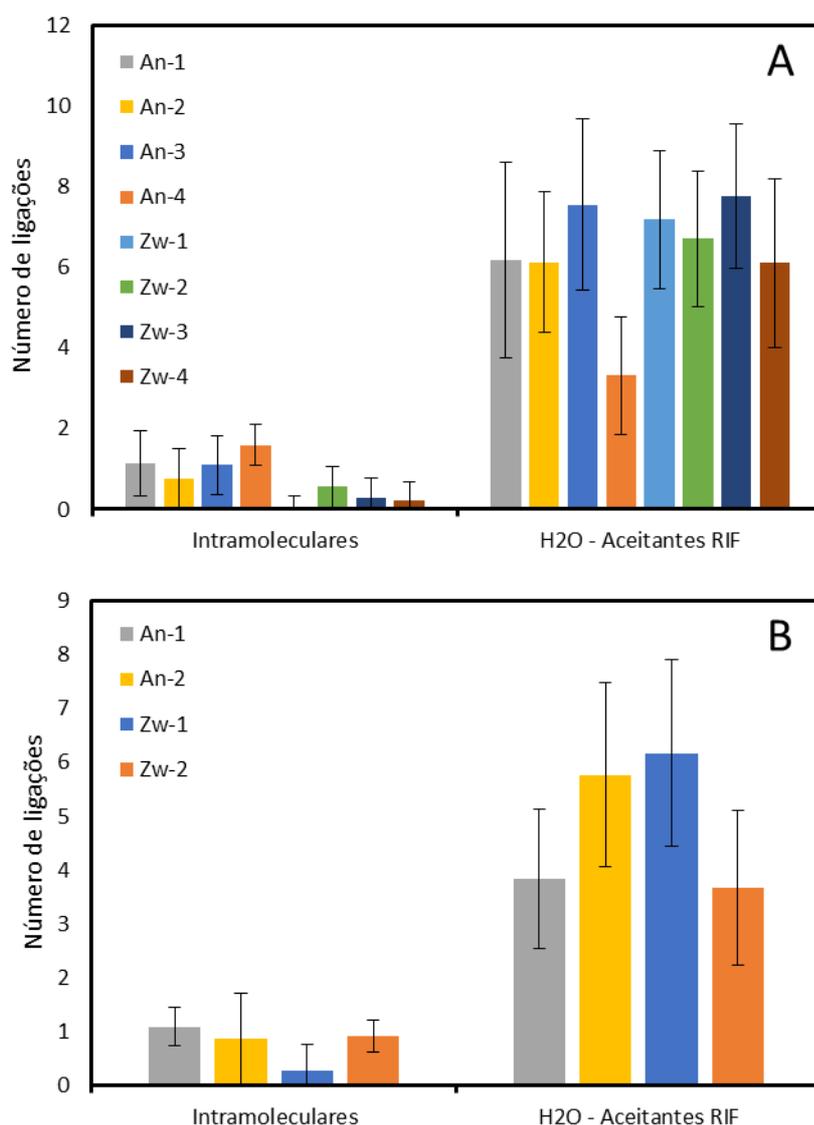


Figura 20. Número médio de ligações de hidrogénio intramoleculares da RIF e entre a água e grupos aceitantes da RIF nas simulações WC (A) e CW (B). As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

O nível de interação intramolecular é distinto entre espécies iónicas, com o anião a formar constantemente cerca de uma ligação de hidrogénio intramolecular, enquanto o seu contraposto zwitteriónico apresenta valores médios mais baixos para toda a simulação, indicando menos ligações deste tipo.

É bastante comum verificar a interação entre os átomos O25/H26/O18, N72/H73/N8 e O14/H15/O18, todos eles associados ao fecho de anéis de seis membros. Para além da formação de anéis de 6 membros existe ainda a possibilidade do fecho de um anel de sete membros, através dos átomos O25/H26/O28. Tendo em conta a

estrutura tridimensional da RIF, estes dois tipos de anéis aparentam ser bastante prováveis, estando os intervenientes estruturalmente próximos, sem que seja necessária uma elevada mudança de conformação. Esta suposição torna-se menos presumível quando se verifica a existência de ligações de hidrogénio entre átomos distantes, como os átomos O59/H60/O71, um grupo onde o dador e o aceitante estão estruturalmente distantes e onde, à partida, não se ponderava que houvesse a possibilidade de formação deste tipo de interações. Existe também a formação de uma outra estrutura pouco intuitiva, um anel de oito membros envolvendo os átomos O14/H15/O71.

Face a todos estas interações e contrariamente ao que se poderia inicialmente calcular, a molécula de RIF, mais consideravelmente para o anião, estabelece diversas interações que implicam uma mudança de conformação aparentemente não imediata, sendo então a molécula de RIF provida de alguma flexibilidade estrutural de modo a acomodar tais conformações. A consequente alteração necessária para acomodar estas duas interações está ilustrada na Figura 21, onde é evidente a mudança de configuração e consequente direção dos átomos envolventes de modo a acomodarem a interação.

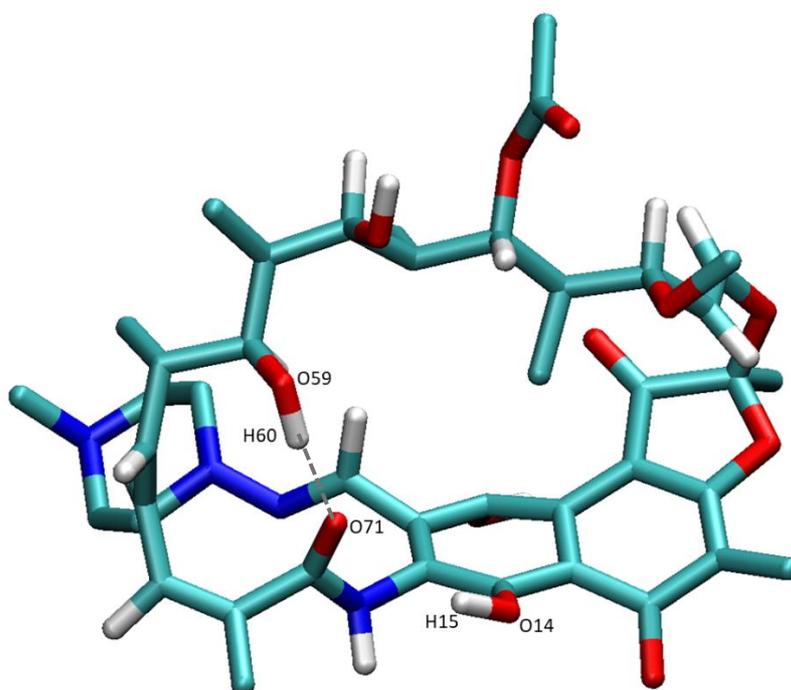
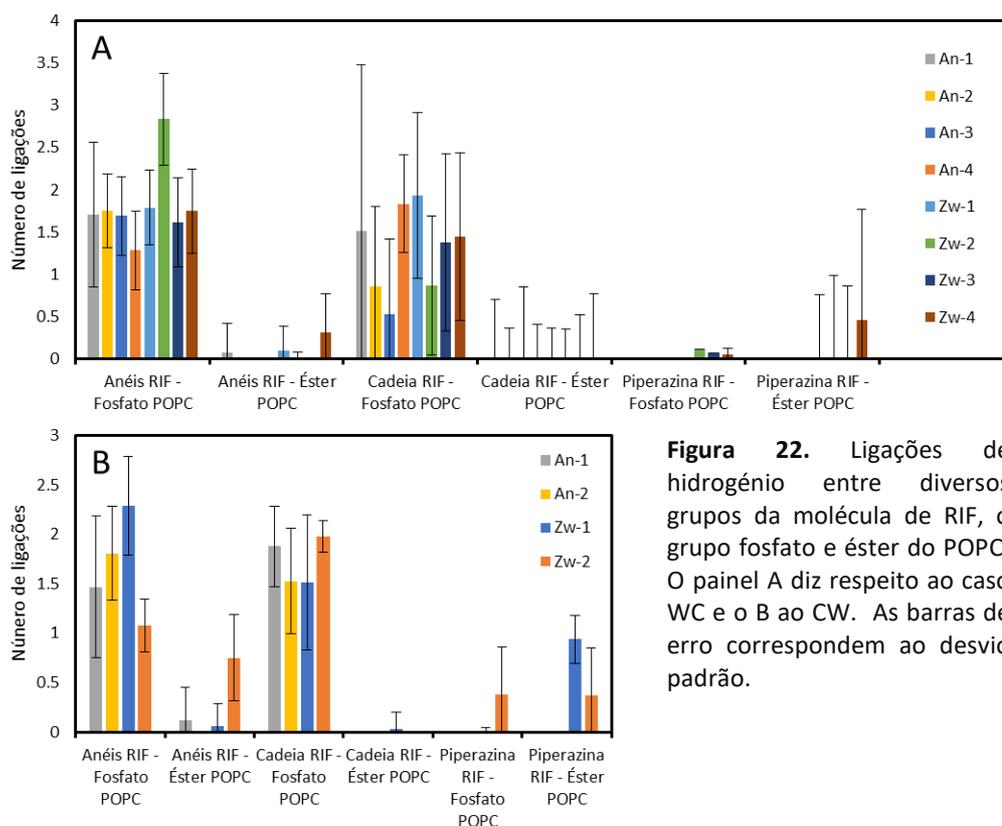


Figura 21. Estrutura da RIF com conformação adequada para a ocorrência de interações de hidrogénio (linha tracejado) entre os átomos identificados.

Relativamente às ligações de hidrogénio entre a água e os grupos aceitantes da RIF é clara a distinção entre moléculas mais internalizadas e menos internalizadas. Moléculas com maior nível de internalização, como é o caso das moléculas número 4 do sistema An-WC ou Zw-WC, têm associados a elas menor número de ligações de hidrogénio com a água, o que seria expectável tendo em conta a baixa concentração de água na região interna da bicamada.

Na Figura 22 estão indicados os valores relativos à formação de ligações de hidrogénio entre diversos grupos da molécula de RIF, o grupo fosfato e o éster do POPC.



Em consonância com os perfis de interação dados pelos RDF, ambas as espécies iónicas conservam uma interação específica entre os anéis aromáticos e o grupo fosfato do POPC, transversal para todos os sistemas e todas as moléculas, mais ou menos internalizadas. Esta interação, ainda que com menor intensidade ao longo de todos os sistemas, também é visível entre a cadeia da RIF e o fosfato do POPC.

Sendo o zwitterião protonado no azoto, este pode estabelecer ligações de hidrogénio com átomos aceitantes. No entanto, durante o período de simulação, para os dois sistemas, esta espécie não estabelece ligações de hidrogénio significativas com nenhum dos grupos do lípido, sugerindo que o perfil de interação bastante particular

observado nos RDF não tem contribuições por ligações de hidrogénio, mas sim por interações electrostáticas, sendo, ainda assim, bastante mais pronunciado para a espécie zwitteriónica que para a aniónica. Na origem da fraca interação poderão estar impedimentos estereoquímicos - tratando-se de uma amina terciária protonada, a aproximação de um grupo aceitante, com orientação favorável, é desfavorecida.

1.4. Potenciais de Força Média

O cálculo de PMF para este sistema implicou a realização de quarenta e uma simulações de *sampling* independentes. Na Figura 23 estão ilustrados *snapshots* representativos da configuração inicial do sistema pós-pulling e na Figura 24, configurações finais pós-*sampling*, em que é possível observar o percurso transversal das moléculas tanto do meio aquoso para o centro da bicamada (sentido WC) como do centro da bicamada para o meio aquoso (sentido CW).

É visível que a integridade da bicamada varia entre os sistemas. Quando uma molécula de RIF atravessa a bicamada através do processo de *pulling* a membrana é colocada sobre um stress não natural que acaba por perturbar o sistema de tal modo que quando a molécula de RIF passa para lá da zona típica da cabeça polar do POPC, olípido é arrastado com ela. Este arrastamento de lípidos por parte das moléculas de RIF

é consistente em ambas as espécies iónicas e, particularmente para o caso de moléculas grandes e estruturalmente complexas como é o caso da RIF, pode dar origem a resultados não reais. As moléculas em questão permanecem em interação com a bicamada mesmo para valores de z em que não deveriam estar caso esta não tivesse seriamente perturbada, como acontece na Figura 23C e F e Figura 24C e F, em que a molécula a $z = 4$ nm atravessou a bicamada, levando consigo lípidos agarrados, assim como moléculas que são puxadas para dentro levam consigo lípidos agarrados para zonas internas. Estas interações presumivelmente permanecem durante toda a corrida, levando a enormes perturbações na bicamada e a distorções dos perfis de energia livre que se poderiam calcular.

Após o *sampling* de todas as configurações é possível calcular o PMF. Para avaliar a sua convergência foram considerados vários métodos de análise, já relatados por Filipe *et al.*⁹² Na Figura 25 estão os perfis de PMF quando considerados intervalos de 20 ns até um máximo de 120 ns.

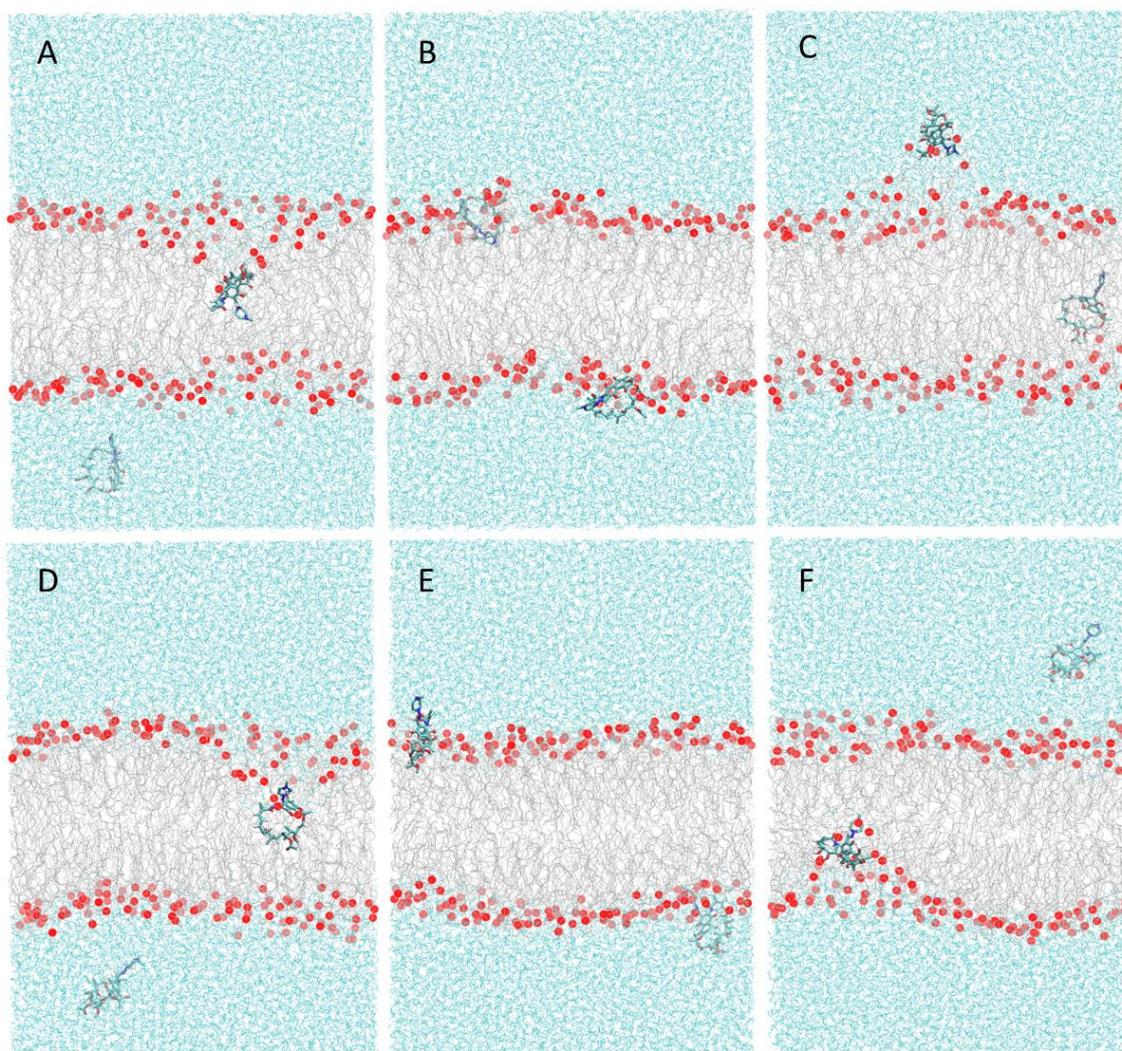


Figura 23. *Snapshots* das configurações iniciais, pós-*pulling*, para o anião (A, B, C) e zwitterião (D, E, F). A e D dizem respeito às configurações de moléculas 1 e 2 a 4 e a 0 nm do centro da bicamada, respetivamente, B e E a ambas as moléculas a 2 nm do centro da bicamada, C e F às moléculas 1 e 2 a 0 e a 4 nm do centro da bicamada, respetivamente. As moléculas de RIF estão representadas com linhas mais grossas, a água a ciano, as caudas do POPC a cinza e os pontos vermelhos representam átomos de fósforo.

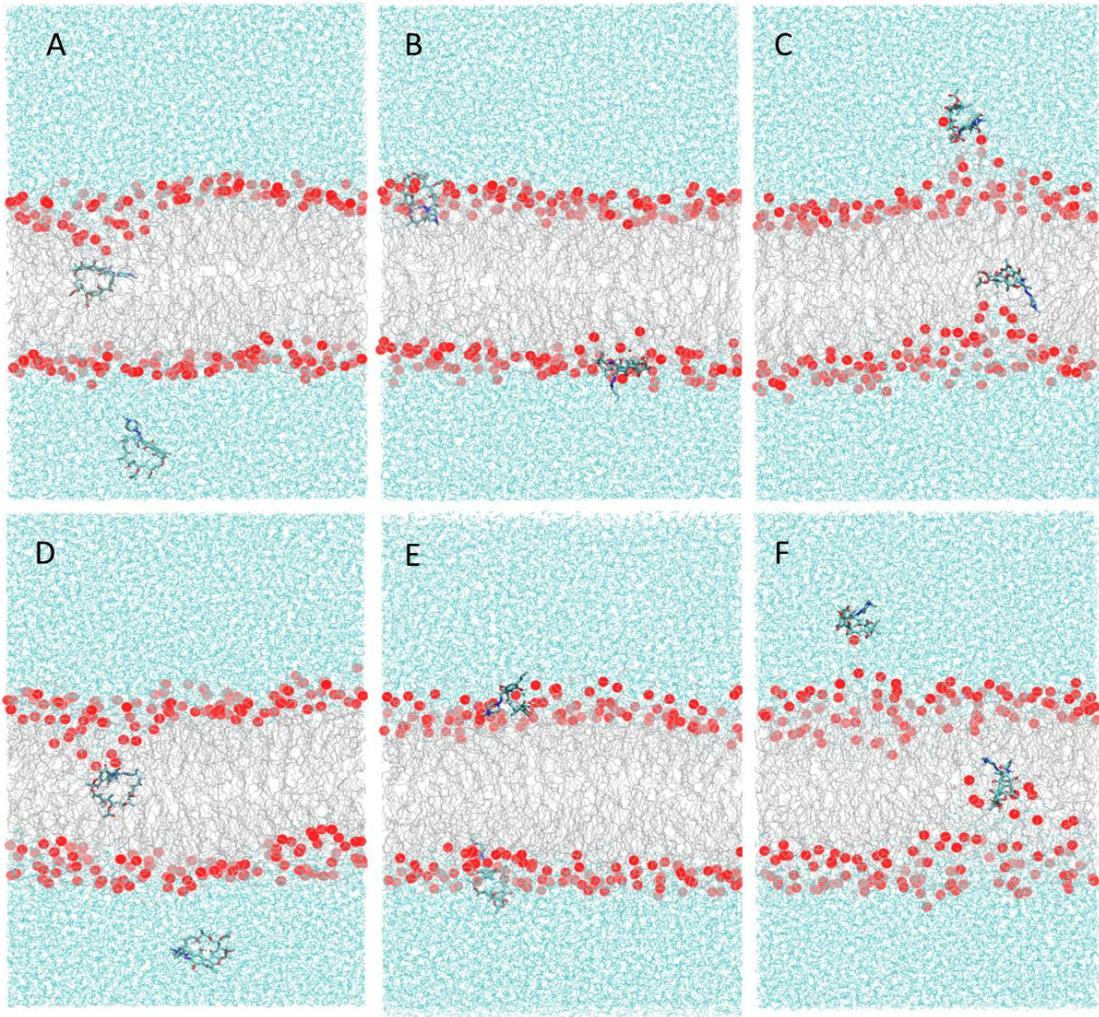


Figura 24. *Snapshots* das configurações finais, pós-*sampling*, para o anião (A, B, C) e zwitterião (D, E, F). A e D dizem respeito às configurações de moléculas 1 e 2 a 4 e a 0 nm do centro da bicamada, respetivamente, B e E a ambas as moléculas a 2 nm do centro da bicamada, C e F às moléculas 1 e 2 a 0 e a 4 nm do centro da bicamada, respetivamente. As moléculas de RIF estão representadas com linhas mais grossas, a água a ciano, as caudas do POPC a cinza e os pontos vermelhos representam átomos de fósforo.

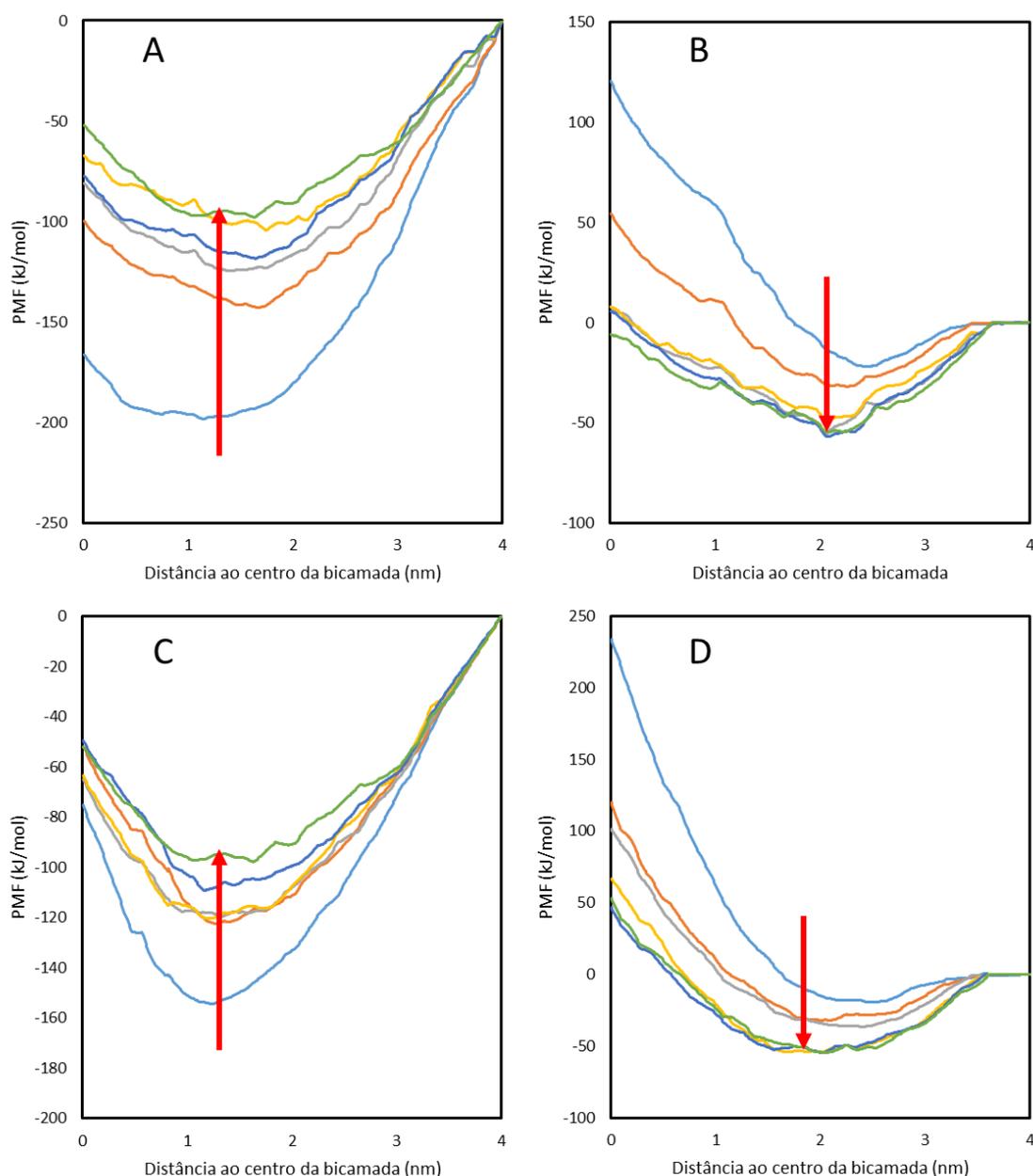


Figura 25. PMF da espécie aniônica (A e B) e zwitteriônica (C e D) para intervalos crescentes de 20 ns até ao máximo de 120 ns. A e C dizem respeito a simulações CW, B e D a simulações WC. As setas vermelhas indicam a tendência de evolução.

A consideração de intervalos sucessivamente mais tardios para o cálculo de PMF está relacionado com o aumento de tempo de equilíbrio, i.e., um PMF calculado tendo em conta o intervalo 20-40 ns é análogo a um PMF com 20 ns de equilíbrio e calculado usando 20 ns de amostragem. O avanço do intervalo de simulação utilizado para o cálculo dos PMF indica uma tendência sistemática da subida da curva para o caso CW e de descida para o caso WC. Esta contínua variação demonstra que o cálculo não

converge para 120 ns, sendo necessário mais tempo para que o perfil de PMF estabilize. Poderá, em último caso, ser necessário uma extensão de tal forma grande que se torna impraticável fazê-lo.

Para as simulações CW, o PMF não tende para 0 quando a molécula está no meio aquoso. Esta falta de patamarização ao nível aquoso está associada ao efeito de disrupção que o método de *pulling* tem na bicamada. Como referido atrás, moléculas que tenham sido puxadas do centro da bicamada para o meio aquoso arrastam lípidos com elas, o que tem impacto direto no cálculo de energia, evidente quando comparados os casos CW e WC para valores da barreira energética de translocação ($\Delta G_t = \Delta G_t(0) - \min(\Delta G)$) e desorção $\Delta G_d = \Delta G_t(4.0 \text{ nm}) - \min(\Delta G) = -\min(\Delta G)$, representados na Figura 26 a partir dos PMF da Fig. 24, respeitantes a diferentes secções (cada uma de 20 ns de duração) das simulações de 120 ns. A diferença entre os casos pode atingir valores de 40 kJ/mol em intervalos de simulação mais avançados, onde já se tem em conta que houve um passo de equilibração considerável.

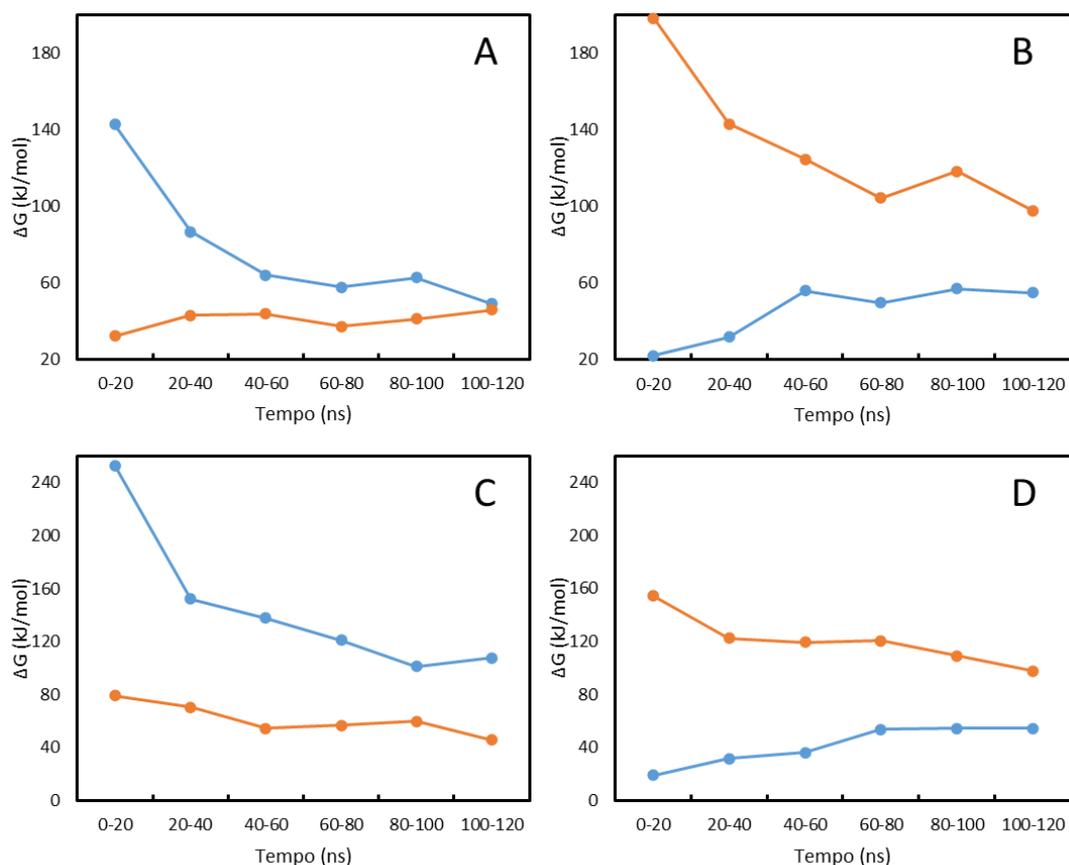


Figura 26. Valores de ΔG para o processo de translocação (A, B) e desorção (C, D) calculados tendo em conta intervalos de 20 ns, para simulações CW (laranja) e WC (azul). A e B dizem respeito à espécie aniônica e C e D à zwitteriônica.

Considerando os últimos 20 ns de simulação para efeito de cálculo de PMF, é possível caracterizar ainda mais a diferença entre CW e WC (Figura 27).

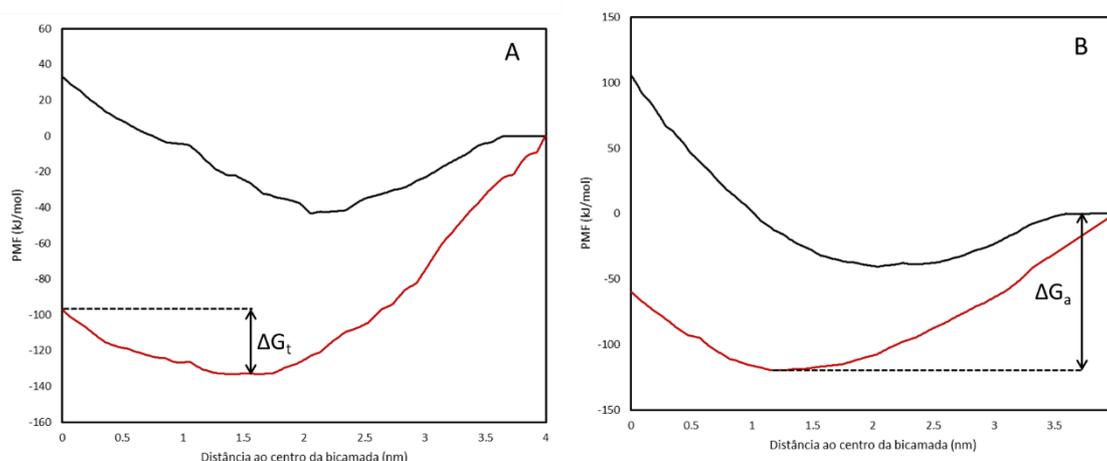


Figura 27. PMF calculado tendo em conta os últimos 20 ns de simulação para simulações CW (vermelho) e WC (preto). A diz respeito ao anião e B ao zwitterião. ΔG_t e ΔG_d indicam as barreiras energéticas para o processo de translocação e dessorção, respetivamente.

Os valores de barreiras de translocação apresentados na Tabela 2 são mais uma vez indicativos da variação do comportamento entre sistemas. Ainda assim, os resultados indicam uma barreira para a translocação significativa. O valor de 46 kJ/mol para a barreira de translocação do An-CW vai de acordo com evidências experimentais obtidas por Kramer *et al.* que indicam valores de permeação na escala do sub-segundo.⁷⁵ No entanto, o valor da barreira de energia para a translocação obtida em algumas das simulações é muito superior, sugerindo uma permeação através da membrana muito mais lenta.

Tabela 2. Valores de ΔG de translocação e dessorção.

		ΔG_t (kJ/mol)	ΔG_a (kJ/mol)
An	CW	46	98
	WC	49	55
Zw	CW	46	98
	WC	108	55

1.5. Constantes de partição

O coeficiente de partição (K_p) é uma propriedade útil para determinar de que forma uma substância se distribui entre fases distintas. Para o caso da distribuição da

RIF entre o meio aquoso e o fosfolípido POPC, esta propriedade pode ser calculada em função da coordenada de reação z , tendo em conta os valores energéticos obtidos dos PMF, através da equação 5:

$$K_p = \frac{1}{|a - b|} \int_a^b e^{-\Delta G/RT} dz \quad (5)$$

Onde a e b delimitam a janela de *sampling*, ΔG denota a energia livre, R a constante dos gases ideais ($0.008314 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T a temperatura. Os valores obtidos a partir da integração da equação aos diferentes sistemas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de K_p calculados.

		K_p
An	CW	2.15×10^{20}
	WC	2.34×10^7
Zw	CW	8.05×10^{18}
	WC	9.74×10^6

Num estudo publicado por Samelo *et al.* através de titulação isotérmica de calorimetria (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) foi obtida a constante de partição de RIF para POPC de 1.9×10^3 . Quando comparados os valores calculados com o valor experimental, a diferença pode chegar a variações mais de dez ordens de grandeza. De facto, valores de K_p na ordem de 10^{20} são excessivos, assim como os de ΔG , onde se sobrestima a diferença de energia livre entre a água e a membrana.

Embora o cálculo de este tipo de constantes para este sistema possa não conduzir a resultados realísticos, a sua comparação entre si pode ser informativa. Nomeadamente, quando avaliadas as razões de K_p obtidas para o mesmo sistema entre a espécie aniónica e zwitteriónica, é possível observar que a razão para o caso WC é de cerca de 2.4 e para o caso CW de 27. Pode-se racionalizar esta razão com a maior partição da espécie aniónica é maior para ambos os processos de cálculo de PMF, CW e WC.

Na Figura 28 é possível verificar que a menor energia de translocação para a espécie aniônica é consistente entre os dois processos de cálculo. Possivelmente causada pelas características químicas do anião, não estando este protonado no grupo piperazina, diminuindo consequentemente a sua energia em zonas mais internas da membrana.

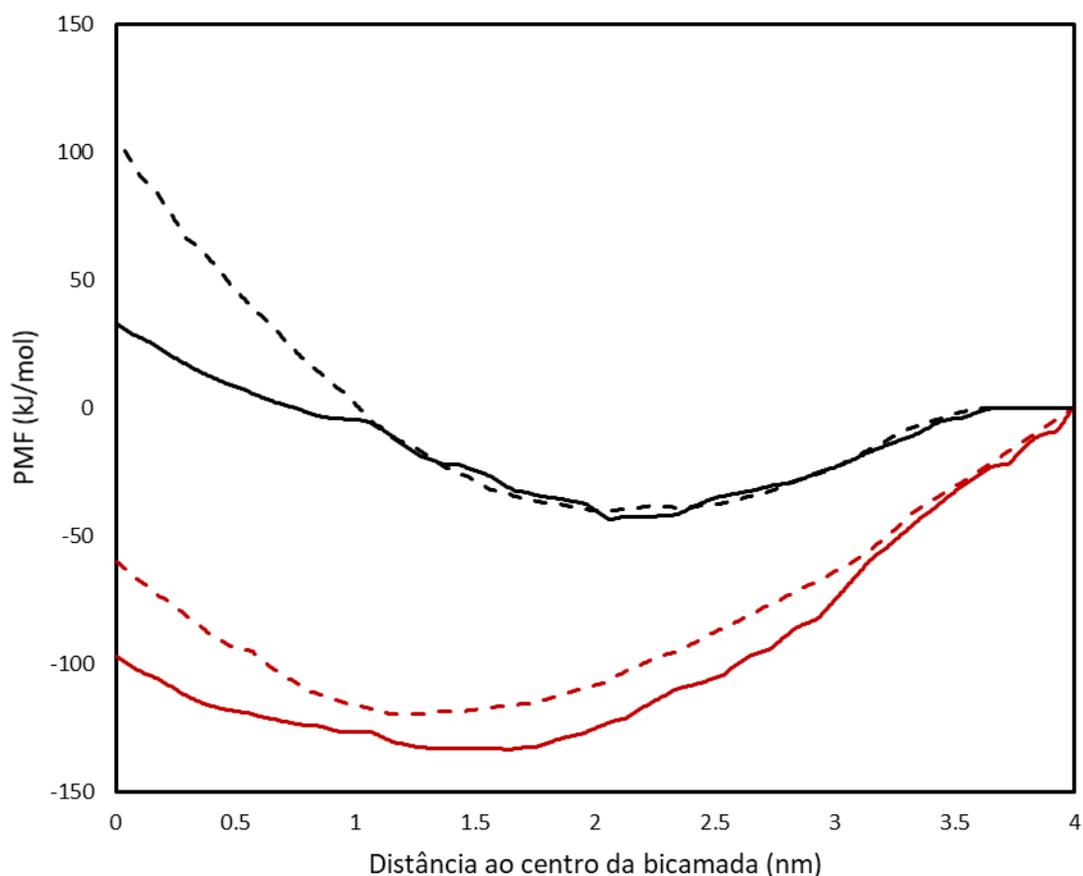


Figura 28. Comparação entre PMF calculados tendo em conta a direção WC (preto) e CW (vermelho) para o anião (linha) e zwitterião (tracejado). Cálculo tendo em conta os últimos 20 ns de simulação.

2. Caracterização Experimental: Ensaio de Permeação

O ensaio de permeação tem como principal objetivo a caracterização da interação da RIF com a membrana. Deste modo, os LUVs com CBF encapsulada foram sujeitos a um período de incubação com diferentes concentrações de RIF e foi avaliada a permeabilização da CBF. A percentagem de CBF libertada em função do tempo de incubação foi adaptada por ajuste monoexponencial e os resultados podem ser observados na Figura 29.

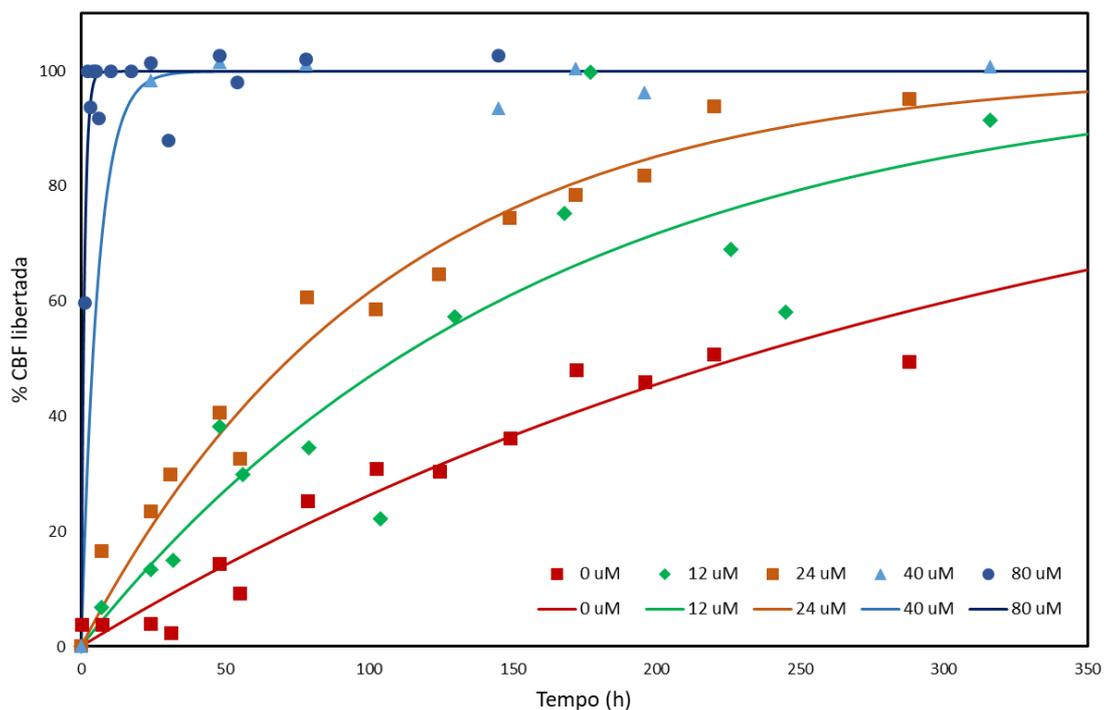


Figura 29. Percentagem de CBF libertada dos LUVs incubados a diferentes concentrações de RIF, em função do tempo de incubação. Os dados apresentados (pontos) foram adaptados a um ajuste monoexponencial (linhas).

Os resultados indicam que a RIF tem efeito na cinética da permeação da CBF. O aumento da concentração de RIF é acompanhado pelo aumento da velocidade de permeação da CBF através de bicamadas lipídicas. Na Tabela 6 estão os valores obtidos para a constante de velocidade de permeação da CBF para as diferentes concentrações de RIF.

Tabela 4. Constante de velocidade de permeação para as várias concentrações de RIF.

[RIF] (µM)	k (h ⁻¹)	Desvio Padrão
0	0.004	0.001
12	0.006	0.001
24	0.010	0.002
40	0.091	0.010
80	0.860	0.064

De facto, através dos resultados acima mostrados é possível observar a variação da permeabilidade da CBF com o aumento de concentração de RIF. Na ausência de RIF, a CBF é consideravelmente menos permeável, como é visível na Figura 29, onde após 50 horas, LUVs incubados na ausência de RIF libertaram menos de 20% da CBF encapsulada, enquanto que LUVs incubados a 40 μM ou 80 μM de RIF já libertaram 100%. Quando comparadas as condições onde houve incubação com antibiótico, a variação é mais notória para concentrações mais elevadas, onde 80 μM produziu um aumento de mais de 215 vezes na constante de velocidade de permeação.

Com esta breve caracterização experimental da cinética de permeação da CBF é possível concluir que a introdução de RIF no sistema conduz a uma manifesta perturbação na membrana, de tal modo que a cinética de uma molécula comparativamente mais pequena como a CBF, pode aumentar até mais de 200 vezes quando as membranas são incubadas com RIF. O aumento da permeabilidade da CBF poderá estar relacionado com o efeito de perturbação que a RIF tem sobre a membrana, corroborado por dinâmica molecular onde a perturbação é claramente visível (Figura 23 e 24). Ainda que a perturbação possa ser artefacto do processo de *pulling*, é expectável que a RIF, sendo uma molécula complexa, interaja com a membrana de tal forma que esta seja perturbada, por um período de tempo suficiente para a permeação de moléculas mais pequenas, como a CBF.

Kramer *et al.* desenvolveu estudos de permeação através do uso de uma sonda fluorescente sensível a alterações de pH, medidas através do método *Stopped-Flow*.⁷⁵ Os resultados obtidos por este método indicam uma velocidade de permeação na escala temporal de sub-segundo, associada ao rápido equilíbrio da RIF com ambos os lados da membrana.

Capítulo IV
Conclusões e Considerações
Futuras

O objetivo primordial do presente estudo é caracterizar o mecanismo de permeação do antibiótico Rifampicina, que, mesmo considerando toda a sua complexidade estrutural e presença de grupos polares, consegue permear membranas biológicas e exercer o seu efeito ao nível do lúmen celular.

Através da análise das simulações de dinâmica molecular é possível afirmar através de simulações *unrestrained* as moléculas de RIF tendem a localizar-se na interface entre o lípido e o meio aquoso. Mais especificamente, o seu grupo piperazina é aquele cuja orientação é mais bem caracterizado. A partir do meio aquoso, este grupo tende a aproximar-se da bicamada e a alinhar-se anti paralelamente com a seu eixo normal, apontando para o seu interior. Esta posição é invertida quando a molécula está mais internalizada, situação na qual a piperazina alinha-se novamente com a normal da bicamada, mas desta vez paralelamente. Assim, tendo em conta todas as moléculas individuais torna-se ainda mais evidente que cada molécula apresenta comportamentos distintos, dependendo do grau de internalização e de interações que faz com átomos de lípido. São estas interações que são a razão pela qual as moléculas não fazem a amostragem de todos os possíveis estados de internalização. Uma molécula poderá estabelecer uma interação tão forte com um átomo, fixando-se numa região específica do espaço configuracional, na qual permanece durante todo, ou quase todo, o tempo de simulação. Não é aconselhável, portanto, considerar todas as moléculas como um único grupo de análise e ter em conta o seu centro de massa apenas como ponto de partida para análises mais específicas.

Os perfis de interação das moléculas em torno do fosfato do POPC indicam uma interação específica entre a piperazina e átomo do lípido. Para o caso do anião, a intensidade do perfil de interação é menor. Isto poderia dever-se, em análise inicial, devido ao facto de que esta espécie iónica não é capaz de estabelecer interações de hidrogénio através da piperazina, dada a falta de grupos dadores. De facto, o perfil de interação para a espécie zwitteriónica, já ela detentora de um grupo dador, é muito mais intenso, mas através da análise de ligações de hidrogénio verificou-se que esta espécie não estabelece interações de hidrogénio com o fosforo do POPC consideráveis. Pode-se então concluir que, ainda que mais forte para o caso do zwitterião, a interação entre piperazina e fosfato é feita essencialmente por contribuições eletrostáticas. O facto de

ser mais intenso para a espécie zwitteriónica é possivelmente devido ao carácter catiónico da piperazina, resultante da protonação do azoto.

A análise de interações de hidrogénio apresenta também uma tendência que varia com o grau de internalização das moléculas, especificamente entre a água e os grupos aceitantes da RIF. Com o aumento do nível de internalização da molécula de RIF, o número de interações estabelecidas por pontes de hidrogénio diminui. Este acontecimento é expectável, sendo que com a internalização das moléculas a polaridade do ambiente diminui. O estabelecimento de ligações de hidrogénio intramoleculares é comum às duas espécies iónicas, mas mais frequente para a espécie aniónica. Existe a possibilidade de vários tipos de interações, como o caso típico de fecho de anéis de seis e sete membros. Menos imediata é a formação de ligações de hidrogénio que dão origem à criação de anéis de oito membros e em casos extremos pode haver interação entre átomos estruturalmente distantes, associadas a mudanças de configuração.

O cálculo de energias livres através das funções de potencial médio, para o caso da RIF, tem associado diversos pontos problemáticos. O primeiro é encontrado na criação das configurações ao longo da coordenada de reação, feita através do *pulling* das moléculas para o centro da bicamada. Este método, quando usado para este tipo de moléculas estruturalmente complexas pode perturbar o sistema de tal forma que as configurações obtidas dão origem a disparidades relevantes entre si. Este problema é observável quando comparados os casos CW e WC, que dão origem a perfis de energia notavelmente diferentes. Possivelmente associado a este facto, os PMF não convergem em tempo útil, variando com o aumento do tempo de simulação. Ainda assim, com a análise das constantes de partição calculadas através dos PMF, é possível observar uma tendência para que a espécie aniónica tenha a si associada uma constante de partição maior, com uma menor barreira de translocação para posições mais internas da membrana. Esta diferença, possivelmente associada ao grau de protonação do grupo piperazina, corrobora mais uma vez o comportamento por vezes díspar entre as duas espécies iónicas, transversal a todas as análises.

Para este tipo de cálculos e particularmente para este tipo de moléculas, a conclusão fundamental é que o método de *pulling* não é o mais adequado para a criação da configuração para o cálculo de PMF. É aconselhável o uso de outros métodos onde o

sistema não seja perturbado com a intensidade aqui observada, de modo a dar origem a resultados realistas.

Experimentalmente, foi seguida a permeação da CBF ao longo do tempo na presença de várias concentrações RIF. Este ensaio de permeabilidade indicou que a RIF interage com a membrana de tal forma que provoca a libertação de CBF para o meio aquoso. Esta interação pode conduzir ao aumento da constante de velocidade de permeação da CBF até 200 vezes, para o caso de concentrações de RIF mais elevados e quando comparada com a ausência de RIF.

Com este estudo e através deste método, foi possível constatar que a RIF interage com a membrana de tal forma que é eficiente a aumentar a velocidade de permeação da CBF. O aumento poderá ocorrer através da perturbação da membrana lipídica, por forma a que a CBF difunda através dela em direção ao meio aquoso. Por métodos computacionais foi possível visualizar o nível de perturbação que uma molécula complexa como a RIF pode ter sobre uma membrana.

Por fim, o presente trabalho conduziu a diversas conclusões, quer seja pela elucidação de algumas interações e conformações importantes que esta molécula estabelece ao permear membranas biológicas, ou pelo facto de que posteriormente serão necessários outros métodos de *sampling* para o cálculo de perfis energéticos de moléculas estruturalmente complexas. Os ensaios de permeação deram origem a informações relevantes, nomeadamente a interação e consequente perturbação que a RIF produz na membrana.

Sendo a perturbação da membrana um ponto fulcral do presente estudo, seria importante a sua caracterização a nível físico por técnicas de anisotropia, para além da continuação dos ensaios de permeação, com a possibilidade do seu aprimoramento. Na vertente computacional, poderá ser vantajoso a aplicação de outras técnicas computacionais para a obtenção de perfis de energia, como *Metadynamics*, *Free Energy Perturbation* (FEP) ou *Absolute Binding Free Energy* (ABFE).^{66,93,94}

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donald Voet, Judith G. Voet, C. W. P. *Fundamentals of biochemistry*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2016). ISBN: 9781118918401.
2. Cheng, X. & Smith, J. C. Biological Membrane Organization and Cellular Signaling. *Chemical Reviews* **119**, 5849–5880 (2019). doi:10.1021/acs.chemrev.8b00439.
3. Gorter, E. & Grendel, F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine* **41**, 439–444 (1925). doi:10.1084/jem.41.4.439.
4. Singer, S. . & Nicolson, G. L. Singer1972.Pdf. *Science* vol. 175 720–731 (1972).
5. Petris, S. de. Immunoelectron Microscopy and Immunofluorescence. Korn E.D. (eds) *Methods in Membrane Biology* (Springer). doi:10.1007/978-1-4613-4036-2_1.
6. Huang, J. & Feigenson, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophysical Journal* **76**, 2142–2157 (1999). doi:10.1016/S0006-3495(99)77369-8.
7. Ackerman, D. G. & Feigenson, G. W. Lipid bilayers: Clusters, domains and phases. *Essays in Biochemistry* **57**, 33–42 (2015). doi:10.1042/BSE0570033.
8. Shimshick, E. J. & McConnell, H. M. Lateral Phase Separation in Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **12**, 2351–2360 (1973). doi:10.1021/bi00736a026.
9. Nicolson, G. L. Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components. *BBA - Reviews on Biomembranes* **457**, 57–108 (1976). doi:10.1016/0304-4157(76)90014-9.
10. Pike, L. J. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research* **47**, 1597–1598 (2006). doi:10.1194/jlr.E600002-JLR200.
11. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572

- (1997). doi:10.1038/42408.
12. Chevalier, M. I. J. P., Charles, M. & Gillispie, C. Structures in an Aqueous World: The Hydrophobic Effect. *Wiley-Interscience* (1973). doi:10.1126/science.184.4136.559.
 13. Marrink, S. J., Lindahl, E., Edholm, O. & Mark, A. E. Simulation of the spontaneous aggregation of phospholipids into bilayers. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 8638–8639 (2001). doi:10.1021/ja0159618.
 14. Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* **1469**, 159–195 (2000). doi:10.1016/S0304-4157(00)00016-2.
 15. Wiese, A., Brandenburg, K., Ulmer, A. J., Seydel, U. & Müller-Loennies, S. The dual role of lipopolysaccharide as effector and target molecule. *Biological Chemistry* **380**, 767–784 (1999). doi:10.1515/BC.1999.097.
 16. Marsh, D. Membrane water-penetration profiles from spin labels. *European Biophysics Journal* **31**, 559–562 (2002). doi:10.1007/s00249-002-0245-z.
 17. Marsh, D. Polarity and permeation profiles in lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7777–7782 (2001). doi:10.1073/pnas.131023798.
 18. Lewis, B. A. & Engelman, D. M. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *Journal of Molecular Biology* **166**, 211–217 (1983). doi:10.1016/S0022-2836(83)80007-2.
 19. Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D. & Evans, E. A. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical Journal* **79**, 328–339 (2000). doi:10.1016/S0006-3495(00)76295-3.
 20. Träuble, H. & Haynes, D. H. The volume change in lipid bilayer lamellae at the crystalline-liquid crystalline phase transition. *Chemistry and Physics of Lipids* **7**, 324–335 (1971). doi:10.1016/0009-3084(71)90010-7.

21. Berg, H. C. *Random walks in biology*. (Princeton University Press, 1983). ISBN: 978-0-691-00064-0.
22. Dietrich, C., Volovyk, Z. N., Levi, M., Thompson, N. L. & Jacobson, K. Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10642–10647 (2001). doi:10.1073/pnas.191168698.
23. Yeagle, P. *The Membranes of Cells*. (Academic Press, 1993). ISBN: 9780128000472.
24. Luchini, A. & Vitiello, G. Mimicking the mammalian plasma membrane: An overview of lipid membrane models for biophysical studies. *Biomimetics* **6**, 1–18 (2021). doi:10.3390/biomimetics6010003.
25. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L. & Henson, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation* **5**, 551–562 (1998). doi:10.1038/sj.cdd.4400404.
26. Fisher, S., States, U., Francisco, S. & Francisco, S. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Bone* 822–837 (2005). doi:10.2741/1576.
27. Kim, J., Mosior, M., Chung, L. A., Wu, H. & McLaughlin, S. Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids. *Biophysical Journal* **60**, 135–148 (1991). doi:10.1016/S0006-3495(91)82037-9.
28. Hediger, M. A. *et al.* The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **447**, 465–468 (2004). doi:10.1007/s00424-003-1192-y.
29. Sugano, K. *et al.* Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 597–614 (2010). doi:10.1038/nrd3187.

30. Deamer, D. D., Kleinzeller, A., Fambrough, D. M. & Benos, D. J. *Membrane Permeability: 100 Years Since Ernest Overton*. (Current Topics in Membranes, 1999). ISBN: 9780121533489.
31. Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W. & Zarghami, N. Liposome: classification, preparation, and applications. 1–9 (2013). doi:10.1186/1556-276X-8-102.
32. Gennis, R. B. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. (Springer-Verlag, 1989). ISBN: 978-1-4757-2067-9.
33. Gonzalez Gomez, A. & Hosseinidoust, Z. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. *ACS infectious diseases* **6**, 896–908 (2020). doi:10.1021/acsinfecdis.9b00357.
34. Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. & Teller, E. Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics* **21**, 1087–1092 (1953). doi:10.1063/1.1699114.
35. Alder, B. J. & Wainwright, T. E. Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics* **27**, 1208–1209 (1957). doi:10.1063/1.1743957.
36. Frenkel, Daan, B. S. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications. Vol. 1. Elsevier*. (2001). ISBN: 9780080519982.
37. Van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. Molecular dynamics computer simulation. Method, application and perspectives in chemistry. *Section Title: Physical Organic Chemistry* **102**, 1020–1055 (1990). doi:10.1002/anie.199009921.
38. Van Der Ploeg, P. & Berendsen, H. J. C. Molecular dynamics simulation of a bilayer membrane. *The Journal of Chemical Physics* **76**, 3271–3276 (1982). doi:10.1063/1.443321.
39. Kox, A. J., Michels, J. P. J. & Wiegels, F. W. Simulation of a lipid monolayer using molecular dynamics. *Nature* **287**, 317–319 (1980). doi:10.1038/287317a0.

40. Bonacic-Koutecky, V. & Mitrić, R. Theoretical exploration of ultrafast dynamics in atomic clusters: Analysis and control. *Chemical Reviews* **105**, 11–65 (2005). doi:10.1021/cr0206925.
41. Hack, M. D. & Truhlar, D. G. Nonadiabatic trajectories at an exhibition. *Journal of Physical Chemistry A* **104**, 7925–7926 (2000). doi:10.1021/jp001629r.
42. Doltsinis, N. L. Molecular Dynamics Beyond the Born-Oppenheimer Approximation: Mixed Quantum–Classical Approaches. *NIC Series* **31**, 389–409 (2006).
43. Sharma, B. & Chandra, A. Born-Oppenheimer Molecular Dynamics Simulations of a Bromate Ion in Water Reveal Its Dual Kosmotropic and Chaotropic Behavior. *Journal of Physical Chemistry B* **122**, 2090–2101 (2018). doi:10.1021/acs.jpcc.7b09300.
44. Marx, D. & Hutter, J. *Ab initio molecular dynamics : basic theory and advanced methods*. (Cambridge University Press, 2009). ISBN: 9780511609633.
45. Patrikeev, G. A. Macromolecular mechanics. *Polymer Mechanics* **7**, 183–192 (1971). doi:10.1007/BF00855851.
46. Lindahl, Abraham, Hess & Spoel, van der. GROMACS 2021.3 Manual. (2021). doi:10.5281/ZENODO.5053220.
47. Price, S. L., Harrison, R. J. & Guest, M. F. An ab initio distributed multipole study of the electrostatic potential around an undecapeptide cyclosporin derivative and a comparison with point charge electrostatic models. *Journal of Computational Chemistry* **10**, 552–567 (1989). doi:10.1002/jcc.540100412.
48. Notman, R. & Anwar, J. Breaching the skin barrier - Insights from molecular simulation of model membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 237–250 (2013). doi:10.1016/j.addr.2012.02.011.
49. Krämer, A. *et al.* Interactions of Water and Alkanes: Modifying Additive Force Fields to Account for Polarization Effects. *Journal of Chemical Theory and Computation* **15**, 3854–3867 (2019). doi:10.1021/acs.jctc.9b00016.

50. Komanduri, R. & Raff, L. M. A review on the molecular dynamics simulation of machining at the atomic scale. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacture* **215**, 1639–1672 (2001). doi:10.1177/095440540121501201.
51. Ott, K. H. & Meyer, B. Parametrization of GROMOS force field for oligosaccharides and assessment of efficiency of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry* **17**, 1068–1084 (1996). doi:10.1002/(SICI)1096-987X(199606)17:8<1068::AID-JCC14>3.0.CO;2-A.
52. Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M. & Gelpí, J. L. Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **8**, 37–47 (2015). doi:10.2147/AABC.S70333.
53. Paquet, E. & Viktor, H. L. Molecular dynamics, monte carlo simulations, and langevin dynamics: A computational review. *BioMed Research International* **2015**, (2015). doi:10.1155/2015/183918.
54. da Silva, G. C. Q., Silva, G. M., Tavares, F. W., Fleming, F. P. & Horta, B. A. C. Are all-atom any better than united-atom force fields for the description of liquid properties of alkanes? *Journal of Molecular Modeling* **26**, (2020). doi:10.1007/s00894-020-04548-5.
55. Larsson, P., Kneiszl, R. C. & Marklund, E. G. MkVsites: A tool for creating GROMACS virtual sites parameters to increase performance in all-atom molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry* **41**, 1564–1569 (2020). doi:10.1002/jcc.26198.
56. Egberts, E., Marrink, S. J. & Berendsen, H. J. C. Molecular dynamics simulation of a phospholipid membrane. *European Biophysics Journal* **22**, 423–436 (1994). doi:10.1007/BF00180163.
57. Shelley, J. C., Shelley, M. Y., Reeder, R. C., Bandyopadhyay, S. & Klein, M. L. A coarse grain model for phospholipid simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 4464–4470 (2001). doi:10.1021/jp010238p.

58. Tieleman, D. P. & Berendsen, H. J. C. Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters. *Journal of Chemical Physics* **105**, 4871–4880 (1996). doi:10.1063/1.472323.
59. Malde, A. K. *et al.* An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation* **7**, 4026–4037 (2011). doi:10.1021/ct200196m.
60. Domański, J., Stansfeld, P. J., Sansom, M. S. P. & Beckstein, O. Lipidbook: A public repository for force-field parameters used in membrane simulations. *Journal of Membrane Biology* **236**, 255–258 (2010). doi:10.1007/s00232-010-9296-8.
61. Ray, J. R. & Rahman, A. Statistical ensembles and molecular dynamics studies of anisotropic solids. *The Journal of Chemical Physics* **80**, 4423–4428 (1984). doi:10.1063/1.447221.
62. Nosé, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics* **52**, 255–268 (1984).
63. Makov, G. & Payne, M. C. MakovPayne.PhysRevB.51.4014.pdf. *Physical Review B* vol. 51 4014 (1995).
64. Van Gunsteren, W. F. *et al.* Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angewandte Chemie - International Edition* **45**, 4064–4092 (2006). doi:10.1002/anie.200502655.
65. Baker, N. A., Hünenberger, P. H. & McCammon, J. A. Polarization around an ion in a dielectric continuum with truncated electrostatic interactions. *Journal of Chemical Physics* **110**, 10679–10692 (1999). doi:10.1063/1.479013.
66. Katiyar, R. S. & Jha, P. K. Molecular simulations in drug delivery: Opportunities and challenges. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **8**, e1358 (2018). doi:10.1002/wcms.1358.
67. Chodera, J. D. *et al.* Alchemical free energy methods for drug discovery: Progress

- and challenges. *Current Opinion in Structural Biology* **21**, 150–160 (2011). doi:10.1016/j.sbi.2011.01.011.
68. Liu, X. *et al.* Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **13**, 23–37 (2018). doi:10.1080/17460441.2018.1403419.
 69. Cheatham, T. E. & Young, M. A. Simulation of Nucleic Acids : Successes , Limitations , and Promise. *Biopolymers* **56**, 232–256 (2001). doi:10.1002/1097-0282(2000)56:4<232::AID-BIP10037>3.0.CO;2-H.
 70. Kresse, G. Ab initio molecular dynamics: Recent progresses and limitations. *Journal of Non-Crystalline Solids* **312–314**, 52–59 (2002). doi:10.1016/S0022-3093(02)01649-6.
 71. Marx, D. & Hutter, J. *Ab Initio Molecular Dynamics*. (Cambridge University Press, 2009). doi:10.1017/CBO9780511609633 ISBN: 9780511609633.
 72. Douglas, J. G. & McLeod, M. J. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. *Clinical Pharmacokinetics* **37**, 127–146 (1999). doi:10.2165/00003088-199937020-00003.
 73. Saxena, A., Kumari, R., Mukherjee, U., Singh, P. & Lal, R. Draft genome sequence of the rifamycin producer *Mycobacterium rifamycinica* DSM 46095. *Genome Announcements* **2**, 1–2 (2014). doi:10.1128/genomeA.00662-14.
 74. Campbell, E. A. *et al.* Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* **104**, 901–912 (2001). doi:10.1016/S0092-8674(01)00286-0.
 75. Benet, L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O. & Oprea, T. I. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Advanced Drug Delivery Reviews* **101**, 89–98 (2016). doi:10.1016/j.addr.2016.05.007.
 76. Krämer, S. D. *et al.* When barriers ignore the “rule-of-five”. *Advanced Drug Delivery Reviews* **101**, 62–74 (2016). doi:10.1016/j.addr.2016.02.001.

77. Piccaro, G., Poce, G., Biava, M., Giannoni, F. & Fattorini, L. Activity of lipophilic and hydrophilic drugs against dormant and replicating Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antibiotics* **68**, 711–714 (2015). doi:10.1038/ja.2015.52.
78. Yao-Shan, F. *Molecular Cytogenetics*. (Humana Press, 2003). ISBN: 9781592593002.
79. Lakowicz, J. R. *General features of protein fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006). ISBN: 0387312781.
80. Yguerabide, J. [24] Nanosecond fluorescence spectroscopy of macromolecules. *Methods in Enzymology* **26**, 498–578 (1972). doi:10.1016/S0076-6879(72)26026-8.
81. Król, M., Wrona, M., Page, C. S. & Bates, P. A. Macroscopic pKa calculations for fluorescein and its derivatives. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2**, 1520–1529 (2006). doi:10.1021/ct600235y.
82. Samelo, J., Mora, M. J., Granero, G. E. & Moreno, M. J. Partition of amphiphilic molecules to lipid bilayers by ITC: Low-affinity solutes. *ACS Omega* **2**, 6863–6869 (2017). doi:10.1021/acsomega.7b01145.
83. Schure, M. R. & Moran, R. E. Size exclusion chromatography with superficially porous particles. *Journal of Chromatography A* **1480**, 11–19 (2017). doi:10.1016/j.chroma.2016.12.016.
84. Schmid, N. *et al.* Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal* **40**, 843–856 (2011). doi:10.1007/s00249-011-0700-9.
85. Dykstra, C. E., Frenking, G., Kim, K. S. & Scuseria, G. E. *Theory and Applications of Computational Chemistry. Theory and Applications of Computational Chemistry* (2005). ISBN: 9780444517197.
86. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F. & Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. *Intermolecular Forces* vol. 19 331–342 (1981). doi:10.1007/978-94-015-7658-1_21.

87. Allouche, A. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *Journal of computational chemistry* **32**, 174–182 (2012). doi:10.1002/jcc.
88. Evans, D. J. & Holian, B. L. The Nose–Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics* **83**, 4069–4074 (1985). doi:10.1063/1.449071.
89. Parrinello, M. & Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* **52**, 7182–7190 (1981). doi:10.1063/1.328693.
90. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **18**, 1463–1472 (1997). doi:10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
91. Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* **103**, 8577–8593 (1995). doi:10.1063/1.470117.
92. Hub, J. S., De Groot, B. L. & Van Der Spoel, D. G-whams-a free Weighted Histogram Analysis implementation including robust error and autocorrelation estimates. *Journal of Chemical Theory and Computation* **6**, 3713–3720 (2010). doi:10.1021/ct100494z.
93. Filipe, H. A. L., Moreno, M. J., Róg, T., Vattulainen, I. & Loura, L. M. S. 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**, 3572–3581 (2014). doi:10.1021/jp501622d.
94. Barducci, A., Bussi, G. & Parrinello, M. Well-tempered metadynamics: A smoothly converging and tunable free-energy method. *Physical Review Letters* **100**, 1–4 (2008). doi:10.1103/PhysRevLett.100.020603.
95. Shirts, M. R. & Mobley, D. L. An Introduction to Best Practices in Free Energy Calculations. *Biomolecular Simulations* vol. 924, 271–311 (2013). doi:10.1007/978-1-62703-017-5_11.