

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ENGENHARIA & INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
BACHARELADO EM ENGENHARIA COMPUTACIONAL

Estudo do Comportamento Estrutural de Agregados de um Análogo Triazólico de Miltefosina por Dinâmica Molecular

Ruan Medina Carvalho

JUIZ DE FORA - MG
JULHO, 2019

Estudo do Comportamento Estrutural de Agregados de um Análogo Triazólico de Miltefosina por Dinâmica Molecular

RUAN MEDINA CARVALHO

Universidade Federal de Juiz de Fora
Faculdade de Engenharia & Instituto de Ciências Exatas
Departamentos de Mecânica Aplicada e Computacional & Ciência da Computação
Bacharelado em Engenharia Computacional

Orientadora: Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt

JUIZ DE FORA - MG

JULHO, 2019

ESTUDO DO COMPORTAMENTO ESTRUTURAL DE AGREGADOS DE UM ANÁLOGO TRIAZÓLICO DE MILTEFOSINA POR DINÂMICA MOLECULAR

Ruan Medina Carvalho

MONOGRAFIA SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA FACULDADE DE ENGENHARIA & INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, COMO PARTE INTEGRANTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL EM ENGENHARIA COMPUTACIONAL.

Aprovada por:

Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt
Pós-doutora em Modelagem Computacional pela Universidade Federal de Juiz de Fora,
UFJF, Juiz de Fora, Brasil.

Adilson David da Silva
Pós-doutor em Química pelo *Centre National de la Recherche Scientifique*, CNRS,
França.

Vinícius Carius de Souza
Doutorando em Modelagem Computacional pela Universidade Federal de Juiz de Fora,
UFJF, Juiz de Fora, Brasil.

JUIZ DE FORA - MG

15 DE JULHO, 2019

Resumo

Estratégias computacionais vêm sendo cada vez mais utilizadas para auxiliar em diversos campos da ciência. Este trabalho consiste no estudo por dinâmica molecular do processo de agregação de moléculas do sal 1,4-distribuído-1,2,3-triazol interagindo com um ânion de acetato (dhmtAc). Tal molécula é tida como possível fármaco contra Leishmânia, apresentando mais eficiência contra o parasito e menos toxicidade para o corpo se comparado com fármacos já comercializados. Mesmo afetando milhões de pessoas ao redor do mundo, a doença é tida como negligenciada pela indústria farmacêutica. O objetivo deste trabalho é estudar a estabilidade estrutural de agregados micelares de dhmtAc e entender seu mecanismo de formação, a fim de identificar características de sistemas que induzam esse comportamento. Os dados cooperam com o processo de viabilização da molécula como fármaco, permitindo diminuir futuramente sua citotoxicidade. Os resultados mostram relação direta entre a concentração e as características dos agregados observados. Menores concentrações ($\sim 0.07M$) da molécula apresentaram agregados maiores (16 – 31 dhmt livres), enquanto maiores concentrações ($\sim 0.12M$) apresentaram maiores números de agregados de tamanhos pequenos (2 – 8 dhmt livres).

Palavras-chave: Modelagem Molecular, Simulação Computacional, Dinâmica Molecular, Micela, Derivado Triazólico de Miltefosina.

Abstract

Computational strategies are being used more and more to help in different fields of science. This work consists of the study by molecular dynamics of the process of aggregation of 1,4-distributed 1,2,3-triazole salt molecules interacting with an acetate anion (dhmtAc). This molecule is considered a drug candidate for Leishmaniasis treatment, exhibiting more efficacy against the parasite and less toxicity to the body in comparison to already commercialized drugs. Even affecting millions of people around the world, Leishmania is seen as a neglected disease by the pharmaceutical industry. The objective of this work is to study the structural stability of micellar aggregates of dhmtAc and to understand its mechanism of formation in order to identify characteristics of systems that induce this behavior. The data cooperates with the process of the viability of the molecule as a drug, allowing to decrease its cytotoxicity in the future. The results show a direct relationship between the concentration and the characteristics of the aggregates observed. Lower concentrations ($\sim 0.07\text{M}$) of the molecule present larger aggregates (16 – 31 free dhmt), while higher concentrations ($\sim 0.12\text{M}$) present larger numbers of small-sized aggregates (2 – 8 free dhmt).

Keywords: Molecular Modeling, Computational Simulation, Molecular Dynamics, Micelles, Triazolic Derivative of Miltefosine.

Agradecimentos

A todos os meus familiares, pelo encorajamento e apoio. Espero um dia poder recompensar o tempo que passei longe de vocês.

Aos professores que me ajudaram a percorrer todo o caminho, em especial à minha orientadora, Priscila Goliatt, e aos meus tutores em educação tutorial, Heder Bernardino e Elson Toledo. A todos os docentes, obrigado pelo conhecimento passado, pela amizade e pela paciência. De fato, vocês contribuem no processo de enriquecimento pessoal e profissional.

Aos amigos que me apoiaram e me apoiam. Agradeço sinceramente, seja os que me ajudaram diretamente no desenvolvimento desse trabalho, seja os que participaram do processo de crescimento acadêmico nas disciplinas e atividades extra classe, ou/e seja os que indiretamente fizeram a minha formação acontecer, simplesmente por estarem comigo.

Finalmente, agradeço pela existência da Universidade Federal de Juiz de Fora e por essa casa proporcionar ensino superior público, gratuito e de qualidade a tantos jovens que como eu, dificilmente pagariam por uma escola equivalente a essa. Em tempos difíceis, as universidades federais são fortalezas contra o obscurantismo do século XXI. Castelos de ideias e de inovação tecnológica que carregam a produção científica do país nos ombros. Durante a chuva de ataques, nasce uma Tsunami. Educação é palavra de ordem. Formação de qualidade é a bandeira. Nossa competência é a arma mais forte. Agradeço por ser prova viva da importância da universidade pública. Agradeço por ter tido a honra de ser parte dessa história.

“(...) não se esqueçam dos cachorros.

Nem por um momento...”.

Conteúdo

1	Introdução	7
1.1	Motivação	11
1.2	Interdisciplinaridade	12
1.3	Dinâmica Molecular	13
1.3.1	Métodos Numéricos em Dinâmica Molecular	17
1.3.2	Etapas de uma Dinâmica Molecular	19
1.3.3	Dinâmica Molecular Acelerada	20
1.4	Objetivos	22
1.4.1	Objetivo Geral	22
1.4.2	Objetivos Específicos	22
2	Material e Métodos	23
2.1	Construção e Parametrização da Molécula	24
2.2	Validação da Parametrização Molecular	25
2.3	Construção da Estrutura Micelar	26
2.4	Parametrização da Estrutura Micelar	28
2.5	Validação da Micela	28
2.5.1	DM1: Simulação de um hemisfério micelar - hem-micela	29
2.5.2	DM2: Simulação da micela completa - whol-micela	29
2.6	Meio Sanguíneo e Protonação da Molécula	30
2.7	Dinâmicas Efetivas	31
2.7.1	DM3: Simulação micela concentração A - sys-ConcA	31
2.7.2	DM4: Simulação micela concentração B - sys-ConcB	32
2.7.3	DM5: Simulação micela B re-termalização - re-Temp	32
2.7.4	DM6: Simulação micela B dinâmica acelerada - ac-DMd	33
2.7.5	DM7: Simulação de automontagem da micela - rand-Start	33
2.8	Sumarização de Configurações e Parâmetros	33
2.9	Análise e Extração de Energias do Sistema	39
2.10	Análise de Agrupamentos Moleculares	40
3	Resultados e Discussão	43
3.1	Validação da Parametrização Molecular	43
3.2	Dinâmicas de Validação da Micela	46
3.2.1	DM1: Hemisfério Micelar - hem-micela	46
3.2.2	DM2: Micela Completa - whol-micela	53
3.3	Resultados das Dinâmicas Efetivas	56
3.3.1	DM3: sys-ConcA	56
3.3.2	DM4: sys-ConcB	58
3.3.3	DM5: re-Temp	61
3.3.4	DM6: ac-DMd	63
3.3.5	DM7: rand-Start	65
3.4	Análise de concentrações e visão experimental	68
4	Conclusão	70

5	Trabalhos Futuros	71
	Bibliografia	72
A	Apêndice	75
A.1	Algoritmos e <i>scripts</i>	75
A.2	Arquivo de Parametrização do dhmt livre	84
A.3	Material e Resultados Complementares	91
A.3.1	4-dmtAc	91
A.3.2	hem-micela	94
A.3.3	sys-ConcB	95

1 Introdução

Estratégias computacionais vêm sendo cada vez mais utilizadas para auxiliar em diversos campos da ciência. Em particular, as áreas de bioinformática e biologia computacional tem o ferramental computacional como base para gerar e lidar com uma enorme quantidade de dados (*big data*) e modelos computacionais (KATSILA et al., 2016). De fato, modelos computacionais de sistemas biológicos são necessários para aumentar o entendimento dos mecanismos presentes em moléculas, células, tecidos e até de organismos inteiros. Como consequência, as estratégias de modelagem computacional são tidas como cruciais para transformar a biologia de uma ciência descritiva, para uma ciência preditiva (KUMAR et al., 2006). Dessa forma, se tratando do desenvolvimento racional de fármacos, por ser um problema que possui como alicerce a predição, simulações computacionais e análise de dados para *big data* são estratégias presentes em todo processo de pesquisa e desenvolvimento, desde a identificação de alvos e mecanismos de ação até a escolha de candidatos a fármacos e estudos sobre a dinâmica dos mesmos (KATSILA et al., 2016), (KUMAR et al., 2006).

O presente trabalho consiste no estudo por dinâmica molécula computacional dos mecanismos de agregação do sal 1,4-distribuído- 1,2,3-triazol interagindo com um ânion de acetato (dhmtAc). A molécula dhmtAc é um derivado não clássico de miltefosina, composto de um acetato que interage de forma não ligada com um anel aromático carregado positivamente ligado ao radical H_3C e uma cauda com 10 carbonos ligados. Essa molécula é tida como um possível fármaco para o tratamento de leishmanioses, apresentando maior eficiência contra o parasito e menor toxicidade para o corpo se comparado com fármacos utilizados atualmente.

A molécula dhmtAc foi apresentada primeiramente por (STROPPIA et al., 2017) no trabalho intitulado “*Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on Leishmania amazonensis*”. No trabalho, os autores apresentam diversos derivados de miltefosina para utilização contra o agente etiológico da leishmaniose, veja a Figura 1.1. O composto intitulado dhmtAc apresentou os melhores resultados contra o parasito

Leishmania amazonensis quando comparados com os demais bioisómeros estudados, inclusive resultados melhores que os obtidos pela própria miltefosina comercial. Segundo os autores, sua aplicação se dá por via intravenosa e seu mecanismo de ação se concentra principalmente na desregulação mitocondrial com redução acentuada do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) e aumento da produção de espécies de oxigênio reativo - do inglês *reactive oxygen species* (ROS). Os estudos mostram atividade leishmanicida mediada via apoptose e necrose do parasito.

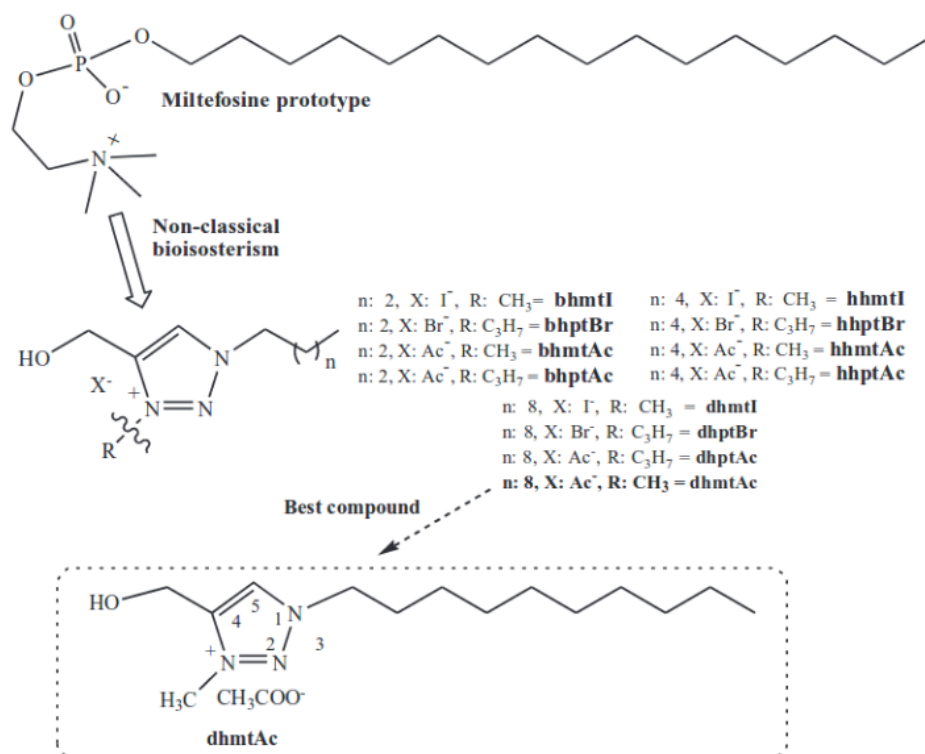


Figura 1.1: Protótipo das Estruturas Químicas dos Derivados Não-clássicos de Miltefosina Apresentados em *Stroppa, P et. al.*, 2017

Contudo, qual o motivo de se estudar fármacos de combate a leishmaniose? As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias que constituem um importante problema de saúde pública, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2010). Elas são causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae*, que inclui parasitas do gênero *Leishmania*, e transmitidas através da picada de fêmeas infectadas de vetores flebotomíneos, enquanto se alimentam do sangue da vítima. São afetados pelas leishmanioses, além do homem, vários mamíferos silvestres (como a preguiça, o gambá e roedores) e domésticos (cães, cavalos, entre outros) (VILELA; MENDONCA, 2013).

Pode-se dividir as leishmanioses em três classes: a leishmaniose cutânea (a mais comum), que ataca a pele, a leishmaniose mucocutânea, que ataca as mucosas, e a leishmaniose visceral (a forma mais agressiva da enfermidade), que ataca órgãos internos. Estima-se entre 700.000 a 1 milhão de novos casos da doença por ano e em torno de 26.000 a 65.000 mortes no mesmo período. Felizmente, apenas uma pequena parte dos infectados eventualmente desenvolverão a enfermidade (WHO, 2019). Os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que mais de 95% dos novos casos anuais das doenças são registrados em um grupo pequeno de países, sendo o Brasil o único país que compõe, para todas as classes de leishmaniose, os grupos de países com maiores números de novos casos em 2017 (WHO, 2019).

Mesmo afetando milhões de pessoas ao redor do mundo, a doença é tida como negligenciada pela indústria farmacêutica por apresentar altos custos no desenvolvimento de novas drogas, mas pouco retorno financeiro (WHO, 2010), (SUNDAR; SINGH, 2018). Além disso, é comum que o parasito da doença, em algumas regiões, apresente aumento de resistência contra os coquetéis clássicos utilizados no tratamento. Isso implica na utilização de maiores doses das drogas nos pacientes, aumentando a ocorrência de efeitos colaterais gerados pela toxicidade dos compostos (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010).

Nesse sentido, estudos como os apresentados em (SUNDAR; SINGH, 2018) são cada vez mais necessários. O trabalho intitulado “*Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis*” apresenta um compilado de novas moléculas que vêm sendo propostas como fármaco contra a leishmaniose. O objetivo é ressaltar tais estudos para que cada vez mais pesquisadores estejam empenhados no estudo e validação desses alvos. Com isso, pode-se evoluir o poder medicinal dos fármacos, diminuir os efeitos colaterais nos pacientes e vencer a resistência que o parasito vêm adquirindo. O composto dhmtAc representa uma abordagem nova de geração de fármacos contra o parasito da Leishmania por meio da construção de bioisómeros de miltefosina (STROPPIA et al., 2017). Essa abordagem vem apresentando bons resultados, sendo a única nesse sentido listada no trabalho de síntese de Sundar e Singh de 2018 (SUNDAR; SINGH, 2018).

Durante testes efetuados em laboratório posteriormente ao trabalho de 2017, STROPPIA et al. observaram comportamento característico de agrupamento dos compos-

tos com a variação da concentração de dhmtAc. Utilizando dados de um espectrômetro de UV, o grupo identificou variação nas amplitudes das medições, o que por sua vez, levava à hipótese de certo alinhamento das moléculas. Além disso, foi observado aumento da estabilidade estrutural nos agrupamentos e sugeriu-se que havia no sistema a formação de nanoesferas do composto. Isso ocorre pelo fato da molécula ser anfifílica, ou seja, apresenta propriedade hidrofóbica na cauda carbônica e propriedade hidrofílica na cabeça aromática. Moléculas com essa propriedade tendem a se organizar quando dispostas em soluções aquosas, protegendo a parte hidrofóbica da molécula por meio de uma camada formada com a parte hidrofílica da molécula.

Existem diversas formas de organização molecular com propósitos que tangem ao do contexto apresentado, como monocamadas ou bicamadas de compostos, vesículas ou lipossomos e micelas (DEAMER et al., 2002). Espera-se uma conformação micelar (em nanoesferas) no agrupamento de moléculas de dhmtAc por comparação com resultados observados para moléculas com propriedades similares na literatura (MARRINK; TIELEMAN; MARK, 2000), (PHILLIPS et al., 2005), (YOSHII; OKAZAKI, 2006), (YOSHII; IWAHASHI; OKAZAKI, 2006) e (LEBECQUE et al., 2017). A Figura 1.2 mostra esquematicamente como se dá a organização dessas moléculas.

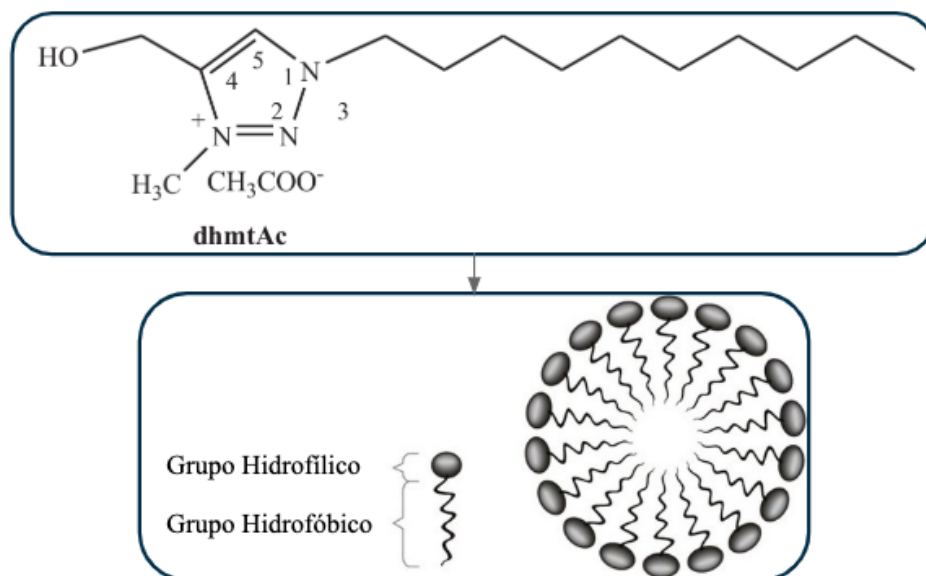


Figura 1.2: Esquema sobre a formação micelar esférica da molécula dhmtAc em solução aquosa. Figura contém parte da arte de RUSNANO – *Glossary of Nanotechnology and Related Terms*, 2011

1.1 Motivação

A indústria farmacêutica, e conseqüentemente pesquisadores do desenvolvimento racional de fármacos, conhecem a importância de melhorias na absorção, distribuição, metabolismo e/ou excreção de fármacos pelo corpo - do inglês *adsorption, distribution, metabolism, and excretion* (ADME). O ADME é parte crucial do processo para o desenvolvimento de terapias farmacêuticas mais efetivas. Desde 1906, Paul Ehrlich já propunha alterar os mecanismos de distribuição das drogas no corpo aliando drogas tóxicas a segmentos de moléculas (denominados *magic bullets* que possuíam alta afinidade por antígenos específicos de células cancerígenas. O objetivo era melhorar a eficácia terapêutica do câncer e diminuir a toxicidade das substâncias fora do meio desejado (BATRAKOVA et al., 2006). Esse era o início das técnicas para melhoramento de fármacos por alterações atômicas, contudo, alterar moléculas nem sempre se mostra um caminho possível, já que a proposta de alteração na conformação pode estar ligada diretamente ao cerne de seu mecanismo de ação. O avanço da biotecnologia nos próximos anos proporcionou a criação de uma grande variedade de moléculas, muitas delas possuíam grande ação contra seus alvos, porém muitas delas não poderiam entrar em contato nem mesmo com a água, inviabilizando a utilização da droga no corpo de seres vivos. Esse cenário exemplifica a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de técnicas para a entrega de medicamentos como forma de viabilizar a aplicação de moléculas recém-descobertas em candidatos a medicamentos potentes. Além disso, técnicas de entrega podem melhorar significativamente as terapias de drogas já existentes, sem modificar a estrutura original dos fármacos (BATRAKOVA et al., 2006). Mas como levar o medicamento ao local específico de ação sem prejudicar sua estrutura?

A literatura mostra que sistemas de *drug-delivery* (entrega racional de fármacos no corpo), junto com os fármacos baseados em polímeros, emergiram da bancada de laboratório nos anos 90 como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de doenças severas para o ser humano (BATRAKOVA et al., 2006), (LANGER, 2001) e (DUNCAN, 2003). A utilização de nanoesferas (chamadas micelas) como 'bolhas' para os fármacos é uma das mais utilizadas por esse ramo de desenvolvimento biotecnológico. Nessa aplicação, as micelas são responsáveis por englobar as moléculas do fármaco e

liberá-las no local de ação. Com isso, a farmacocinética é melhorada e a citotoxicidade fora do alvo é reduzida. Desde descobertas até os dias atuais, tais soluções são amplamente pesquisadas e aplicadas para moléculas pouco solúveis, drogas muito citotóxicas como as do tratamento contra cânceres e diversas outras situações correlatas (CROY; KWON, 2006), (KEDAR et al., 2010), (BISWAS et al., 2016) e (IMRAN; SHAH et al., 2018).

O presente trabalho se trata de uma abordagem teórico-computacional da dinâmica de formação de micelas do composto dhmtAc. Estudos como este cooperam com as análises de viabilidade do uso da molécula como fármaco. Além disso, oferece meios para a compreensão do funcionamento da molécula em escala atômica, que por sua vez, permite avançar em pesquisas sobre a otimização dos meios de entrega do fármaco no corpo. A organização de moléculas de dhmtAc em nanoesferas nos permite acreditar que a molécula pode funcionar como sua própria micela em uma estratégia de *drug-delivery*. Mesmo com os testes experimentais que apontam a molécula de dhmtAc como toxicidade baixa ($CC_{50} = 115.9\mu M$ e índice de seletividade > 115) (STROPPA et al., 2017), a utilização de micelas permitiria reduzir ainda mais a citotoxicidade do composto e aumentar sua efetividade como fármaco, melhorando a farmacocinética do mesmo. Para isso, é necessário entender os mecanismos de formação e estabilidade estrutural dessas organizações. O estudo computacional sobre a dinâmica de moléculas é denominado Dinâmica Molecular - explicitado posteriormente - e será amplamente utilizada nesse trabalho. (KUBINYI; MARTIN; FOLKERS, 1993), (HINCHLIFFE, 2005) e (SCHLICK, 2010).

1.2 Interdisciplinaridade

A cooperação Teórico-Computacional-Experimental nasce das limitações individuais das formas de experimentar e pesquisar. Dentro dos desafios impostos à ciência, cada vez se faz mais necessária a utilização cíclica e integrada de pesquisas que englobam a teoria com validações *in silico*, *in vitro* e *in vivo* em uma abordagem interdisciplinar. Este trabalho parte de uma observação experimental que precisava de uma explicação: “*Como se dá a formação micelar e como avaliar a estabilidade da estrutura do dhmtAc como fármaco?*”. Por meios teórico-computacionais, obtém-se compreensão dos fenômenos a níveis atômicos, o que nos possibilita realizar predições sobre o comportamento do com-

posto em diversas situações. Todas as predições efetuadas devem então ser verificadas experimentalmente de modo a validar todo o ciclo científico de pesquisa. Este esquema ideal está descrito na Figura 1.3.

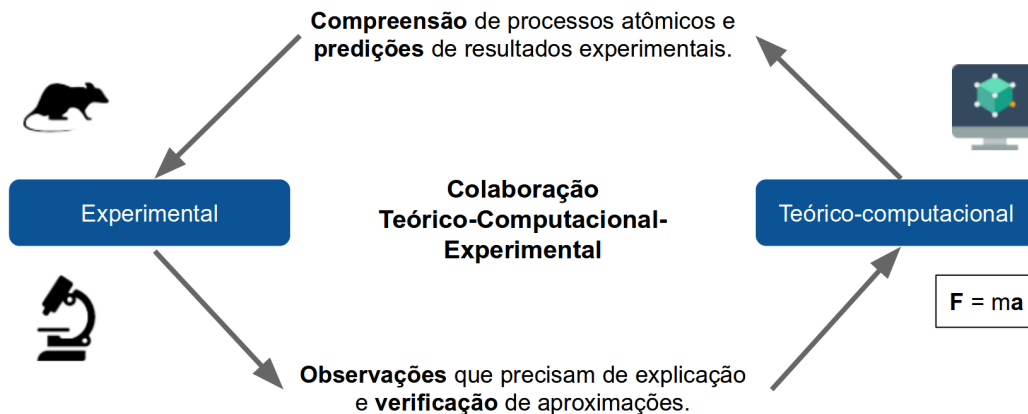


Figura 1.3: Esquema de cooperação Teórico-Computacional-Experimental no desenvolvimento científico.

1.3 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é um método de simulação computacional (*in silico*) desenvolvido durante a década de 1970, que estuda os movimentos de átomos e moléculas das quais se conhecem o potencial de interação entre estas partículas e as equações que regem o seu movimento (MARTINEZ; BORIN; SKAF, 2007). Ou seja, a técnica de Dinâmica Molecular estuda a evolução temporal do movimento de partículas em um sistema controlado computacionalmente em escalas tão pequenas quanto necessárias.

As dinâmicas moleculares podem ser divididas em clássicas (DMC) e quânticas (DMQ). O que difere esses métodos são as equações que regem o movimento dos átomos do sistema. As DMC consistem na resolução numérica das equações de movimento da mecânica clássica (2ª Lei de Newton) e as DMQ consistem na resolução numérica de simplificações da equação de Schrödinger (HINCHLIFFE, 2008). Por terem alicerce em teorias diferentes, as DMC e DMQ se diferem em níveis de detalhes simulados. A DMC realiza a simulação com detalhes de átomos, sem contemplar fenômenos de reações químicas, enquanto a DMQ realiza a simulação a nível de elétrons, podendo simular reações químicas

entre as partículas do sistema (SCHLICK, 2010).

Para o estudo de configurações de sistemas de partículas, ainda existem as Simulações de Monte Carlo. Porém, por se basearem somente em propriedades termodinâmicas e na distribuição de Boltzmann para as configurações do sistema, não se leva em consideração a evolução temporal do mesmo. Sua aplicabilidade se resume em contextos nos quais apenas as configurações mais prováveis são buscadas (HINCHLIFFE, 2008). Neste trabalho, queremos entender como as moléculas de dhmtAc interagem e evoluem temporalmente. Para isso, utilizou-se das técnicas de Dinâmica Molecular Clássica.

No contexto de simulações por dinâmica molecular, as forças que atuam em cada átomo do sistema podem ser obtidas pela derivação de um conjunto de equações da energia potencial do sistema, sendo essa última dependente apenas da estrutura espacial do sistema molecular. As etapas para o cálculo das trajetórias das partículas do sistema estão dispostas na Figura 1.4.

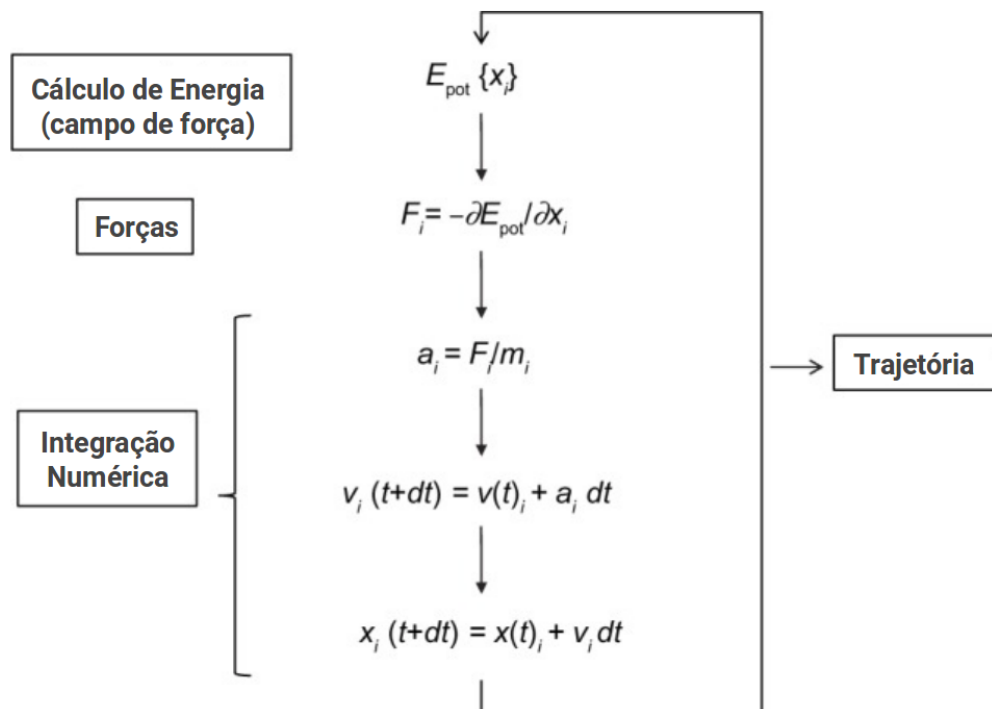


Figura 1.4: Passos para cálculo de trajetória de um sistema de partículas por dinâmica molecular clássica. Onde E_{pot} é a energia potencial; t é o tempo de simulação; dt é o passo de iteração temporal. Para cada um dos N átomos simulados: x são as coordenadas do átomo; F são os componentes da força resultante; a é a aceleração; m é a massa do átomo e v é a velocidade (HOSPITAL et al., 2015).

O conjunto de expressões matemáticas para o cálculo de energia ($E_{pot}(X_j)$), juntamente com os parâmetros atômicos obtidos por experimentos físicos ou químicos, constituem os campos de força (*force-field*). A forma funcional básica de um campo de força comumente inclui termos de átomos ligados covalentemente, que incluem propriedades de ligação, oscilação e angulações, e de átomos não-ligados, que descrevem as interações eletrostáticas de longo alcance e potenciais de Van der Waals.

A forma explícita com os termos mais comuns de equações do campo de força CHARMM é apresentado na Equação 1.1 (JR et al., 1998).

$$\begin{aligned}
 E_{\text{total}} = & \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_b} K_{bn} (b_n - b_{0n})^2}_I + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\theta} K_\theta (\theta_n - \theta_{0n})^2}_{II} + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\xi} K_\xi (\xi_n - \xi_{0n})^2}_{III} + \\
 & \underbrace{\sum_{n=1}^{N_\phi} K_{\phi n} [1 + \cos(n_n \phi_n - \delta_n)]}_{IV} + \underbrace{\sum_{n \leq k}^{N_{\text{nonb.pair}}} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 + \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12}}_V + \underbrace{\sum_{n \leq k}^{N_{\text{nonb.pair}}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}}}_{VI}
 \end{aligned} \tag{1.1}$$

Os termos *I* a *VI* da Equação 1.1 são termos referentes a átomos ligados covalentemente, onde o termo *I* representa o potencial harmônico para as N_b ligações químicas e seus movimentos vibracionais, sendo K_{bn} a constante de Hooke, b e b_0 os comprimentos instantâneo e de equilíbrio, respectivamente. O termo *II* descreve o potencial angular para os N_θ ângulos formados por três átomos ligados consecutivamente na molécula, sendo K_θ a constante de Hooke, θ o ângulo entre as ligações e θ_0 o ângulo de equilíbrio. O termo *III* denota o potencial diedral impróprio entre os N_ξ ângulos, formados pelos planos das ligações que envolvem quatro átomos; os termos K_ξ ξ e ξ_0 denotam a constante de Hooke, o ângulo entre os planos e o ângulo de equilíbrio. Já o termo *IV* refere-se ao diedral próprio entre as N_ϕ torções em torno do eixo de ligação química, sendo K_ϕ a constante que define a barreira de rotação das ligações químicas formadas, n é o número de mínimos assumido pela função, ϕ é variação do ângulo e δ é o ângulo de diferença de fase (0° ou 180°).

Os termos seguintes, *V* e *VI*, descrevem a interação entre pares de átomos não ligados, sendo que *V* representa o potencial de Lennard-Jones, o qual possui um termo atrativo entre os átomos (interação de Van der Waals) que é definido por $\left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}} \right)^6$, e um

termo repulsivo descrito por $\left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12}$, onde r_{ij} é a distância entre os átomos i e j e A_{ij} e B_{ij} são as distâncias finitas mínimas nas quais o potencial inter-atômico é igual a zero, ambos termos dependentes dos tipos dos átomos reagentes. Já o termo VI representa as interações de Coulomb, sendo q_i e q_j as cargas dos átomos i e j , respectivamente, ϵ_0 a permissividade elétrica do vácuo, ϵ_r a constante dielétrica do meio e r_{ij} a distância entre os átomos interagentes. Os valores desses termos podem ser escalados ou mesmo desconsiderados caso o par de átomos não ligados sejam vizinhos ligados indiretamente por baixo grau (distância entre os átomos ≤ 3 ligações).

Apesar dos termos da Equação 1.1 serem os mais comuns, é possível que haja campos de forças que utilizem termos adicionais para modelarem propriedades específicas do sistema de interesse. Como exemplo, pode-se citar o termo de Urey-Bradley, que insere um fator harmônico adicional para a angulação entre átomos 1,3 não ligados (como hidrogênios de uma molécula de água). Esse termo é comumente desprezado por apresentar valores muito baixos, porém se mostra importante para estudar as deformações em um plano ou para separar os modos de estiramento de ligação simétrica e assimétrica, como por exemplo, em moléculas alifáticas (JR et al., 1998). Outro termo recentemente proposto no CHARMM36 é o potencial de CMAP, que trata-se de um termo cruzado entre ângulos diedrais do *backbone* de proteínas (ϕ e ψ) (JR; FEIG; III, 2004).

Além das equações e parâmetros do campo de força, uma simulação por dinâmica molecular deve possuir condições de contorno bem definidas. Neste trabalho, a modelagem dos sistemas conta com condições periódicas de contorno, que são um conjunto de condições usadas para aproximar um sistema finito de um sistema infinito de partículas. Essa condição relaciona a saída de um átomo da célula de simulação com a entrada de uma cópia desse átomo na extremidade oposta da caixa. Essa característica está diretamente ligada com a manutenção do número de átomos no sistema durante a simulação. Os sistemas simulados também garantem a manutenção do volume e da energia potencial do sistema. Essas características definem um *ensemble* termodinâmico NVE e são garantidas pelo uso de integradores simpléticos na resolução numérica das equações dinâmicas, como os métodos numéricos *Leapfrog*, *Velocity Verlet* ou *Position Verlet* (SCHLICK, 2010).

1.3.1 Métodos Numéricos em Dinâmica Molecular

A escolha do método numérico de integração está diretamente ligada à confiabilidade das simulações das macromoleculares do seu sistema. A classe de métodos simpléticos é utilizada para resolução de sistemas Hamiltonianos, ou seja, sistemas físicos nos quais as forças são invariantes da velocidade. Esses métodos possuem propriedades numéricas favoráveis, teoricamente e na prática, se comparados com métodos não simpléticos, em especial por preservar propriedades físicas do sistema (SIMONSON, 2001). A propriedade simplética implica em bom comportamento durante as iterações dos métodos, por estes apresentarem pequenas flutuações sobre o valor inicial do Hamiltoniano (conservado em teoria, mas aproximado numericamente) e nenhum desvio sistemático nas energias, como pode ocorrer ao utilizar métodos não simpléticos (SCHLICK, 2010).

A Figura 1.5 mostra o comportamento simulado de um sistema não-linear formado por quatro moléculas de água (TIP3). O gráfico mostra a evolução da energia total calculada pelo método simplético *Verlet* e pelo método não simplético *Runge-Kutta* de quarta ordem. É notável o desvio acumulado pelo método não simplético, em especial para pequenos intervalos de integração, que são os demandados no contexto de dinâmicas moleculares. O método simplético, apesar de aumentar a margem de oscilação, não se distancia sistematicamente do valor inicial de energia total. Ademais, métodos que utilizam menos passos nas iterações se mostram mais usuais, pois reduzem o consumo de memória utilizada. As classes de métodos de *Verlet* vêm apresentando bons resultados para dinâmicas biomoleculares, utilizando apenas resultados de uma iteração anterior, em seu formato explícito, o que reduz ainda, os cálculos necessários (SCHLICK, 2010).

Tendo em vista a importância da manutenção de propriedades conservativas do *ensemble* escolhido, utiliza-se um esquema *Velocity Verlet* para a simulação de dinâmica molecular no programa NAMD (BERNARDI et al., 2018). Tanto o programa quando o método de integração citados foram os escolhidos para o desenvolvimento desse trabalho. Características e parâmetros necessários para a utilização do NAMD são descritos posteriormente nesse trabalho.

O método de integração *Velocity Verlet* é usado para avançar iterativamente as posições e velocidades dos átomos no tempo. As iterações do método são dadas pelas

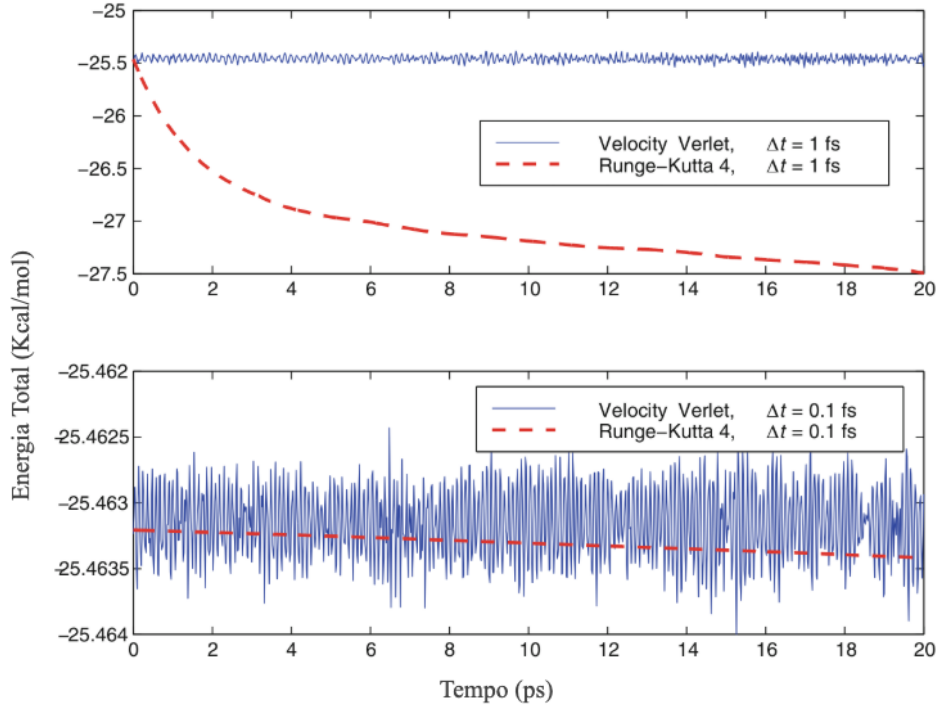


Figura 1.5: Evolução da energia total de um tetrâmero de água (TIP3) simulado pelo esquema de *Verlet* (linha contínua) e pelo esquema de Runge-Kutta de quarta ordem (linha tracejada) com intervalos de integração $\Delta t = 0.1, 1\text{fs}$. Referência (SCHLICK, 2010)

expressões na Equação 1.2. As matrizes de posição (X^n) e as matrizes de velocidade (V^n) são atualizadas de forma explícita. O cálculo das matrizes de aceleração (A^n) vem do campo de força por meio da relação entre a matriz de massa (M) e a energia potencial (E) da configuração atual do sistema, dada por: $A^n = -M^{-1}\nabla E(X^n)$.

$$X^{n+1} = X^n + \Delta t V^n + \frac{\Delta t^2}{2} A^n \quad (1.2)$$

$$V^{n+1} = V^n + \frac{\Delta t}{2}(A^n + A^{n+1})$$

Para reduzir o custo computacional dos cálculos, geralmente são utilizadas estratégias de múltiplos passos de tempo (do inglês *Multiple Time Stepping* - MTS). Neste caso, interações locais (*e.g.*, interações de ligação, Van der Waals e interações eletrostáticas dentro de uma distância máxima) são calculadas a cada passo de tempo. Já as interações de maior alcance (*e.g.*, interações eletrostáticas além da distância máxima) são computadas com menos frequência. A abordagem influencia diretamente nos termos que são

considerados no campo de força em cada iteração do sistema. Além disso, o NAMD também permite empregar um intervalo de tempo intermediário (*eg.* $X^{n+\frac{1}{2}}$) para as interações não ligadas de curto alcance, modificando a granularidade desse cálculo quando necessário, e executando cálculo apenas para as interações ligadas nos intervalos de tempo inteiros (BERNARDI et al., 2018).

1.3.2 Etapas de uma Dinâmica Molecular

Toda dinâmica molecular consiste em quatro etapas. Segundo (VERLI, 2014) e (NUNES et al., 2015) podemos descrevê-las como:

1. Minimização: a função de energia potencial de moléculas é muito complexa, apresentando diversos mínimos e máximos locais. Apesar de existir um mínimo global de energia, atingí-lo pode ser algo difícil. Assim, a minimização tem como objetivo encontrar um mínimo local em que a biomolécula pode ser encontrada. Além disso, a etapa de minimização de um sistema é altamente recomendada, pois permite resolver problemas de sobreposição de átomos, interações instáveis ou desfavoráveis e outras distorções na estrutura que podem levar a resultados não confiáveis.
2. Termalização: é a etapa de tratamento térmico do sistema. Este passo é necessário para elevar a temperatura, partindo da temperatura de cristalização da molécula ou de uma aproximação da mesma para uma estrutura criada em softwares de desenho molecular - conformação inicial da molécula no sistema - e atingir a temperatura desejada para simulação. Durante a fase de aquecimento, as velocidades iniciais dos átomos são atribuídas à temperatura mais baixa e a cada passo de tempo as velocidades são recalculadas e ajustadas para temperaturas maiores. Este passo é repetido até atingir a temperatura necessária. As velocidades iniciais são definidas aleatoriamente, de forma a satisfazer a temperatura inicial especificada e respeitando a função de distribuição de Boltzmann.
3. Equilibração: as etapas anteriores não consideram o controle e estabilidade de parâmetros como pressão, temperatura, volume e energia. O propósito de realizar a fase de equilibração é estabilizar propriedades do sistema em valores desejáveis, com

o intuito de reduzir variações bruscas nas medidas, responsáveis por instabilidade estrutural da molécula e por resultados não confiáveis.

4. Produção: partindo de um sistema equilibrado, essa é a fase final da simulação de dinâmica molecular, na qual o sistema é simulado por um período de tempo suficiente para observar as mudanças estruturais de relevância biológica. Durante essa fase, as trajetórias armazenadas em arquivos com a evolução das coordenadas dos átomos do sistema podem ser utilizadas para realizar cálculos de energia média, flutuações estruturais, *etc.*

1.3.3 Dinâmica Molecular Acelerada

Os sistemas de dinâmica molecular são modelos caóticos, na forma que pequenas flutuações no sistema inicial podem conduzir a evolução do sistema em direções completamente diferentes. A complexidade e os altos níveis de liberdade do sistema configuram uma superfície de energia potencial rugosa, ou seja, com um conjunto extenso de mínimos locais de energia. O processo de DM busca estabilizar a energia do sistema em mínimos de energia potencial. Contudo, é comum que o sistema se estagne em um mínimo local e não consiga evoluir para configurações mais próximas do mínimo global de energia. A Figura 1.6 mostra um esquema da relação entre conformação e energia potencial associada a uma proteína, porém, esse conceito pode ser estendido para qualquer molécula.

Primeiramente proposta por (HAMELBERG; MONGAN; MCCAMMON, 2004) e mais recentemente revisitada por (WANG et al., 2011), a dinâmica molecular acelerada (aMD) é um método de amostragem aprimorada que serve para melhorar a amostragem de espaço conformacional de um sistema. Na aMD, as barreiras de energia que separam os diferentes estados de um sistema são reduzidas. O método modifica o formato da superfície de energia potencial ao elevar os valores de energia nos poços de mínimo que estão abaixo de um certo limiar (*threshold*); acima desse limiar as energias não são afetadas. Como resultado, as barreiras que separam as bacias energéticas são reduzidas, permitindo ao sistema amostrar espaços conformacionais que não poderiam ser facilmente acessados em uma simulação clássica de MD (BERNARDI et al., 2018).

Das variações existentes de aMD, o modelo padrão e o aplicado nesse trabalho, é

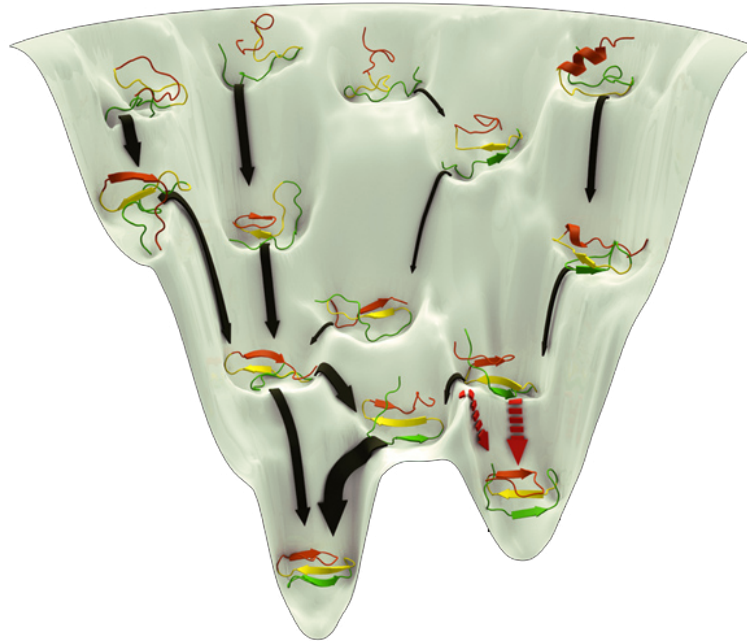


Figura 1.6: Esquema ilustrativo de uma hiper-superfície de energia potencial para uma proteína genérica (representação *cartoon*). Cada conformação possível possui uma energia potencial associada, e logo uma posição na superfície ilustrada. Cada conformação estável refere-se a um mínimo local de energia na base da superfície ilustrada. Figura retirada do blog de Maya Benowitz. Disponível em www.mpbowitz.work

o que insere impulsos de energia no potencial diedral das moléculas do sistema (aMDd), já que há grande variação conformacional em torções. Existem ainda as aDM de impulso no potencial total (aMDT) e impulsos em ambos potenciais citados (aMDdual). No formato de aMD originalmente proposto por (HAMELBERG; MONGAN; MCCAMMON, 2004), o sistema evolui naturalmente até atingir um valor de energia potencial inferior ao limiar informado, geralmente definido como a média da energia potencial de equilíbrio do sistema (E). Quando o limiar é atingido, um impulso $\Delta V(\mathbf{r})$ é adicionado à energia potencial $V(\mathbf{r})$ do sistema guiado pelas Equações 1.3 e 1.4.

$$V^*(\mathbf{r}) = V + \Delta V(\mathbf{r}), \quad (1.3)$$

$$\Delta V(\mathbf{r}) = \begin{cases} 0 & V(\mathbf{r}) \geq \mathbf{E} \\ \frac{(E-V(\mathbf{r}))^2}{\alpha+E-V(\mathbf{r})} & V(\mathbf{r}) < \mathbf{E} \end{cases} \quad (1.4)$$

A Figura 1.7 mostra o efeito das Equações 1.3 e 1.4 em uma função de energia potencial hipotética. O parâmetro α , presente na Equação 1.4, é denominado fator de

aceleração e define a amplitude da modificação na superfície potencial. O valor de α é inversamente proporcional ao tamanho dos impulsos aplicados e é sempre positivo.

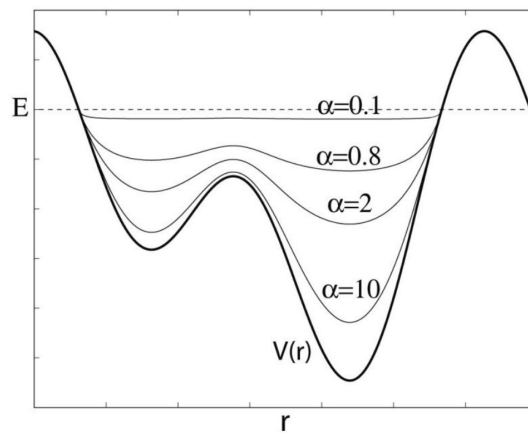


Figura 1.7: Esquema do método aMD. Energia potencial original $V(\mathbf{r})$ (linha grossa), limite de energia (*threshold*) E (linha tracejada) e perfis de energia modificados (linhas finas) variando com a variação de α . Quanto menor os valores de α , menores são as barreiras que separam as bacias energéticas. Referência (BERNARDI et al., 2018).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo é analisar a estabilidade estrutural de conjuntos de moléculas de dhmtAc em soluções aquosas ionizadas e, desta forma, entender o mecanismo característico de formação de agregados micelares observado experimentalmente em laboratório.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Parametrizar a molécula de dhmtAc para o campo de força CHARMM;
- Aferir o número de agregação da molécula;
- Aferir as condições que proporcionem a formação de agregados micelares do composto;
- Testar a estabilidade dos agregados moleculares em ambiente mimético ao sangue humano.

2 Material e Métodos

Este capítulo é destinado à exposição da trajetória realizada para o desenvolvimento do dado trabalho. Primeiramente, descreve-se o processo de construção geométrica e parametrização das propriedades da molécula, seguido dos testes computacionais para a validação dos modelos criados. Logo após, descreve-se o processo de construção geométrica das estruturas micelares, a estratégia utilizada para a parametrização da micela e os testes computacionais de validação. Segue-se com as definições de meio sanguíneo no contexto das dinâmicas do trabalho e com os ajustes da protonação da molécula no pH sanguíneo. Descreve-se as configurações das dinâmicas efetivas do trabalho, seguida de uma sumariação de todos os parâmetros e versões de ferramentas utilizadas nas experimentações computacionais. Por fim, são apresentadas estratégias de extração de dados de energia do sistema e análise de agrupamentos moleculares.

O método seguido para os estudos das micelas se assemelha ao apresentada nos trabalhos presentes nas referências (MARRINK; TIELEMAN; MARK, 2000), (BRAUN; ENGELMAN; SCHULTEN, 2004), (YOSHII; IWAHASHI; OKAZAKI, 2006), (YOSHII; OKAZAKI, 2006) e (LEBECQUE et al., 2017). Estes trabalhos apresentam uma validação teórica-computacional de informações experimentais sobre a agregação de certas moléculas, permitindo concluir informações de concentração que possibilitam maior estabilidade estrutural dos agregados.

Contudo, no presente trabalho, por tratar-se de uma molécula nova, alguns dados experimentais são desconhecidos, como o número de agregação ou a concentração crítica para a formação de micelas. Desconhecer esses parâmetros da molécula dificulta todo o trabalho a ponto que os graus de liberdade de concentração do composto e temperatura foram acrescentados nas simulações. Dessa forma, buscou-se configurar sistemas em concentrações próximas às apresentadas na literatura em trabalhos sobre moléculas com propriedades semelhantes à molécula dhmtAc. Como essas estimativas não garantem sucesso na simulação, é necessário que haja possibilidade de termalizações múltiplas do sistema e amostragem aprimorada de conformações de estabilidade por dinâmica acelerada.

É importante ressaltar que as buscas por parâmetros geradas por conta da falta de dados, aumentam considerativamente a demanda por recursos computacionais e configuram uma das maiores dificuldades do dado trabalho.

Ademais, o trabalho de Johnston e colaboradores em 2016 (JOHNSTON et al., 2016), concentra-se em descrever protocolos para a simulação de micelas. Este trabalho foi utilizado como modelo para o desenvolvimento de estratégias de análise dos resultados por agrupamento de moléculas.

2.1 Construção e Parametrização da Molécula

A estrutura química do dhmtAc foi obtida pelo contato com a equipe do Núcleo Multifuncional de Pesquisas Químicas (NUPEQ) do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Primeiramente, foi necessário gerar um arquivo de geometria tridimensional do composto estudado utilizando o programa Spartan (www.wavefun.com) e realizou-se uma minimização estrutural utilizando o campo de força CHARMM. A seguir, foi necessário gerar uma parametrização computacional para o composto dhmtAc. Assim, a molécula foi dividida em acetado livre e dhmt livre. Por ampla utilização, o acetato livre já se encontrava parametrizado nos campos de força.

Como o dhmt livre se trata de uma molécula proposta pelo grupo de pesquisa, foi necessário parametrizar cada um de seus átomos. A metodologia escolhida consiste em executar um cálculo semi-empírico da distribuição de cargas nos átomos das moléculas por conta da carga positiva no nitrogênio do anel aromático. Para isso, utilizou-se o programa GABEDIT (ALLOUCHE, 2011) para visualizar a molécula e gerar um arquivo de entrada (*.mop*) para a ferramenta MOPAC 2016 (*Molecular Orbital PACkage*) (JAMES, 2016) de cálculos semi empíricos. De posse do arquivo de coordenadas e da distribuição pontual de cargas da molécula calculada pelo MOPAC, foram realizadas inspeções dos arquivos de parametrização do CHARMM em busca de conformações atômicas que se relacionam com as presentes na molécula em questão. Essas informações foram usadas para criar um arquivo de parametrização da molécula (*.par*). Os tipos de átomos definidos e as cargas calculadas foram utilizadas para a criação de um arquivo de topologia (*.top*). A partir dos arquivos de coordenadas de átomos da molécula (*.pdb* ou *.mol2*) e o arquivo de

topologia criado (.top), foi possível construir um arquivo de topologia da molécula (.psf) pela ferramenta *psfgen*, disponível no software VMD.

A Figura 2.1 resume os passos descritos seguidos para a parametrização da molécula de dhmt livre. A parametrização proposta é apresentada no Apêndice A.4.

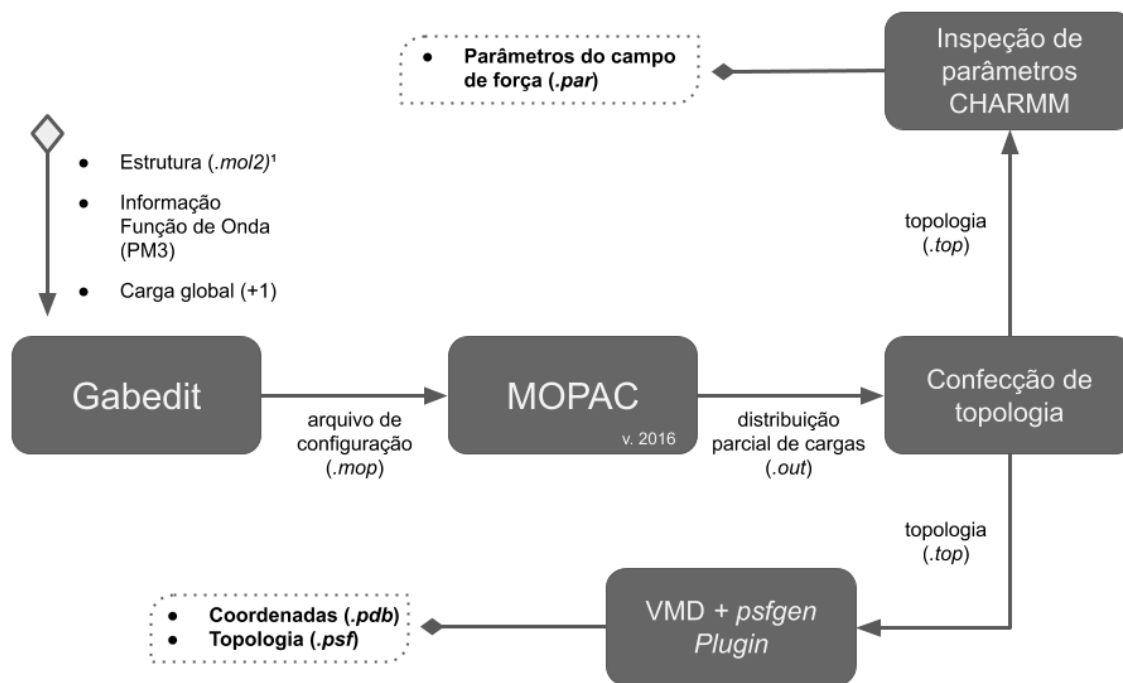


Figura 2.1: Fluxograma dos passos seguidos para realizar a parametrização da molécula de dhmt livre. ¹ Apesar do arquivo *.mol2* possuir informação sobre cargas parciais dos átomos, no início do processo tínhamos valores não otimizados para as mesmas. Losangos claro e escuro representam passo inicial e final, respectivamente. Contorno pontilhado indica arquivo utilizado como entrada nas dinâmicas moleculares.

2.2 Validação da Parametrização Molecular

Após parametrizar o composto, foi necessário efetuar simulações computacionais para a validação do modelo construído. Assim, foram realizadas quatro (4) simulações:

- A- act livre: Simulação computacional de uma molécula de acetato livre;
- B- dhmt livre: Simulação computacional de uma molécula de dhmt livre;
- C- 1-dhmtAc: Simulação de um composto dhmtAc;
- D- 4-dhmtAc: Simulação de um sistema com 4 compostos dhmtAc;

Para todos os sistemas de simulação utilizou-se uma caixa ortorrômbica (considerando as condições periódica de contorno) solvatada com água (TIP3), construída com *padding* de 15Å e ionizada com NaCl a 0,15 mol/L. A minimização seguiu em duas fases de 100ps cada: (i) minimização do solvente e íons e com a molécula simulada fixada espacialmente, (ii) minimização de todo o sistema. Em seguida, a termalização partiu de 298K até 310K em (A), (B) e (C). O sistema (D) partiu de 277.15K até 310.00K para verificar consequências de uma termalização mais gradativa. Em ambos os casos realizaram-se 500ps de termalização aquecendo o sistema em passos de 0.0001K. Para os sistemas (B), (C) e (D) foram executados 5ns de simulação da evolução do sistema. O acetato livre (A) já é amplamente conhecido e difundido na literatura. Informações adicionais do sistema estão dispostas na Seção 2.8 com os respectivos identificadores.

Espera-se observar uma molécula estável tanto com o acetato livre (A) quanto com o dhmt livre (B), ambos interagindo com as moléculas de água e íons do sistema. Em (C), espera-se observar certa interação entre o acetato e o anel aromático carregado. Em (D) espera-se observar interação entre as moléculas de dhmtAc, fortemente induzido pelo crescimento gradual de temperatura proposto.

2.3 Construção da Estrutura Micelar

Uma vez obtida uma molécula estável e parametrizada de dhmtAc, partiu-se para a modelagem geométrica da micela, que se trata de uma estrutura esférica composta por um conjunto dessas moléculas. Durante a construção da micela, para garantir a interação entre os átomos das moléculas de dhmtAc e evitar sobreposição de átomos de diferentes moléculas, assumiu-se como distância mínima entre moléculas 1.8Å e máxima 3Å.

A montagem da estrutura foi feita em etapas: primeiramente foi formado um quadrante de círculo utilizando 4 moléculas do composto. A etapa foi realizada no programa GaussView (FRISCH et al., 2016). Em seguida, realizou-se a formação de um dos hemisférios da esfera com espelhamento e rotação do quadrante, sendo realizado no programa Pymol (Schrödinger, LLC, 2015). Duplicando-se o hemisfério obtido, tem-se a esfera completa do composto. Após esse processo, ajustes pontuais das moléculas foram realizados para garantir as distâncias entre moléculas estabelecidas. Acetatos foram

adicionados nos espaços vazios na superfície da nanoesfera, obedecendo as restrições de distância estabelecidas, para evitar a quebra da estrutura por moléculas de água. Em todas as etapas, o arquivo de extensão *.mol2* foi utilizado. A Figura 2.2 exemplifica os passos seguidos para a construção e ilustra a estrutura construída em cada etapa.

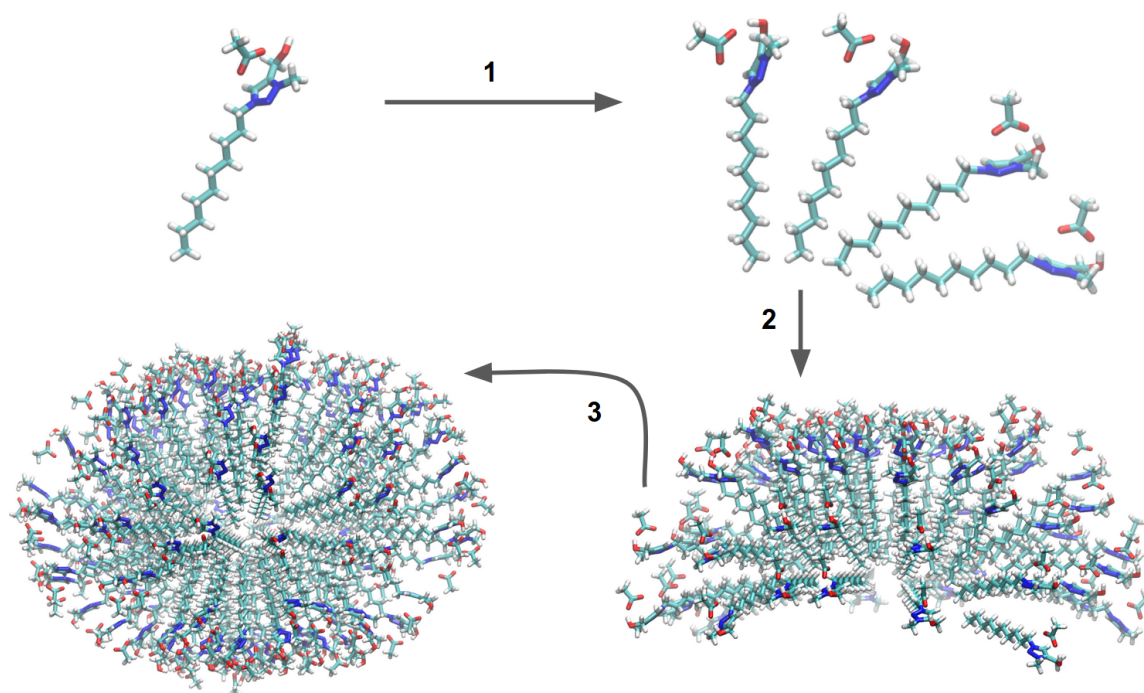


Figura 2.2: Processo de construção da estrutura da micela. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio.

A formação da micela ocorreu de forma aproximada, uma vez que os resultados experimentais não indicavam o número de moléculas presentes nas micelas formadas pelo composto. A estrutura básica gerada aproxima uma quantidade de moléculas no sistema, contudo, as simulações não limitam um eventual desmonte dessa estrutura inicial. Dessa forma, ao simular o sistema completo com uma micela, espera-se descobrir o número médio de moléculas presentes nos agrupamentos estáveis desse composto. Variações da concentração do composto no sistema devem ser efetuadas em busca do aumento de estabilidade estrutural e direcionar os resultados da pesquisa para um palpite do número de agregação do dhmtAc.

No processo de formação da estrutura 3D da micela, obteve-se como resultado uma esfera com 116 moléculas de dhmt livre e 131 moléculas de acetato. Com essa estrutura construída, esperava-se realizar a minimização da energia, contudo, o tamanho

da mesma não permite que se realize tal cálculo nas ferramentas disponíveis à pesquisa. A alternativa escolhida para a solução desse empecilho foi efetuar a minimização de energia apenas como parte da equilibração da dinâmica molecular da micela, *a priori*, para fins de otimização estrutural. Após isso, a simulação segue para se obter uma dinâmica de produção da estrutura desejada.

Os resultados obtidos para as simulações possuindo a micela construída como sistema inicial serão comparados com resultados de simulação partindo de uma distribuição aleatória das moléculas no sistema. Dessa forma, pode-se investigar se a configuração inicial do sistema, neste caso, modifica os resultados de agrupamentos do composto.

2.4 Parametrização da Estrutura Micelar

Como a micela é formada de um conjunto de moléculas de dhmtAc, é necessário somente garantir uma parametrização para uma das moléculas e criar uma forma sistemática de perpetuar a parametrização para as demais moléculas do sistema. Assim, foi criado um *script .tcl*, que executa no VMD, capaz de separar cada molécula da estrutura micelar criada e aplicar a parametrização definida. O algoritmo recebe arquivos de topologia que contém as parametrizações do acetato e do dhmtAc livre, assim como o arquivo de coordenadas da micela. No final do processo, obtém-se a parametrização de toda a estrutura de entrada do algoritmo por meio de um arquivo de coordenadas padronizado *.pdb* e o arquivo de topologia *.pfs*. O *script* criado é apresentado no Apêndice A.2.

2.5 Validação da Micela

A validação dos arquivos de topologia e parametrização da micela ocorreram por meio de dois casos teste. As dinâmicas descritas abaixo, DM1 e DM2, também servem para gerar resultados preliminares para a pesquisa. Os resultados das dinâmicas DM1 e DM2 serão comparados para analisar características relativas à configuração inicial do sistema e concentração de moléculas no mesmo.

2.5.1 DM1: Simulação de um hemisfério micelar - hem-micela

A estrutura simulada nessa dinâmica é um hemisfério micelar (uma esfera cortada ao meio), composta por 3.339 átomos. O sistema de simulação é composto por uma caixa de solvatação aquosa (TIP3) de tamanho definido pelo tamanho da molécula somado a 25Å de *padding* em cada eixo. A concentração iônica do sistema é 0,15 mol/L de NaCl (padrão na literatura). O sistema preparado apresenta 110.662 átomos. Isso define um sistema com concentração 0.0788M de dhmt livre e uma razão de 566 moléculas de água por dhmt livre. A temperatura de simulação é de 293,15K (20°) - valor intermediário aos das temperaturas dos testes experimentais: 288,15 (15°) a 298,15K (25°). Foi utilizado *cutoff* para consideração de interações não ligadas locais de 10,0Å.

Na dinâmica, a minimização seguiu em duas fases de 100 ps cada: (i) do solvente e íons e com a molécula simulada fixada espacialmente, (ii) de todo o sistema. A termalização partiu de 273.15K até 293.15K em 100 ps com passos de 0.001K. Foram rodados 10 ns de simulação na dinâmica de produção.

2.5.2 DM2: Simulação da micela completa - whol-micela

A estrutura simulada nessa dinâmica é uma micela completa composta por 6.253 átomos. O sistema de simulação é composto por uma caixa de solvatação aquosa (TIP3) de tamanho definido pelo tamanho da molécula somado a 25Å de *padding* em cada eixo. A concentração iônica do sistema é 0,15 mol/L de NaCl (padrão na literatura). O sistema preparado apresenta 127.852 átomos. Isso define um sistema com concentração 0.128M de dhmt livre e uma razão de 349 moléculas de água por dhmt livre. A temperatura de simulação é de 293,15K (20°) - valor intermediário aos das temperaturas dos testes experimentais: 288,15 (15°) a 298,15K (25°). Foi utilizado *cutoff* para consideração de interações não ligadas locais de 10,0Å.

Na dinâmica, a minimização seguiu em duas fases de 100 ps cada: (i) do solvente e íons e com a molécula simulada fixada espacialmente, (ii) de todo o sistema. A termalização partiu de 273,15K até 293,15K em 100 ps com passos de 0,001K. Foram rodados 10 ns de simulação na dinâmica de produção.

2.6 Meio Sanguíneo e Protonação da Molécula

Visto que a aplicação proposta para o dhmtAc, pelo grupo de pesquisa experimental do Núcleo Multifuncional de Pesquisas Químicas (NUPEQ) do Programa de Pós-graduação em Química da UFJF, será de forma endovenosa, é desejável verificar se o agrupamento dessas moléculas ocorre e permanece estável em ambiente mimético ao sangue humano. Para modelar esse ambiente, utilizou-se duas estratégias apresentadas a seguir.

A primeira estratégia foi verificar como se dá a distribuição de cargas e ligações da molécula estudada com prótons (H^+) quando a mesma é inserida em um ambiente de pH do sangue ($pH \sim 7.4$). Esse processo é conhecido como estudo da protonação da molécula e envolve mudança de carga e massa da mesma, por conta de alterações das ligações com hidrogênio. Para isso utilizou-se o programa Chemicalize (chemicalize.com) que retorna a configuração da molécula de entrada em diferentes valores de pH. O *smile* da molécula informado foi [CCCCCCCCCN1C=C(CO)[NH+](C)=N1] (hidrogênios periféricos omitidos). A Figura 2.3 mostra os resultados do programa para a molécula de dhmt livre. Os cálculos do programa indicam que a molécula já se encontrava na protonação correta para a simulação no pH desejado.

A ressonância prevista na estrutura já era conhecida, porém não pode ser simulada por meio de dinâmica molecular clássica. Simulações moleculares que envolvam química e dinâmica de elétrons da estrutura são modeladas por meio de dinâmicas moleculares quânticas. A distribuição eletrônica foi aproximada pelas cargas pontuais calculadas pelo método semi-empírico na etapa de parametrização do composto.

A segunda estratégia de modelagem, foi ionizar o sistema com concentrações iônicas próximas às encontradas na corrente sanguínea. A Tabela 2.1 mostra as concentrações utilizadas para as simulações que envolviam o ambiente sanguíneo.

Tabela 2.1: Concentração iônica para as simulações em ambiente sanguíneo humano.

Ion	Concentração (mol/L)
NaCl	0.150
KCl	0.005
CaCl ₂	0.002
MgCl ₂	0.002

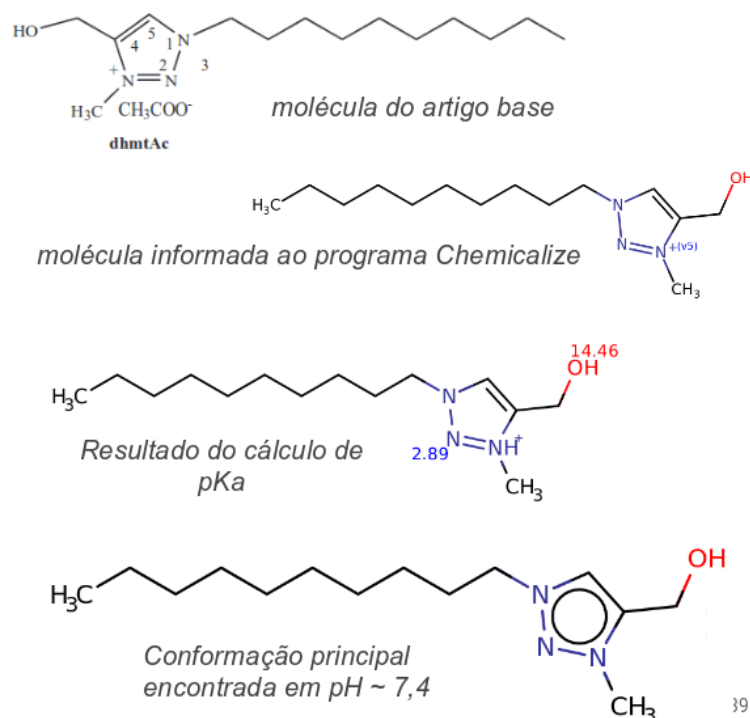


Figura 2.3: Resultados do programa Chemicalize de pK_a e protonação da molécula [CCCCCCCCN1C=C(CO)[NH+](C)=N1] (hidrogênios omitidos) - dhmtAc.

2.7 Dinâmicas Efetivas

A molécula dhmtAc é estudada como possível fármaco com via de administração parenteral através injeção na corrente sanguínea. Dessa forma, espera-se observar o comportamento dessa molécula em um sistema que simula o ambiente de ação do fármaco no corpo. Além disso, estudar a estabilidade de agregados da molécula no sistema sanguíneo permite a investigação sobre o uso de uma estrutura micelar como mecanismo de entrega planejada da droga no corpo, diminuindo ainda mais os efeitos colaterais da droga no paciente e aumentando a eficácia contra o parasito causador das Leishmanioses.

2.7.1 DM3: Simulação micela concentração A - sys-ConcA

A estrutura simulada nessa dinâmica é uma micela completa, composta por 6.253 átomos. As moléculas da micela devem se encontrar em sua protonação característica em ambiente de $pH \sim 7,4$ (pH médio do sangue). O sistema de simulação é composto por uma caixa de solvatação aquosa (TIP3) de tamanho definido pelo tamanho da molécula somado a 25Å de *padding* em cada eixo. A concentração iônica do sistema simula o ambiente sanguíneo,

como informado na Tabela 2.1. O sistema preparado apresenta 127.852 átomos. A temperatura de simulação é de 293.15K (25°) (temperatura próxima à temperatura ambiente). Foi utilizado *cutoff* de 12.0Å. O reajuste do valor de *cutoff* permite consideração de maior número de moléculas vizinhas para a formação de grupos moleculares.

Na dinâmica, a minimização seguiu em duas fases de 100 ps cada: (i) do solvente e íons livres e com a molécula simulada fixada espacialmente, e (ii) de todo o sistema. A termalização partiu de 283,15K até 293.15K em 500 ps com passos de 0,001K. Foram executados 35ns de simulação de evolução do sistema.

2.7.2 DM4: Simulação micela concentração B - sys-ConcB

A DM4 envolve a simulação do sistema de micela completa com íons de sangue nas mesmas configurações que na DM3, exceto por considerar um *padding* de 28Å para a criação da caixa de simulação. Esse valor garante concentração de moléculas de dhmt livre aproximadamente de 0.12M. Este valor de concentração foi buscado para se aproximar das condições de simulação apresentado por *Marrink et. al.* (MARRINK; TIELEMAN; MARK, 2000) em seu trabalho sobre agregação espontânea de moléculas de dodecylphosphocholine (DPC). O DPC possui comprimento de calda hidrofóbica próximo aos observados na molécula de dhmt livre. Essa propriedade é definitiva para a formação dos agregados. Estima-se que equiparar as configurações dos sistemas seja uma boa hipótese para as concentrações de favoreçam a formação de micela do composto dhmt livre. Além disso, aumentar o *padding* da caixa de simulação diminui a probabilidade da molécula sofrer interferência própria por conta das condições periódicas de contorno. Foram executados 100ns de evolução do sistema.

2.7.3 DM5: Simulação micela B re-termalização - re-Temp

A simulação DM5 parte do sistema ionizado como descrito em DM4, porém efetua uma evolução do sistema em diferentes temperaturas. Primeiramente, o sistema é minimizado e termalizado (283,15K - 293.15K) como em DM4. Após a obtenção de um sistema já equilibrado energeticamente, aproximadamente 80ns de evolução computacional, o sistema passa por uma segunda termalização elevando a temperatura de simulação a

309,65K (36,5°) (valor médio da temperatura de funcionamento corporal humano). A nova termalização ocorre de maneira gradual durante 1ns. O sistema passa por uma nova estabilização de 20ns.

2.7.4 DM6: Simulação micela B dinâmica acelerada - ac-DMd

A simulação DM6 é uma dinâmica acelerada, baseada em potenciais diedrais, a partir do centésimo nanosegundo de DM4, para buscar diferentes configurações de estabilidade do sistema. Dessa forma, durante a dinâmica acelerada, foram adicionados potenciais diedrais nas moléculas de dhmt livre quando o somatório de energia potencial diedral dessas moléculas era menor que a medida média do somatório do potencial diedral do sistema DM4 equilibrado. Como especificado na Subseção 1.3.3, o fator de aceleração $\alpha = 29$ foi ajustado por relação a medidas utilizadas em dinâmicas aceleradas de modelos proteicos. A base do valor está em um quarto do número de moléculas de dhmt livre no sistema. Foram executados 50ns de evolução do sistema em dinâmica acelerada.

2.7.5 DM7: Simulação de automontagem da micela - rand-Start

Partindo de um sistema com 52 moléculas de dhmtAc em posições aleatórias e concentração 0.12M de dhmt livre, o sistema simula a automontagem das micelas. O sistema é ionizado com as concentrações descritas em DM3, assim como utiliza as mesmas temperaturas de simulação. Os resultados serão comparados com os obtidos a partir de sistemas pré-estruturados em micelas. A concentração definida foi fixada a partir das concentrações nas dinâmicas anteriores para possibilitar a comparação. O sistema evoluiu por 100ns.

2.8 Sumarização de Configurações e Parâmetros

As simulações desse trabalho foram efetuadas pelo programa de dinâmica molecular NAMD 2.11 (*Nanoscale Molecular Dynamics*) (PHILLIPS et al., 2005) em conjunto com o software de visualização VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). O campo de força utilizado é o CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) (MACKERELL, 2001) que oferece parametrização para

ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e proteínas. O NAMD permite execução em paralelo e em placas gráficas por API CUDA (anteriormente conhecido como *Compute Unified Device Architecture*), propriedades necessárias para acelerar as simulações e análises propostas.

As execuções das simulações ocorreram nas máquinas do *cluster* de computadores do Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional da Universidade Federal de Juiz de Fora (PPGMC/UFJF). As máquinas utilizadas possuem processadores AMD Opteron modelo 6.272 com 32 núcleos de processamento. Na arquitetura, elas estão conectadas por rede *Infiniband* e *Gigabit Ethernet*. As execuções CUDA em cada máquina foram realizadas sobre duas (2) GPUs Tesla M2075 - *driver* versão 340.102. Sobre a arquitetura, as máquinas executam Linux versão 3.10.0 - 693.5.2.e17.x86_64.

Os parâmetros invariantes entre as dinâmicas são ressaltados de forma unificada a seguir:

- **exclude=scaled1-4:** Exclui dos cálculos de energia de iteração de longa distância os pares de átomos ligados por apenas um outro átomo (ligados a 2 passos) e escala o valor para iterações de átomos ligados a 3 (**scaled1-4=1**).
- **cutoff¹=12.0:** Distância limite em angstrom (Å) para consideração de interações de Van der Waals e eletrostáticos locais. O valor é base para definição de **switching=on**; **switchdist=cutoff-2** e **pairlistdist=cutoff+2** que definem o uso de funções de suavização, início da troca de termos não-locais e locais por funções de suavização no campo de força e distância máxima para manutenção das listas de interação dos átomos do sistema respectivamente.
- **stepspercycle=20:** Números de passos de integração calculados antes de uma atualização de toda a lista de interação dos átomos do sistema.
- **timestep=2.0:** Intervalo de tempo simulado nos passos de integração (2fs/passos). Esse valor alto de integração demanda a definição do parâmetro **rigidBonds=all** que fixa as distâncias de ligação que envolvem átomos de hidrogênio.

¹ Os valores utilizados para as dinâmicas de validação foram de 10.0Å, contudo, o valor foi considerado invariante após o ajuste necessário para garantir que a dinâmica molecular estivesse considerando distâncias suficientes para a formação da micela.

- **PME=yes**: Utiliza o método *Particle Mesh Ewald* (PME) para a definição da malha e cálculo de iterações de longa distância.

Os parâmetros **PMEGridSpacing=1.0** e **fullElectFrequency=1** são usualmente utilizados para definir o espaçamento dos pontos da malha em angstroms e o intervalo de cálculo das iterações não ligadas em número de passos.

- **langevinPiston=on**: Parâmetros de controle de pressão do sistema por meio de cálculos de *Langevin Dynamics*.

No parâmetro **langevinPistonTarget=1.01325** informa-se a pressão desejada em bar.

- **rescaleTemp=293.15**: Temperatura que o sistema é mantido por meio de temperaturas re-escaladas.

O parâmetro **rescaleFreq=1** informa a frequência, em passos de integração, na qual as velocidades do sistema são re-escaladas.

- **dcdfreq=1000**: Frequência, em passos de integração, de gravação da configuração da simulação no arquivo binário de coordenadas. Demais saídas são definidas nessa frequência nos demais parâmetros.

A dinâmica acelerada foi configurada com os seguintes parâmetros:

- **accelMD=on**: Especifica ao programa que a dinâmica acelerada será ativada.
- **accelMDdih=on**: Especifica que os impulsos de energia ocorrerão na energia potencial diedral.
- **accelMDE=5350**: Especifica o limiar de energia potencial diedral aceito. Valor é média da energia potencial diedral das moléculas de dhmt livre no sistema **sys-ConcB** equilibrado.
- **accelMDalpha=29**: Fator de aceleração. Um quarto do número de moléculas no sistema.

A Tabela 2.2, a Tabela 2.3 e a Tabela 2.4 apresentam os parâmetros que variam entre as preparações dos sistemas de simulação e entre as dinâmicas de validação e efetivas, respectivamente, descritas nesse capítulo.

Tabela 2.2: Tabela de parâmetros variantes entre as preparações dos sistemas das dinâmicas moleculares efetuadas no trabalho.

Identificador	Grupo Molecular		Solvatação		Ionização		Sistema de Simulação				
	N_m^a	N_m^a	N_m^a	pad^c	íons	C_{ion}	N_{at}^b	$R_{H_2O/soluto}^d$	C_{soluto}^e		
	dhmt	act	TIP3	(A)		(mol/L)	sys	dhmt	acetato	dhmt	acetato
act livre	0	1	325	15	NaCl	0.15	985	<i>nd</i>	325	0	0.1376
dhmt livre	1	0	1852	15	NaCl	0.15	5612	1852	<i>nd</i>	0.0241	0
1-dhmtAc	1	1	1864	15	NaCl	0.15	5656	1864	1864	0.0210	0.0210
4-dhmtAc	4	4	3482	15	NaCl	0.15	10666	870	870	0.0514	0.0514
hem-micela	63	63	35707	25	NaCl	0.15	110662	566	566	0.0789	0.0789
whol-micela	116	131	40528	25	NaCl	0.15	127852	349	309	0.1280	0.1445
sys-Conca	116	131	40274	25	I_s	C_s	127344	347	307	0.1287	0.1454
sys-ConcB	116	131	47789	28	I_s	C_s	149931	411	364	0.1085	0.1226
re-Temp	116	131	47789	28	I_s	C_s	149931	411	364	0.1085	0.1226
ac-DMd	116	131	47789	28	I_s	C_s	149931	411	364	0.1085	0.1226
rand-Start	52	52	19182	12	I_s	C_s	60423	368	368	0.1212	0.1212

^a Número de moléculas; ^b Número de átomos; ^c *Padding* relativo ao grupo molecular utilizado;

^d Razão do número de moléculas de água por moléculas de soluto; ^e Concentração molar de soluto relativo à água (mol/Vol_{H₂O});

I_s Conjunto de sais do sangue: {NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂}; C_s Conjunto de concentrações: {0.15, 0.005, 0.002, 0.002} (mol/L);

nd Não definido.

Tabela 2.3: Tabela de parâmetros variantes nas configurações das DMs de validação de parâmetros do trabalho

Identificador	Configuração de simulação							
	Minimização		Aquecimento		Evolução Dinâmica			
	H2O T_s (ps)	Sistema T_s (ps)	T_0 (K)	T_f (K)	Sistema T_s (ps)	Sistema T_s (ns)	Sistema T_s (ns)	
act livre	100	100	298.00	298.00	500	500	-	
dhmt livre	100	100	298.00	298.00	500	500	5	
1-dhmtAc	100	100	298.00	298.00	500	500	5	
4-dhmtAc	100	100	277.15	310.00	500	500	5	
hem-micela	100	100	283.15	293.15	500	500	10	
whol-micela	100	100	283.15	293.15	500	500	10	

T_s Tempo de simulação em: picosegundo (ps) e em nanosegundo (ns);

T_0 Temperatura inicial do sistema em Kelvin (K);

T_f Temperatura final do sistema em Kelvin (K).

Tabela 2.4: Tabela de parâmetros variantes nas configurações das DMs efetivas do trabalho

Identificador	Configuração de simulação									
	Minimização		Aquecimento			Equilibrção		Produção		
	H2O T_S (ps)	Sistema T_S (ps)	T_0 (K)	T_f (K)	Sistema T_S (ps)	Sistema T_S (ns)	Sistema T_S (ns)	Sistema T_S (ns)	Sistema T_S (ns)	Sistema T_S (ns)
sys-ConcA	100	100	283.15	293.15	500	35	-	-	-	-
sys-ConcB	100	100	283.15	293.15	500	60	40	-	-	-
re-Temp ¹	-	-	293.15	309.15	1000	20	-	-	-	-
ac-DMd ²	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-
rand-Start	100	100	293.15	309.15	500	60	40	-	-	-

T_S Tempo de simulação em: picosegundo (ps) e em nanosegundo (ns);

T_0 Temperatura inicial do sistema em Kelvin (K);

T_f Temperatura final do sistema em Kelvin (K).

¹ A simulação não contém minimização, pois constitui parte de uma segunda termalização sobre o sistema equilibrado (80ns) de sys-ConcB.

² A simulação não contém minimização ou termalização, pois trata-se de uma dinâmica acelerada a partir do sistema equilibrado (100ns) de sys-ConcB.

A Figura 2.4 esquematiza a linha do tempo das dinâmicas efetivas efetuadas no trabalho. Cada parte especificada permite a comparação entre sistemas ou/e expressão de bifurcações nas dinâmicas efetuadas.

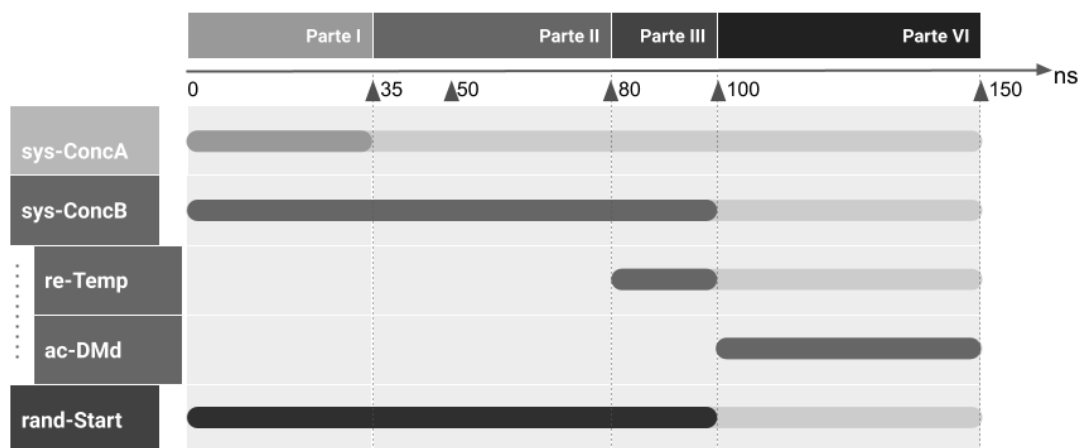


Figura 2.4: Linha do tempo das dinâmicas efetivas realizadas no trabalho. As dinâmicas **re-Temp** e **ac-DMd** são sub-dinâmicas de **sys-ConcB** e por isso apresentam tabulação na tabela. A Parte I resulta na comparação entre os sistemas de **sys-ConcA** e **sys-ConcB**. A Parte II resulta em uma bifurcação na dinâmica **sys-ConcB** em uma cópia do sistema que passa por uma segunda termalização para elevação da temperatura - **re-Temp**. A Parte III resulta na comparação entre os sistemas **sys-ConcB** e **re-Temp**, bifurcação do sistema **sys-ConcB** para uma simulação com dinâmica acelerada - **ac-DMd** - e comparação entre os sistemas **sys-ConcB** e **rand-Start**. A Parte VI resulta na análise do espaço conformacional na busca por estabilidade via dinâmica acelerada - **ac-DMd**.

2.9 Análise e Extração de Energias do Sistema

Um dos tipos de resultado de uma dinâmica molecular consiste de um arquivo de trajetória dos átomos do sistema. Por sua extensão, os arquivos são gerados e apresentados como um arquivo binário de extensão *.dcd*. Com os parâmetros indicados nas dinâmicas, cada 5ns de dinâmica dos sistemas tratados geram 2.500 *frames* de gravação, que são aproximadamente 4Gb de dados binários. Carregar a dinâmica inteira para a memória RAM e visualizar de forma geral é impraticável, já que carregar 5ns já ultrapassam 8Gb de memória RAM na visualização pelo VMD. Dessa forma, as estratégias de análise passam por métodos de

análise por subconjunto. Os *scripts* gerados na pesquisa auxiliam na aplicação sistemática das estratégias de geração de dados e análise de resultados.

O *NAMDEnergy* é um *plugin* para avaliação de energia em dinâmicas moleculares. A ferramenta calcula as energias potenciais solicitadas em cada *frame* especificado da dinâmica. Por meio de seleções de tipos de átomos específicos é possível calcular as energias potenciais associadas a subconjuntos de moléculas desejadas. Um *script* foi criado como uma forma sistemática de lidar com os arquivos de trajetória gerados nas dinâmicas. O algoritmo é apresentado no Apêndice A.2. O algoritmo carrega na memória os arquivos de trajetória da pasta `./do_conf`, juntamente com o arquivo de topologia `.psf`. Uma seleção de moléculas é realizada. Para esse estudo, seleciona-se as moléculas de dhmt livre, nomeadas "ART" no arquivo de topologia. Então, o *script* executa o *plugin* do NAMD passando como parâmetro a seleção efetuada e o arquivo de parametrização `.par` utilizado na dinâmica molecular. Como saída, temos os arquivos com as energias potenciais da seleção durante cada *frame* gravado da dinâmica.

2.10 Análise de Agrupamentos Moleculares

Uma vez que as micelas podem variar o seu tamanho e conformação durante a simulação, cabe acompanhar o número de moléculas que participam de cada estrutura estável na trajetória calculada. A proposta seria acompanhar a evolução dessas organizações durante a dinâmica com o uso de algoritmos de agrupamento (clusterização). Como discutido por *Johnston, M. A. et al.* (JOHNSTON et al., 2016), a estratégia utilizada deve levar em consideração o tamanho de suas moléculas e informações de proximidade entre elas. Neste cenário, cada molécula de dhmt livre poderia ser representada pela posição espacial de um de seus átomos (*e.g.*, um nitrogênio por estar localizado na parte hidrofílica da molécula). Porém, o comprimento da molécula de dhtAc livre permite que haja agrupamentos de moléculas sem que suas cabeças hidrofílicas estejam extremamente próximas uma das outras. Para melhorar os resultados, foi proposto um modelo de representação computacional baseado no centro de massa de cada molécula de dhmt livre. Essa estratégia aproxima os pontos de representação das moléculas em uma micela para o centro de massa da própria micela.

Partindo desse modelo de representação molecular, é necessário escolher um algoritmo de agrupamento. Como não se conhece os tamanhos das micelas a priori, deve-se utilizar técnicas de clusterização para agrupar os pontos representativos (de cada molécula) por meio de algoritmos como o DBSCAN (*Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise*). O DBSCAN (ESTER et al., 1996) foi escolhido por não demandar previamente o número de grupos a serem formados, o que é de suma importância nesse cenário, no qual não temos o controle da quantidade de agregados/micelas a serem formadas. Neste agrupamento, o número de grupos teria relação com o número de agregados/micelas formadas e o tamanho dos grupos teria relação com o número de moléculas em cada micela, valores que aproximam o número de agregação do composto em questão. Além disso, o algoritmo permite a existência de *outliers*, não forçando a criação de grupos desnecessários e permitindo a identificação de moléculas que se desprendem de seus agrupamentos durante a simulação. Para isso, o DBSCAN requer dois (2) parâmetros de entrada: `min_samples` (`minPts`) que determina o mínimo de pontos para definir uma região densa (um *cluster*) e ϵ (`eps`) que determina o raio de vizinhança de busca com relação a cada ponto de um *cluster*. Um esquema do funcionamento é descrito na Figura 2.5. O primeiro parâmetro, de fato, ajuda no controle da contagem dos agrupamentos, pois é possível definir o tamanho mínimo dos agrupamentos de interesse. O segundo parâmetro apresenta maiores dificuldades na definição, pois exige um *cutoff* para a consideração de um ponto (molécula) em um grupo. Os valores utilizados partem da literatura, como descrito por Marrink S. et al. (MARRINK; TIELEMAN; MARK, 2000), e de observações em dinâmicas menores efetuadas durante a pesquisa.

As análises de agrupamento são executadas por um *script* em Python3. Foram utilizadas as bibliotecas `sklearn` para o pré-processamento e agrupamento dos dados e `mdtraj` para o auxílio na manipulação dos arquivos binários de trajetória (*.dcd*) com resultados da dinâmica. A estratégia de análise aplica o agrupamento em intervalos de 50 *frames*. Dessa forma, a amostragem de configurações do sistema estudada é de 50 *frames* por nanosegundo de dinâmica. O algoritmo criado recebe um arquivo com os nomes dos arquivos de trajetória para auxiliar na ordem na qual os agrupamentos e gráficos de dispersão são gerados. O código inclui um dicionário com as massas dos átomos para

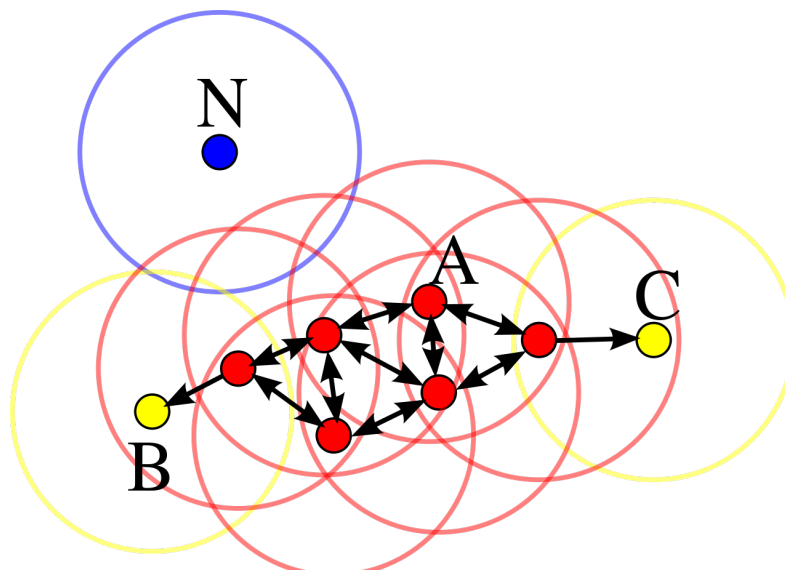


Figura 2.5: Esquema de funcionamento do algoritmo de agrupamento DBSCAN. Neste exemplo, $\text{minPts} = 4$. O ponto **A** e os outros pontos vermelhos são pontos centrais, porque a área que circunda esses pontos em um raio ϵ contém pelo menos 4 pontos (incluindo o próprio ponto). Já que todos os pontos vermelhos são alcançáveis entre si, eles formam um único *cluster*. Os pontos **B** e **C** não são pontos centrais, mas são alcançáveis a partir de **A** (alcançáveis através de outros pontos centrais) e portanto, também pertencem ao *cluster*. O ponto **N** é um ponto de ruído que não é nem um ponto central nem diretamente acessível.

cálculo do centro de massa de cada uma das moléculas em cada *frame*. O agrupamento é realizado em um espaço tridimensional por meio do DBSCAN com parâmetros $\text{eps}=0.33$ e $\text{min_samples}=3$. Os grupos observados são divididos em 5 classes, em uma adaptação do proposto por (MARRINK; TIELEMAN; MARK, 2000): `small_clst` (de 2 a 4 moléculas), `intermediate_clst` (5-8), `large_clst` (9-15), `micelles` (16-31) e `large_micelles` (32 ou mais moléculas). O *script* em *Python* em questão é apresentado no Apêndice A.3 desse trabalho.

3 Resultados e Discussão

Este capítulo é destinado a apresentar os resultados obtidos e as discussões envolvendo comparações entre os sistemas simulados. A apresentação dos dados segue a ordem exposta no Capítulo 2. Primeiramente, serão apresentados os resultados dos testes computacionais para a validação dos modelos criados e das estruturas micelares construídas. Em seguida, serão apresentados os resultados das dinâmicas efetivas, incluindo dados de energia e análise de agrupamento de moléculas nas dinâmicas. Comparações serão efetuadas assim que os resultados forem apresentados. Os resultados demonstram os primeiros *insights* sobre o número de agregação e concentração micelar do composto estudado.

3.1 Validação da Parametrização Molecular

A partir do processo descrito, foi possível obter os dados necessários para estudos preliminares sobre o composto dhmtAc. O comportamento do acetato em `act livre` foi constante e estável durante toda a simulação. Observando o comportamento do dhmt em `dhmt livre` durante a evolução do sistema, percebeu-se modificações estruturais devido ao comprimento de cadeia de carbono. Foram observadas interações de curto alcance entre moléculas de água e o anel aromático do dhmt livre com tempo de permanência de aproximadamente 200ps. As interações com os íons apresentaram uma permanência de 400ps. De forma geral, a estrutura se mostrou pouco estável sozinha.

Na simulação do complexo dhmtAc em `1-dhmtAc`, foi possível observar o alinhamento do acetato com o anel da molécula, como mostrado na Figura 3.1. Além disso, houve interação eletrostática entre o acetato e o radical hidroxila da molécula. O composto demonstrou certo aumento de estabilidade estrutural com relação aos resultados para `dhmt livre`, porém essa estabilidade não se manteve durante toda a dinâmica.

Na simulação do sistema com quatro (4) moléculas de dhmtAc em `4-dhmtAc`, foi possível observar interação entre as moléculas de dhmt livre no decorrer da evolução do sistema. A configuração do sistema oscila entre estados de interação entre duplas de

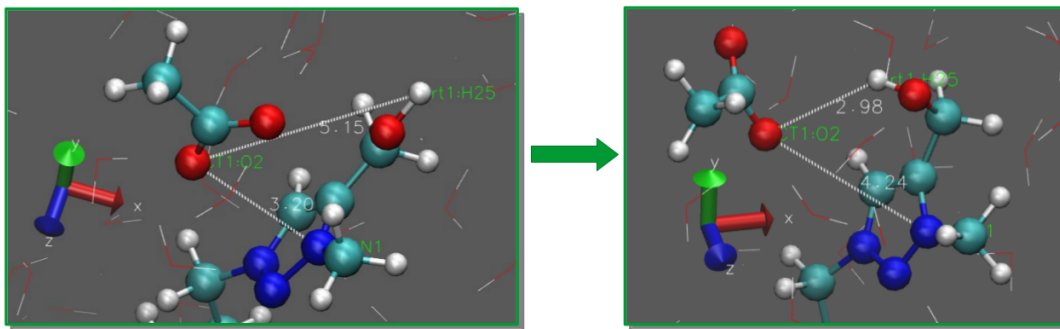


Figura 3.1: Alinhamento entre a molécula de acetato e ambos anel aromático e radical hidroxila no sistema 1-dhmtAc. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco hidrogênios. A linha tracejada em branco indica a distância entre os átomos medida em ångström (Å).

moléculas e estado de dispersão homogênea de moléculas. A Figura 3.2 mostra alguns estados do sistema durante os 5ns simulados. O Apêndice A.5 apresenta um gráfico de distâncias entre todas as combinações dois a dois de molécula de dhmt livre nesse sistema, corroborando com a oscilação de estados de interação descrita. Um resultado de tendência geral pode ser observado no Apêndice A.4 que apresenta o gráfico de dispersão entre moléculas de dhmt livre durante a dinâmica. O gráfico mostra que com maior frequência moléculas de dhmt livre são encontradas próximas uma das outras (entre 3 – 12Å) do que separadas durante os 5ns de simulação.

Foi observado que os acetatos ficam livres no sistema e interagem consideravelmente menos com as moléculas de dhmt livre em relação como o dhmt livre interage com seus pares. O Apêndice A.3 apresenta o gráfico de dispersão entre moléculas de acetato e dhmt livres durante a dinâmica. As frequências observadas são mais distribuídas pelo eixo de distâncias. O pico apresentado tem frequência inferior à apresentada no Apêndice A.4 e se mantém por uma faixa relativamente menor.

Conforme esperado, foi possível observar maior estabilidade nos agrupamentos das moléculas em um sistema com maior número de moléculas do composto, em relação às simulações iniciais. As iterações observadas e resultados obtidos foram suficientes para validar, *a priori*, a parametrização computacional proposta. Validações posteriores devem envolver maior quantidade de dados experimentais. Contudo, as interações entre as moléculas dos sistemas revelam características esperadas em uma parametrização correta do composto.

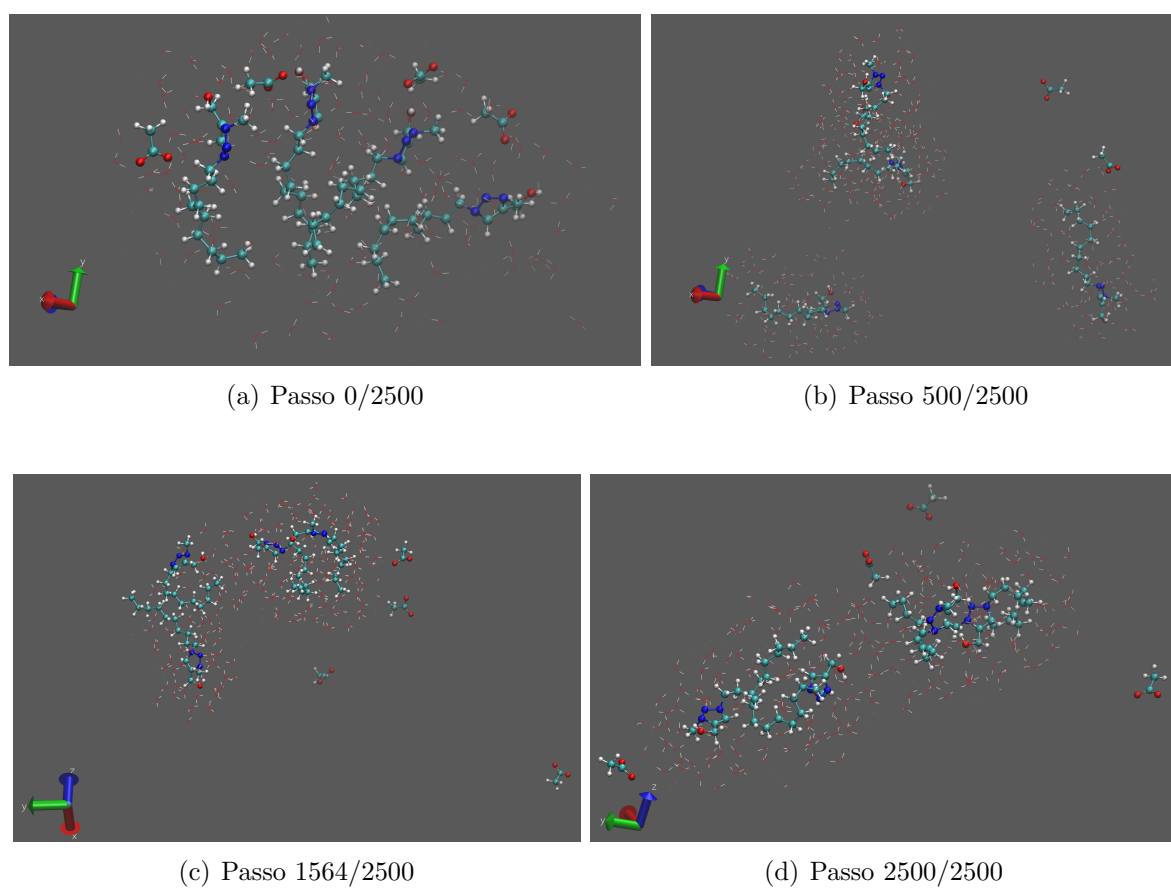


Figura 3.2: Resultados dos 5ns de evolução do sistema 4-dhmtAc. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio.

3.2 Dinâmicas de Validação da Micela

3.2.1 DM1: Hemisfério Micelar - hem-micela

Nesta subseção, será apresentado o processo para a obtenção dos resultados das simulações do sistema **hem-micela**. A ilustração da configuração inicial do sistema está presente na Figura 3.3.

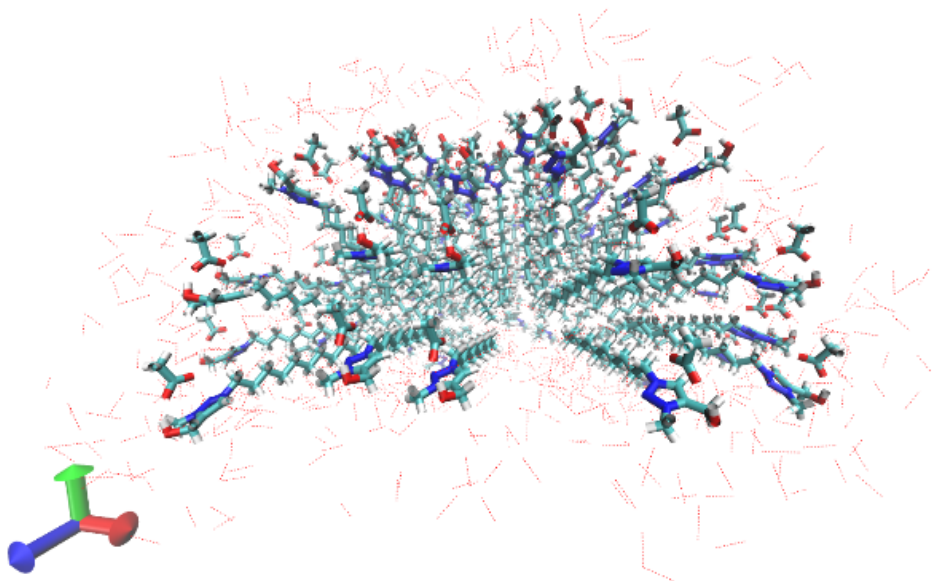


Figura 3.3: Configuração inicial do sistema de simulação de um hemisfério da micela - sistema **hem-micela**. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio.

Os resultados mostraram um desmonte da conformação original do hemisfério da micela, porém apresentou a reorganização das moléculas na formação de micelas menores (contendo menos moléculas de **dhmtAc** livre). Esse comportamento pode ser observado na apresentação dos resultados na Figura 3.4 que apresenta alguns *frames* da minimização do sistema, termalização e dos primeiros cinco (5) nanossegundos da dinâmica.

A reorganização e permanência dos agregados observados é corroborada pelo Apêndice A.6 que mostra o gráfico de dispersão para o sistema **hem-micela** durante os primeiros 5ns de simulação. A tendência de proximidade entre moléculas de **dhmt** livre durante a dinâmica se mostra semelhante ao apresentado no Apêndice A.4 para **4-dhmtAc**. A faixa de manutenção do pico observado (entre 3 – $\sim 18\text{\AA}$), contudo, é maior que em **4-dhmtAc**, uma vez que o decaimento da função de dispersão se mostra mais suave.

A Figura 3.5 mostra a elevação da temperatura dos átomos do sistema durante a fase de termalização. O gráfico indica que o sistema conseguiu atingir a temperatura desejada e efetuar uma estabilização inicial característica de uma termalização correta. Ao final dos 5ns da dinâmica de evolução, algumas hipóteses devem ser testadas: seria a reorganização em micelas menores um estado de minimização do sistema (em estabilidade) ou um estágio intermediário para a reorganização de uma micela contendo todos as moléculas no sistema? Aumentando o tempo de simulação - 5-10ns - pode-se observar

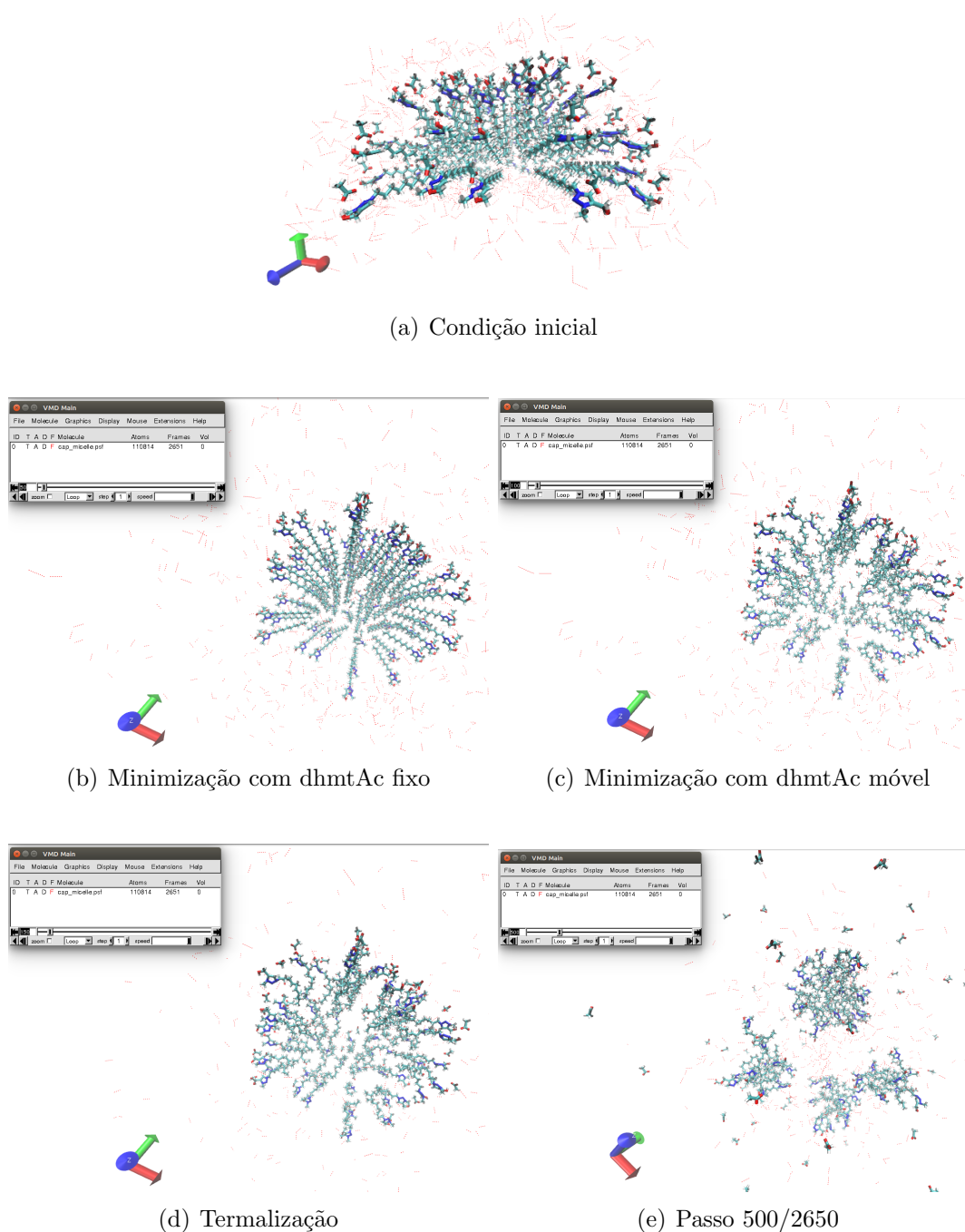


Figura 3.4: Resultados dos primeiros 5 ns da dinâmica molecular do sistema DM1.

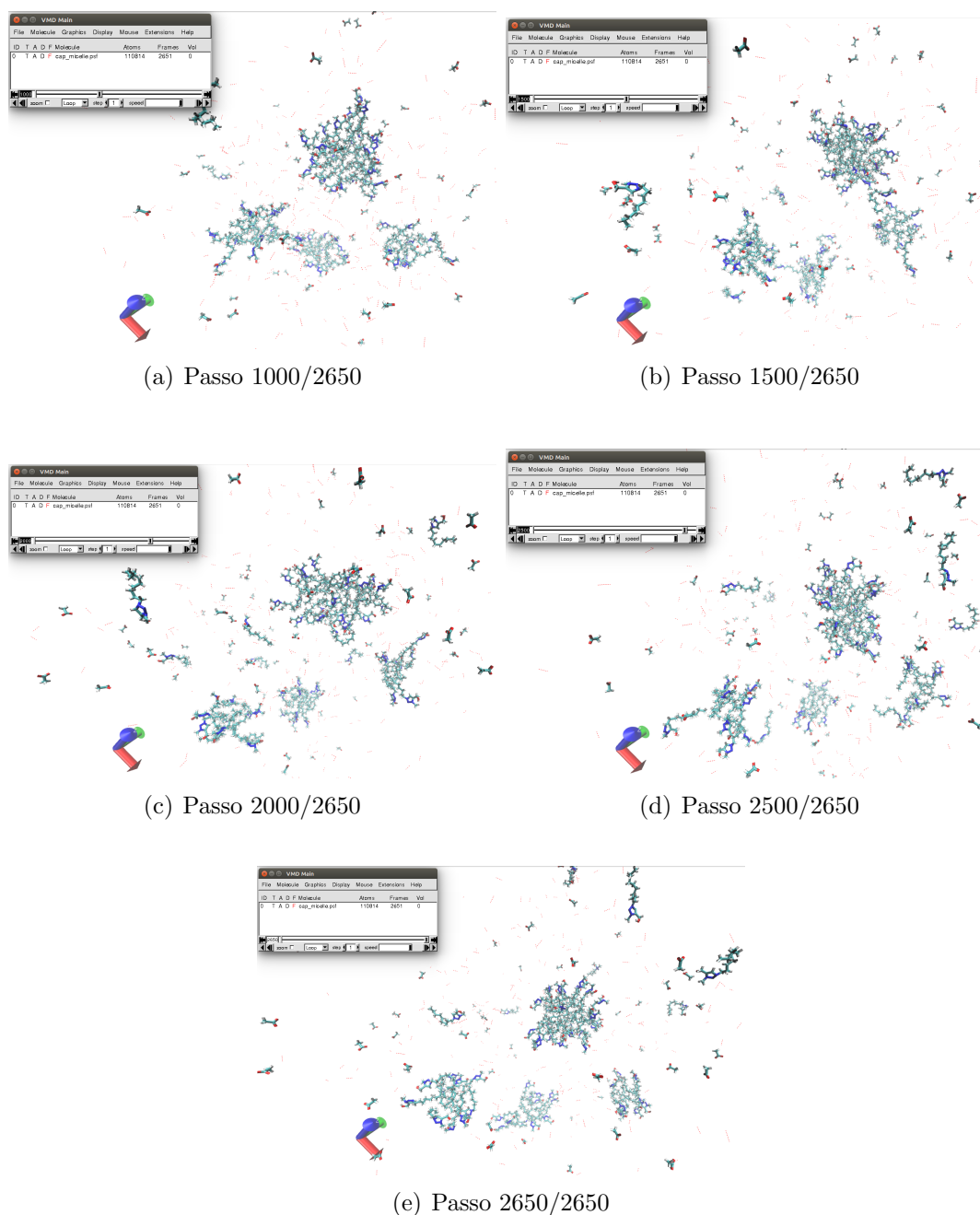


Figura 3.4: Resultados dos primeiros 5 ns da dinâmica molecular do sistema DM1 (cont.).

que o sistema reduz sua taxa de desmonte e se mostra em caminho de estabilização com agrupamentos de diferentes tamanhos e algumas moléculas não agrupadas de dhmt livre.

É característico do sistema as moléculas de acetato se desprenderem de sua interação eletrostática com as moléculas de dhmt livre, como já havia indicado os resultados do sistema 4-dhmtAc. A distribuição das moléculas de acetato com a evolução do sistema se mostra homogênea. Existe uma concentração levemente maior de íons ao redor das micelas formadas. Isso se dá pela carga positiva na cabeça hidrofílica da molécula de dhmt livre.

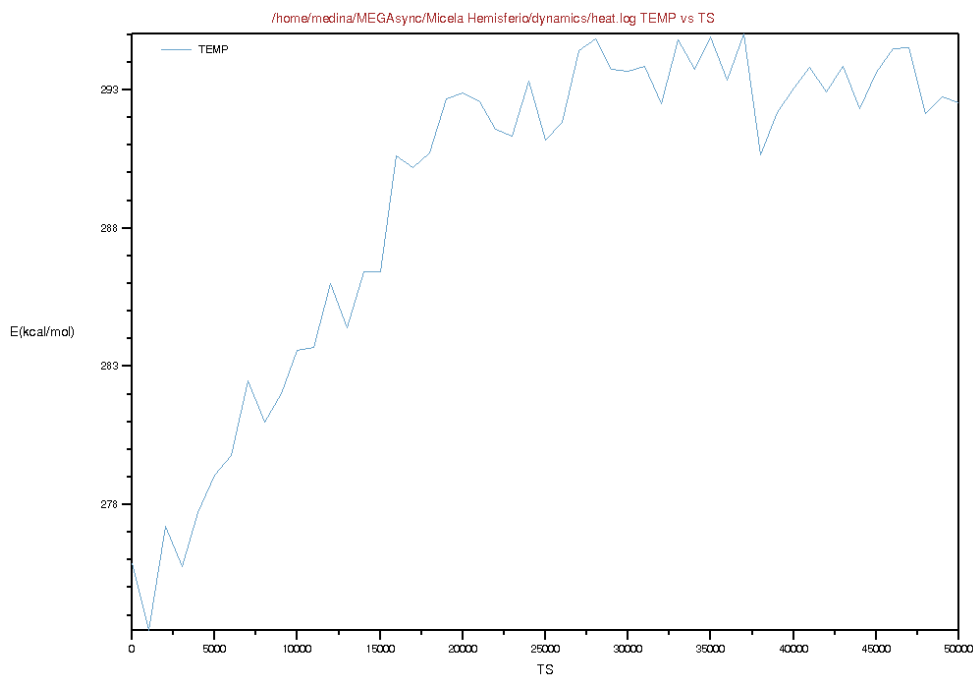


Figura 3.5: Gráfico de temperatura (kcal/mol) por *frame* gravado do sistema hem-micela durante a fase de termalização.

A análise das propriedades energéticas do sistema partem da retirada de águas, íons e acetatos do sistema. O motivo da seleção de moléculas de dhmt livre do sistema se dá por conta dessas moléculas serem as formadores de micelas na simulação. As trajetórias calculadas para essas moléculas foram mantidas e as energias potenciais calculadas pela ferramenta *NAMD Energy*. Os gráficos da Figura 3.8 mostram as energias em kcal/mol em cada *frame* gravado da dinâmica, assim como explicado na Seção 2.9. As grandezas expostas são de Energia de Ligação, Energia Angular, Energia de Diedrais, Energia Total, Energia de Conformação, Energia de Interações Não-ligadas, VdW e Energia Eletrostática. Os gráficos apresentam início de uma estabilidade das propriedades do sistema, ou seja, uma posterior evolução do sistema apresentaria comportamento passível de aproximar comportamentos do sistema biológico. A estabilidade das energias do sistema garante que estudos estruturais de agrupamento de moléculas possam ser efetuados sobre os dados gerados. Em especial, é válido ressaltar como ocorre o processo de estabilização da energia eletrostática das moléculas. Diferente das outras grandezas que apresentam estabilização mais rápida, a energia eletrostática passa por um processo gradativo de estabilização por conta da reorganização das moléculas de dhmt. Por apresentar tendência próxima da energia total do sistema, ela parece guiar todo o processo de estabilização na dinâmica.

A energia de Van der Waals (VdW) cresce durante a evolução do sistema. É sugerido um maior tempo de simulação para avaliar a ocorrência de uma maior estabilidade energética do sistema.

A ilustração do sistema final, após os 10 ns de simulação, está presente na Figura 3.6. Pode-se observar dois conjuntos de moléculas agregadas em micelas, além de moléculas de dhmtAc livres soltas pelo sistema. Eventualmente, durante a simulação, grupos menores (contendo entre 2 e 8 moléculas) surgem e voltam a se desfazer, seguindo um processo oscilatório como o apresentado em 4-dhmtAc. Tudo indica que grupos com poucas moléculas não são estáveis e não indicam número de agregação próximo do valor que gera estabilidade para o sistema biológico. Os agrupamentos estáveis nesse período de evolução do sistema tem composição molecular na faixa de 16-31 moléculas.

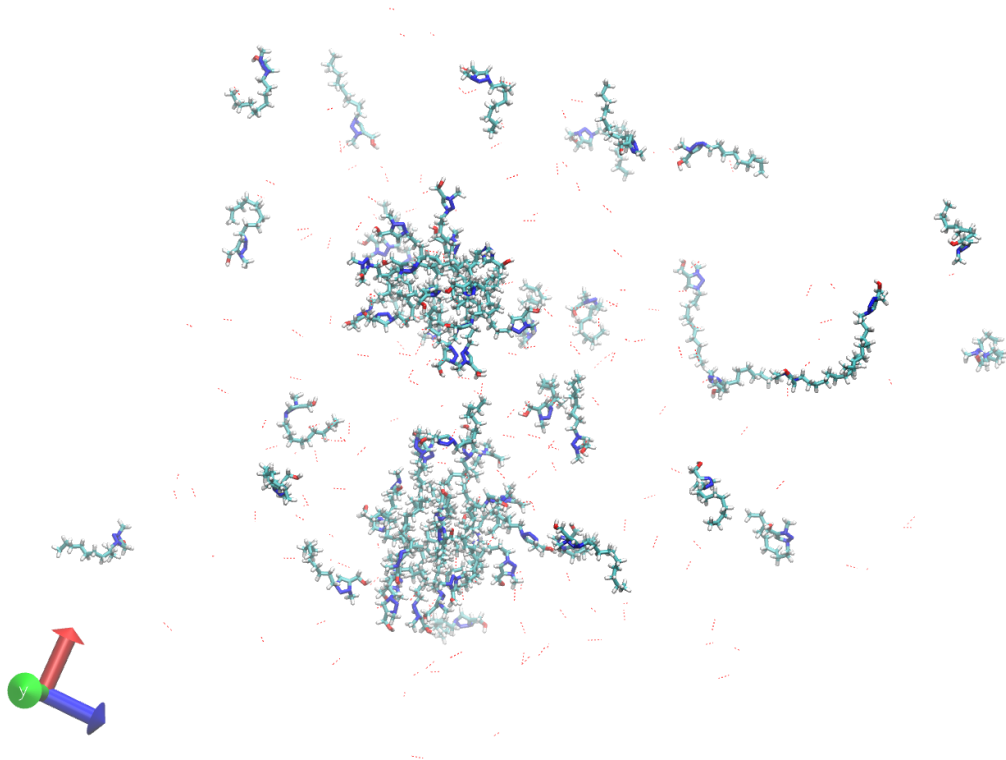


Figura 3.6: Configuração final (10ns) do sistema de simulação *hem-micela*. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio.

A Figura 3.7 apresenta a evolução dos agrupamentos formados durante a dinâmica. Cada molécula foi representada pelo seu centro de massa. Os dados foram retirados a cada 50 *frames* gravados da dinâmica de produção. Cada valor de 50-*frame* indica 0.1ns de simulação. Os parâmetros seguem como descrito na Seção 2.10. Os tamanhos dos

grupos formados foram separados em faixas para facilitar o entendimento dos resultados - descrição adicional na legenda na figura.

Na Figura 3.7, os primeiros dois (2) nanossegundos apresentam comportamento bem caótico com relação à formação de grupos. Nos nanossegundos subsequentes o sistema tende a se estabilizar com duas micelas de tamanho constante (contendo de 16 a 31 moléculas) e oscilações na presença de pequenas micelas. Em breves momentos as duas micelas formadas interagem formando uma grande micela. Essa interação acontece algumas vezes durante a dinâmica (por exemplo, *frames* 21, 27, 35, entre outros), porém parece indicar apenas uma casualidade de diminuição de distância entre os grupos, não apresentando aumento de estabilidade do sistema. Os agrupamentos gerados permanecem estáveis ao final dos 10 nanossegundos.

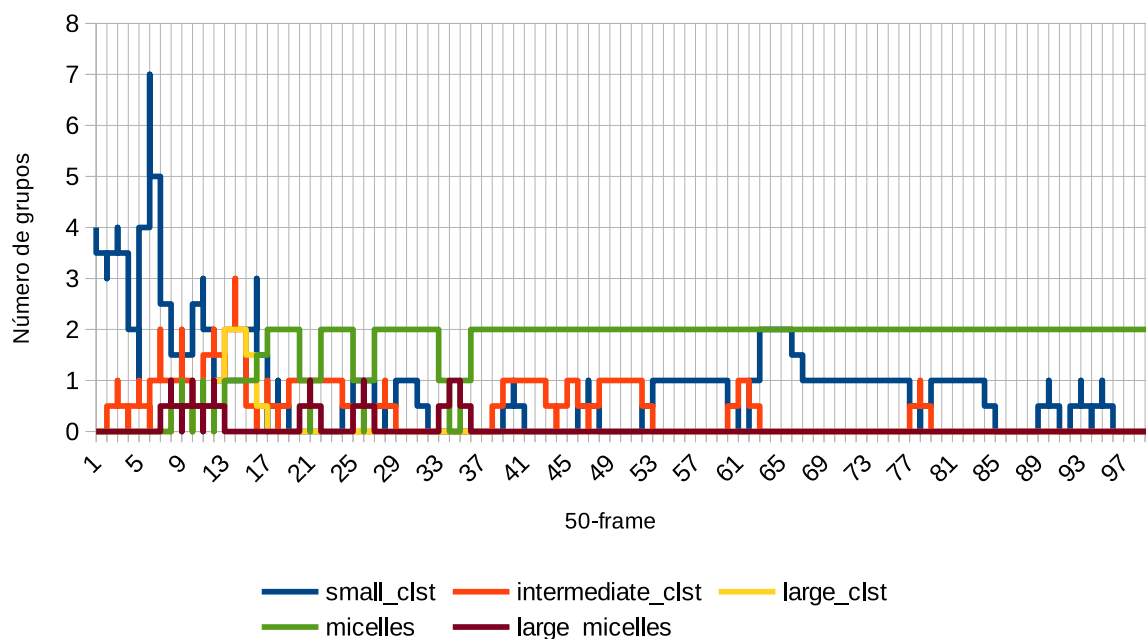


Figura 3.7: Gráfico da dinâmica de agrupamento de moléculas de dhtm livre de 0-10 ns da dinâmica molecular de produção para DM1. Agrupamento calculado em saltos de 50 *frames* no conjunto de gravação da dinâmica. O gráfico mostra os dados para 5 tamanhos de grupos: small_clst (de 2 a 4 dhtm livres), intermediate_clst (5-8), large_clst (9-15), micelles (16-31) e large_micelles (32 ou mais dhmt livres).

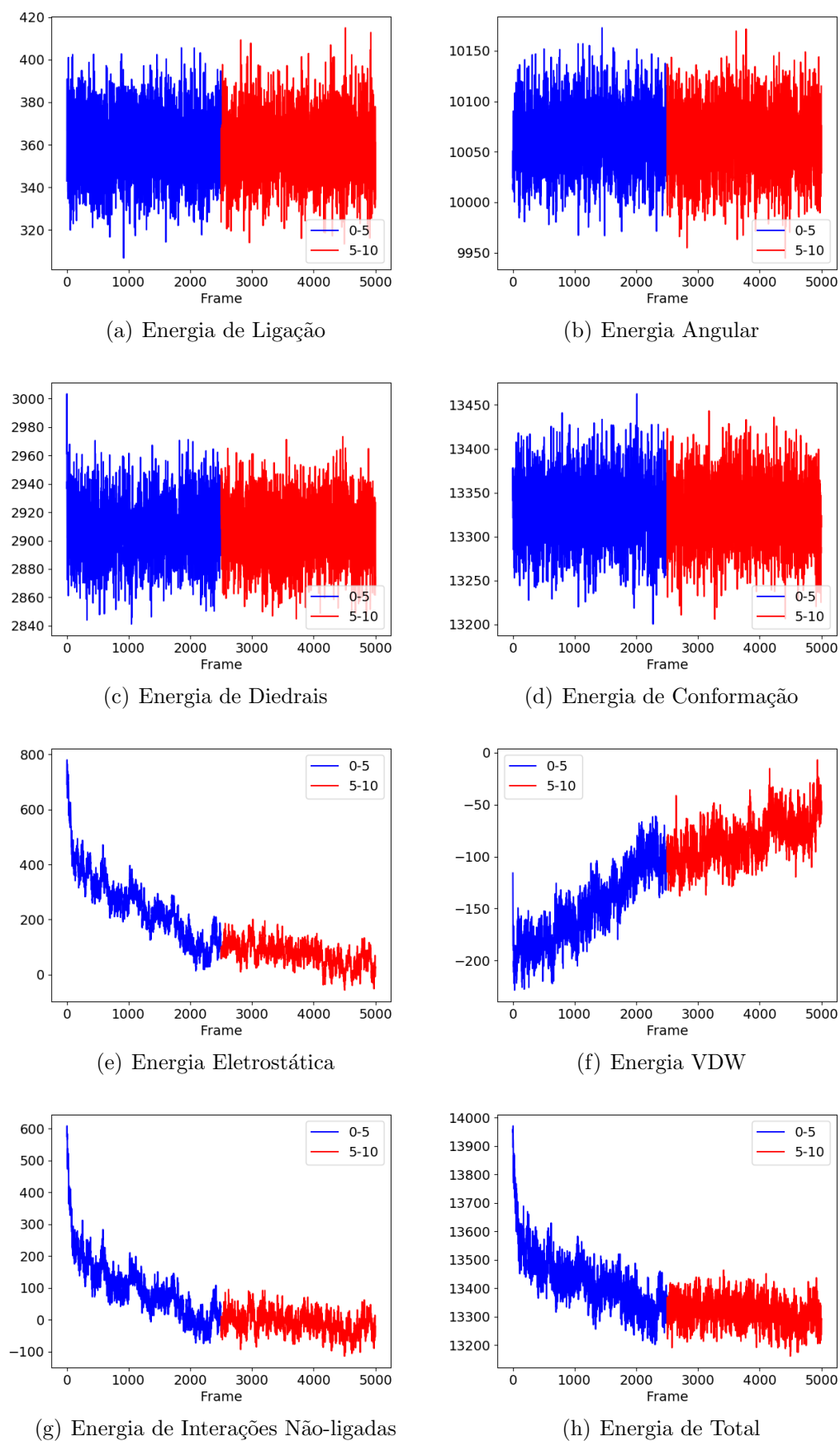


Figura 3.8: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a evolução (0-10ns) do sistema hem-micela. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução.

3.2.2 DM2: Micela Completa - whol-micela

Apresenta-se aqui os resultados das simulações do sistema `whol-micela`. A ilustração da configuração inicial do sistema está presente na Figura 3.9.

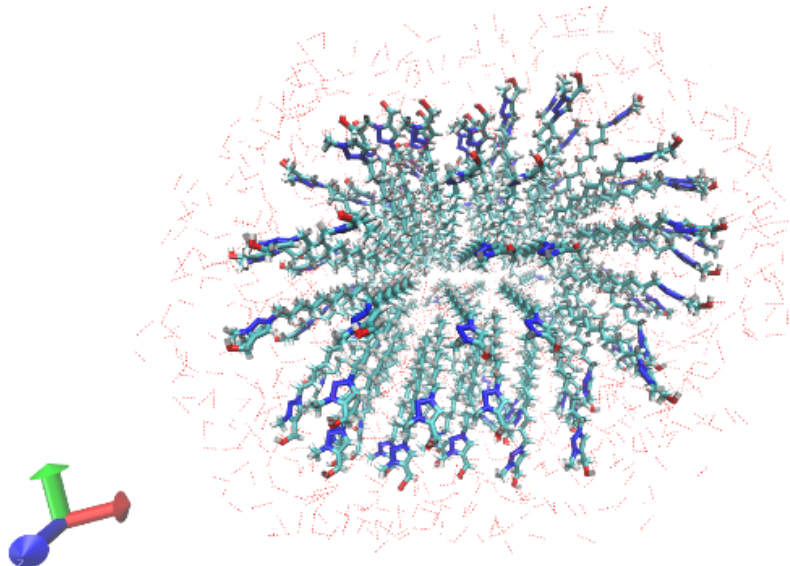


Figura 3.9: Configuração inicial do sistema de simulação da micela completa do sistema `whol-micela`. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio.

A Figura 3.10 mostra o estado de agregação das moléculas em 5ns de evolução do sistema e ao final dos 10ns efetuados. As moléculas se difundem mais com relação aos resultados obtidos com o sistema `hem-micela`. Essa observação pode ser constatada pelo gráfico de agregação da evolução do sistema na Figura 3.11. O comportamento é consideravelmente mais caótico que o apresentado nos resultados do sistema `hem-micela` e não demonstra estabilidade de agrupamentos ao final dos 10ns de evolução.

A análise das energias potenciais envolvendo as moléculas de `dhmt` livre na Figura 3.12 demonstram as mesmas tendências observadas em DM1. Os valores de energia medidos se mostram devidamente escalados em aproximadamente duas unidades na maioria das grandezas, o que era esperado, uma vez que o sistema DM2 contém aproximadamente o dobro de moléculas de `dhmt` livre que o sistema DM1. As energias mostram que o sistema não está próximo de uma possível estabilização, pois não há queda aparente da taxa de mudança das energias não estabilizadas entre os intervalos de 5ns. Esse comportamento está dentro do esperado, já que é natural que sistemas maiores demorem mais

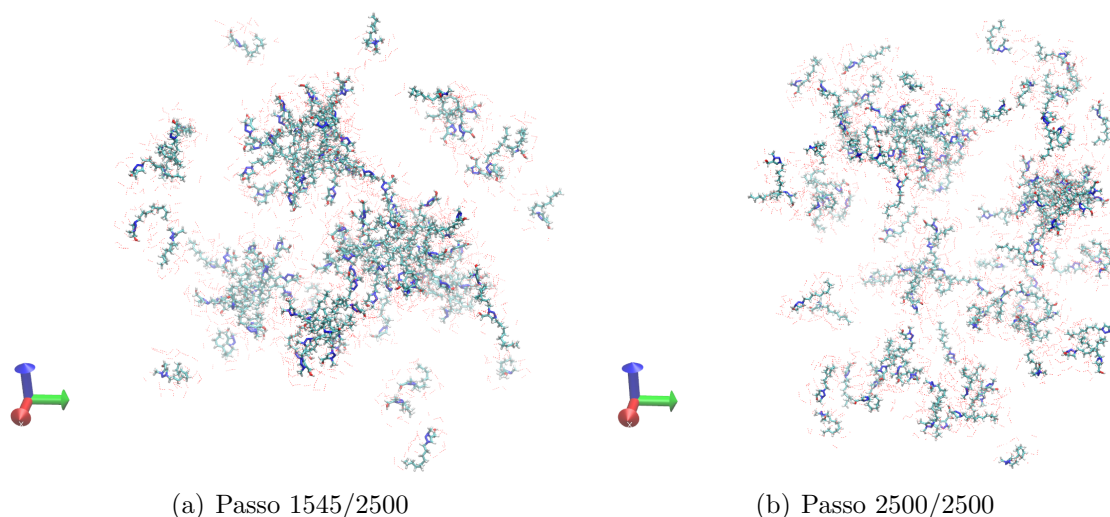


Figura 3.10: Resultados dos 5ns e 10ns de evolução do sistema `whol-micela`. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio.

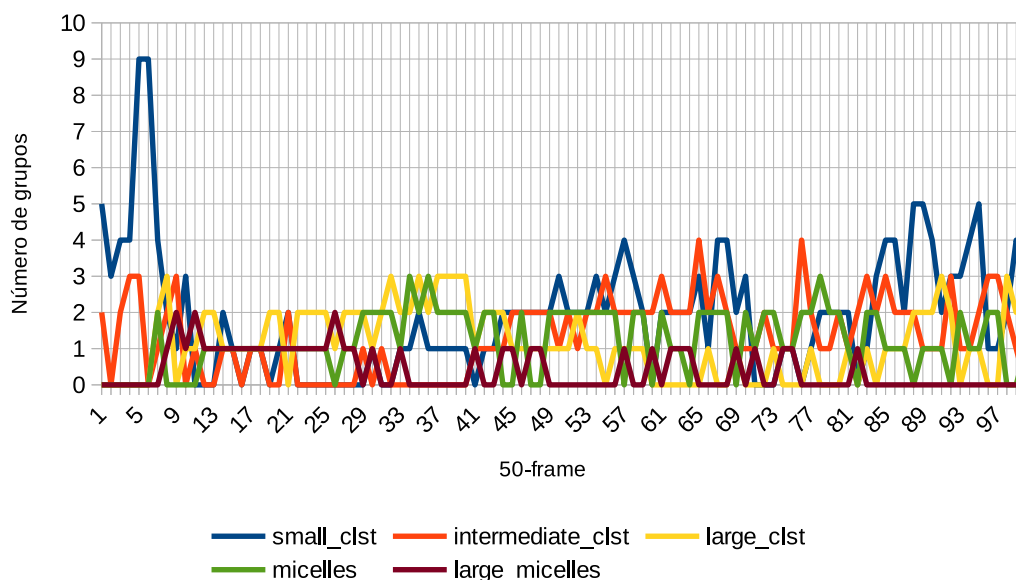


Figura 3.11: Gráfico da dinâmica de agrupamento de moléculas de `dhtm` livre de 0-10 ns da dinâmica molecular de produção para DM2. Agrupamento calculado em saltos de 50 *frames* no conjunto de gravação da dinâmica. O gráfico mostra os dados para 5 tamanhos de grupos: `small_clst` (de 2 a 4 `dhtm` livres), `intermediate_clst` (5-8), `large_clst` (9-15), `micelles` (16-31) e `large_micelles` (32 ou mais `dhtmt` livres).

que sistemas menores para se estabilizarem. Vale ressaltar que o gráfico de VDW parece subir direto para valores maiores que zero. Essa característica pode estar relacionada a uma desregulação na solvatação do sistema, ou seja, uma alta concentração de `dhmtAc` no sistema (moléculas muito próximas uma das outras). Isso pode indicar a necessidade de ajustes nas concentrações dos sistemas das próximas simulações.

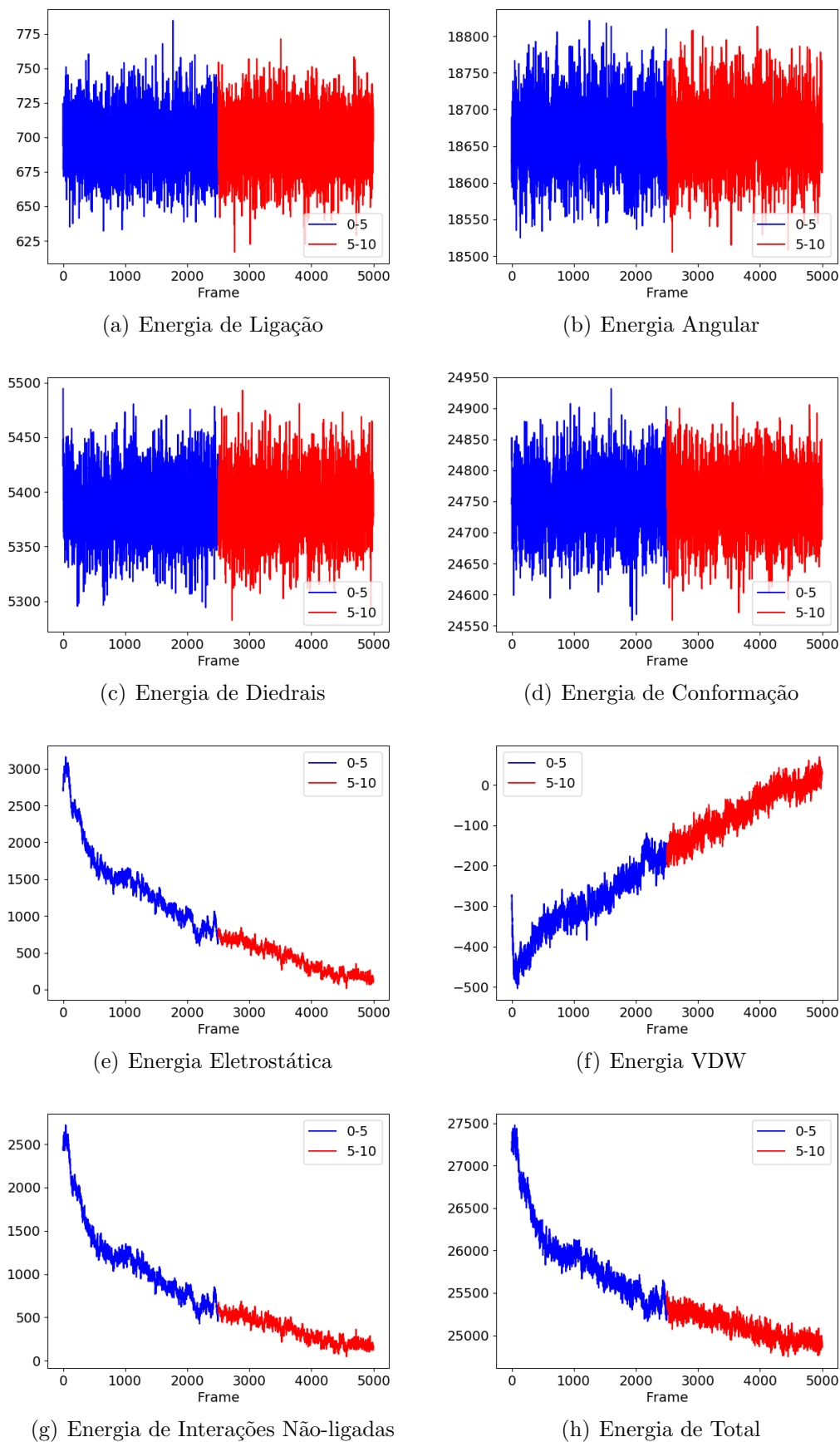


Figura 3.12: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a evolução (0-10ns) do sistema *whol-micela*. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução.

3.3 Resultados das Dinâmicas Efetivas

3.3.1 DM3: sys-ConcA

Apresenta-se aqui os resultados da simulação do sistema **sys-ConcA**. O sistema apresenta geometria próxima ao da simulação DM2, diferindo-se levemente em concentração e por DM3 possuir ionização mimética ao sangue. Por esse motivo, emite-se ilustração da geometria inicial do sistema. A Figura 3.13 expõe a configuração do sistema ao final dos 35ns de simulação. O estado final de simulação revela maior número de agrupamentos menores. Apesar disso, ainda se observa um agrupamento de tamanho considerável.

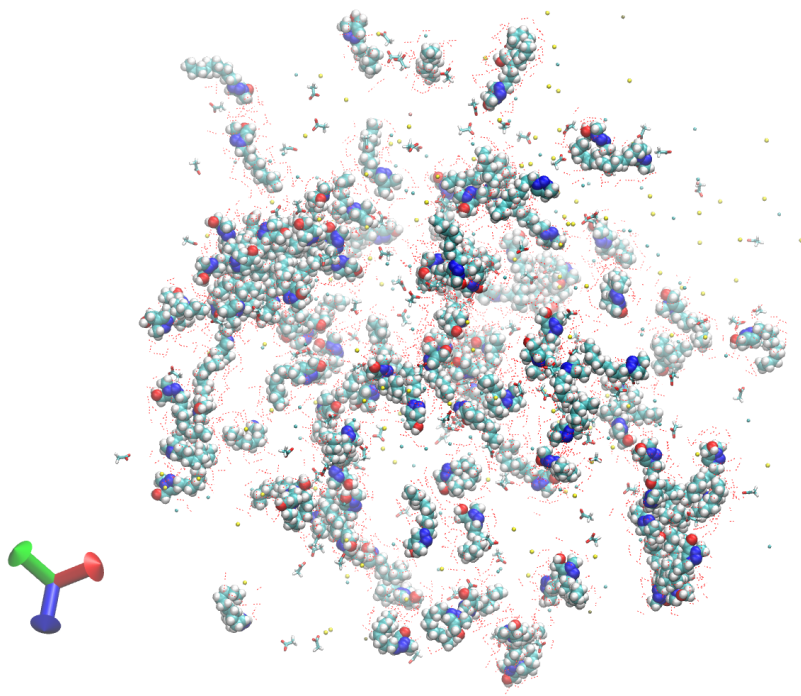


Figura 3.13: Configuração inicial do sistema de simulação da micela completa em meio sanguíneo do sistema **sys-ConcA**. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio. Moléculas de dhmt livre destacadas em visualização de esferas de VDW.

As medidas quantitativas dos agrupamentos estão dispostas no gráfico de agregação na Figura 3.14. Foi observado o aumento do número de grupos *small_clst* e *intermediate_clst* a partir do limiar de 10ns de simulação (limiar referente a `50-frame=100` do gráfico da Figura 3.14. Agregados com maior número de moléculas (*micelles* e *large_micelles*) eram mais comuns no sistema antes desse limiar. Apesar disso, é possível observar um grupo estável na faixa *micelles* até o final dos 35ns de simulação.

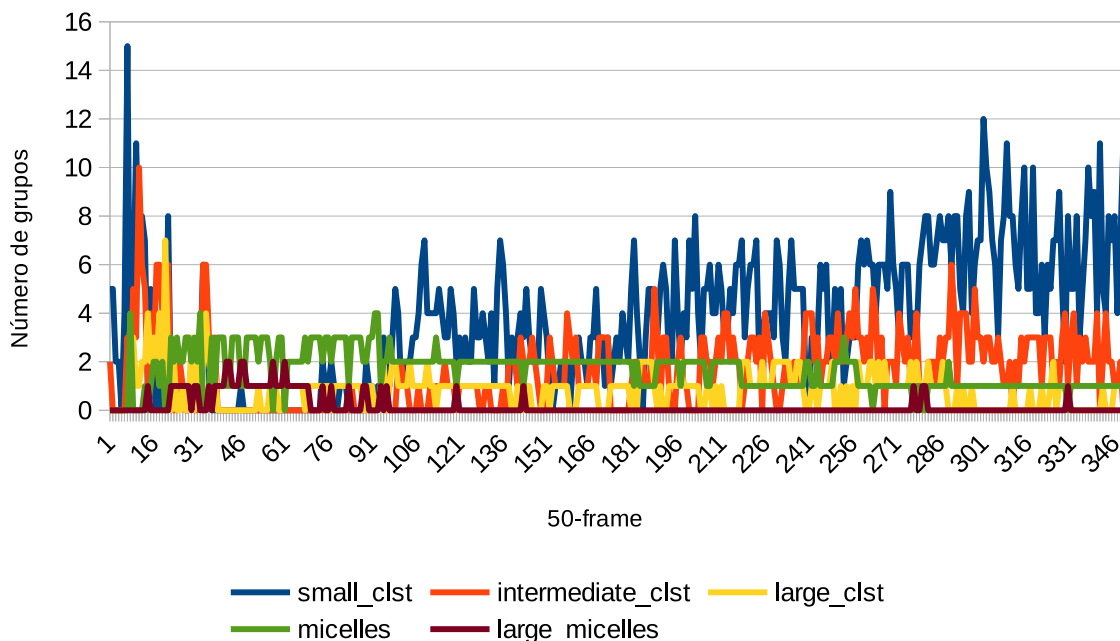


Figura 3.14: Gráfico da dinâmica de agrupamento de moléculas de dhmt livre de 0-35ns da dinâmica molecular de produção para DM3. Agrupamento calculado em saltos de 50 *frames* no conjunto de gravação da dinâmica. O gráfico mostra os dados para 5 tamanhos de grupos: *small_clst* (de 2 a 4 dhmt livres), *intermediate_clst* (5-8), *large_clst* (9-15), *micelles* (16-31) e *large_micelles* (32 ou mais dhmt livres).

A análise das energias potenciais envolvendo as moléculas de dhmt livre na Figura 3.15 demonstram as mesmas tendências observadas em DM1 e DM2. Os valores de estabilização são os mesmos observados em DM2, o que era esperado, uma vez que os sistemas possuem composições similares. Emite-se os gráficos de estabilização rápida: Energias de ligação, angular, diedral e conformacional. Os resultados demonstram uma relação direta entre a ionização do sistema e a velocidade na qual o sistema evolui para os estados de energias equilibrado, uma vez que as mesmas tendências são observadas entre DM2 e DM3, porém, nesse último, apresentando estabilização mais gradual durante os 35ns de evolução do sistema.

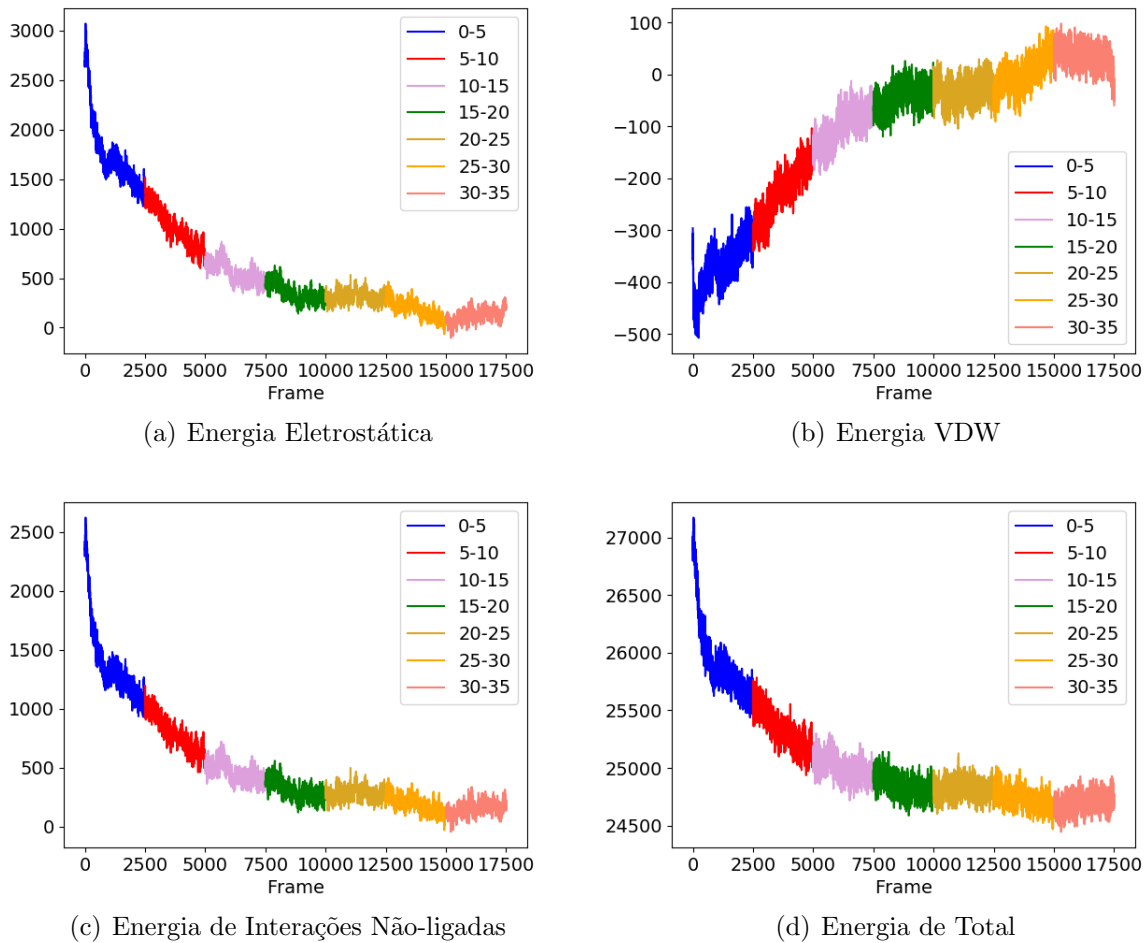


Figura 3.15: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a evolução (0-35ns) do sistema `sys-ConcA`. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução.

3.3.2 DM4: `sys-ConcB`

O sistema de simulação DM4 é uma diluição do sistema DM3. A concentração é diminuída e a razão de moléculas de água por moléculas de dhmt livre aumenta. A alteração no sistema visa levar as configurações para valores próximos aos descritos por (MARRINK; TIELEMAN; MARK, 2000). Figuras do sistema são omitidas.

A Figura 3.16 mostra o gráfico de agrupamentos moleculares durante os 100ns da dinâmica `sys-ConcB`. As tendências são as mesmas observadas em D3, porém, com o aumento do tempo de simulação foi possível observar uma estabilização do número de grupos em faixas bem definidas. Novamente os resultados demonstram que grupos menores são mais frequentes que grupos maiores. Comparando os primeiros 35ns de DM4 com a dinâmica DM3, conclui-se que as mudanças de concentração não foram suficientes

para observar mudanças significativas no comportamento de agregação molecular.

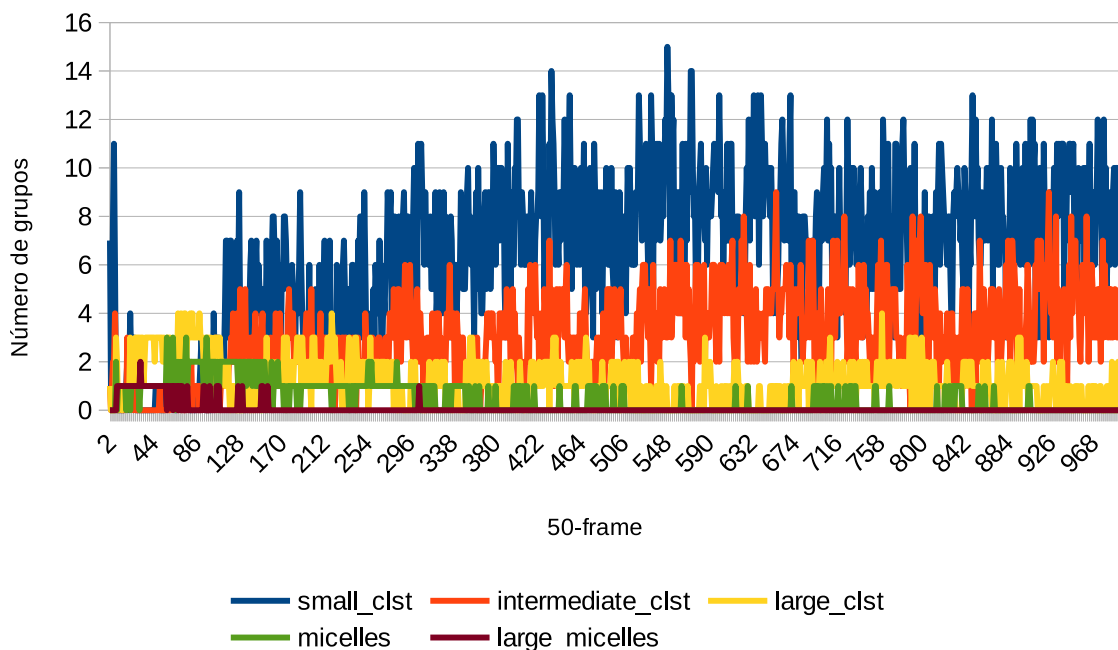


Figura 3.16: Gráfico da dinâmica de agrupamento de moléculas de dhtm livre de 0-100ns da dinâmica molecular de produção para DM4. Agrupamento calculado em saltos de 50 *frames* no conjunto de gravação da dinâmica. O gráfico mostra os dados para 5 tamanhos de grupos: *small_clst* (de 2 a 4 dhtm livres), *intermediate_clst* (5-8), *large_clst* (9-15), *micelles* (16-31) e *large_micelles* (32 ou mais dhmt livres).

A análise das energias potenciais envolvendo as moléculas de dhmt livre na Figura 3.17 demonstram as mesmas tendências e valores próximos aos observados em DM3. Emite-se os gráficos de estabilização rápida: Energias de ligação, angular, diedral e de conformacional. É importante ressaltar que o aumento do tempo de simulação permite alcançar um sistema equilibrado e definir uma dinâmica de produção. Define-se como fim da estabilização o estágio no qual todas as energias de encontram estabilizadas concomitantemente. A partir desse limiar, pelo modelo, pode-se inferir dados biológicos e/ou bifurcar o sistema simulado para outras configurações, como de sistemas de múltiplas termalizações ou simulações por dinâmica acelerada para amostragens aprimoradas do espaço conformacional. Com segurança, obtém-se estabilização desse sistema a partir de 60ns de evolução (equivalente ao *frame* 30.000 dos gráficos de energia).

É importante ressaltar que o sistema como um tod deve estar estabilizado para predições mais apuradas de comportamentos biológicos do sistema. O Apêndice A.8 mostra os gráficos de energias potenciais para as moléculas de água do sistema. Os gráficos

mostram que as moléculas de água se estabilizam conforme as moléculas de dhmt livre se organizam. Contudo, apesar do dhmt livre está com o potencial eletrostático devidamente equilibrado, ao que parece, o eletrostático do acetato não está completamente estável, como apresento pelo Apêndice A.9. Contudo, isso não impede que façamos análises preliminares sobre o sistema.

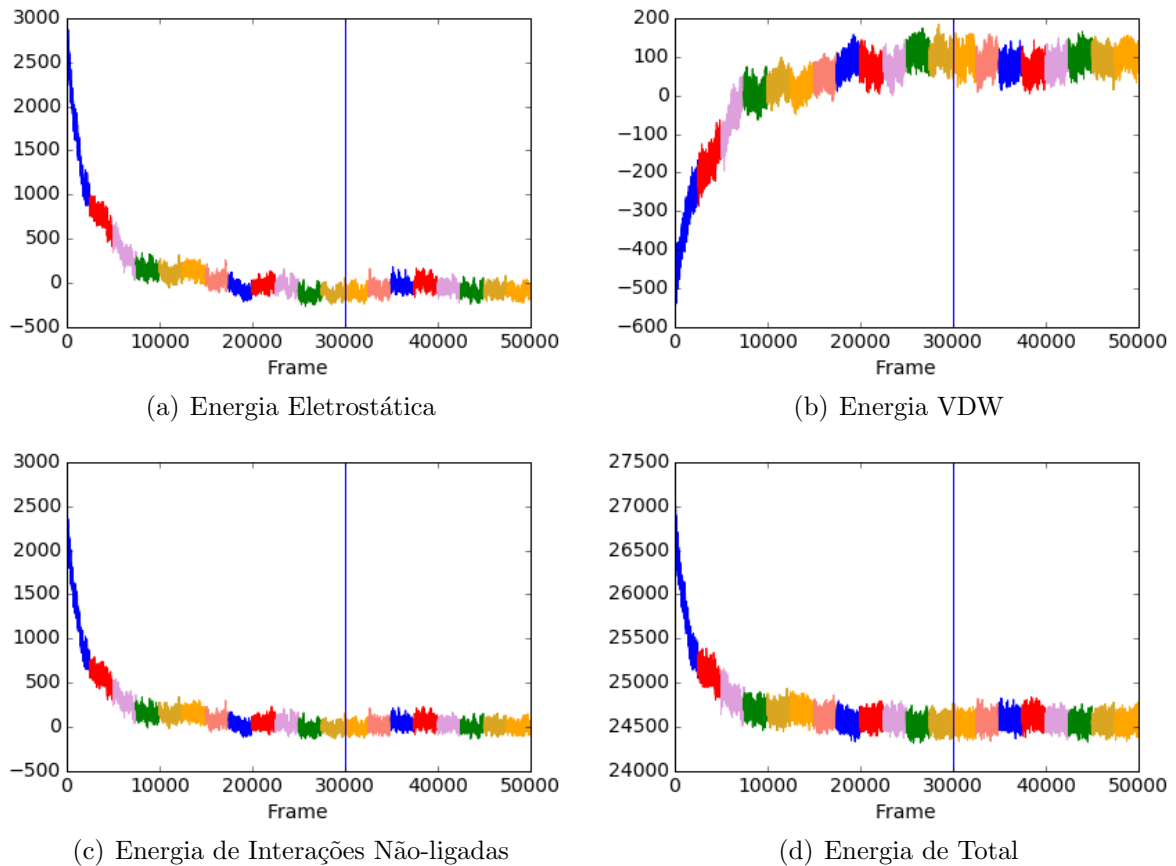


Figura 3.17: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a evolução (0-100ns) do sistema `sys-ConcB`. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução. Linha vertical delimita o fim da estabilização e início da dinâmica de produção.

A Tabela 3.1 mostra as médias dos potenciais durante a dinâmica de produção. Os potenciais eletrostático e Van der Waals tendem a se equilibrar. O potencial eletrostático medido é predominante negativo e Van der Waals é majoritariamente positivo. Percebe-se que os sinais dessas energias mudam durante a dinâmica, cada um deles iniciando a simulação com potencial de sinal oposto ao calculado na dinâmica de produção.

Tabela 3.1: Média e desvio padrão das energias potenciais (kcal/mol) durante a dinâmica de produção de `sys-ConcB`.

Potencial	μ	σ
Eletrostático	-68.33	59.56
Van der Waals	86.65	23.46
Int. Não-ligada	17.93	49.25
Total	24564.60	67.17

3.3.3 DM5: re-Temp

O sistema de simulação DM5 é uma bifurcação do sistema DM4 em 80ns em uma nova termalização e posteriores 20ns de evolução do sistema. Figuras do sistema são omitidas por semelhança às já apresentadas. Durante os 20ns de simulação não foram identificados mudanças significativas no conjunto de agregados moleculares. A Figura 3.18 mostra o gráfico de agrupamentos. Repare a semelhança com o gráfico apresentado em DM4.

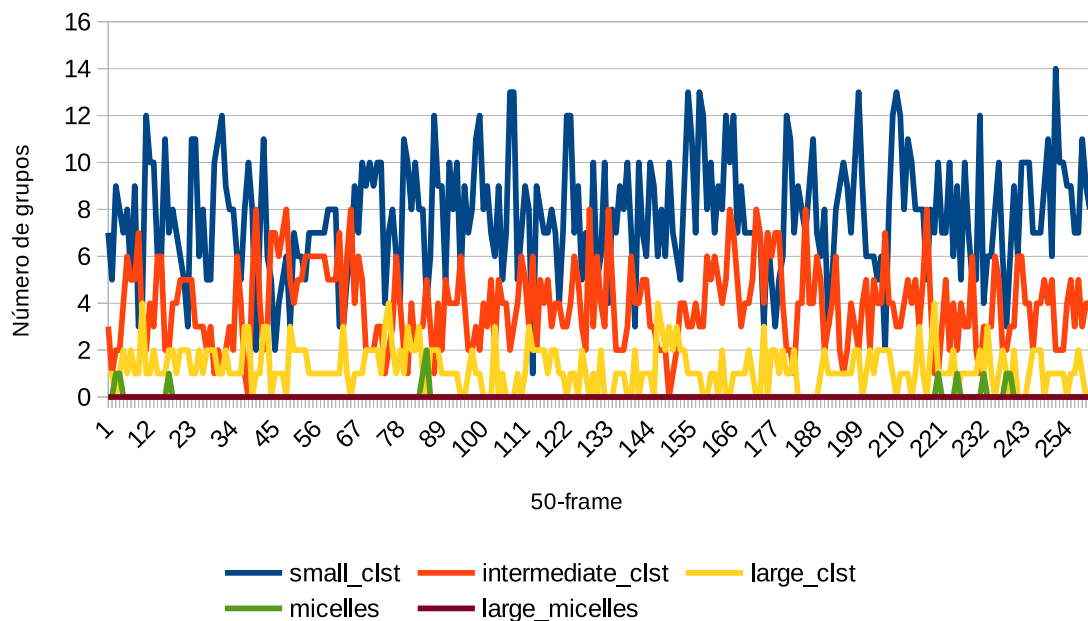


Figura 3.18: Gráfico da dinâmica de agrupamento de moléculas de dhtm livre de 80-100ns da DM de produção para DM5 (bifurcação do sistema DM4 em 80ns). Agrupamento calculado em saltos de 50 *frames* no conjunto de gravação da dinâmica. O gráfico mostra os dados para 5 tamanhos de grupos: `small_clst` (de 2 a 4 dhtm livres), `intermediate_clst` (5-8), `large_clst` (9-15), `micelles` (16-31) e `large_micelles` (32 ou mais dhmt livres).

Os gráficos de energia apresentados na Figura 3.19 mostram o processo de transição entre os sistemas `sys-ConcB` para `re-Temp`. As energias sofrem alteração, em especial as energias de estabilização rápida. As energias de VDW e Eletrostática parecem manter

a mesma tendência anterior, sendo que a última apresentou leve queda no tempo de simulação realizado. Conclusões devem ser feitas após um maior tempo de evolução, para que se tenha certeza da equilibração do sistema.

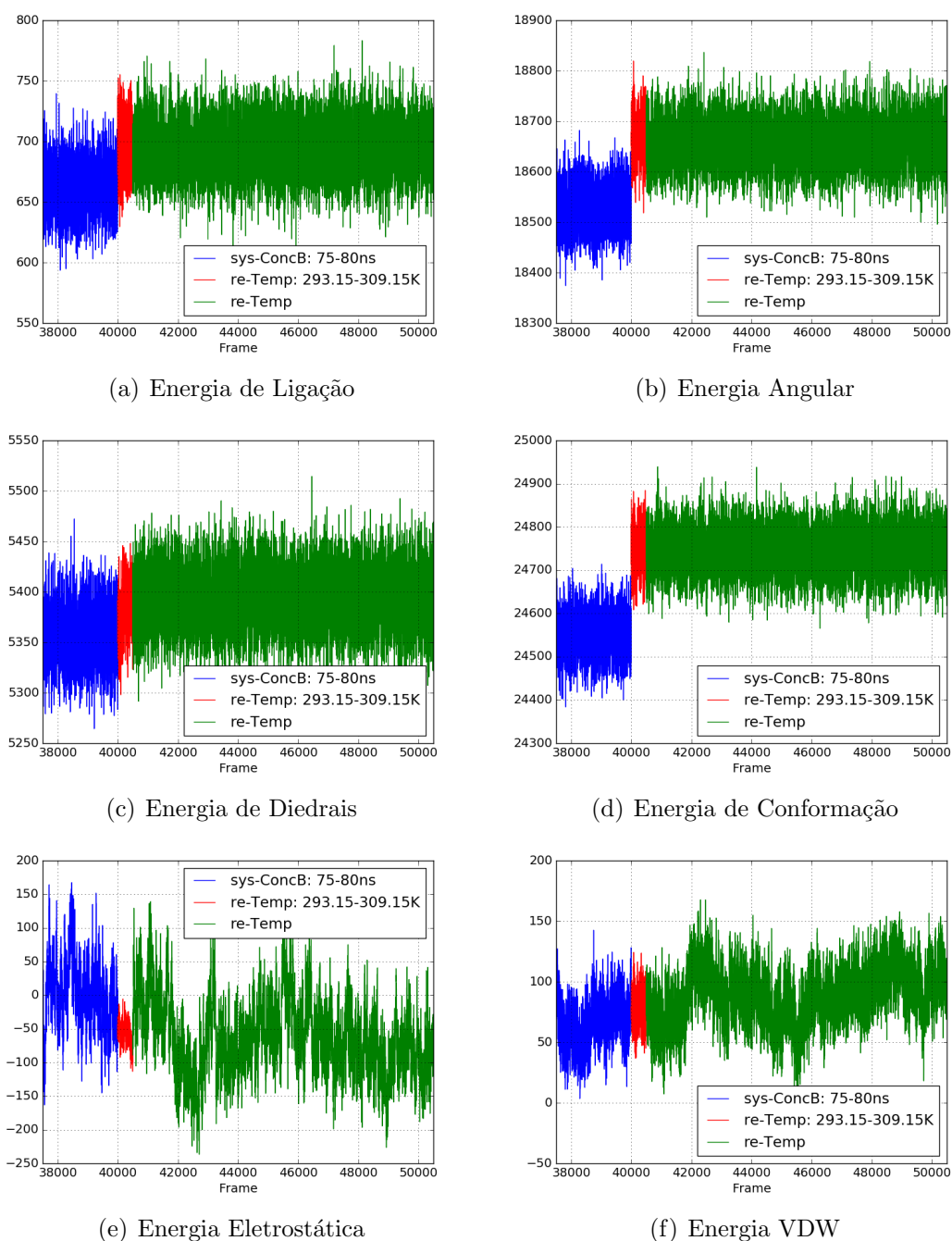


Figura 3.19: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a transição entre os sistemas sys-ConcB (80ns) e re-Temp (aquecimento e evolução 20ns).

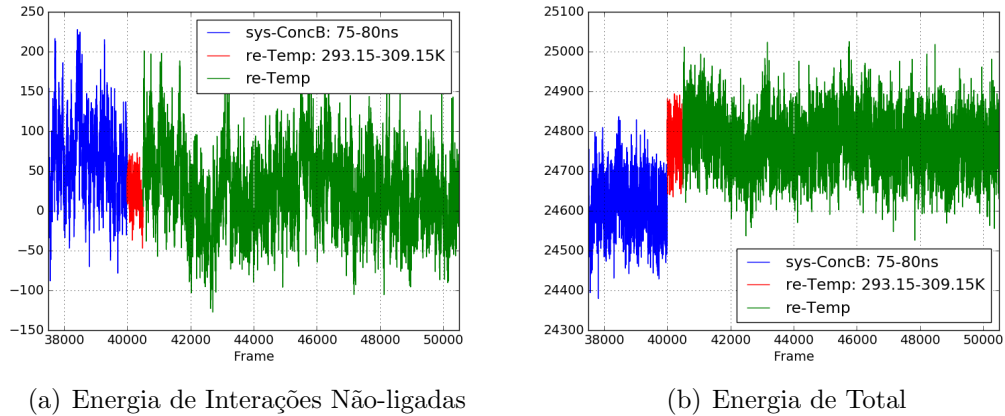


Figura 3.19: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a transição entre os sistemas `sys-ConcB` (80ns) e `re-Temp` (aquecimento e evolução 20ns). (*cont.*)

3.3.4 DM6: ac-DMd

O sistema de simulação DM6 é uma bifurcação do sistema DM4 em 100ns em uma dinâmica acelerada de parâmetros $\alpha = 29$ e $\mu_{diedral} = 5.350$. Durante os 50ns de dinâmica molecular efetuados, não foram observadas mudanças significativas no conjunto de agregados moleculares. A Figura 3.20 mostra o gráfico de agrupamentos. Repare a semelhança com os gráficos apresentados em DM4 e DM5.

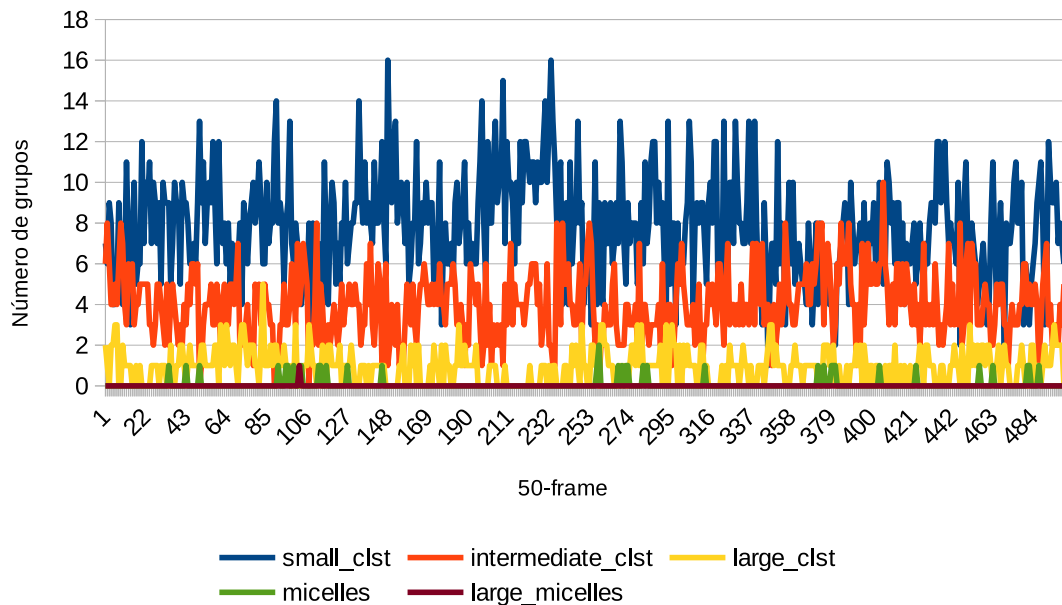


Figura 3.20: Gráfico da dinâmica de agrupamento de moléculas de dhmt livre de 100-150ns da DM de produção para DM6 (bifurcação do sistema DM4 em 100ns). O gráfico mostra os dados para 5 tamanhos de grupos: `small_clst` (de 2 a 4 dhmt livres), `intermediate_clst` (5-8), `large_clst` (9-15), `micelles` (16-31) e `large_micelles` (32 ou mais dhmt livres).

Os gráficos de energia apresentados na Figura 3.21 mostram as consequências do processo de transição entre os sistemas **sys-ConcB** para **ac-DMd**. As energias que não sofreram alteração foram omitidas. Percebe-se alteração no potencial diedral, como esperado. O potencial eletrostático sobre leve alteração. Analisando os gráficos da dinâmica molecular, percebe-se pouca alteração entre os sistemas. Isso não é positivo, uma vez que desejava-se amostrar amplamente o espaço conformacional e buscar diferentes configurações de estabilidade do sistema. É possível concluir que os parâmetros utilizados na configuração da dinâmica foram muito conservadores e não foram capazes de gerar impulsos de energia que trouxessem variação significativa na evolução do sistema.

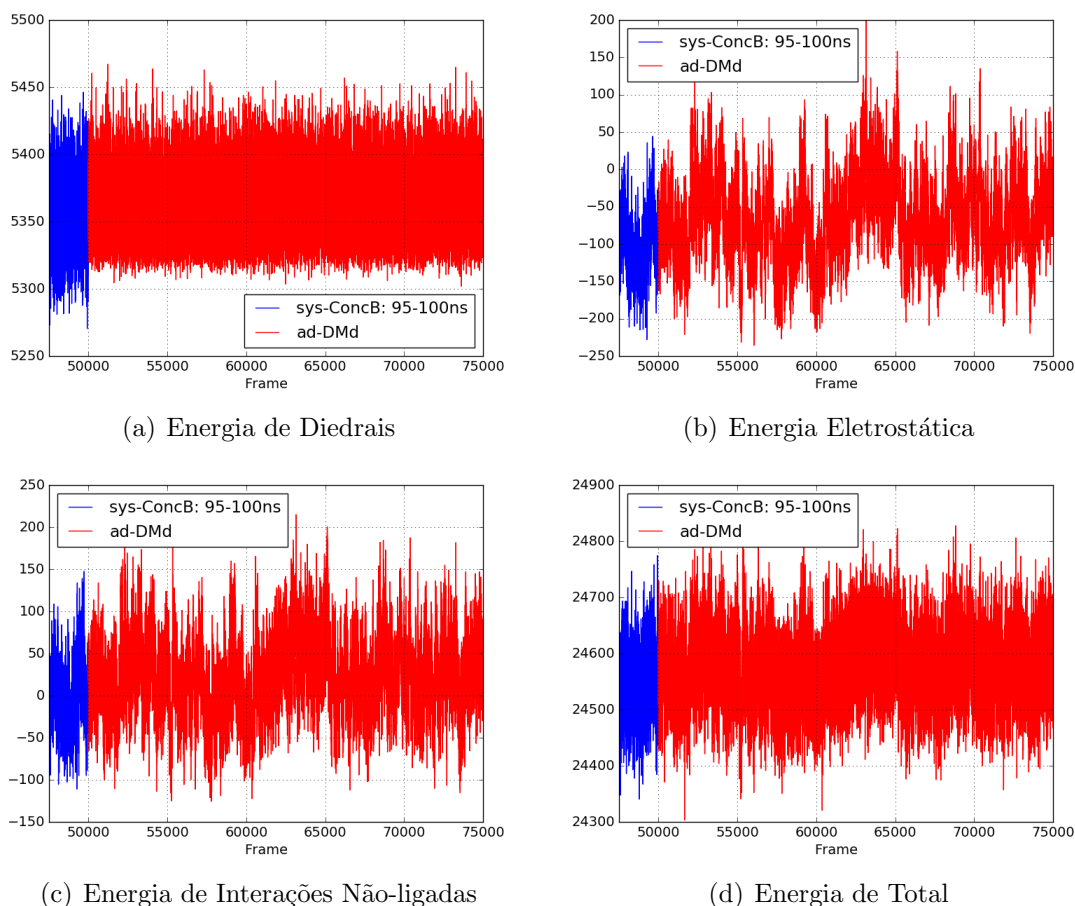


Figura 3.21: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a transição do sistema **sys-ConcB** em 100ns e o sistema **ac-DMd** que evolui por dinâmica acelerada com impulsos nos potenciais diedrais.

3.3.5 DM7: rand-Start

Apresenta-se aqui os resultados da simulação do sistema **rand-Start**. O sistema tem configuração inicial com distribuição e posicionamento aleatórios dos compostos de dhmtAc pela caixa de simulação. Ao final dos 100ns de simulação, o sistema mantém uma configuração semelhante com uma maior dispersão pela caixa de simulação. A Figura 3.22 mostra como se dá a distribuição nesses dois momentos. Ao final, é possível observar agrupamentos de tamanho inferiores, assim como nas dinâmicas anteriores. Os resultados permitem inferir que a formação de agregados maiores e de sua estabilidade no decorrer da dinâmica está diretamente ligado à configuração inicial que favoreça essa formação.

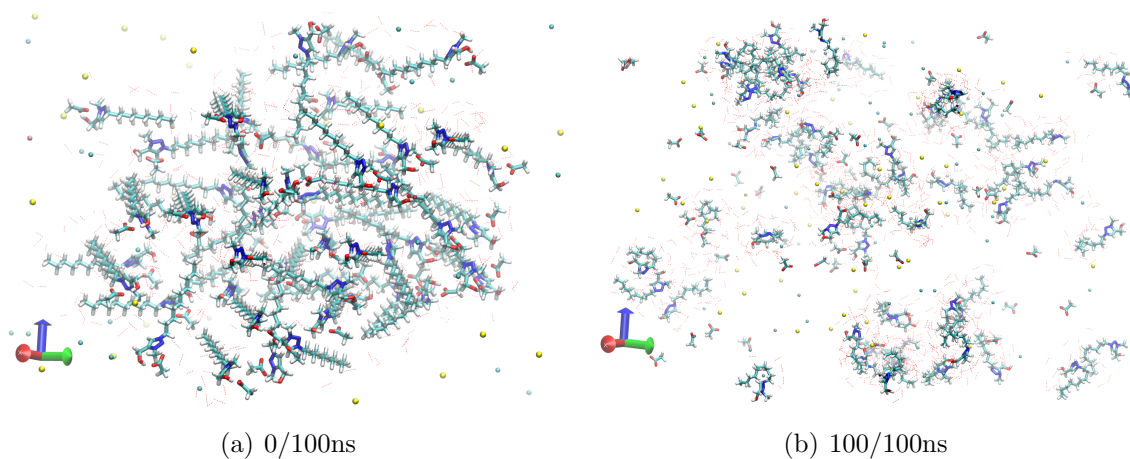


Figura 3.22: Configuração inicial (a) e final (b) do sistema de simulação **rand-Start**. Visualização pelo VMD. Em verde átomos de carbono, em azul átomos de nitrogênio, em vermelho átomos de oxigênio e em branco átomos de hidrogênio. Moléculas de dhmt livre destacadas em visualização de esferas de VDW.

O gráfico de agrupamentos na Figura 3.23 corrobora com a ideia de relação entre estabilidade de grandes agregados e configuração inicial, uma vez que apresentam as mesmas características encontradas nos últimos nanosegundos das dinâmicas anteriores. Contudo, o número de grupos, em especial dos grupos *large_clst*, é altamente reduzido. A Figura 3.24 mostra o número de moléculas que não participam de nenhum agrupamento molecular durante a evolução do sistema **rand-Start**. É notório que a maioria das moléculas do sistema se encontram livres de interação com seus pares na equilibração. Ao que tudo indica, iniciar o sistema com moléculas em posições aleatórias nessa concentração somente acelera o processo de dispersão das moléculas do sistema. Entretanto, um tempo maior de simulação de dinâmica molecular é necessário para se confirmar essa

hipótese.

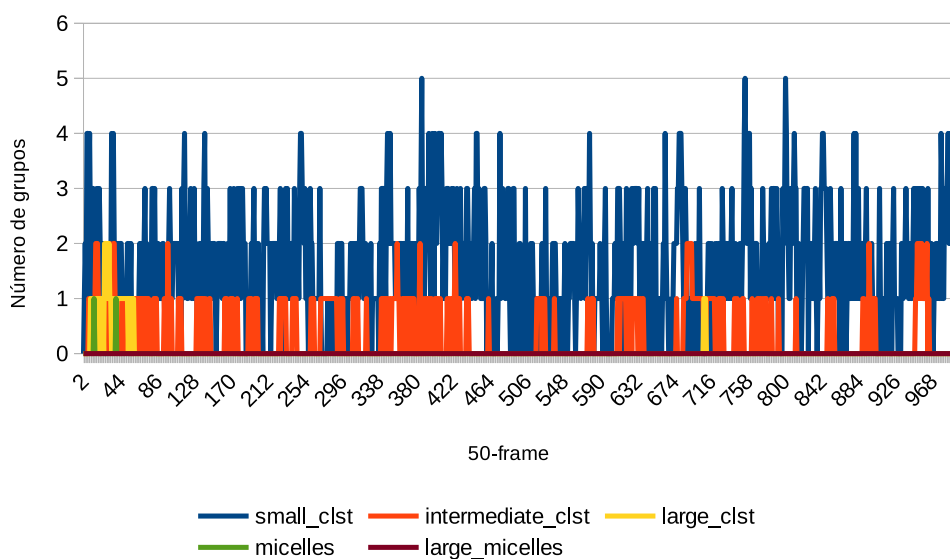


Figura 3.23: Gráfico da dinâmica de agrupamento de moléculas de dhtm livre de 0-10 ns da dinâmica molecular de produção para DM7. Agrupamento calculado em saltos de 50 *frames* no conjunto de gravação da dinâmica. O gráfico mostra os dados para 5 tamanhos de grupos: *small_clst* (de 2 a 4 dhtm livres), *intermediate_clst* (5-8), *large_clst* (9-15), *micelles* (16-31) e *large_micelles* (32 ou mais dhmt livres).

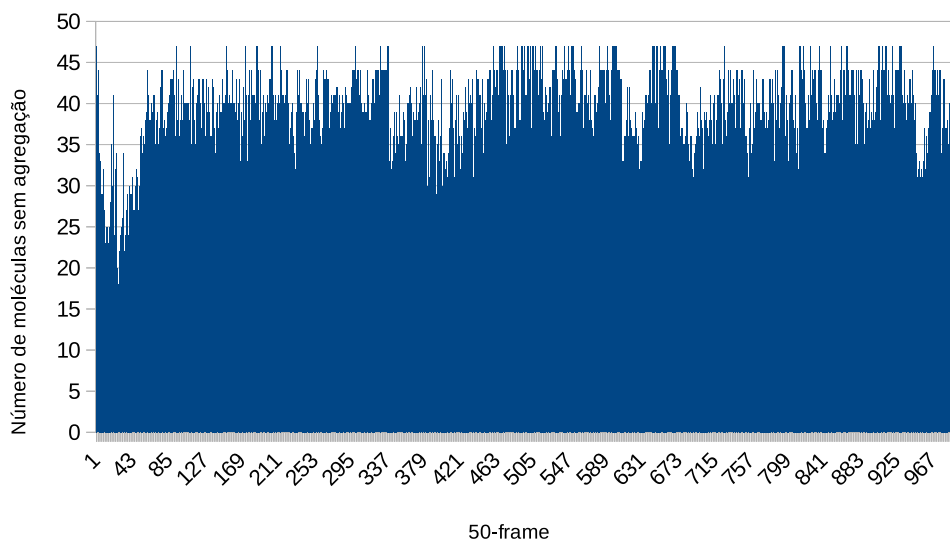


Figura 3.24: Número de moléculas que não participam de nenhum agrupamento molecular durante a evolução do sistema DM7. Dados dos agrupamentos calculados em saltos de 50 *frames* no conjunto de gravação da dinâmica.

A Figura 3.25 mostra as energias potenciais das moléculas de dhmt livre durante a simulação. Percebe-se uma diferença menor entre os valores das energias no início da dinâmica e nas energias de equilíbrio do sistema, em especial nos gráficos 3.25.e, 3.25.f,

3.25.g e 3.25.h. Isso se dá pela configuração inicial do sistema, que com mostram as análises anteriores, está mais próximo da configuração de estabilidade, na concentração simulada, que os sistemas anteriores. Assim como em **sys-ConcB**, pode-se definir uma dinâmica de produção a partir dos resultados obtidos. Por praticidade, define-se o mesmo limiar que o utilizado em **sys-ConcB** ($60\text{ns} = \text{frame } 30000$) para início da DM de produção. Contudo, o sistema já se encontrava equilibrado anterior a esse limiar por conta da maior velocidade de estabilização observada. É possível ainda observar que apesar de partirem de estados iniciais distintos e de na presente dinâmica ainda não ser possível observar a estabilização de agregados moleculares, ambos os sistemas, **sys-ConcB** e **rand-Start**, apresentam o mesmo padrão e valores de energias eletrostática e Van der Waals.

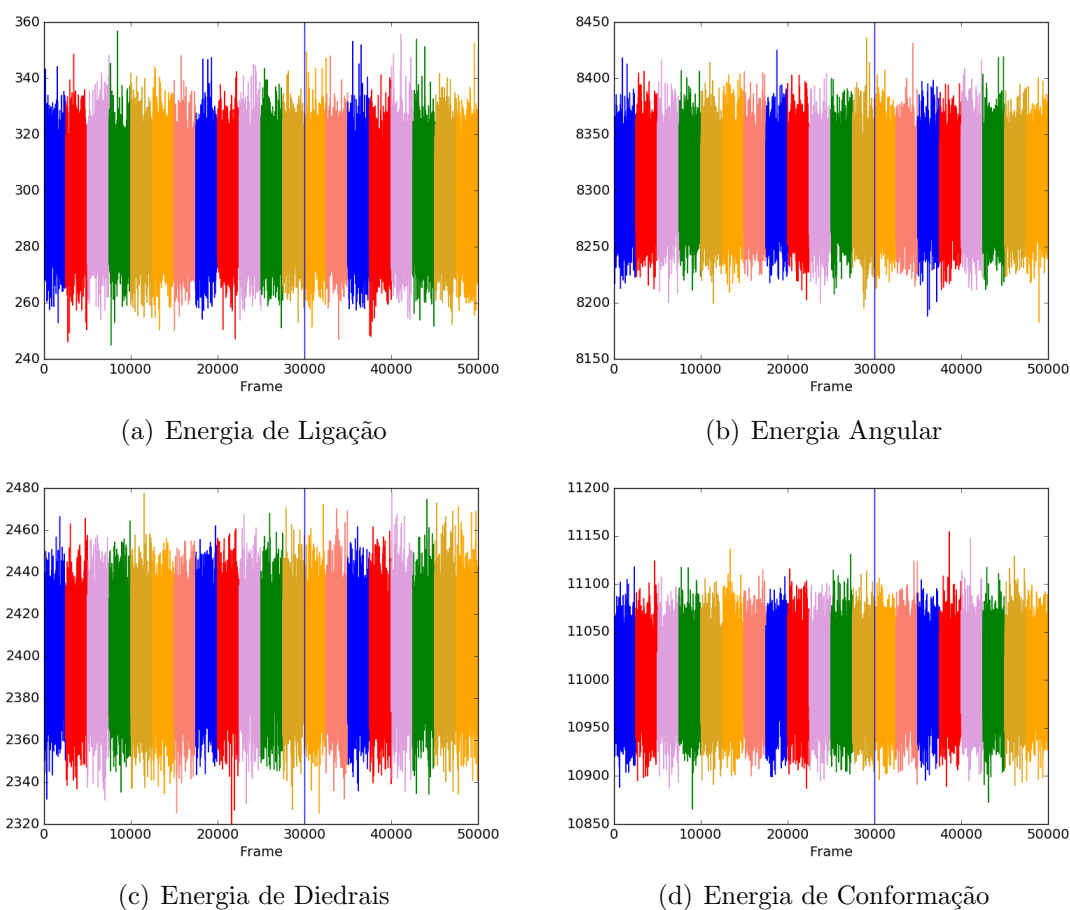


Figura 3.25: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a evolução (0-100ns) do sistema **rand-Start**. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução. A linha vertical delimita o que foi considerado o fim da equi- libração e início da dinâmica de produção.

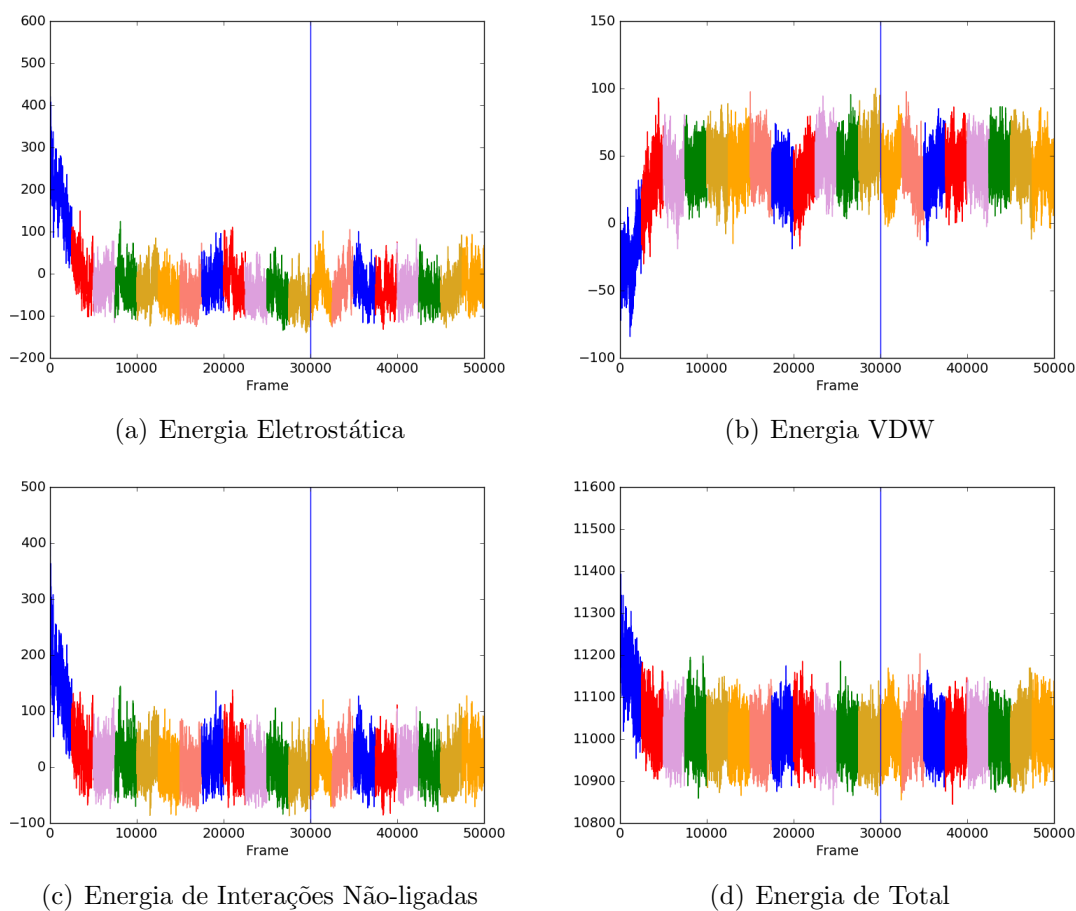


Figura 3.25: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de dhmt livre durante a evolução (0-100ns) do sistema `rand-Start`. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução. A linha vertical delimita o que foi considerado o fim da equi-
 libração e início da dinâmica de produção. (*cont.*)

A Tabela 3.2 mostra as médias dos potenciais durante a dinâmica de produção. As tendências são as mesmas apresentadas em `sys-ConcB`. Logo, conclui-se que os sistemas `sys-ConcB` e `rand-Start`, apesar de configurações iniciais diferentes, evoluem para a mesma configuração de equilíbrio.

3.4 Análise de concentrações e visão experimental

Posteriormente a realização dos estudos de DM desse trabalho, teve-se acesso a dados experimentais (dados não apresentados) que relacionavam a faixa de concentração de $0,0039 - 0,039 \text{ mol/L}$ de dhmtAc à formação de agregados nanométricos. As concentrações utilizadas nesse trabalho são superiores a esse valor, pertencentes a faixa de $0,078 - 0,128 \text{ mol/L}$. De fato, os resultados obtidos demonstram que o sistema de menor

Tabela 3.2: Média e desvio padrão das energias potenciais (kcal/mol) durante a dinâmica de produção de **rand-Start**.

Potencial	μ	σ
Eletrostático	-37,69	34,72
Van der Waals	41,68	14,13
Int. Não-ligada	3,92	29,86
Total	11.008,20	42,36

concentração simulado (**hem-micela** $\sim 0,078\text{mol/L}$) mostrou, *a priori*, menor número de agregados, porém agregados com maior número de moléculas. Já nas dinâmicas com concentrações superiores (**whol-micela** $\sim 0,0128\text{mol/L}$ ou **sys-ConcB** $\sim 0,0108\text{mol/L}$), foi possível observar grande quantidade de grupos, porém de tamanho inferior.

Mesmo nos testes experimentais, foi observada uma dificuldade em obter estabilidade de grandes grupos micelares. Assim, uma série de substâncias foram testadas para compor o sistema a fim de aumentar a estabilidade dos agregados observados (dados não mostrados). Entre o conjunto de substâncias testadas estão: fosfato de cálcio + PEG-glu, manteiga + polímero ABA, polímero P(Lys-chol) ou PEG-P(Lys-chol). Diferentes concentrações foram utilizadas. Foram observadas nanopartículas nos sistemas com fosfato e micelas nos sistemas com PEG-P(Lys-chol). A inserção de substâncias auxiliares nos sistemas de simulação caracteriza uma possibilidade de trabalhos futuros.

4 Conclusão

Esse trabalho consiste em um estudo inicial sobre alguns sistemas de simulação de interação entre moléculas de dhmtAc, uma molécula que apresenta ações farmacêuticas no combate da leishmania. Primeiramente, este trabalho apresenta uma proposta de parametrização da molécula dhmtAc, inexistente até então na literatura por se tratar de uma molécula nova. Os resultados das simulações mostram relação direta entre a concentração da molécula de dhmtAc no sistema e as características dos grupos observados. Menores concentrações (0,078M dhmt livre) da molécula mostraram agregados maiores (16 – 31 dhmt livres). Maiores concentrações (\sim 0,12M dhmt livre) apresentam maiores números de agregados de tamanhos pequenos (2 – 8 dhmt livres). Essa tendência foi a mesma observada em testes experimentais com a molécula.

Foi possível também identificar uma relação entre a configuração inicial do sistema e o estado de estabilização do mesmo, mostrando maior número percentual de grupos moleculares estáveis quando o sistema inicial partia da configuração com as moléculas pré-dispostas em formato esférico (similar ao de uma micela já estruturada). Não foi possível observar agregados suficientemente estáveis na concentração testada (0,109M dhmt livre) para as simulações em ambiente mimético ao sangue, mesmo realizando termalização gradual do sistema em duas etapas, ou dinâmica acelerada para amostragem aprimorada do espaço conformacional.

5 Trabalhos Futuros

A falta de dados experimentais que pudessem ser utilizados para validações mais precisas do sistema foi uma grande dificuldade no trabalho. Como trabalho futuro, pode-se buscar maior número de dados experimentais para validar o modelo proposto.

Durante o desenvolvimento desse trabalho foram encontradas dificuldade para a definição de alguns parâmetros utilizados. Os parâmetros da dinâmica acelerada foram baseados em estratégias de definição dos mesmos para proteínas. Como visto, eles não foram suficientes para impulsionar os potenciais do sistema para buscar diferentes regiões de estabilidade. Como trabalho futuro, pode-se efetuar uma dinâmica com parâmetros que realizem alterações mais significativas no sistema.

Nos testes experimentais, diversas substâncias foram adicionadas nas soluções para aumentar a estabilidade dos agrupamentos observados, como fosfato de cálcio, manteiga, P(Lys-*chol*) ou PEG-P(Lys-*chol*). Como trabalho futuro, pode-se reproduzir os experimentos com essas substâncias imersas nos sistemas de simulação.

Computacionalmente, é comum que os estudos por dinâmica molecular sobre a formação de micelas ocorram por meio de simulações que chegam a $1\mu s$ de simulação. Para os sistemas apresentados, esse tempo de simulação não pode ser obtido visto o custo computacional demandado. Uma possibilidade futura seria propor uma modelagem da molécula por estratégias *coarse-grained*, que reduziriam os graus de liberdade da mesma por meio da criação de superátomos, mas como contrapartida, poderiam reduzir significativamente o tempo de computação de dinâmicas mais extensas.

O mecanismo de ação do fármaco ocorre na mitocôndria do parasito. Dessa forma, a estrutura do fármaco, seja em formato de agregados, micela ou individualmente, deve interagir com membranas tanto das células que hospedam o parasito quanto com a membrana plasmática do organismo unicelular e a membrana mitocondrial. Realizar computacionalmente estudos de interação fármaco-membrana pode ser de grande valia ao promover entendimento do mecanismo estrutural e dinâmico da ação do fármaco em escalas atômicas.

Bibliografia

ALLOUCHE, A.-R. Gabedit—a graphical user interface for computational chemistry softwares. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 32, n. 1, p. 174–182, 2011.

BATRAKOVA, E. V. et al. Polymer micelles as drug carriers. In: _____. *Nanoparticulates as Drug Carriers*. [s.n.], 2006. cap. 5, p. 57–93. Disponível em: https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9781860949074_0005.

BERNARDI, R. et al. Namd user's guide. *Theoretical Biophysics Group*, The Board of Trustees of the University of Illinois, v. 2, n. 13, 2018.

BISWAS, S. et al. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Elsevier, v. 83, p. 184–202, 2016.

BRAUN, R.; ENGELMAN, D. M.; SCHULTEN, K. Molecular dynamics simulations of micelle formation around dimeric glycophorin a transmembrane helices. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 87, n. 2, p. 754–763, 2004.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 2, n. 2, p. 167, 2010.

CROY, S.; KWON, G. Polymeric micelles for drug delivery. *Current pharmaceutical design*, Bentham Science Publishers, v. 12, n. 36, p. 4669–4684, 2006.

DEAMER, D. et al. The first cell membranes. *Astrobiology*, v. 2, p. 371–81, 02 2002.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer. *nat rev drug discov* 2:347-360. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 2, p. 347–60, 06 2003.

ESTER, M. et al. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In: *Kdd*. [S.l.: s.n.], 1996. v. 96, n. 34, p. 226–231.

FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 16 Revision B.01*. 2016. Gaussian Inc. Wallingford CT.

HAMELBERG, D.; MONGAN, J.; MCCAMMON, J. A. Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules. *The Journal of chemical physics*, AIP, v. 120, n. 24, 2004.

HINCHLIFFE, A. *Molecular modelling for beginners*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2005.

HINCHLIFFE, A. Molecular modelling for beginners. In: LTD, J. W. . S. (Ed.). *Molecular Modelling for Beginners. 2nd ed*. [S.l.]: John Wiley and Sons, Ltd, Publication, 2008. p. 0–432. ISBN 978-0-470-51314-9.

HOSPITAL, A. et al. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, Dove Press, v. 8, p. 37, 2015.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. Vmd: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, Elsevier, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

- IMRAN, M.; SHAH, M. R. et al. Amphiphilic block copolymers-based micelles for drug delivery. In: *Design and Development of New Nanocarriers*. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 365–400.
- JAMES, J. P. Mopac2016 - molecular orbital package. *Stewart Computational Chemistry*, Colorado Springs, CO, USA, 2016. Disponível em: <www.OpenMOPAC.net>.
- JOHNSTON, M. A. et al. Toward a standard protocol for micelle simulation. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 120, n. 26, p. 6337–6351, 2016.
- JR, A. D. M. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry B*, ACS Publications, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998.
- JR, A. D. M.; FEIG, M.; III, C. L. B. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 25, n. 11, p. 1400–1415, 2004.
- KATSILA, T. et al. Computational approaches in target identification and drug discovery. *Computational and structural biotechnology journal*, Elsevier, v. 14, p. 177–184, 2016.
- KEDAR, U. et al. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Elsevier, v. 6, n. 6, p. 714–729, 2010.
- KUBINYI, H.; MARTIN, Y. C.; FOLKERS, G. *3D QSAR in drug design: volume 1: theory methods and applications*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 1993. v. 1.
- KUMAR, N. et al. Applying computational modeling to drug discovery and development. *Drug discovery today*, Elsevier, v. 11, n. 17-18, p. 806–811, 2006.
- LANGER, R. Drug delivery: Drugs on target. *Science (New York, N.Y.)*, v. 293, p. 58–9, 08 2001.
- LEBECQUE, S. et al. Molecular dynamics study of micelles properties according to their size. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, Elsevier, v. 72, p. 6–15, 2017.
- MACKERELL, A. Atomistic models and force fields. *Computational Biochemistry and Biophysics*, p. 7–38, 01 2001.
- MARRINK, S.; TIELEMAN, D.; MARK, A. Molecular dynamics simulation of the kinetics of spontaneous micelle formation. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 104, n. 51, p. 12165–12173, 2000.
- MARTINEZ, L.; BORIN, I.; SKAF, M. Fundamentos de simulação por dinâmica molecular. *Morgon, NH; Coutinho, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*, 2007.
- NUNES, V. S. P. et al. Análise comparativa das ecto-ntpdase 1 de homo sapiens e schistosoma mansoni por meio de modelagem tridimensional, dinâmica molecular e docking receptor-ligante. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015.
- PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with namd. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005.

SCHLICK, T. *Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide: an interdisciplinary guide*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2010. v. 21.

Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.8. Ferramenta computacional. 2015.

SIMONSON, T. Macromolecular electrostatics: continuum models and their growing pains. *Current opinion in structural biology*, Elsevier, v. 11, n. 2, p. 243–252, 2001.

STROPPIA, P. H. et al. Effect of 1, 2, 3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on leishmania amazonensis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, Elsevier, v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017.

SUNDAR, S.; SINGH, B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Taylor and Francis, v. 22, n. 6, p. 467–486, 2018. PMID: 29718739. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472241>.

VERLI, H. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

VILELA, M.; MENDONÇA, S. Glossário de doença: Leishmaniose. *Glossário de doenças digital da Fundação Oswaldo Cruz*, 2013.

WANG, Y. et al. Implementation of accelerated molecular dynamics in namd. *Computational science & discovery*, IOP Publishing, v. 4, n. 1, 2011.

WHO. Control of the leishmaniasis - report of a meeting of the who expert committee on the control of leishmaniasis. *WHO Technical Report Series*, n. 949, 2010.

WHO. Leishmaniasis - key facts. In: . [s.n.], 2019. Acesso em: 2019-05-23. Disponível em: <http://who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

YOSHII, N.; IWAHASHI, K.; OKAZAKI, S. A molecular dynamics study of free energy of micelle formation for sodium dodecyl sulfate in water and its size distribution. *The Journal of chemical physics*, AIP, v. 124, n. 18, p. 184901, 2006.

YOSHII, N.; OKAZAKI, S. A molecular dynamics study of structural stability of spherical sds micelle as a function of its size. *Chemical physics letters*, Elsevier, v. 425, n. 1-3, p. 58–61, 2006.

A Apêndice

Esse capítulo se destina a apresentar materiais complementares e códigos gerados que auxiliam no entendimento e reprodução do conteúdo apresentado nesse relatório.

A.1 Algoritmos e *scripts*

Listing A.1: Algoritmo de parametrização sistemática da micela

```
1 package require psfgen
2
3 #Arquivos de topologia e parametrizacao do dhmtAc
4 topology ART105_mopacCHARGES_molefacture_FIX-charges.top
5 topology top_all127_prot_lipid_na.inp
6
7 #Arquivo de coordenadas da micela
8 mol new micela.pdb
9
10 set seltxt {all}
11 set nres [llength [lsort -unique -integer [[atomselect top
12     $seltxt] get residue]]]
13
14 for {set i 0} {$i < $nres} {incr i} {
15     set res [atomselect top "fragment $i"]
16     $res writepdb ./tmp/fragment$i.pdb
17 }
18
19 set nseg 1
20 foreach pdb [lsort [glob ./tmp/*.pdb]] {
21     set segid V$nseg
22     segment $segid {
```

```
22     first NONE
23     last NONE
24     pdb $pdb
25 }
26     coordpdb $pdb $segid
27     incr nseg
28 }
29
30 guesscoord
31 writepsf mergedpdb.psf
32 writepdb mergedpdb.pdb
```

Listing A.2: Algoritmo de obtenção de energias potenciais pelo *namdEnergy*.

```
1 package require namdenergy
2 mkdir ./tmp
3
4 foreach dcd [lsort [glob ../../do_conf/*.dcd]] {
5
6     mol new ../../do_conf/micela_sistema_lowc.psf type psf first
7         0 last -1 step 1 filebonds 1 autobonds 1 waitfor all
8
9     mol addfile $dcd type dcd first 0 last -1 step 1 filebonds 1
10        autobonds 1 waitfor all
11
12    set sel1 [atomselect top "resname ART"]
13
14    # Configuracao do nome do arquivo de saida
15    set output [string range $dcd [expr {[string first "micela_"
16        $dcd] + 20}] end]
17
18    set dm_step_name [lindex [split $output "."] 0]
19    puts $dm_step_name
20
21    namdenergy -all -sel $sel1 -ofile ./energias_$dm_step_name -
22        par ./merged_par.par -exe ../../NAMD_2.11/namd2
23
24    mol delete [molinfo top get id]
25 }
26 rm -r ./tmp
```

Listing A.3: Algoritmo de agrupamento de moléculas nas trajetórias das DMs.

```
1 import pandas as pd
2 import numpy as np
3 import mdtraj as md
4 from sklearn import cluster, metrics
5 from sklearn.preprocessing import normalize
6
7 mass_atom = { 'H':1.00800,      # H ! polar H
8               'HC':1.00800,     # H ! N-ter H
9               'HA':1.00800,     # H ! nonpolar H
10              'HT':1.00800,     # H ! TIPS3P WATER HYDROGEN
11              'HP':1.00800,     # H ! aromatic H
12              'HB':1.00800,     # H ! backbone H
13              'HR1':1.00800,    # H ! his he1, (+) his HG,HD2
14              'HR2':1.00800,    # H ! (+) his HE1
15              'HR3':1.00800,    # H ! neutral his HG, HD2
16              'HS':1.00800,     # H ! thiol hydrogen
17              'HE1':1.00800,    # H ! for alkene; RHC=CR
18              'HE2':1.00800,    # H ! for alkene; H2C=CR
19              'C':12.01100,     # C ! carbonyl C, peptide backbone
20              'CA':12.01100,    # C ! aromatic C
21              'CT1':12.01100,   # C ! aliphatic sp3 C for CH
22              'CT2':12.01100,   # C ! aliphatic sp3 C for CH2
23              'CT3':12.01100,   # C ! aliphatic sp3 C for CH3
24              'CPH1':12.01100,  # C ! his CG and CD2 carbons
25              'CPH2':12.01100,  # C ! his CE1 carbon
26              'CPT':12.01100,   # C ! trp C between rings
27              'CY':12.01100,    # C ! TRP C in pyrrole ring
28              'CP1':12.01100,   # C ! tetrahedral C (proline CA)
29              'CP2':12.01100,   # C ! tetrahedral C (proline CB/CG)
30              'CP3':12.01100,   # C ! tetrahedral C (proline CD)
31              'CC':12.01100,    # C ! carbonyl C, asn, asp, gln, glu, cter, ct2
```

```
32      'CD':12.01100, # C ! carbonyl C, pres aspp,glup,ct1
33      'CPA':12.01100, # C ! heme alpha-C
34      'CPB':12.01100, # C ! heme beta-C
35      'CPM':12.01100, # C ! heme meso-C
36      'CM':12.01100, # C ! heme CO carbon
37      'CS':12.01100, # C ! thiolate carbon
38      'CE1':12.01100, # C ! for alkene; RHC=CR
39      'CE2':12.01100, # C ! for alkene; H2C=CR
40      'N':14.00700, # N ! proline N
41      'NR1':14.00700, # N ! neutral his protonated ring nitrogen
42      'NR2':14.00700, # N ! neutral his unprotonated ring
         nitrogen
43      'NR3':14.00700, # N ! charged his ring nitrogen
44      'NH1':14.00700, # N ! peptide nitrogen
45      'NH2':14.00700, # N ! amide nitrogen
46      'NH3':14.00700, # N ! ammonium nitrogen
47      'NC2':14.00700, # N ! guanidinium nitrogen
48      'NY':14.00700, # N ! TRP N in pyrrole ring
49      'NP':14.00700, # N ! Proline ring NH2+ (N-terminal)
50      'NPH':14.00700, # N ! heme pyrrole N
51      'O':15.99900, # O ! carbonyl oxygen
52      'OB':15.99900, # O ! carbonyl oxygen in acetic acid
53      'OC':15.99900, # O ! carboxylate oxygen
54      'OH1':15.99900, # O ! hydroxyl oxygen
55      'OS':15.99940, # O ! ester oxygen
56      'OT':15.99940, # O ! TIPS3P WATER OXYGEN
57      'OM':15.99900, # O ! heme CO/O2 oxygen
58      'S':32.06000, # S ! sulphur
59      'SM':32.06000, # S ! sulfur C-S-S-C type
60      'SS':32.06000, # S ! thiolate sulfur
61      'HE':4.00260, # HE ! helium
62      'NE':20.17970, # NE ! neon
```

```
63     'CAL':40.08000, # CA ! calcium 2+
64     'ZN':65.37000, # ZN ! zinc (II) cation
65     'FE':55.84700, # Fe ! heme iron 56 }
66
67 CLUSTER_PER_FRAME = []
68 FRAME = 0
69 dm_names = open('./traj_files_names.txt','r')
70
71 for dm_file_name in dm_names:
72     print("\n ##### Lendo arquivo " + dm_file_name.split('.')
73           .')[0] + " #####")
74
75     for chunk in md.iterload(dm_file_name.split('.')[0]+'dcd',
76                             chunk=50, top='micela_sistema_lowc'+'.pdb'):
77         print('\n FRAME: ' + str(FRAME))
78         print(chunk)
79         selection = chunk[0].atom_slice(chunk[0].topology.select(
80             "resname ART"))
81         selection.save_pdb("tmp_frame.pdb")
82
83         D = []
84         with open('tmp_frame.pdb', 'r') as f:
85             data = f.readlines()
86
87             for line in data:
88                 if (line.split()[0] == "ATOM"):
89                     d = dict()
90                     d['x'] = float(line.split()[6])
91                     d['y'] = float(line.split()[7])
92                     d['z'] = float(line.split()[8])
93                     d['group'] = str(line.split()[11])
94                 try:
```

```
92         d['atom'] = str(line.split()[12])
93     except:
94         d['group'] = str(line.split()[11])[:-1]
95         d['atom'] = str(line.split()[11])[-1]
96
97         D.append(d)
98
99     D = pd.DataFrame(D)
100
101     grouped = D.groupby("group")
102
103     center_masses = []
104
105     for group in D.group.unique():
106         aux = grouped.get_group(group)
107         sum_x = sum_y = sum_z = sum_masses = 0.0
108         for i in range(len(aux)):
109             atom, _, x, y, z = aux.iloc[i]
110             sum_x = sum_x + x
111             sum_y = sum_y + y
112             sum_z = sum_z + z
113             sum_masses = sum_masses + mass_atom[atom]
114             center_masses.append([sum_x/sum_masses, sum_y/
115                 sum_masses, sum_z/sum_masses])
116
117     X = np.array(center_masses)
118
119     # normalize the data in the space of 0 to 1
120     X = normalize(X, axis=0, norm='max')
121
122     db = cluster.DBSCAN(eps=0.33, min_samples=3, algorithm='
123         kd_tree', metric='euclidean').fit(X)
124
125     core_samples_mask = np.zeros_like(db.labels_, dtype=bool)
126     core_samples_mask[db.core_sample_indices_] = True
127
128     labels = db.labels_
129
130
131
```



```
122     #SAVE DATA FROM FRAME
123     # Number of clusters in labels, ignoring noise if present
124     .
125     n_clusters_ = len(set(labels)) - (1 if -1 in labels else
126         0)
127     n_noise_ = list(labels).count(-1)
128
129     print('Estimated number of clusters: %d' % n_clusters_)
130     print('Estimated number of noise points: %d' % n_noise_)
131     try:
132         silh = metrics.silhouette_score(X, labels)
133         print("Silhouette Coefficient: %0.3f" % silh)
134     except:
135         silh = -2
136         unique_elements, counts_elements = np.unique(labels,
137             return_counts=True)
138         print("Clusters:")
139         print(unique_elements)
140         print("Quantidades:")
141         print(counts_elements)
142
143         size_of_clusters = [0, 0, 0, 0, 0]
144         for tc in counts_elements[1:]:
145             if tc>=2 and tc<=4:         size_of_clusters[0] += 1
146             if tc>=5 and tc<=8:         size_of_clusters[1] += 1
147             if tc>=9 and tc<=15:        size_of_clusters[2] += 1
148             if tc>=16 and tc<=31:       size_of_clusters[3] += 1
149             if tc>=32:                   size_of_clusters[4] += 1
150
151         CLUSTER_PER_FRAME.append([FRAME, n_clusters_, n_noise_,
152             silh, unique_elements, counts_elements,
153             size_of_clusters[0],
```


A.2 Arquivo de Parametrização do dhmt livre

Listing A.4: Parametrização proposta para a molécula de dhmt livre

```
1 !=====
2 !
3 ! Parameter file generated by the Force Field ToolKit (ffTK)
4 !
5 ! For additional information, see:
6 ! http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/fftk
7 ! http://www.ks.uiuc.edu/Research/fftk
8 !
9 ! Authors:
10 ! Christopher G. Mayne
11 ! Beckman Institute for Advanced Science and Technology
12 ! University of Illinois, Urbana-Champaign
13 ! http://www.ks.uiuc.edu/~mayne
14 ! mayne@ks.uiuc.edu
15 !
16 ! James C. Gumbart
17 ! Georgia Institute of Technology
18 ! http://simbac.gatech.edu
19 ! gumbart_physics.gatech.edu
20 !
21 ! If you use parameters developed using ffTK, please cite:
22 ! C.G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, J.C. Gumbart.
    ! J. Comput. Chem. 2013, 34, 2757-2770.
23 !
24 !=====
25
26 BONDS
27 !V(bond) = Kb(b - b0)**2
28 !
```

```
29 !Kb: kcal/mole/A**2
30 !b0: A
31 !
32 !atom type Kb b0
33 !
34 CCNH CC2N 410.000 1.3600 ! * BOND C3 C2
35 CCNH NC2N 360.00 1.4120 ! * BOND C3 N1
36 CCNH HC 375.00 1.0830 ! * BOND C3 H4
37 CC2N NC2N 360.00 1.4120 ! * BOND C2 N3
38 CC2N CCOH2 229.63 1.5000 ! * BOND C2 C1
39 NC2N NN2 355.00 1.4000 ! * BOND N1 N2 N2 N3
40 NC2N CNH3 250.00 1.4800 ! * BOND C4 N1
41 NC2N CCNH2 250.00 1.4800 ! * BOND C5 N3
42 CCNH2 CC2H2 229.63 1.5000 ! *
43 CCNH2 HC 375.00 1.0830 ! *
44 CC2H2 CC2H2 229.63 1.5000 ! *
45 CC2H2 HC 375.00 1.0830 ! *
46 CC2H2 CCH3 229.63 1.5000 ! *
47 CCH3 HC 375.00 1.0830 ! *
48 CCOH2 OH 428.00 1.4200 ! *
49 CCOH2 HC 375.00 1.0830 ! *
50 OH HO 545.00 0.9600 ! *
51 CNH3 HC 375.00 1.0830 ! *
52
53 ANGLES
54 !
55 !V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2
56 !
57 !V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2
58 !
59 !Ktheta: kcal/mole/rad**2
60 !Theta0: degrees
```

```

61 !Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)
62 !S0: A
63 !
64 !atom types      Ktheta      Theta0      Kub      S0
65 !
66 !
67 CCNH      NC2N      CCNH2      130.00      110.00      ! *
68 CCNH      NC2N      NN2        105.00      111.80      ! *
69 CCNH      CC2N      CCOH2      45.80       130.00      ! *
70 CCNH      CC2N      NC2N       105.00      111.80      ! *
71 CC2N      CCOH2      HC         22.00       130.00      15.00      2.21500      ! *
72 CC2N      CCOH2      OH         130.00      111.70      ! *
73 CC2N      NC2N      CNH3       130.00      110.00      ! *
74 CC2N      NC2N      NN2        105.00      111.80      ! *
75 CC2N      CCNH      HC         22.00       130.00      15.00      2.21500      ! *
76 CC2N      CCNH      NC2N       105.00      111.80      ! *
77 NC2N      CNH3      HC         35.00       118.20      ! *
78 NC2N      NN2      NC2N       160.00      110.30      ! *
79 NC2N      CC2N      CCOH2      105.00      111.80      ! *
80 NN2      NC2N      CCNH2      105.00      111.80      ! *
81 NN2      NC2N      CNH3       105.00      111.80      ! *
82 NC2N      CCNH2     HC         35.00       118.20      ! *
83 NC2N      CCNH2     CC2H2      105.00      111.80      ! *
84 NC2N      CCNH      HC         35.00       118.20      ! *
85 CCNH2     CC2H2     HC         22.00       130.00      15.00      2.21500      ! *
86 CCNH2     CC2H2     CC2H2      45.80       130.00      !
87 CC2H2     CC2H2     HC         22.00       130.00      15.00      2.21500      ! *
88 CC2H2     CC2H2     CC2H2      45.80       130.00      ! *
89 CC2H2     CCNH2     HC         22.00       130.00      15.00      2.21500      ! *
90 CC2H2     CC2H2     CCH3       45.80       130.00      ! *
91 CC2H2     CCH3      HC         22.00       130.00      15.00      2.21500      ! *
92 CCH3      CC2H2     HC         22.00       130.00      15.00      2.21500      ! *

```

```

93 CCOH2 OH HO 55.00 104.38 ! *
94 OH CCOH2 HC 65.00 107.99 ! *
95 HC CCNH2 HC 35.50 108.40 ! *
96 HC CC2H2 HC 35.50 108.40 ! *
97 HC CCH3 HC 35.50 108.40 ! *
98 HC CCOH2 HC 35.50 108.40 ! *
99 HC CNH3 HC 35.50 108.40 ! *
100
101 DIHEDRALS
102 !
103 !V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
104 !
105 !Kchi: kcal/mole
106 !n: multiplicity
107 !delta: degrees
108 !
109 !atom types Kchi n delta
110 !
111 NC2N NN2 NC2N CCNH 2.0500 3 180.00 ! *
112 CCNH NC2N CCNH2 CC2H2 2.5000 1 180.00 ! *
113 CCNH NC2N CCNH2 HC 3.0000 3 180.00 ! *
114 CCNH CC2N NC2N NN2 8.0000 2 180.00 ! *
115 CCNH CC2N NC2N CNH3 2.5000 1 180.0 ! *
116 CCNH CC2N CCOH2 OH 3.1000 2 180.00 ! *
117 CCNH CC2N CCOH2 HC 0.3000 3 180.00 ! *
118 CC2N CCOH2 OH HO 0.8200 3 180.00 ! *
119 CC2N NC2N NN2 NC2N 0.1800 3 0.00 ! *
120 CC2N NC2N CNH3 HC 0.1000 3 0.00 ! *
121 CC2N CCNH NC2N NN2 0.0400 3 0.00 ! *
122 CC2N CCNH NC2N CCNH2 2.5000 1 180.0 ! *
123 NC2N NN2 NC2N CCNH2 2.0500 3 180.00 ! *
124 NC2N CCNH CC2N NC2N 1.0000 3 0.00 ! *

```

125	HC	CCNH	CC2N	NC2N	0.3000	3	0.00	! *
126	NC2N	CC2N	CCOH2	OH	14.0000	2	180.00	! *
127	NC2N	CC2N	CCOH2	HC	0.3000	3	0.00	! *
128	HC	CCNH	NC2N	NN2	0.3000	3	0.00	! *
129	NN2	NC2N	CCNH2	CC2H2	8.0000	2	180.00	! *
130	NN2	NC2N	CCNH2	HC	0.3000	3	0.00	! *
131	CCOH2	CC2N	NC2N	NN2	2.5000	1	180.00	! *
132	NN2	NC2N	CNH3	HC	0.3000	3	0.00	! *
133	NC2N	CCNH2	CC2H2	CC2H2	0.1900	3	0.00	! *
134	NC2N	CCNH2	CC2H2	HC	0.3000	3	0.00	! *
135	CNH3	NC2N	NN2	NC2N	2.0500	3	180.00	! *
136	NC2N	CCNH	CC2N	CCOH2	0.1900	3	0.00	! *
137	CCNH2	CC2H2	CC2H2	CC2H2	0.2000	1	0.00	! *
138	CCNH2	CC2H2	CC2H2	HC	0.3000	3	180.00	! *
139	HC	CCNH	NC2N	CCNH2	3.0000	3	180.00	! *
140	CC2H2	CC2H2	CC2H2	CC2H2	0.2000	1	0.00	! *
141	CC2H2	CC2H2	CC2H2	HC	0.3000	3	180.00	! *
142	HC	CCNH2	CC2H2	CC2H2	0.3000	3	180.00	! *
143	CC2H2	CC2H2	CC2H2	CCH3	0.2000	1	0.00	! *
144	CC2H2	CC2H2	CCH3	HC	0.3000	3	180.00	! *
145	HC	CC2H2	CC2H2	CCH3	0.3000	3	180.00	! *
146	HC	CCNH	CC2N	CCOH2	0.3000	3	180.00	! *
147	CCOH2	CC2N	NC2N	CNH3	2.5000	1	180.0	! *
148	HC	CCNH2	CC2H2	HC	0.2000	5	180.00	! *
149	HC	CC2H2	CC2H2	HC	0.2000	5	180.00	! *
150	HC	CC2H2	CCH3	HC	0.2000	5	180.00	! *
151	HC	CCOH2	OH	HO	0.1800	3	0.00	! *
152								
153	IMPROPER							
154	!							
155	!V(improper) = Kpsi(psi - psi0)**2							
156	!							

```

157 !Kpsi: kcal/mole/rad**2
158 !psi0: degrees
159 !note that the second column of numbers (0) is ignored
160 !
161 !atom types          Kpsi          psi0
162 !
163
164 NONBONDED nbxmod  5 atom cdiel shift vatom vdistance vswitch -
165 cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5
166 !
167 !V(Lennard-Jones) = Eps,i,j[(Rmin,i,j/ri,j)**12 - 2(Rmin,i,j/ri,j
      )**6]
168 !
169 !epsilon: kcal/mole, Eps,i,j = sqrt(eps,i * eps,j)
170 !Rmin/2: A, Rmin,i,j = Rmin/2,i + Rmin/2,j
171 !
172 !atom ignored      epsilon      Rmin/2      ignored      eps,1-4
      Rmin/2,1-4
173 !
174 CC2H2  0.0          -0.0560      2.0100      0.0 -0.01 1.9          ! ! SET
      BY ANALOGY!!!
175 CC2N   0.0          -0.0500      2.1000          ! ! SET BY ANALOGY!!!
176 CCH3   0.0          -0.0560      2.0100      0.0 -0.01 1.9          ! ! SET
      BY ANALOGY!!!
177 CCNH   0.0          -0.0500      2.1000          ! ! SET BY ANALOGY!!!
178 CCNH2  0.0          -0.0560      2.0100      0.0 -0.01 1.9          ! ! SET
      BY ANALOGY!!!
179 CCOH2  0.0          -0.0560      2.0100      0.0 -0.01 1.9          ! ! SET
      BY ANALOGY!!!
180 CNH3   0.0          -0.0560      2.0100      0.0 -0.01 1.9          ! ! SET
      BY ANALOGY!!!
181 HC     0.0          -0.0460      0.9000          ! ! SET BY ANALOGY!!!

```


182	HO	0.0	-0.0460	0.2245	! ! SET BY ANALOGY!!!
183	NC2N	0.0	-0.2000	1.8500	! ! SET BY ANALOGY!!!
184	NN2	0.0	-0.2000	1.8500	! ! SET BY ANALOGY!!!
185	OH	0.0	-0.1921	1.7650	! ! SET BY ANALOGY!!!
186					
187	END				

A.3 Material e Resultados Complementares

Para todos os gráficos que se seguem, as seguintes denominações de átomos do composto dhmtAc da Figura A.1 serão utilizadas.

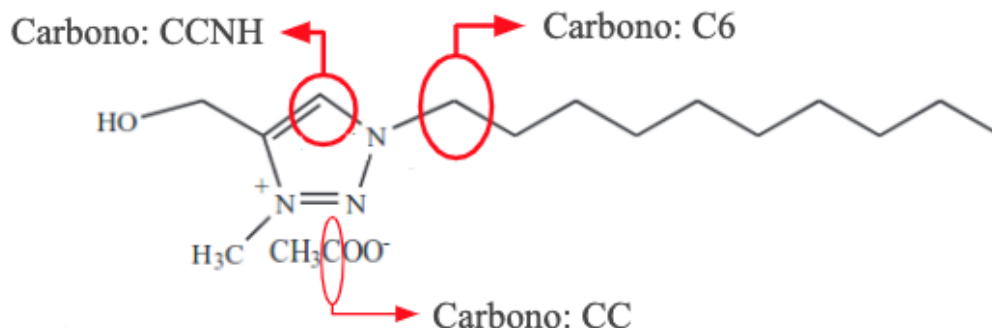


Figura A.1: Composto dhmtAc com marcações de tipos de átomos utilizados nas seleções dos gráficos posteriores.

A.3.1 4-dmtAc

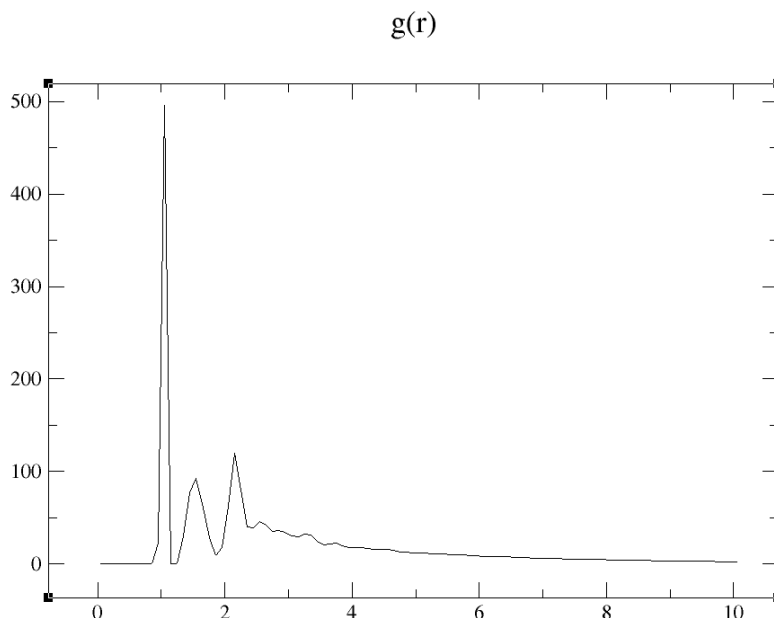


Figura A.2: Gráfico da função de dispersão molecular $g(r)$ vs Å entre todos os átomos das moléculas de dhmt livre no sistema 4-dhmtAc. Os valores são muito pequenos, pois nessa seleção considera-se a distâncias entre todos os átomos pertencentes a moléculas de dhmt livre, incluindo átomos ligados, que sempre estarão próximos. Para se livrar desse efeito é necessário fazer seleções a tipos de átomos específicos, para que esteja-se, de fato, medindo dispersão entre moléculas de dhmt livre.

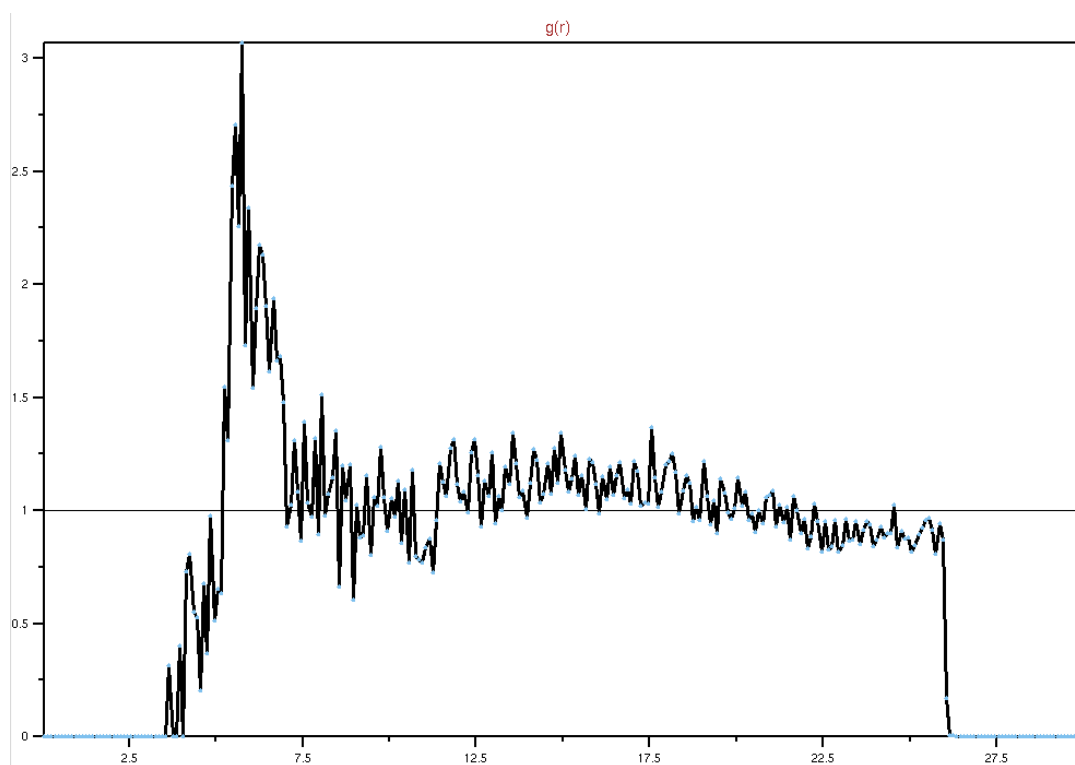


Figura A.3: Gráfico da função de dispersão molecular $g(r)$ vs Å entre átomos carbono CCNH das moléculas de dhmt livre e átomos de carbono CC das moléculas de acetato livre no sistema 4-dhmtAc.

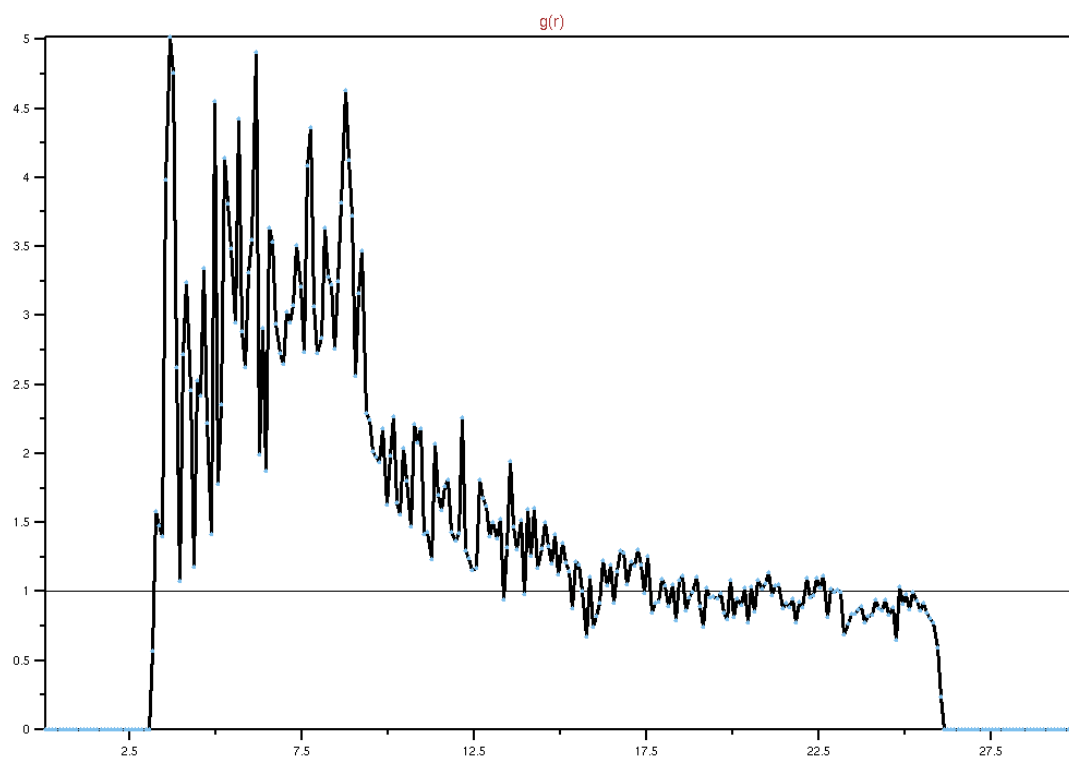


Figura A.4: Gráfico da função de dispersão molecular $g(r)$ vs Å entre átomos carbono C6 das moléculas de dhmt livre no sistema 4-dhmtAc.

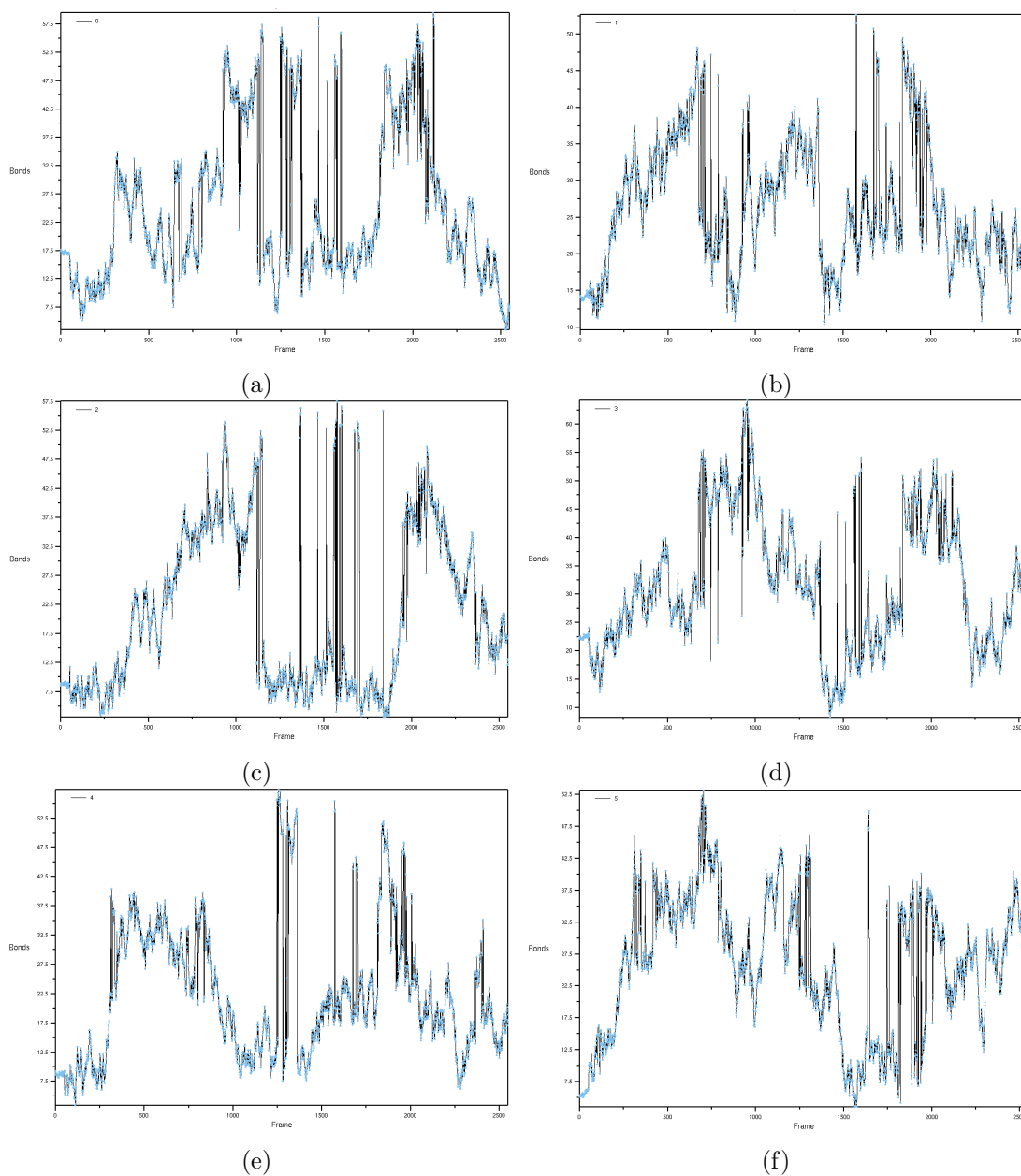


Figura A.5: Gráficos de distâncias em ångström (\AA) entre as combinações de pares de átomos carbono C6 das moléculas de dhmt livre no sistema 4-dhmtAc).

A.3.2 hem-micela

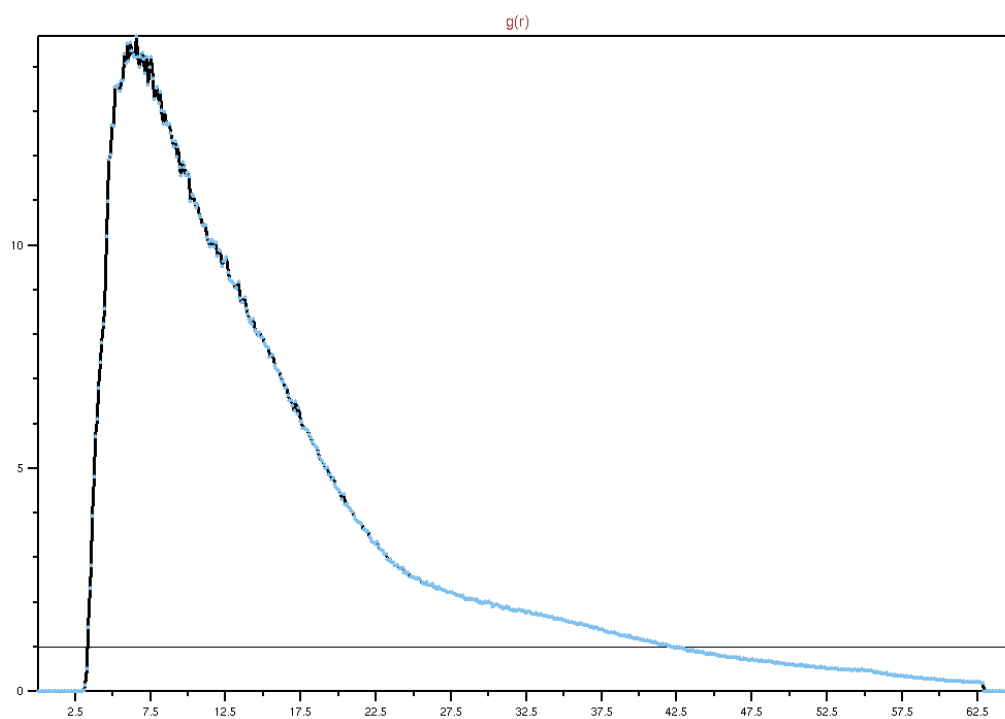


Figura A.6: Gráfico da função de dispersão molecular $g(r)$ vs Å entre átomos carbono C6 das moléculas de dhmt livre nos primeiros 5ns do sistema hem-micela.

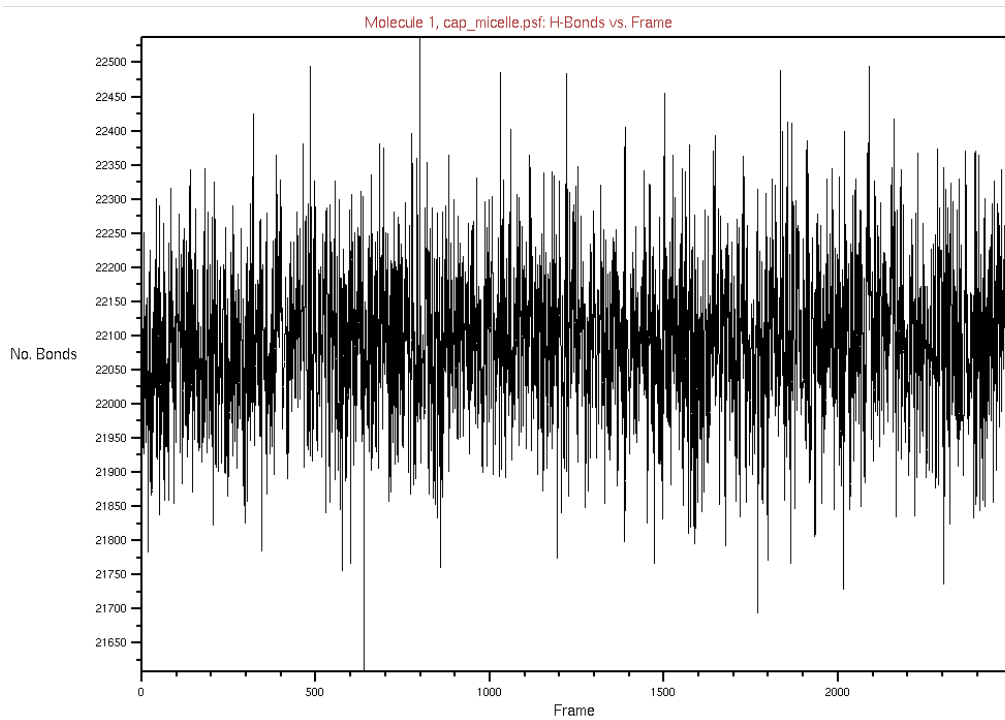


Figura A.7: Gráfico do número de ligações de hidrogênio no sistema hem-micela durante a evolução do sistema.

A.3.3 sys-ConcB

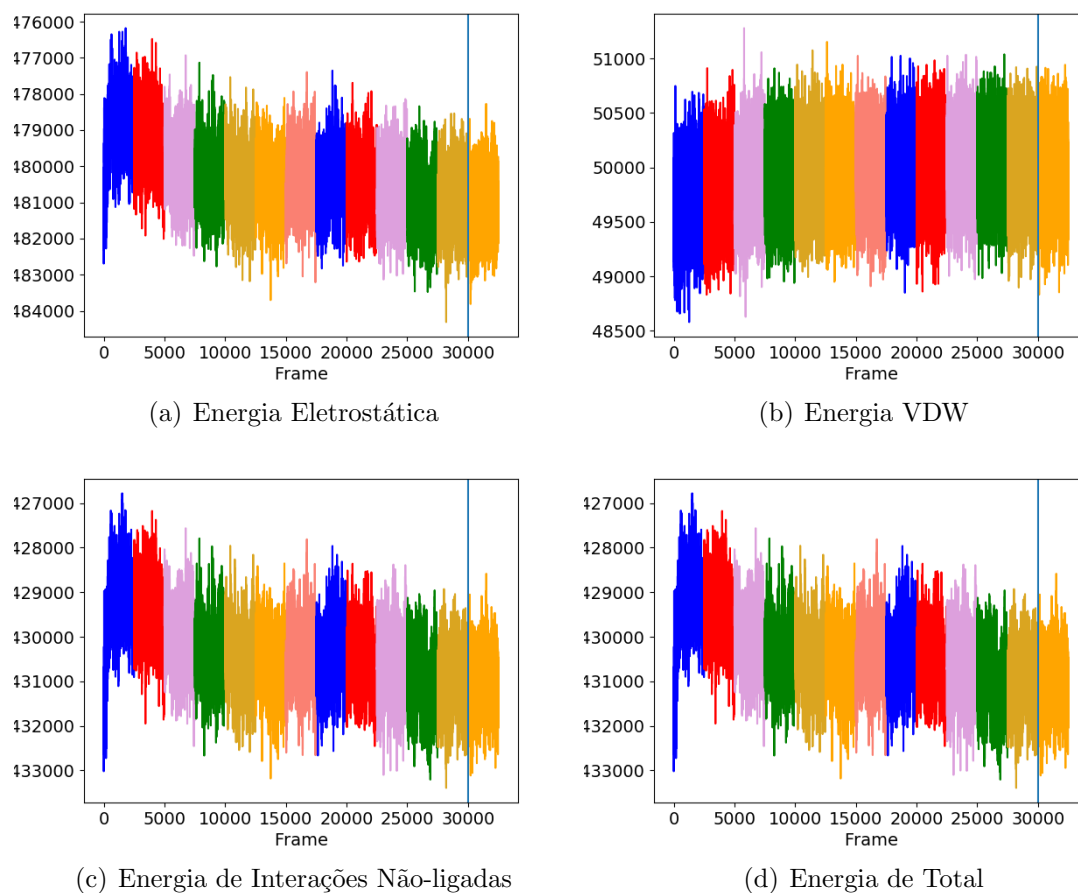


Figura A.8: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de água (TIP3) durante a evolução (0-65ns) do sistema **sys-ConcB**. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução. A linha vertical delimita o que foi considerado o fim da equilibrção e início da DM de produção, tendo base o estudo das energia do dhmt livre de **sys-ConcB**.

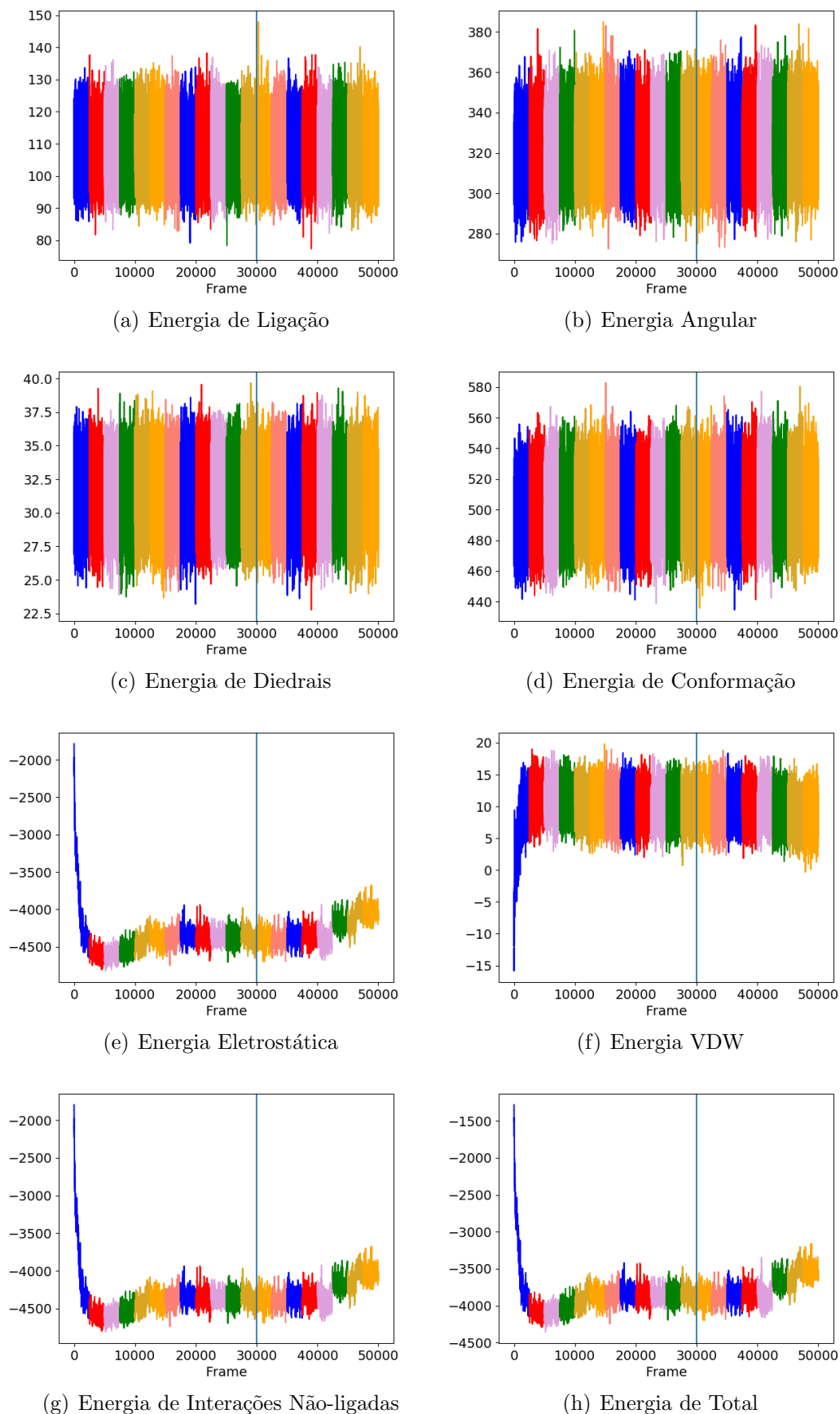


Figura A.9: Gráficos de energias (kcal/mol) das moléculas de acetato livre durante a evolução (0-100ns) do sistema `sys-ConcB`. Cada intervalo de mesma cor indica 5ns consecutivos de evolução. A linha vertical delimita o que foi considerado o fim da equilibração e início da DM de produção, tendo base o estudo das energia do dhmt livre de `sys-ConcB`.