

**Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado**  
**Instituto de Química - Universidade Federal de Uberlândia**

**RICHARD ANDRÉ CUNHA**

*CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE INTERAÇÃO DE QUITOSANAS COM  
BICAMADAS LIPÍDICAS COMPOSTAS DE DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA*

UBERLÂNDIA

2013

RICHARD ANDRÉ CUNHA

*CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE INTERAÇÃO DE QUITOSANAS COM  
BICAMADAS LIPÍDICAS COMPOSTAS DE DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestrado em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

UBERLÂNDIA

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 165/COPGQ.

DATA: 01/03/2013

DISCENTE: Richard André Cunha

MATRÍCULA: 11122QMI006

TÍTULO DO TRABALHO: Caracterização molecular do mecanismo de interação de quitosanas com bicamadas lipídicas compostas de dipalmitoilfosfatidilcolina.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Físico-química de Macromoléculas e Coloides

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Caracterização molecular de produtos de interesse biotecnológico – nanopartículas de quitosana (para descontaminação ambiental e regeneração celular) e complexos metálicos (com potencial atividade antitumoral e antifúngica).

Às quatorze horas do dia primeiro de março do ano dois mil e treze, no Auditório 50-F do Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Osmair Vital de Oliveira, do Instituto Federal do Espírito Santos, Carlos Alberto de Oliveira, do Instituto de Química da UFU e Eduardo de Faria Franca, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será O MESMO

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 40 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Osmair Vital de Oliveira – IFES

Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira – IQUFU

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca – IQUFU

A Deus.

Aos meus pais: Rener e Irani.

Ao meu amado irmão: Robert.

À minha amada namorada: Marina.

À minha maravilhosa família.

*“Cultura é indício de compromisso.  
Inteligência é traço mental solicitando o  
complemento do amor para conduzir o  
homem aos rumos do bem.”*

*(Ermance Dufaux)*

## *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade única de ter nascido cercado de tanto amor. Pela oportunidade incrível de viver próximo a pessoas maravilhosas. Agradeço por todos os dias que somente a crença em Deus e a fé na vida futura puderam me impulsionar.

Ao Professor, Orientador, Amigo e Companheiro, Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca, pela paciência, dedicação, confiança e amizade. Pela orientação, que foi decisiva para toda minha vida acadêmica, me apresentado a área com a qual irei sempre trabalhar; por me ensinar a não desistir, e principalmente, pelo incentivo e reconhecimento. Muito obrigado!

Ao Dr. Roberto Dias Lins Neto pela orientação, amizade, confiança e palavras de incentivo sem as quais eu não poderia imaginar o quão longe eu posso ir. Por acreditar em mim e me incentivar me apoiando sempre que precisei. Pelos momentos de descontração, e principalmente pela enorme quantidade de conhecimento que me passou, sempre com muita atenção e paciência. Muito obrigado!

Aos membros da banca, Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira e Prof. Dr. Osmair Vital de Oliveria, meu muito obrigado por aceitarem o convite para o encerramento deste mestrado. É uma grande honra poder contar com vocês na comissão examinadora e agradecemos por todas as contribuições feitas ao nosso trabalho.

Ao meu papai e minha mamãe que são os responsáveis pela minha formação de vida, física e espiritual. Agradeço pelo carinho de todas as horas, pelo esforço sem medidas, que me proporciona condições para crescer moral, espiritual e intelectualmente.

Ao meu querido irmão Robert, por ser uma das maiores inspirações de minha vida, sempre me impulsionando para o bem. Obrigado por me compreender, ouvir, apoiar e incentivar.

Ao meu Amor, Marina, pela compreensão, e pelas inúmeras renúncias em nome de nosso bem-estar. Pelo carinho e amor incondicional que me motiva a construir um futuro digno.

À Sônia, pelo apoio e compreensão incondicionais, e também pelas conversas sempre edificantes e proveitosas.

Ao Agnaldo, pela amizade, alegria e força que contribuem pra eu continuar seguindo.

A Profa. Dra. Silvana Guillard, pela amizade, incentivo e apoio crucial na minha vida acadêmica.

Aos amigos do coração: Bruno Garcês, Erick, Juliano, Keila e Rodrigo Banana, que podem contar com minha gratidão sempre, por terem sido fundamentais em várias etapas acadêmicas importantíssimas assim como em minha vida.

Aos amigos, da UFU pelo apoio e momentos de descontração e alegria: Ana Cristina, Lucas, Héden (Zituz), Drielly, Ana Caroline, Michel, Albert, Renata, Vinícius, Fellipy, Leandro (Japa), José e Guedmiller.

A Mayta, pela amizade, carinho e pelo auxílio, sempre de pronto, a todas as minhas necessidades acadêmicas.

A minha família maravilhosa, cujo amor é o que me mantém vivo. Muito Obrigado! Às vovós Jeovânia e Edite; às Tias: Iraídes, Irene, Joana, Nair, Cida, Mara e Régia; Aos Tios: Zezinho, Luis, Lauro, Eduardo, Romes, Rogério; Aos primos(as) incríveis: Lucas, Felipe, Fred, Victor, João Marcos, Kauã, André, Denizon, Paula, Daniela, Lívia, Alessandra, Mary Joe e Mariana.

A todos os professores que contribuíram com minha formação acadêmica.

A Universidade Federal de Uberlândia que sempre supriu minhas necessidades acadêmicas e me acolheu durante esses últimos anos.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Pacific Northwest National Laboratory, Richland – USA, pela infra-estrutura em horas computacionais, para realização de parte deste trabalho.



## ***Resumo***

A quitosana é uma versátil macromolécula com total biocompatibilidade, biodegradabilidade e um caráter catiônico que a torna vantajosa para aplicações biomédicas, (engenharia de tecidos: pele, ossos, células neurais e fígado), bem como em aplicações biofarmacêuticas (entrega de drogas e genes). As informações apresentadas através de técnicas experimentais atuais são pouco conclusivas em relação aos eventos moleculares por trás da bioatividade da quitosana e, em sua maioria, se limitam a descrever propriedades macroscópicas. No presente trabalho utilizou-se de simulações por dinâmica molecular para se obter uma descrição da interação da quitosana com modelos de membrana formados por unidades de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Estes fosfolípidios, em especial, são biomoléculas largamente encontradas em membranas biológicas sendo majoritariamente determinantes nas propriedades de membranas celulares. Para descrição do comportamento molecular da quitosana e do DPPC nas simulações, utilizaram-se parâmetros recentemente desenvolvidos e/ou modificados. Os sistemas iniciais utilizados consistem em uma quantidade variada de cadeias de quitosanas com grau de acetilação de 20%, colocadas a alguns angströms da bicamada de DPPC, em solvente explícito. A relação entre a quantidade de quitosana e moléculas de água visou reproduzir as concentrações de 10, 30 e 50 mg/mL de quitosana. As simulações foram realizadas por 100 ns para o DPPC, 150 para 10 mg/mL e 250 ns para 30 e 50 mg/mL de quitosana. Os resultados sugerem que o mecanismo de ação biológica da quitosana em bicamadas lipídicas não pode ser explicado apenas por interações eletrostáticas. As simulações permitiram descrever o papel dos grupos polares nas interações quitosana – DPPC, bem como sua relação com o solvente. Desta forma, as ligações de hidrogênio têm papel tão importante quanto às eletrostáticas, e o mecanismo de interação depende também de fatores como a interação com o solvente e a concentração de quitosana. O aumento na concentração de quitosana está diretamente ligado com a efetividade das interações específicas, direcionadas pela competição entre a interação quitosana – quitosana e quitosana – DPPC. Os resíduos *N*-acetilglicosamina, mostraram ter importante contribuição para ação da quitosana na membrana, sendo esta dependente da concentração de quitosana. A quitosana induz alterações estruturais na organização supramolecular da membrana, e fatores como área média por lipídio e a ordem dos carbonos nas cadeias alifáticas são bastante alterados nas concentrações de 30 e 50 mg/mL.

**Palavras-chaves:** Quitosana, bicamadas lipídicas, DPPC, Dinâmica Molecular.

## ***Abstract***

Chitosan is a versatile macromolecule with total biocompatibility, biodegradability and a cationic character which makes it suitable to biomedical applications (tissue engineering: skin, bones, neural cell and liver), as well to biopharmaceutical (drug and gene delivery). The information presented by experimental techniques remains unclear about the molecular events that are related with the biological activity of chitosan, and most of them, are limited to describe macroscopic properties. In the present work, simulations of molecular dynamics simulations were used in order to describe the interaction between the chitosan and models of biological membranes made by units of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). These phospholipids, in particular, could be largely found in biological membranes, playing an important role in the cells membranes. In order to describe the molecular behavior of the chitosan and DPPC in the simulations, were used parameters recently developed or improved. The initial systems were built by putting a variable amount of chitosan chains, with 20% of acetylation degree, at a few angstroms of the DPPC bilayer, in explicit solvent. The relation between the quantity of chitosan and the number of water molecules, aims to reproduce the chitosan concentration of 10, 30 e 50 mg/mL. The simulations were made by 100 ns for the DPPC only, 150 ns for the 10 mg/mL and 250 ns for the concentration of 30 and 50 mg/mL. The results suggest that the biological action mechanism of the chitosan on lipids bilayers cannot be explained only by electrostatic interactions. The simulations help to describe the role of the polar groups in the chitosan – DPPC interactions, as well their relationship with the solvent. Thereby, the hydrogen bond plays an important role such as the pure electrostatic interactions, and this interaction mechanism also depends on factors such as the chitosan concentration and the relation with water. The increase in the chitosan concentration is closely dependant on the effectiveness of specific interactions, that are driven by the competition between the interactions of the type chitosan – chitosan, and chitosan-DPPC. The *N*-acetylglicosamine residues, showed to have an important role on the chitosan action in the membrane, with a concentration dependant influence. The chitosan inflicts structural alterations in the supramolecular organization of the membrane, and properties such as area per lipid and order parameter of the carbons in the aliphatic chain, which are drastically affected by the chitosan concentrations of 30 and 50 mg/mL.

**Keywords:** Chitosan, Lipid Bilayers, DPPC, Molecular Dynamics.

## *Lista de Figuras*

Figura 1 – A) Estrutura da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). B) Representação da estrutura tridimensional do DPPC e a polaridade de algumas regiões. ....	19
Figura 2 – Representação de uma camada lipídica e dos movimentos possíveis dos lipídios sem considerar passagem para outra camada. ....	20
Figura 3 – Movimentos dos lipídios em membranas e os tempos aproximados de correlação. Adaptada do livro “The Structure of Biological Membranes” no capítulo 4 de YEAGLE, P. L. e colaboradores [22]. ....	21
Figura 4 – Representação esquemática das duas unidades monoméricas que compõe a quitosana onde $n$ é o grau de polimerização. As cadeias de quitina e quitosana são formadas por diferentes proporções destes resíduos, sendo o resíduo GlcN predominante na quitosana. Estão destacados em vermelho os substituintes responsáveis pela diferenciação dos monômeros e os ângulos diedros $\Phi$ e $\Psi$ (formados pelos átomos O5-C1-O1-C4 <sub>(n+1)</sub> and C1-O1-C4 <sub>(n+1)</sub> -C5 <sub>(n+1)</sub> ). Adaptada do livro “The Complex World of the Polysaccharides”, capítulo 9 de nossa autoria [36]. ....	22
Figura 5 – Esquema das estruturas polimórficas de quitina. As setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor. ....	25
Figura 6 – Estruturas secundárias da quitosana obtidas por cristalografia de raios-X. A) hélice 2; B) hélice 3; C) hélice 4; D) hélice 5; e E) hélice 2 relaxada. Os hidrogênios ligados ao carbono foram omitidos para melhor visualização. Os átomos estão coloridos como: ciano: carbono; vermelho: oxigênio; branco: hidrogênio; e azul: nitrogênio. Adaptada do livro “The Complex World of the Polysaccharides”, capítulo 9 de nossa autoria [36]. ....	26
Figura 7 – Representação do ângulo de ligação ( $\theta$ ) e o ângulo diedro ( $\phi$ ). ....	35
Figura 8 – Esquema global do algoritmo da DM. (Adaptado do manual do programa GROMACS [103]) ....	41
Figura 9 – Representação de condições periódicas de contorno em duas dimensões. O círculo no centro seria a esfera de raio $R_c$ na qual as interações de vdW seriam calculadas (entre os átomos $i$ e $j_1$ e $i$ e $j_2$ . Os átomos em preto só interagem com o átomo $i$ através de interações ligadas. ....	43
Figura 10 – <i>Snapshot</i> das configurações iniciais dos sistemas simulados. Os átomos estão representados como esferas de van der Waals. Sendo que A(1-2) é apenas DPPC e B(1-2), C(1-2) e D(1-2), são 10, 30, 50 mg/mL de quitosana. ....	47

Figura 11 – Arranjo geométrico das ligações de hidrogênio. (1) Ligação normal entre duas partículas. (2) Ponte formada por ligação de hidrogênio via a água.....	51
Figura 12 – Representação bidimensional do raio e dos elementos para o cálculo de $g_{ij}(r)$ . Os átomos azuis (claro e escuro) serão utilizados para calcular a densidade $\rho_j$ , sendo que os átomos $j_{(1-5)}$ contribuem para $g_{ij}(r+dr)$ .....	52
Figura 13 – Representação esquemática do processo de difusão lateral dos lipídios ao longo de uma monocamada.....	54
Figura 14 – Definição do eixo normal da membrana e do eixo molecular $i$ para o carbono $n$ formado entre os carbonos $n+1$ e $n-1$ (em verde) da cadeia alifática. ....	56
Figura 15 – Variação da área média por lipídio ( $A_L$ ) pelo tempo de simulação e concentração de quitosana nos sistemas simulados. ....	58
Figura 16 – Módulo do valor de $S_{cd}$ para os átomos de carbono das cadeias alifáticas do DPPC nos sistemas simulados. Cadeia sn-1 (A) e sn-2 (B).....	59
Figura 17 – Lipídios imediatamente abaixo da quitosana. A) Estrutura extraída da simulação contendo DPPC e 30 mg/mL de quitosana aos 225 ns, B) e C) são diferentes ângulos da região demarcada, em que os outros lipídios e a água foram removidos para melhor visualização de suas conformações e posições. As bolas azuis (em B e C) destacam a posição dos grupos $-NH_3^+$ da quitosana e $-N(CH_3)_3^+$ do DPPC. Em C, a quitosana foi representada a partir do volume aproximado que a mesma ocupa (cálculo baseado nos raios de vdW dos átomos constituintes).....	60
Figura 18 – A) Estrutura da membrana + 10 mg/mL de quitosana (amarelo) após 150 ns de simulação. B) Interações específicas de 6 resíduos de quitosana com o DPPC. As ligações de hidrogênio foram numeradas sendo que: 1 – Grupo $-NH_3^+$ com a carbonila do DPPC, diretas e intermediadas pela água, e com a hidroxila Ho6-O6 intermediada pela água. 2 – Grupo Ho3-O3 e fosfato. 3 - Grupo Ho3-O3 e a carbonila. 4 – Hidroxilas da quitosana e grupos fosfato do DPPC via água.....	63
Figura 19 – Rede de ligações de hidrogênio entre água, DPPC e Quitosana aos 150 ns da simulação do sistema DPPC + quitosana 10 mg/mL. Na esquerda 4 moléculas de água formam uma rede envolvendo dois lipídios e o grupo amino da quitosana. Enquanto que a rede formada no lado direito envolve uma das hidroxilas da quitosana e 5 moléculas de água. ....	64

Figura 20 – Número médio de Ligações de Hidrogênio por grupo amino da quitosana nos últimos 25 ns de simulação. Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul 50 mg/mL de quitosana.....	65
Figura 21 – Número médio de Ligações de Hidrogênio por hidroxila da quitosana nos últimos 25 ns de simulação. Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul 50 mg/mL de quitosana.....	65
Figura 22 – Número médio de ligações de hidrogênio nos últimos 25 ns de simulação. Os valores de <i>HB</i> para quitosana - quitosana incluem as ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul 50 mg/mL de quitosana	67
Figura 23 – Função de distribuição radial de pares entre o oxigênio da água (OW), oxigênio das hidroxilas (O3, O6) e o nitrogênio da quitosana (N). NC é o número de coordenação para a primeira camada de solvatação para as concentrações de quitosana indicadas. ....	68
Figura 24 – Função de distribuição radial de pares entre o átomo de fósforo e os principais átomos dos grupos polares passíveis de interação com o $-\text{PO}_4^-$ . Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul: 50 mg/mL de quitosana e em preto (gráfico C): somente DPPC. Os números de coordenação (NC) mostrados em C, são referentes à quantidade de moléculas de água interagindo diretamente com o $-\text{PO}_4^-$ . ....	69
Figura 25 – Função de distribuição radial de pares entre o átomo de N dos grupos $\text{NH}_3^+$ e NAc da quitosana com os átomos O12 e O22 da carbonila dos lipídios, da cadeia sn1 e sn2 respectivamente. Os valores do número de coordenação (NC) são do $N_{\text{quitosana}}$ em relação ao O22.....	71
Figura 26 – Distribuição radial de pares para entre os átomos de oxigênio das hidroxilas (O3 e O6) da quitosana e os átomos de oxigênio das carbonilas das cadeias sn1 e sn2 do DPPC (O12 e O22 respectivamente).....	72

## *Lista de Tabelas*

Tabela 1- Porcentagem de massa dos principais componentes de algumas membranas biológicas. Adaptado de [24].....	17
Tabela 2 – Exemplo de níveis de modelagem computacional em bioquímica e biologia molecular [92].....	32
Tabela 3 – Equações Newtonianas básicas utilizadas na DM. ....	39
Tabela 4 – Tabela com a composição dos sistemas simulados. Todos os sistemas continham uma membrana de DPPC com 512 lipídios que foram inclusos no número total de partículas. As concentrações de quitosana são aproximadas. ....	46
Tabela 5 – Definição e quantidade dos grupos cujas ligações de hidrogênio foram analisadas. As quantidades de $-\text{PO}_4^-$ e carbonilas são relativas ao lado da bicamada que interagiu com a quitosana.....	51
Tabela 6 – Tabela com o valor médio da área por lipídio. A concentração é de quitosana em relação à água e as médias foram extraídas após 50, 100, 150 e 150 ns para os sistemas DPPC, 10, 30 e 50 mg/mL, respectivamente. ....	58
Tabela 7 – Tabela contendo os valores de $D_{\text{lat}}$ para os lipídios que compunham as bicamadas presentes nas simulações. O valor experimental obtido a 421 K [131]. ....	61

### *Lista de abreviaturas e siglas*

A: Aceptor.

$A_L$ : Área média por lipídio.

CM: Centro de Massa.

D: Doador.

$D_{lat}$ : Coeficiente de Difusão Lateral.

DM: Dinâmica Molecular.

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina.

DPPG: Dipalmitoilfosfatidilglicerol.

GA: Grau de Acetilação

GlcN: Glicosamina ou 2-acetamido-2-desoxi- D-glicopirranose.

GlcNAc: *N*-acetilglicosamina ou 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose.

$\overline{HB}$ : Número médio de ligações de hidrogênio.

IR: Infrared ou Infravermelho.

MM: Mecânica Molecular.

$\overline{MM}$ : Massa molecular média.

RMN: Ressonância Magnética Nuclear.

$S_{cd}$  ou  $|S_{cd}|$  = Parâmetro de Ordem de Deutério.

$S_n$  = Parâmetro de Ordem.

vdW: van der Waals.

## Sumário

<b>Justificativa.....</b>	<b>16</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>17</b>
1.1 Membranas Celulares .....	17
1.1.1 Bicamadas Lipídicas .....	18
1.2 Quitosana.....	22
1.2.1 Estrutura molecular e dinâmica estrutural da quitosana .....	24
1.2.2 Interações moleculares e atividade biológica da quitosana .....	28
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	31
<b>3 Fundamentação Teórica.....</b>	<b>32</b>
3.1 Mecânica Molecular.....	33
3.1.1 Potencial harmônico de ligação (ou linear).....	35
3.1.2 Potencial harmônico angular .....	35
3.1.3 Potencial torsional (ou diedral).....	36
3.1.4 Potencial de Lenard-Jones (ou van der Waals).....	37
3.1.5 Potencial de Coulomb .....	38
3.2 Dinâmica Molecular.....	38
3.2.1 Condições periódicas de contorno e tratamento das interações não ligadas .....	42
<b>4 Metodologia .....</b>	<b>46</b>
4.1 Sistemas simulados.....	46
4.2 Simulações por Dinâmica Molecular.....	48
4.3 Ferramentas computacionais de Análises dos Dados.....	49
4.3.1 Área por Lipídio.....	49
4.3.2 Ligações de Hidrogênio.....	50
4.3.3 Função de Distribuição Radial de Pares .....	52
4.3.4 Coeficiente de difusão lateral .....	53
4.3.5 Parâmetro de Ordem.....	54
<b>5 Resultados e Discussões .....</b>	<b>57</b>
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>74</b>



<b>7</b>	<b><i>Referências Bibliográficas</i></b> .....	<b>76</b>
----------	--	-----------

## *Justificativa*

A quitosana é um biopolímero catiônico com propriedades únicas que a conferem inúmeras aplicações. No campo da engenharia de tecidos, o uso de materiais artificiais é uma estratégia adequada na criação de um meio favorável ao crescimento e reparo de nervos periféricos danificados [1, 2]. E neste contexto, a quitosana se destaca como um material extremamente versátil [3, 4]. Este polissacarídeo agrega notáveis características, podendo-se enfatizar sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, ação bactericida e fungicida; e a possibilidade de ser fabricada em variadas formas (filmes, membranas, *3D scaffolds*, géis, microesferas, nanopartículas e nanofibras) [5-8]. A quitosana, como seus derivados e compósitos, tem ação comprovada como matriz de crescimento celular, induzindo regeneração neural [9]. No campo biofarmacêutico a quitosana também se mostra bastante promissora, podendo ser aplicada para entrega de drogas, genes e até mesmo na formação de compósitos com lipossomas, o que leva a outras inúmeras aplicações [10-14].

Ainda que a quitosana tenha inúmeras aplicações, há grande dificuldade em descrever os mecanismos de ação da quitosana com sistemas biológicos a nível molecular, incluindo interações entre a quitosana e as membranas celulares [15]. Os trabalhos neste campo se focam na análise de propriedades macroscópicas fornecendo uma visão um pouco superficial do que pode estar ocorrendo a nível molecular [16-19]. Com o aperfeiçoamento de técnicas e modelos para estudo a resolução dos experimentos vem aumentando, no entanto não se sabe quando teremos plena instrumentação e metodologia para abordar a atividade biológica da quitosana com uma visão molecular. Dessa forma, este trabalho propõe elucidar os mecanismos de ação da quitosana em modelos de membranas celulares através da simulação computacional em nível atômico, correlacionando os sistemas microscópicos com as propriedades macroscópicas. Essa compreensão molecular da interação da quitosana com membranas poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas aplicações assim como no aperfeiçoamento das propostas já existentes.

# 1 Introdução

## 1.1 Membranas Celulares

As membranas celulares são componentes primordiais do mundo biológico. Acredita-se que as primeiras células possam ter surgido através do envolvimento de RNA autoreplicante por uma membrana de fosfolipídios [20]. Com exceção de alguns vírus, todos os seres vivos dependem de uma maneira ou outra, de membranas celulares. Elas separam o conteúdo interno das células do resto do universo, podendo formar também compartimentos intracelulares no citoplasma. As membranas plasmáticas, tanto em células procarióticas quanto em eucarióticas, controlam a composição do citoplasma servindo como uma barreira seletiva para transporte de moléculas [21].

As membranas celulares têm como arcabouço uma bicamada fluída composta em sua maioria por lipídios, proteínas e alguns polissacarídeos. A porcentagem de cada componente varia com o tipo de célula e sua função sendo que os lipídios são os componentes mais abundantes em células animais, a quantidade de lipídios na membrana pode chegar a 80% [22, 23]. A Tabela 1 mostra a porcentagens em massas de proteínas, lipídios e carboidratos [24]. Note que a relação de massa de proteínas em relação à dos lipídios fica próxima a um e em muitas vezes supera esse número, no entanto uma única proteína de membrana pode ter a massa milhares de vezes superior a de um lipídio, comprovando a superioridade em número de moléculas que os lipídios têm relação às outras.

Tabela 1- Porcentagem de massa dos principais componentes de algumas membranas biológicas. Adaptado de [24].

Membrana		Proteínas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Relação Proteínas/Lipídios
Membranas plasmáticas	Células de fígados de ratos	46	54	2-4	0,85
	Eritrócito humano	49	43	8	1,1
	Ameba	52	42	4	1,3
Membrana Nuclear do fígado de Rato		59	35	2,0	1,6
Membrana mitocondrial externa		52	48	(2-4)	1,1
Membrana mitocondrial interna		76	24	(1-2)	3,2

Mielina	18	79	3	0,23
Bactéria gram-positiva	75	25	(10)	3,0
<i>Halobacterium purple membrane</i>	75	25		3,0

As propriedades estruturais das membranas são definidas principalmente pelos lipídios e proteínas que a compõem. As proteínas de membranas desempenham inúmeros papéis no metabolismo celular que vão desde fixação estrutural até funções especializadas como reconhecimento de determinadas moléculas, transporte de elétrons e até mesmo interações com outras células [25]. A membrana celular e seus componentes têm participação em praticamente todos os processos celulares importantes. A produção de energia em nosso organismo depende fortemente do transporte de moléculas para dentro e fora da célula. Como exemplo, a conversão de energia elétrica produzida pelo gradiente de carga ao longo da membrana em energia química armazenada na forma de ligações do fosfato no ATP.

Muitos mecanismos das atividades celulares ainda permanecem desconhecidos, e isso se deve principalmente à complexidade deste sistema, de como seus componentes se relacionam e a dificuldade experimental de lidar com células para estudos a nível molecular. Por isso o uso de técnicas computacionais pode contribuir fortemente no campo da biologia molecular.

### 1.1.1 Bicamadas Lipídicas

As bicamadas lipídicas são a base estrutural das membranas celulares, servindo de arcabouço para outros componentes como proteínas. São formadas em sua maioria por fosfolipídios (glicerofosfolipídios) podendo conter também glicolipídios (glicosil-diacylgliceróis), esfingolipídios, esteróis e lipo-polissacarídios [26]. Um dos fosfolipídios comumente presente em membranas celulares de mamíferos é a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), cuja estrutura está representada na Figura 1A. O DPPC possui duas caldas de ácidos graxos hidrofóbicas e uma cabeça hidrofílica e zwitteriônica [21]. Assim como o DPPC os lipídios em geral são biomoléculas anfipáticas podendo ou não ser zwitteriônicas. Estima-se que em geral que cerca de 10% dos lipídios apresentam-se carregados [27]. No mapa de distribuição de cargas do DPPC, na Figura 1B, podemos observar quais grupos contribuem para a polaridade ao longo da molécula de DPPC. Devido à polaridade e hidrofilicidade da cabeça dos lipídios, estas se posicionam nas bordas da bicamada enquanto as caldas

compostas de carbono e hidrogênio interagem entre si e ocupando o centro da estrutura, formando camadas [28].

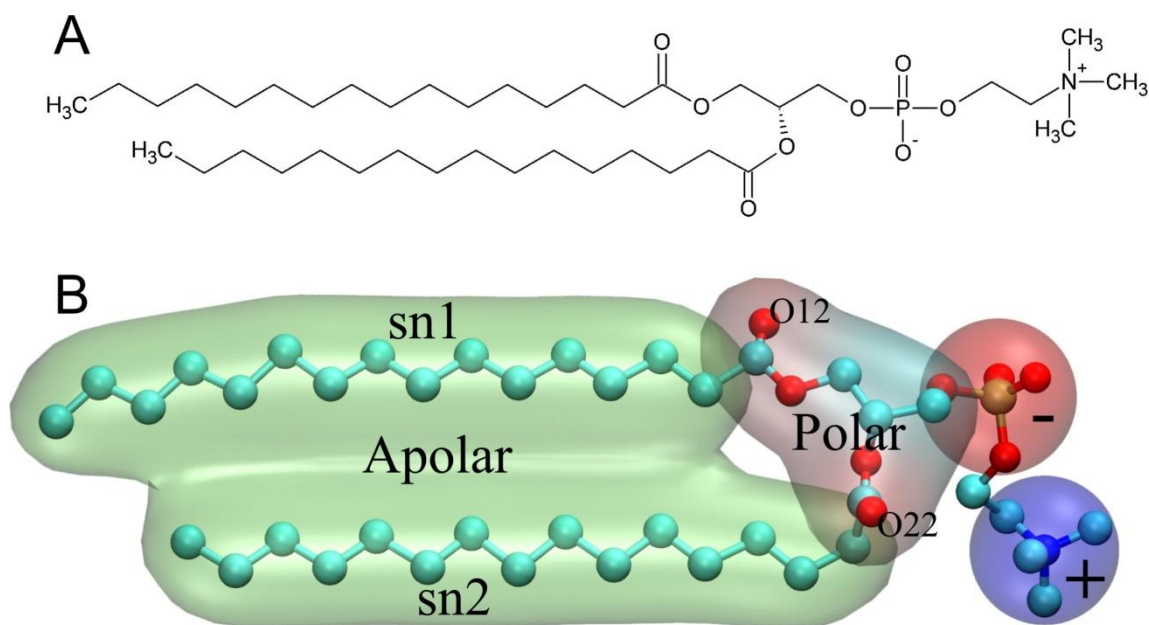


Figura 1 – A) Estrutura da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). B) Representação da estrutura tridimensional do DPPC e a polaridade de algumas regiões.

As interações entre os lipídios determinam importantes propriedades da membrana. O equilíbrio de forças entre interações eletrostáticas, de van der Waals (vdW) e ligações de hidrogênio (efeito da água) determinam características dinâmicas da bicamada tais como sua largura, a área ocupada por lipídio e o coeficiente de difusão lateral dos lipídios. As interações do tipo van der Waals prevalecem dentro os lipídios; no entanto, são relativamente fracas, se comparadas às eletrostáticas. A região polar dos lipídios é estabilizada não só por interações entre elas, mas também interações com a água, sendo esta última primordial na estabilização da estrutura [22].

Os lipídios têm relativa liberdade na membrana e interagem de maneira muito dinâmica. As interações que ocorrem na bicamada são suficientes para manter o padrão estrutural e permitem movimentações lipídicas translacionais e rotacionais na membrana como mostrado na Figura 2. Desta forma a matriz de lipídio de quase todas as biomembranas está num estado líquido-cristalino lamelar caracterizado pela formação de uma camada dupla estável [28]. O modelo de mosaico fluido proposto por Singer e Nicholson foi o primeiro a sugerir que uma bicamada lipídica poderia ser comparada a um líquido bidimensional [29]. Os graus de liberdade translacionais dos lipídios estão inerentemente ligados à elasticidade da bicamada

assim como importantes funções das membranas, como permeabilidade a solventes e solutos, e ação de proteínas de membrana periféricas e integrais. A manutenção do caráter líquido-cristalino da matriz lipídica da membrana requer uma composição específica assim como uma determinada faixa de temperatura e estado de hidratação [30].

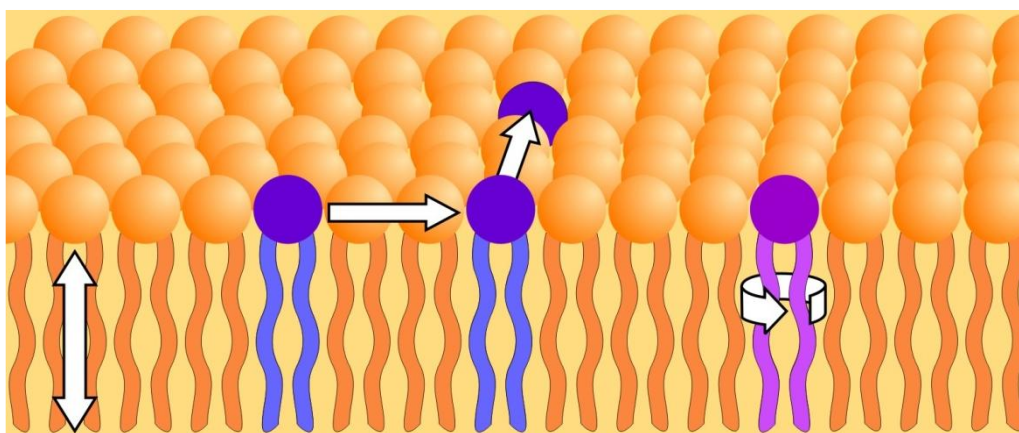


Figura 2 – Representação de uma camada lipídica e dos movimentos possíveis dos lipídios sem considerar passagem para outra camada.

A compreensão da estrutura molecular das membranas é de fundamental importância, e este tópico já foi largamente estudado ao longo dos anos, visto que o modelo de mosaico fluido de Singer e Nicholson sugere que a fluidez da membrana tem importante papel nas suas propriedades biológicas [31]. Nos últimos anos, o foco do estudo tem apontado para a caracterização de propriedades dinâmicas da bicamada e como estas são afetadas pela interação com proteínas e peptídeos [32, 33]. A combinação de metodologias teóricas e experimentais torna possível a descrição da estrutura molecular de bicamadas lipídicas e, até certo ponto, membranas celulares. A ordenação dos lipídios e sua dinâmica podem ser estudadas através de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho/Raman, espectroscopia de fluorescência com resolução temporal em marcas localizadas em diferentes regiões da bicamada, ressonância paramagnética eletrônica (EPR) de spin, varredura diferencial de calorimetria (DSC), difração de raios-X e nêutrons, além de simulações moleculares. As simulações moleculares provêm uma descrição detalhada dos movimentos moleculares ao longo de determinado tempo. O aumento no poder computacional, em termos de processamento e memória tem permitido que as simulações possam ser estendidas alcançando escalas de tempo de até microssegundos. Desta forma é

possível simular grande parte dos movimentos moleculares dos lipídios na membrana. As escalas de tempo de correlação dos lipídios na membrana estão mostradas na Figura 3.

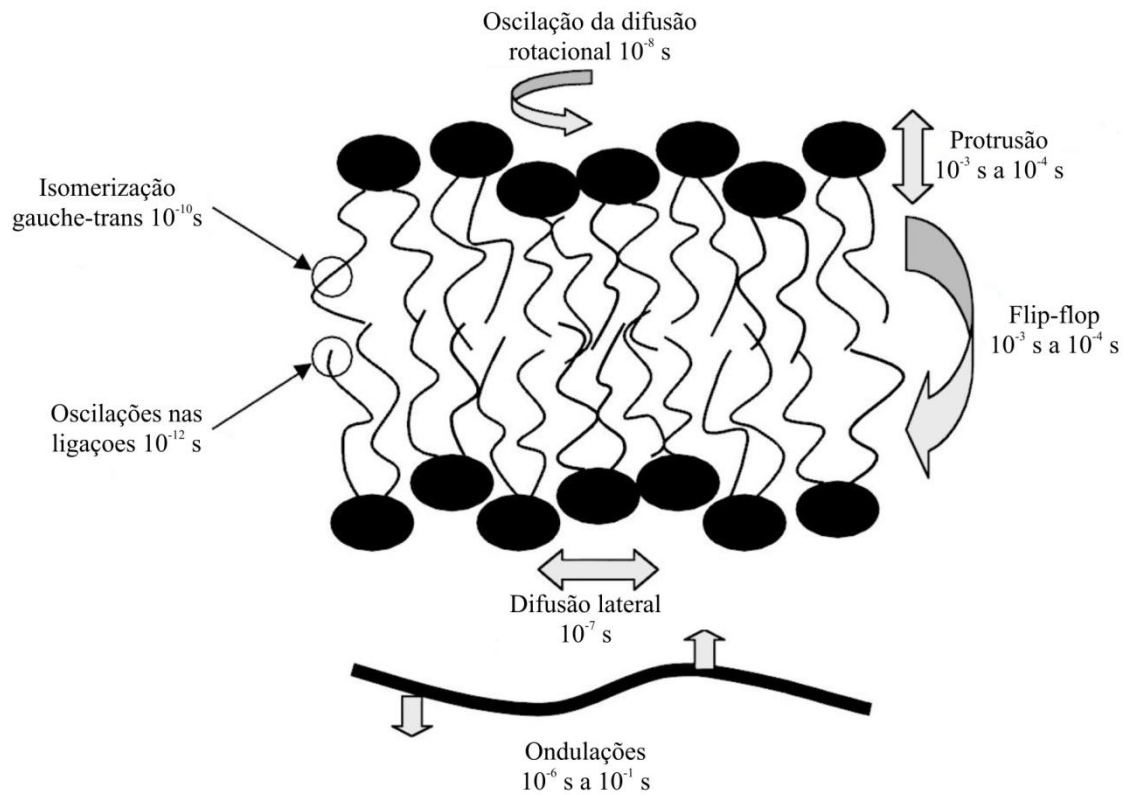


Figura 3 – Movimentos dos lipídios em membranas e os tempos aproximados de correlação. Adaptada do livro “The Structure of Biological Membranes” no capítulo 4 de YEAGLE, P. L. e colaboradores [22].

## 1.2 Quitosana

A quitosana é um copolímero linear e semi-sintético obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina. Seus monômeros estão unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$ , e são alternados de forma randômica entre glicosamina (GlcN) e *N*-acetilglicosamina (GlcNAc). Os dois monômeros se diferem pelo substituinte na posição C2 do anel glicosídico, podendo ser um grupamento amino ou acetamino (N-acetil) [34]. A representação de uma unidade de quitosana/quitina é dada na Figura 4. A produção natural de quitina chega a centenas de bilhões de toneladas por ano, tornando este biomaterial um dos mais abundantes no planeta. Uma grande parte da quitina presente na natureza se encontra no exoesqueleto de artrópodes, tais como o camarão e caranguejos [35]. Tanto a quitina quanto a quitosana são biocompatíveis e biodegradáveis, tornando estes materiais compatíveis com a proposta de sustentabilidade. Devido à enorme disponibilidade da quitina, a quitosana pode ser considerada como um material proveniente de uma fonte renovável.

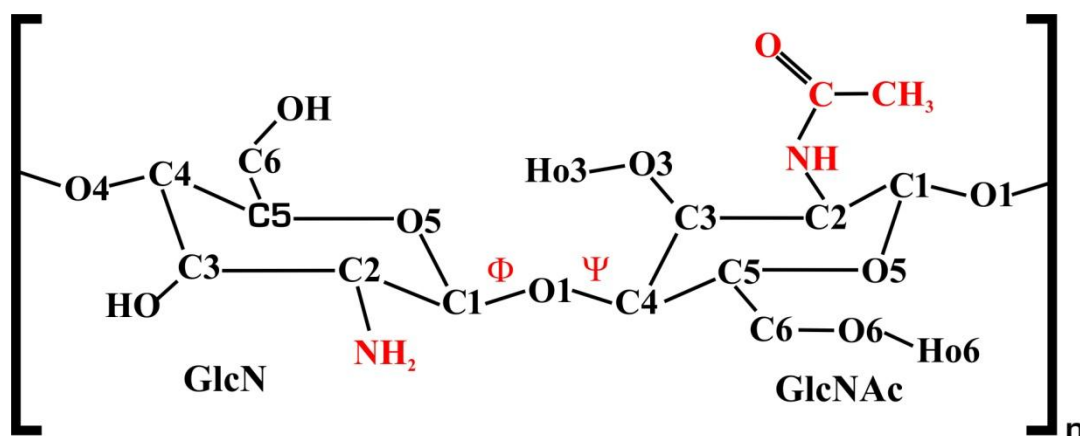


Figura 4 – Representação esquemática das duas unidades monoméricas que compõe a quitosana onde  $n$  é o grau de polymerização. As cadeias de quitina e quitosana são formadas por diferentes proporções destes resíduos, sendo o resíduo GlcN predominante na quitosana.

Estão destacados em vermelho os substituintes responsáveis pela diferenciação dos monômeros e os ângulos diedros  $\Phi$  e  $\Psi$  (formados pelos átomos O5-C1-O1-C4<sub>(n+1)</sub> and C1-O1-C4<sub>(n+1)</sub>-C5<sub>(n+1)</sub>). Adaptada do livro “The Complex World of the Polysaccharides”, capítulo 9 de nossa autoria [36].

A quitina é composta por resíduos de GlcNAc que ao serem submetidos à hidrólise alcalina, perdem o acetato sendo convertidos em resíduos de GlcN. Esta reação é chamada de



desacetilação e por não ser um processo homogêneo os resíduos GlcNAc e GlcN adotam proporções e posições variadas nas cadeias do biopolímero [37, 38]. A proporção de resíduos GlcNAc, expressa em porcentagem, é denominada grau de acetilação (GA) e este influem significativamente as propriedades da quitina e quitosana [39, 40]. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem efeito marcante na sua solubilidade, sendo este um dos parâmetros adotados para determinar a diferença entre quitina e quitosana. Considera-se como quitosana os polissacarídeos cuja composição seja de grupos GlcNAc e GlcN em proporção que seja possível solubilizá-lo em meio fracamente ácido (geralmente 0,1 mol/L de ácido acético). Convencionalmente, quando o GA da quitina é inferior a 50%, ou seja, mais da metade dos resíduos possui grupamentos amino, podemos considerá-la como quitosana.

Devido à sua estrutura única, a quitosana tem se mostrado com um biomaterial muito promissor com aplicações nos mais diversos campos. Dentre os principais, que a quitosana se aplica, podemos destacar sua utilização em química verde; aplicações biomédicas e farmacêuticas; em alimentos [41]; e agricultura [42]. A estrutura intrínseca da quitosana e a sua interação dinâmica com a água e biomoléculas são determinantes para suas aplicações. Sua estrutura varia de acordo com mudanças em sua massa molecular média ( $\overline{MM}$ ), que está relacionada ao tamanho da cadeia, ao GA e a modificações químicas em sua estrutura. Os tipos de modificações químicas e formação de compósitos com a quitosana são inúmeros e não serão abordados neste trabalho (um *review* pode ser encontrado na referência [43]) [43-47].

A quitosana possui propriedades quelantes e alta absorvidade, o que a torna um excelente material para a reparação de ambientes contaminados com metais pesados [48]. Uma das primeiras utilizações da quitosana foi para a remoção de mercúrio de águas contaminadas, sendo também utilizada para remover urânio/uranila [49, 50]. O processo de quelação dos metais ocorre nos grupos polares da quitosana (hidroxilas e acetamida e aminas primárias). Estes grupos são determinantes no comportamento químico da quitosana frente a interações da quitosana com o solvente, sendo responsáveis por importantes propriedades para processo de solubilização da quitosana (em meios fracamente ácidos, pH  $\approx$  6,5), tais como: alta hidrofilicidade, reatividade e flexibilidade estrutural.

Além de ser proveniente de uma fonte renovável, ser completamente atóxica, quelar metais e possuir atividade antifúngica e antibacteriana, a quitosana é um excelente material absorvivo. Este polissacarídeo pode ser utilizado como floculante no tratamento de água e na

remoção de agentes nocivos como pesticidas e corantes industriais de águas residuais [51-54]. Seu caráter catiônico pode ser controlado através do pH da solução na qual está preparada. A partir do controle da distribuição de cargas da quitosana em solução a mesma pode ser utilizada como suporte para catálises e adsorção de proteínas [55, 56]. A quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como géis, membranas, nanofibras, esferas, micropartículas, nanopartículas, *3D scaffolds* e esponjas [57]. A vastidão de aplicações biomédicas da quitosana tem de receber especial importância devido a sua imensa variedade e complexidade, por isso serão tratadas nos próximos tópicos, logo após uma discussão sobre a estrutura molecular da quitosana.

### *1.2.1 Estrutura molecular e dinâmica estrutural da quitosana*

A caracterização da estrutura molecular da quitosana se dá a partir das mesmas técnicas utilizadas na caracterização na maioria dos polissacarídeos, e conseqüentemente possui as mesmas dificuldades. A descrição da estrutura de açúcares é um desafio, pois esta classe de biomoléculas é altamente flexível e responde com severas modificações conformacionais frente a modificações químicas, complexação com biomoléculas, mudanças no pH, força iônica e tipos de solvente [37]. Os oligossacarídeos quando solvatados tendem a adotar conformações cuja flutuação se baseia na enorme variedade de arranjos espaciais em torno das ligações glicosídicas. Desta forma, um dos problemas chave na caracterização de carboidratos é a descrição correta dos ângulos diedros  $\Phi$  e  $\Psi$  (mostrados na Figura 5) desde que se considere que os anéis glicosídicos permanecem restritos a uma conformação, ou seja, rígidos. A combinação de cristalografia de raios-X, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de infravermelho (IR) permitiram obter a estrutura molecular da quitina e quitosana [58-61]. A partir destes dados pôde-se utilizar a Dinâmica Molecular (DM), e deste modo caracterizar o comportamento dinâmico frente a alterações no meio e interações com o solvente [36].

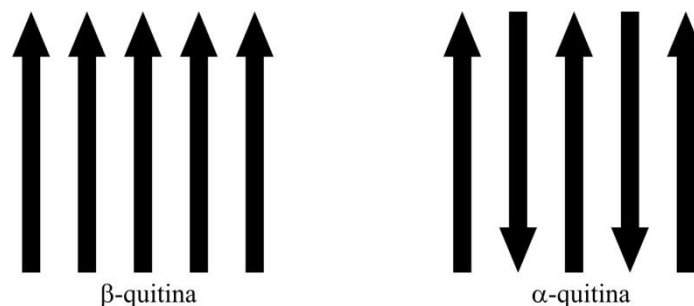


Figura 5 – Esquema das estruturas polimórficas de quitina. As setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

A quitosana, no estado sólido possui uma estrutura organizada em folhas com alto grau de cristalinidade e polimorfismo [62, 63]. O empacotamento cristalino é bem similar ao da  $\alpha$ -quitina anidra caracterizado por cadeias de quitosanas organizadas de forma antiparalela. As formas mais comuns de quitina são a  $\alpha$  e  $\beta$  sendo que nos cristais do tipo  $\beta$  as cadeias estão arranjadas paralelamente e nos do tipo  $\alpha$  de modo paralelo e antiparalelo, como mostrado na Figura 5 [64, 65]. Os estudos cristalográficos mostram que estes biopolímeros possuem forma cristalina hidratada e anidra e uma estrutura helicoidal. A quitosana pode adotar algumas conformações de hélice enquanto que a quitina se detém à convencional hélice 2 ainda que em solução [65]. Os tipos de motivos helicoidais que a quitosana pode adotar estão apresentados na Figura 6. Estas estruturas podem ser classificadas em quatro principais tipos: tipo I (anidro), tipo II (hidratado), tipo IIa (hidratado) e tipo III (anidro), os quais adotam conformações helicoidais hélice 2, hélice 2 relaxada (ou estendida), hélice 4 (ou 4/1) e hélice 5, respectivamente (Figura 6) [66, 67]. As condições experimentais de cristalização e síntese da quitosana fazem com que os filamentos possam adotar estas diferentes estruturas [66, 68]. A determinação dessas estruturas se dá pela análise da unidade que se repete e da simetria das hélices. Como exemplo pode-se analisar um tipo de motivo helicoidal comum à quitina e quitosana a hélice 2, os monômeros voltam para a mesma posição em relação ao ângulo diedro da ligação glicosídica a cada 1 nm, e se repetem de 2 em 2 resíduos, de maneira mais simples há um giro de 180° do plano do anel do resíduo  $n$  em relação ao do resíduo  $n-1$ , como pode ser observado na Figura 6A. A diferença entre o tipo I e o tipo II, é o padrão de repetição sendo no segundo de 4.08 nm com a repetição de unidades assimétricas de quatro resíduos, ou seja, os resíduos  $n$  e  $n+7$  se encontram com o mesmo ângulo em relação à ligação glicosídica e a o plano formado com os resíduos vizinhos. Um motivo helicoidal menos comum da quitosana é o de hélice 3, descoberto em 2003, e é altamente dependente da condição

experimental [69]. Apesar da flexibilidade da quitosana, sua estrutura no estado sólido é mantida por forças intra e intermoleculares bem definidas. As ligações de hidrogênio têm papel primordial na definição da estrutura da quitosana. A hélice 2 é mantida pela ligação de hidrogênio intermolecular do tipo O3-Ho3-O5<sub>(n+1)</sub>, tanto na quitosana quanto na quitina [62].

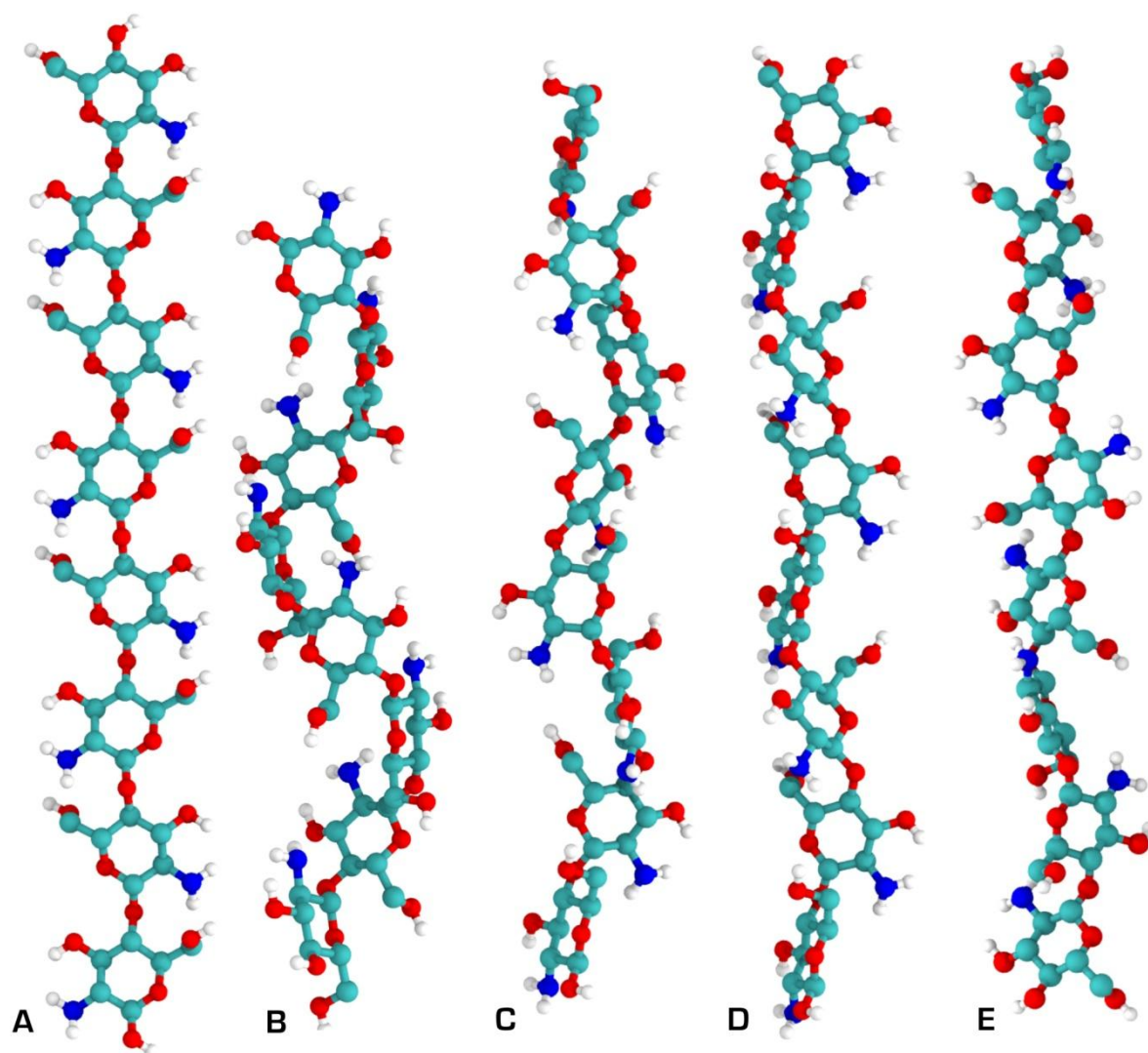


Figura 6 – Estruturas secundárias da quitosana obtidas por cristalografia de raios-X. A) hélice 2; B) hélice 3; C) hélice 4; D) hélice 5; e E) hélice 2 relaxada. Os hidrogênios ligados ao carbono foram omitidos para melhor visualização. Os átomos estão coloridos como: ciano: carbono; vermelho: oxigênio; branco: hidrogênio; e azul: nitrogênio. Adaptada do livro “The Complex World of the Polysaccharides”, capítulo 9 de nossa autoria [36].

Entretanto apesar de os cristais de quitosana serem extensivamente estudados, algumas propriedades e processos dinâmicos (principalmente relacionados à solvatação e formação de nanopartículas) não podem ser determinados por cristalografia de raios-X e/ou por

espectroscopia de RMN. Dessa forma, são necessárias outras metodologias para compreender, por exemplo, o comportamento molecular de quitosanas em processos envolvendo a solubilização e formação de nanopartículas em solução; ou verificar suas propriedades helicoidais em solução. Através do uso de DM é possível descrever tais eventos dependentes do tempo assim como relacioná-los a interações específicas. Simulações de DM de quitosanas e suas nanopartículas mostraram que a helicidade se altera significativamente em solução frente a alterações do GA, do pH e da força iônica do meio [65, 70, 71]. Estas simulações mostraram que o motivo helicoidal que a quitosana adota em solução é altamente dependente de seu GA, assim como sua solubilidade. Foi observado que quanto maior o GA, mais próximo de uma conformação de hélice 2 e conseqüentemente menor a solubilidade. O modelo de quitosana desenvolvido para as simulações computacionais reproduziu as propriedades experimentais inerentes da quitosana, se mostrando suficiente para fazer previsões acerca do comportamento da mesma em solução [70-73].

As simulações computacionais de quitosana em água permitiram analisar qual o seu comportamento e quais tipos de hélice que predominam em diferentes pHs e GA. O aumento no GA implica na estabilização da ligação O3-Ho3-O5<sub>(n+1)</sub> intramolecular que resulta em uma maior porcentagem de hélice 2 em solução. A estabilização da ligação O3-Ho3-O5<sub>(n+1)</sub> implica no aumento da rigidez em torno da ligação glicosídica e conseqüentemente numa maior organização das moléculas de água ao redor das cadeias facilitando a agregação das mesmas e diminuindo a solubilidade da quitosana. No caso de GA inferiores a 60% prevalecem conformações mais flexíveis, como hélice 5 e 2 relaxada. Em outras palavras, a rigidez da cadeia de quitosana bem como sua solubilidade é inversamente proporcional a estabilidade da ligação O3-Ho3-O5<sub>(n+1)</sub> e diretamente proporcional ao GA. Por outro lado, mudanças no pH têm influência na distribuição de cargas ao longo da cadeia bem como na sua solubilidade e flexibilidade. A diminuição do pH implica no aumento de densidade de carga positiva na quitosana, devido à protonação do grupo -NH<sub>2</sub>, criando repulsão entre as cadeias e alterando sua forma de interação com o solvente. Neste caso, o tempo de vida e o número médio de ligações do tipo O3-Ho3-O5<sub>(n+1)</sub> diminui, resultando em maior mobilidade tanto da cadeia quanto das moléculas de água ao seu redor, aumentando sua solubilidade [65, 70, 72].

### 1.2.2 Interações moleculares e atividade biológica da quitosana

A Quitina e a quitosana têm valor econômico devido principalmente à versatilidade de suas atividades biológicas. Entretanto, a quitina é insolúvel em meio aquoso e é um material quimicamente pouco reativo, de forma que em comparação a quitosana a quitina possui pouquíssimas aplicações no campo biomédico. A quitosana contém uma gama de propriedades que viabilizam e contribuem para sua utilização para fins farmacêuticos e biomédicos, tais como: boa solubilidade em água ( $\text{pH} < 6$ ); biodegradabilidade tanto no organismo de mamíferos quanto no meio ambiente; atóxica; alta absortividade; fungicida; bactericida; boa reatividade devido à amina e hidroxilas disponíveis, o que facilita a síntese de derivados; e possibilidade de ser fabricada em várias formas [7, 62, 74-80].

A atividade biológica deste composto é fortemente dependente de suas propriedades físico-químicas especialmente sua solubilidade em água. Em outras palavras suas aplicações estão estreitamente ligadas aos parâmetros como pH, GA e massa molecular média ( $\overline{MM}$ ). Diferentes estruturas de quitosana têm diferentes atividades, e nem todos os efeitos biológicos podem ser encontrados em um tipo específico de quitosana [81]. A  $\overline{MM}$  da quitosana tem efeito marcante em suas aplicações, entretanto o mecanismo de como esta propriedade altera as interações da quitosana com sistemas biológicos ainda permanece obscuro. Quanto ao GA, muito se pode inferir, pois seus efeitos são traduzidos em termo de interações moleculares que podem ser caracterizadas tanto por metodologias experimentais como por teóricas.

Os grupamentos amina das unidades GlcN da quitosana são cruciais na atividade deste polissacarídeo. O grupo  $-\text{NH}_2$  ( $\text{pK}_a \sim 6,3-6,5$ ) é bem reativo devido ao seu par de elétrons livre, sua polaridade e a possibilidade de protonar-se em meio ácido adquirindo carga positiva. Desta forma, este mesmo grupo pode fazer interações com caráter predominantemente de ligação de hidrogênio ou eletrostático. Este é um dos motivos pelos quais a quitosana é um polieletrólito com excelente propriedade absorativa [82, 83]. Apesar de seus grupos polares e capazes de realizar ligações de hidrogênio ( $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}_2$ ), a quitosana é lipofílica, e tem alta afinidade química com lipídeos. Isso ocorre devido à variedade de tipos de interações moleculares que são possíveis devido à estrutura molecular única da quitosana. A fim de compreender melhor a interação da quitosana com componentes biológicos, tais como DNA e membranas celulares, vários estudos tem sido realizados [4, 62, 77, 79]. Os parâmetros de pH e  $\overline{MM}$  podem ser controlados com relativa confiabilidade tornando-os

experimentalmente sendo alvo de um grande número de estudos quanto às condições experimentais ótimas para o uso da quitosana. As propriedades antibacterianas da quitosana têm sido extensivamente estudadas, e são dependentes dos fatores supracitados [84-86].

Encontrar as melhores condições experimentais para a aplicação biomédica de um determinado material é um processo longo, trabalhoso e financeiramente dispendioso. A análise de propriedades macroscópicas nem sempre nos dá *insights* acerca do mecanismo de ação do composto em questão. Desta forma o estudo do mecanismo molecular de ação da quitosana pode poupar tempo e reduzir o número de experimentos necessários para encontrar as condições mais adequadas. Por este motivo o estudo sob um prisma molecular que relacione atividade à estrutura e propriedades físicoquímicas é fundamental [87]. Quanto à ação antibacteriana da quitosana, uma das propostas de mecanismo é que a mesma mata as bactérias através do dano ou rompimento nas suas membranas celulares [85]. No entanto, no caso de sua ação fungicida, o mecanismo permanece desconhecido, ainda que já se saiba que não é via endocitose [86]. Perante a complexidade que envolve os processos biológicos desencadeados pela quitosana, não há ainda formas de caracterizar em detalhes, e a nível molecular, o mecanismo de ação deste biopolímero, principalmente quando células estão envolvidas, e por isso é crucial o uso de modelos [88]. Com relação à interação da quitosana com células, o primeiro passo é compreender como esta pode alterar as propriedades da membrana celular. Dentre os modelos utilizados para este fim, os filmes de Langmuir e Lipossomas têm sido bastante adequados [19, 89].

Apesar de a quitosana ser policatiónica, as interações eletrostáticas não são suficientes para explicar sua atividade biológica [15]. A contribuição das interações hidrofóbicas, de ligação de hidrogênio e eletrostáticas entre a quitosana e três diferentes lipídios foi avaliada através de um estudo feito com a utilização de filmes de Langmuir. Neste estudo, foi mostrado que baixas concentrações de quitosana têm pouco efeito na área por lipídio e pressão superficial de monocamadas de DPPC se comparado ao quanto ela afeta as monocamadas de dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e colesterol [76]. Em adição, alterações no pH alteram significativamente o modo de interação da quitosana com o DPPG, e tem efeito desprezível nos filmes de DPPC e colesterol, confirmando que as interações com estes sistemas não são mediadas por cargas [76]. A análise experimental da interação da quitosana com o DPPC mostrou que mesmo que a quitosana tenha poucos efeitos nas propriedades gerais de bicamadas zwitteriônicas, a interação é bem efetiva e claramente depende de outros fatores além das forças eletrostáticas [19]. A adição de quitosana a lipossomas, formados por

DPPC, forma um compósito cuja estabilidade termodinâmica é aumentada. A proposta é que esta estabilização advém de um mecanismo de blindagem direcionado por interações eletrostáticas entre as cadeias de quitosana e a cabeça polar dos fosfolipídios [16, 90]. Um estudo recente sugeriu que a sensibilidade dos fungos à quitosana é devido a alterações que a mesma implica na fluidez e dinâmica de sua membrana celular [91].



## 2 *Objetivos*

Este trabalho visa realizar simulações computacionais que mimetizem os processos moleculares da interação de quitosanas com bicamadas lipídicas possibilitando a compreensão do mecanismo de interação.

Espera-se propor um mecanismo que relacione as interações específicas quitosana/DPPC com as propriedades físicoquímicas da membrana. Desta forma, dando condições para o desenvolvimento de aplicações biomédicas da quitosana através da compreensão a nível molecular de sua atividade biológica.

### 2.1 *Objetivos Específicos*

- Avaliar as interações moleculares específicas pelas quais a quitosana interage com a bicamada de DPPC.
- Relacionar a ação da quitosana com as propriedades estruturais da membrana.
- Compreender qual o efeito da variação de concentração no mecanismo de interação e nas propriedades da membrana.

### 3 Fundamentação Teórica

A interpretação de resultados experimentais a partir de metodologias teóricas sempre esteve presente na prática científica. Nas últimas décadas, a química e a biologia computacional adotaram importante papel frente ao avanço em suas respectivas áreas. O contínuo crescimento do poder computacional, em particular no contexto dos computadores pessoais, tem tornado possível analisar, comparar e caracterizar enormes e complexos conjuntos de dados obtidos de experimentos com sistemas biomoleculares. Este avanço tornou possível a formulação de modelos para processos biomoleculares que são passíveis de serem simulados em um computador. A partir do conhecimento prévio do comportamento molecular desses sistemas é possível fazer previsões e dar suporte aos experimentos.

O uso de biologia e química computacional permite que tempo e recursos sejam poupados. Nos estudos de modelagem biomolecular alguns fatores devem ser levados em conta para que o objeto de estudo seja descrito corretamente, sendo um deles o nível de metodologia que será usado [73, 92, 93]. Cada processo biomolecular exige um nível de modelagem, que é escolhido segundo a resolução espacial (tamanho), a escala de tempo e os graus de liberdade de interesse do processo biomolecular de interesse (Tabela 2).

Tabela 2 – Exemplo de níveis de modelagem computacional em bioquímica e biologia molecular [92].

Método	Graus de Liberdade	Propriedades, processos	Escala de tempo
<b>Dinâmica Quântica</b>	Átomos, núcleos e elétrons	Estados excitados, relaxação e dinâmica reacional	Picosegundos
<b>Mecânica Quântica (ab initio, densidade funcional, semiempírico, métodos de ligação de valência)</b>	Átomos, núcleos, elétrons	Estados fundamentais e excitados, mecanismos de reação	Pode ser em função do tempo (femtosegundos)
<b>Mecânica estatística clássica (DM, Monte Carlo)</b>	Átomos, solvente	<i>Ensembles</i> , médias, propriedades de sistemas,	Nanosegundos - microssegundos

		enovelamento	
<b>Métodos Estatísticos</b> <b>(análise de banco de dados)</b>	Grupos de átomos, amino ácidos, ácidos nucléicos	Homologia estrutural e similaridade	Sem escala de tempo
<b>Métodos de contínuo</b> <b>(hidrodinâmica e eletrostática)</b>	Contínuo dielétrico, contínuo de velocidade, etc.	Propriedades reológicas	Milisegundos
<b>Equações cinéticas</b>	População de espécies	Dinâmica populacional, transdução de sinal	Segundos

As metodologias baseadas em Mecânica Molecular (MM) são adequadas para a simulação de processos que não envolvam transferências de elétrons, quebra e/ou formação de ligação, pois os elementos básicos desta metodologia são os átomos. Entretanto, apesar desta aproximação, um grande número de propriedades e processos pode ser reproduzido via modelagem molecular. Idealmente, através da MM pode ser simulado todo fenômeno molecular que dependa exclusivamente das posições atômicas, das velocidades dos átomos, de suas cargas (parciais ou totais) e de suas interações (vdW, ligação de hidrogênio e Coulômbicas) e que ocorra em escalas de tempo inferiores a microssegundos, podem ser simulados. Como por exemplo, em biologia molecular podemos analisar como o solvente altera a estrutura de proteínas, bicamadas, RNA, DNA e polissacarídeos.

Nos próximos itens serão discutidas as bases da MM e sua aplicação através da DM, visto que esta metodologia foi utilizada para a realização deste trabalho.

### 3.1 *Mecânica Molecular*

A mecânica molecular (MM) é uma alternativa metodológica que visa contornar dificuldades práticas que impedem o uso de metodologias mais precisas (Mecânica Quântica) em sistemas compostos por um grande número de partículas. As metodologias baseadas em MM assumem como elemento básico os átomos (ou grupos de átomos), e não os elétrons e prótons. Os átomos são considerados como esferas indivisíveis, dotadas de determinada massa, carga e parâmetros de vdW específicos. Desprezando os movimentos eletrônicos, o

sistema pode ser tratado pelas leis da física clássica. Devido à evolução nos algoritmos para aplicação das leis Newtonianas, hoje já é possível simulações com até milhões de partículas.

De forma geral, a MM descreve a dinâmica de um determinado sistema através da aplicação das leis da mecânica newtoniana a um *ensemble* definido por um determinado número de partículas sob efeito de determinadas regras (campo de força). Essas regras são definidas de acordo com as características moleculares de cada sistema, e são aplicadas através de potenciais lineares combinados. As forças que atuam em cada átomo são definidas com base no campo de força do sistema nas posições e velocidade atômicas. O conjunto de potenciais harmônicos que descrevem a dinâmica e interação das moléculas pode ser dividido em duas partes: potenciais ligados e não ligados. A parte do campo de força que define as interações do tipo ligadas é descrito pelo potencial linear de ligação ( $V_d$ ), angular ( $V_\theta$ ) e torcional ( $V_\phi$ ) que visam reproduzir as interações ligadas da molécula a ser simulada. As interações não ligadas, ou intermoleculares, são descritas pelos potenciais de Lennard-Jones ( $V_{LJ}$ ), ou van der Waals, e de Coulomb ( $V_C$ ), o que permite a construção de uma expressão completa da energia potencial ( $V_{total}$ ) do sistema:

$$V_{total} = V_d + V_\theta + V_\phi + V_{LJ} + V_C$$

Em outras palavras, as moléculas são descritas a partir de um modelo de esferas indeformáveis dotadas de cargas ligadas por molas devidamente calibradas, de modo que estas possam descrever as vibrações de ligações químicas e as barreiras energéticas torcionais e angulares que remontam o comportamento da molécula a ser mimetizada. Em uma simulação, a força  $F$  em cada átomo é expressa em função do tempo e é igual à derivada negativa do potencial em relação à posição do átomo, demonstrada em uma forma análoga da segunda lei de Newton:

$$-\frac{dV}{dr_i} = m \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

Cada termo da equação total de energia potencial visa reproduzir uma determinada propriedade molecular importante, como exemplo, o termo  $V_d$  mimetiza uma ligação covalente, permitindo que eles vibrem em torno de uma posição de equilíbrio, como em uma ligação química. A seguir serão discutidas as expressões explícitas de cada termo de energia potencial que define o campo de força.

### 3.1.1 Potencial harmônico de ligação (ou linear)

Em métodos de MM as ligações covalentes são descritas como um oscilador harmônico clássico. O estiramento entre dois átomos é definido pelo potencial harmônico linear ( $V_d$ ), o qual reproduz a barreira energética associada ao desvio da distância de equilíbrio ( $d_0$ ) entre dois átomos ligados covalentemente. A equação associada a este potencial possui o seguinte formato:

$$V_d = \frac{1}{2} k_d (d - d_0)^2$$

Sendo  $d$  o comprimento da ligação entre dois átomos  $i$  e  $j$ ;  $d_0$  a distância de equilíbrio e  $k_d$  a constante elástica.

A distância  $d_0$  e a constante de força são parâmetros essenciais para este termo do campo de força. Tais parâmetros podem ser obtidos experimentalmente, através dos espectros de infravermelho, ou através de cálculos mecânico quânticos. A constante  $k_d$  varia de acordo com a rigidez da ligação química, sendo maior tanto menor for a flutuação em relação à posição de equilíbrio. Como exemplo, em uma ligação simples entre carbonos C–C,  $k_d$  vale 317 kcal/mol Å<sup>2</sup>, enquanto que a ligação dupla C=C, a constante elástica é igual a 570 kcal/mol Å<sup>2</sup> [94].

### 3.1.2 Potencial harmônico angular

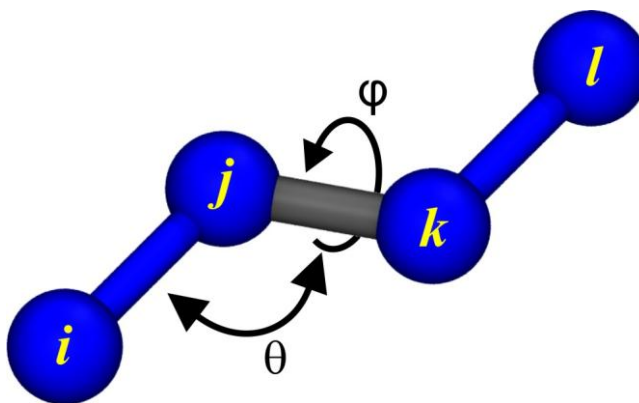


Figura 7 – Representação do ângulo de ligação ( $\theta$ ) e o ângulo diedro ( $\phi$ ).

O potencial harmônico angular ( $V_\theta$ ) está relacionado à energia potencial referente à deformação angular de determinado ângulo  $\theta$  (Figura 7). O potencial  $V_\theta$  pode ser definido de forma análoga ao  $V_d$ , de acordo com a equação:

$$V_\theta = \frac{1}{2}k_\theta(\theta - \theta_0)^2$$

em que  $\theta$  é o ângulo definido pela ligação entre 3 átomos de referência;  $\theta_0$  é o ângulo de equilíbrio; e  $k_\theta$  é a constante elástica de força. Vale ressaltar, que as equações aqui apresentadas são a forma mais básica do potencial em questão, podendo ser reescritas em outras formas visando facilitar sua aplicação na forma de algoritmos computacionais.

### 3.1.3 Potencial torsional (ou diedral)

Considerando um conjunto de quatro átomos ligados,  $i$ ,  $j$ ,  $k$  e  $l$ , como mostrado na Figura 7, o ângulo diedro  $\varphi$  é definido como o ângulo entre os planos formados pelos átomos  $ijk$  e  $jkl$  em que o valor zero, corresponde à conformação *cis* (átomos  $i$  e  $j$  estão no mesmo lado).

Pode-se compreender  $V_\varphi$  como sendo a representação explícita da barreira energética atribuída à rotação dos átomos  $i$  e  $l$  ao redor da ligação  $j-k$ . A equação que define a curva de energia potencial diedral pode ser representada pela equação abaixo:

$$V_\varphi = k_\varphi[1 + \cos(n\varphi + \delta)]$$

sendo  $k_\varphi$  a constante que define a extensão da barreira energética para torção;  $n$  é o número de mínimos na curva de energia potencial versus ângulo de torção;  $\varphi$  o ângulo diedral da ligação central e em relação a quatro átomos e  $\delta$  a diferença de fase do ângulo diedral  $\varphi$ , que pode ser  $0^\circ$  ou  $180^\circ$ , dependendo de este valor ser um ponto de máximo ou de mínimo.

A equação que representa o potencial diedral aqui apresentada é comumente reescrita na forma de uma soma de Fourier, também chamada de função de Ryckaert-Bellemans, que além de facilitar sua implementação em softwares de dinâmica molecular também exclui implicitamente as interações de vdW entre os átomos  $i$  e  $l$  que são tratadas em outras sub-rotinas.

Há outro tipo de diedro comumente empregado em metodologias de DM, que envolve quatro átomos que não estejam necessariamente ligados. Neste caso o ângulo diedro é chamado de impróprio e sua aplicação é de grande importância na caracterização de átomo no mesmo plano e vibrações moleculares fora do plano.

A obtenção experimental dos parâmetros que podem ser utilizados nos potenciais torcionais não é trivial. Na parametrização de moléculas novas é comum se utilizar de potenciais diedrais já conhecidos, desde que a molécula nova em questão tenha regiões que podem se comportar de maneira análoga as já conhecidas. Outra estratégia para se determinar os parâmetros  $k_\phi$ ,  $n$ , e  $\delta$  é otimizar os parâmetros para moléculas simples e extrapolar para moléculas complexas com grupamentos de átomos semelhantes. A curva de energia potencial também pode ser obtida a partir de cálculos quânticos robustos, o que é uma grande vantagem pela independência de valores experimentais [94].

### 3.1.4 Potencial de Lennard-Jones (ou van der Waals)

O potencial de Lennard-Jones é utilizado para descrever interações intra e intermoleculares do tipo van der Waals. Este potencial é utilizado para descrever interações atômicas tanto intra quanto intermoleculares. No caso de átomos em uma mesma molécula só são levadas em conta interações entre átomos separados por três ou mais ligações covalentes. A expressão de energia potencial que descreve este tipo de interação entre dois átomos ( $i$  e  $j$ ) é dada por:

$$V_{LJ} = 4\varepsilon \left[ \frac{\sigma^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma^6}{r_{ij}^6} \right]$$

sendo  $r_{ij}$  a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ,  $\varepsilon$  a profundidade do poço de energia potencial e  $\sigma$  o diâmetro de Lennard-Jones (ou raio de vdW), o qual depende das espécies químicas ligadas. Existem outras formas de abordagem para a descrição deste tipo específico de interação, no entanto o formato de equação acima apresentado é o mais simples e geral.

### 3.1.5 Potencial de Coulomb

As interações puramente eletrostáticas, ou de cargas, entre dois átomos  $i$  e  $j$  são descritas pela equação de energia potencial Coulômbica, cuja forma geral é:

$$V_c = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}}$$

sendo  $r_{ij}$  a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ,  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas dos átomos,  $\epsilon_0$  a permissividade no vácuo e  $\epsilon$  a constante dielétrica do meio.

Na parametrização de novas moléculas para sua simulação via MM, é necessário determinar vários parâmetros para que a equação de energia potencial total descreva com precisão o comportamento molecular do sistema. Como citado anteriormente, os parâmetros podem ser obtidos via cálculo mecânico quântico ou técnicas experimentais como cristalografia de raios-X, espectroscopia de infravermelho e RMN, dentre outras.

## 3.2 Dinâmica Molecular

As metodologias de DM são fundamentadas nas leis da mecânica clássica, pois os movimentos dos elétrons são muito mais rápido que o dos átomos (aproximação de Born-Oppenheimer). A dinâmica de cada átomo é derivada do campo de força, das coordenadas e das velocidades atômicas [95]. As equações clássicas de movimento são numericamente integradas de forma iterativa para cada átomo do sistema e ao mesmo tempo (Tabela 3). O potencial direciona todas as interações que reproduzem as propriedades do sistema, e ao ser integrado gera a força que atua em cada átomo. Este processo é caracterizado como um passo, e a apresentação de  $n$  passos em ordem cronológica gera a trajetória. A cada passo, as equações são integradas novamente, com a adição de um determinado  $\Delta t$ . A força aplicada altera a velocidade e a posição dos átomos que são atualizadas em relação ao tempo gerando uma trajetória. Ou seja, o processo de integração se repete considerando as posições atômicas e obedecendo a um determinado incremento no tempo ( $\Delta t$ ), o qual é determinado pelo usuário geralmente é na escala de femtossegundos ( $10^{-15}$  s). O processo de simulação se repete até atingir o tempo  $t$ , que é o resultado de  $\Delta t$  multiplicado pelo número de passos.



Tabela 3 – Equações Newtonianas básicas utilizadas na DM.

Termos para o cálculo da Energia total em uma simulação de DM		
<b>Eq. 1</b>	$V_{\text{total}} = V_d + V_\theta + V_\phi + V_{LJ} + V_C$	<p>Termo de Energia Potencial</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Depende da posição dos átomos (<math>r_i</math>) e dos parâmetros do campo de força.</li> </ul>
<b>Eq. 2</b>	$K(p; m) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2}$	<p>Termo de Energia Cinética</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Depende das massas (<math>m</math>) e velocidades atômicas (<math>v_i</math>) de todos os átomos.</li> </ul>
Termos para o cálculo das trajetórias na DM		
<b>Eq. 3</b>	$F_i = m_i \cdot a_i = -\frac{dV}{dr_i} = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2}$	<p>Força <math>F</math> no átomo <math>i</math> no tempo <math>t</math></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Dependem do potencial (<math>V</math>) e das posições (<math>r_i</math>) e massas (<math>m_i</math>) atômicas.</li> </ul>
<b>Eq. 4</b>	<p>Passo 1: <math>r_{i(\Delta t)} = r_{i(0)} + v_{i(0)} \cdot \Delta t + \frac{F_{i(0)}}{2m_i} \cdot \Delta t^2</math></p> <p>Passo 2: <math>r_{i(2\Delta t)} = r_{i(\Delta t)} + v_{i(\Delta t)} \cdot \Delta t + \frac{F_{i(\Delta t)}}{2m_i} \cdot \Delta t^2</math></p>	<p>Atualização das posições atômicas (<math>r_i</math>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Depende da força (<math>F_i</math>), das velocidades anteriores e do <i>timestep</i> (<math>\Delta t</math>).</li> </ul>

As escalas de tempo utilizadas na DM devem ser tão pequenas a ponto de não suprimir eventos moleculares decisivos para a dinâmica do sistema. Em outras palavras, se o valor de  $\Delta t$  for grande alguns eventos moleculares importantes, que ocorrem em escalas de tempo pequenas, não seriam simulados, criando artifícios computacionais, que não concordam com os experimentos. Tais artifícios implicam em erros significativos no cálculo das forças, e conseqüentemente nos cálculos de energia livre. Após as mudanças iniciais, o sistema pode convergir para o estado de equilíbrio termodinâmico, no qual a energia total do mesmo permanece constante. Pelas médias obtidas através da análise da trajetória da evolução dinâmica de um sistema que esteja em equilíbrio é possível calcular várias propriedades macroscópicas. Este é um dos princípios básicos da DM, em que a relação entre os resultados teóricos e experimentais é feito com base na Hipótese Ergódica de Boltzmann. Uma das conseqüências deste axioma fundamental é a de que o valor médio de uma propriedade obtida a partir de pequeno número de partículas por um longo tempo (vários microestados entrópicos em equilíbrio termodinâmico) é equivalente às médias obtidas para um sistema de muitas partículas por um tempo curto. Baseado nisto as simulações de DM que possuem poucas

partículas (comparado ao número de Avogadro) tem que ser suficientemente longas para que o sistema visite um número suficiente de conformações representativas para satisfazer este princípio.

Existem alguns algoritmos disponíveis para realizar a integração numérica das equações de movimento. O esquema geral de como um cálculo computacional de DM se desenvolve está representado na Figura 8, e os vários algoritmos disponíveis seguem esta mesma lógica. A execução dos passos mostrados pode ser feita de maneiras diferentes, podendo haver adição de etapas. Os algoritmos de *Verlet*, *Velocity-Verlet* e *leap-frog* são os mais utilizados, pois tem um custo computacional menor em termos de consumo de memória RAM e de processamento [96, 97]. Outros algoritmos, como o de Beeman, são bem mais precisos quanto à conservação da energia livre total do sistema, entretanto são bem mais custosos computacionalmente. A condição para que se escolha um algoritmo mais leve a um mais preciso é a de que com menos custo computacional as simulações podem atingir escalas de tempo maior, amostrando mais microestados entrópicos e energéticos do sistema.

Outra grande vantagem das simulações de DM é permitir a utilização de solvente explícito. O uso desse modelo de solvatação aumenta o custo computacional das simulações, no entanto permite uma descrição mais precisa de várias propriedades que são diretamente dependes da interação com solventes. Os modelos de água mais utilizados são o SPC, TIP3P, TIP4P e TIP5P [98-102]. Conforme a dependência do sistema de sua interação com o solvente opta-se por um modelo mais ou menos preciso. Em geral, a precisão do modelo é inversamente proporcional ao seu custo computacional de simulação, e fatores como temperatura e pressão devem ser levadas em conta.

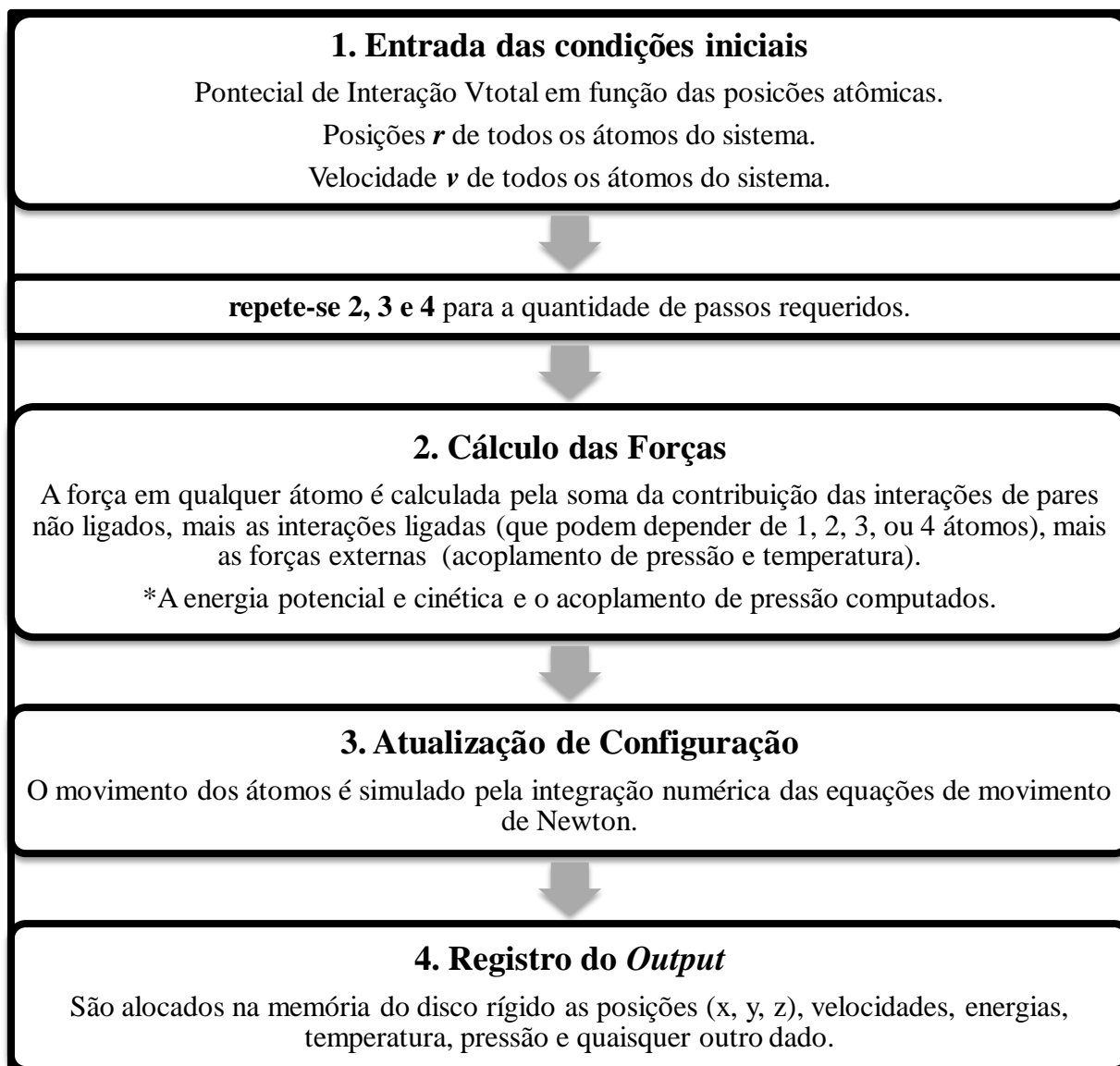


Figura 8 – Esquema global do algoritmo da DM. (Adaptado do manual do programa GROMACS [103])

Atualmente já é possível realizar simulações por DM de centenas de nanossegundos a alguns microssegundos, dependendo do número de átomos no sistema. Entretanto, mesmo com a evolução computacional, as escalas de tempo simuladas não são suficientes para simular muitos fenômenos importantes, como o enovelamento completo de proteínas e de DNA. Algumas estratégias têm sido usadas visando aumentar o tempo de cada passo ( $\Delta t$ ) obtendo assim simulações mais longas, considerando a evolução conformacional do sistema em relação a sua posição inicial.

Alguns processos são computacionalmente mais custosos, em termos de simulação. Dentre eles, estão as vibrações de ligação, em especial as ligações que envolvam hidrogênio.

Os átomos de hidrogênio são bastante leves, em comparação a átomos de outros elementos, e esse comportamento pode adquirir caráter quântico (por exemplo, um próton pode ser transferido através de uma ligação de hidrogênio superando a barreira de potencial via tunelamento). Este processo não pode ser tratado classicamente. Desta forma, algumas aproximações devem ser aplicadas às simulações de dinâmica molecular quanto a vibrações e/ou processo que possam adquirir caráter quântico. Isso pode ser feito a partir de termos que corrijam a energia total e o calor específico  $C_V$ , ou considerando as ligações com vibrações limitadas, constrictas. A última aproximação é razoável desde que o  $\Delta t$  usado seja muito superior a escala de tempo das vibrações de ligação. Se as ligações vibram muito mais rápido que a escala de tempo usada na simulação, pode-se considerar como se os átomos ligados estivessem em seus pontos de equilíbrio. Estas vibrações podem, com uso das devidas aproximações, serem consideradas semelhantes aos osciladores clássicos. Alguns algoritmos como o SHAKE [104], RATTLE [105] e LINCS [106] mantêm estas ligações relativamente constrictas, diminuindo o custo computacional das simulações e contornando o problema do caráter quântico desses fenômenos.

### 3.2.1 *Condições periódicas de contorno e tratamento das interações não ligadas*

Na DM é possível simular sistemas com até milhões de partículas (átomos ou conjuntos de átomos), e isso incorre em alguns efeitos que podem afetar diretamente os resultados da simulação. A simulação de um sistema molecular é realizada em uma caixa virtual o que leva a dois principais problemas: primeiro, o número de partículas é sempre muito pequeno comparado a um sistema real; e segundo, cria-se efeitos de superfície, como tensão superficial, devido a uma interação artificial das moléculas da borda com o vácuo [107]. Visando minimizar estes efeitos são utilizadas condições periódicas de contorno, em que um sistema com um número relativamente pequeno de partículas estará sujeito a interações que se aproximam da amostragem de um pequeno espaço no centro de uma solução [95]. O esquema geral de como funciona esta aproximação primordial nas simulações de DM está representado na Figura 9.

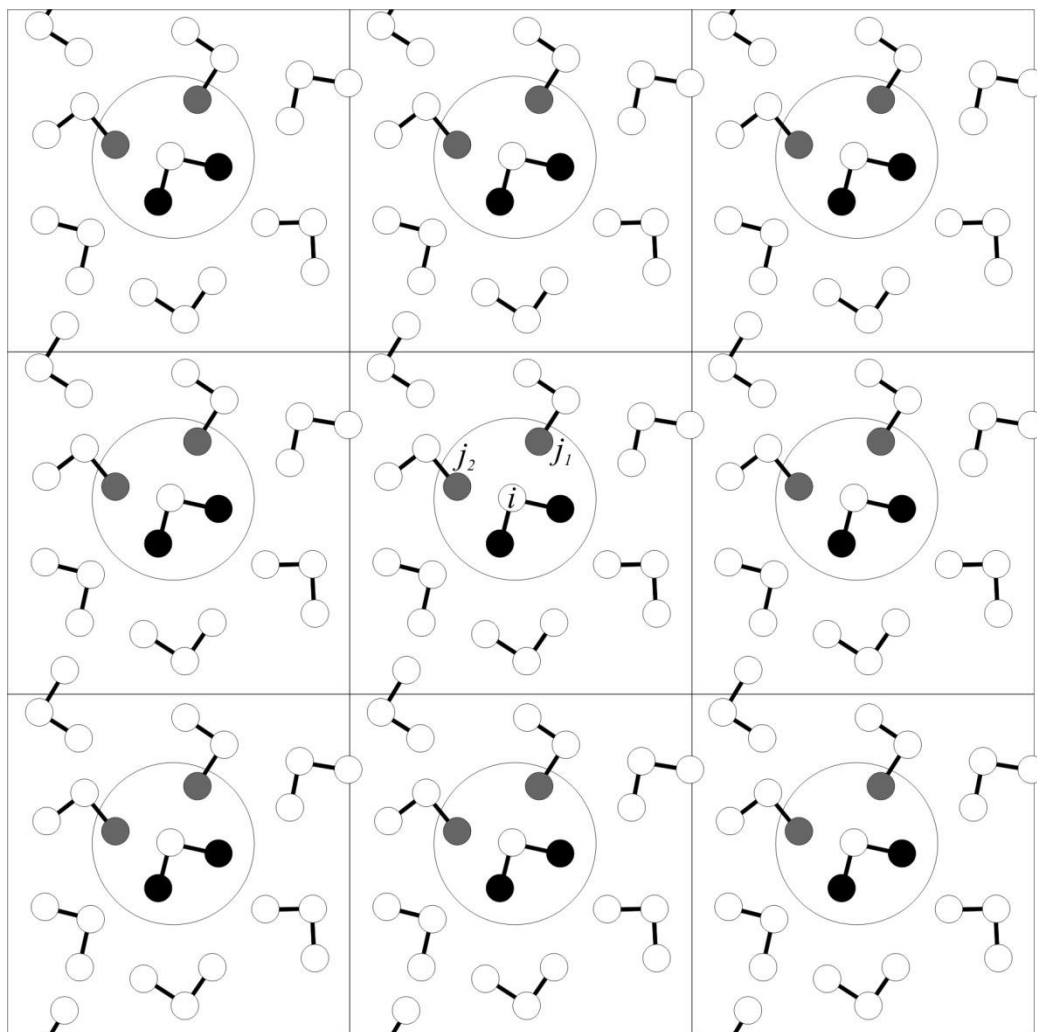


Figura 9 – Representação de condições periódicas de contorno em duas dimensões. O círculo no centro seria a esfera de raio  $R_c$  na qual as interações de vdW seriam calculadas (entre os átomos  $i$  e  $j_1$  e  $i$  e  $j_2$ ). Os átomos em preto só interagem com o átomo  $i$  através de interações ligadas.

As condições periódicas de contorno consistem em replicar a caixa de simulação em todas as direções, resultando em um arranjo periódico tridimensional infinito. Deste modo, uma caixa de simulação interage com a outra, mesmo sendo réplicas idênticas, de modo que não existam bordas. As coordenadas dos átomos nas caixas adjacentes à principal são calculadas pela soma e/ou subtração do comprimento da aresta nas mesmas, de modo que os movimentos atômicos são reproduzidos nas caixas adjacentes tal como ocorrem na caixa principal. Algumas considerações são muito importantes para aplicação deste modelo, como por exemplo, uma partícula não pode interagir com a réplica de si mesma da caixa adjacente, e o somatório total das cargas deve ser zero. Se essas condições não forem cumpridas haveria

um efeito totalmente artificial em que interações idênticas iriam se somar indefinidamente. Quando uma partícula deixa a caixa de simulação passando por uma face, automaticamente uma idêntica (em todos os sentidos) a ela é recolocada na caixa pela face oposta com exatamente a mesma velocidade que saiu. Desta forma o número de partículas e a densidade da caixa permanecem constantes durante toda a simulação. Esse modelo elimina o problema dos efeitos de superfície, como tensão superficial, porém é necessário haver outras considerações principalmente no que concerne a interações não ligadas.

O número de interações não ligadas a serem calculadas aumenta drasticamente com a quantidade de partículas simuladas. Visto que este cálculo é realizado entre pares de átomos (seções 3.1.4 e 3.1.5), as condições periódicas aumentam em muito a quantidade de interações. O cálculo deste tipo de interação é computacionalmente bastante dispendioso, de modo que seria impraticável calcular as interações entre todos os possíveis pares de partículas, ao mesmo tempo e em todos os passos da simulação.

Considerando que as interações de vdW decaem rapidamente com a distância ( $V_{LJ} \approx r^{-6}$ ), uma determinada região do espaço é determinada por uma esfera de raio ( $R_c$ ) com origem em uma partícula  $i$ , truncando o potencial em um raio de corte específico. Dentro desta esfera todas as interações de vdW são calculadas aos pares com o átomo  $i$  no centro. Faz-se isto para todos os átomos no sistema em todos os passos da simulação. O algoritmo exclui automaticamente as interações repetidas e àquelas muito similares às do passo anterior, em que a lista de átomos vizinhos não se altera. Esta aproximação é bem adequada visto que fora desta esfera as interações de vdW com o átomo no centro, não são efetivas.

A escolha do raio de corte está condicionada ao tamanho da caixa de simulação de modo que o raio  $R_c$  não pode ultrapassar a metade do menor comprimento da caixa ( $R_c \leq L/2$ , sendo  $L$  o menor comprimento de um dos lados da caixa). Esta condição é para evitar que qualquer átomo interaja com sua própria imagem. Desta forma diminui-se a quantidade de cálculos que envolvam os potenciais de Lennard-Jones sem que haja perda na qualidade dos resultados e/ou aumento excessivo no custo computacional em termos de processamento e memória.

As interações de Coulomb não podem ser tratadas de maneira semelhante, pois o potencial  $V_c$  decai com o inverso da distância (o de Lennard-Jones decai na ordem de  $r^{-6}$  ou  $r^{-12}$ ). Assim o truncamento desse potencial eletrostático poderá induzir erros significativos em simulações com espécies carregadas [95]. Os métodos mais utilizados para descrever as interações de longo alcance são a soma de Ewald e o método de campo de reação [108, 109].

No tratamento eletrostático por campo de reação, o ambiente fora do raio de corte  $R_c$  é tratado como um contínuo dielétrico com determinada constante  $\epsilon_{rf}$ . Esta aproximação é mais apropriada para sistemas que tendem ser homogêneos, pois desconsidera a identidade das partículas fora do raio de corte. O potencial de Coulomb com a aproximação do campo de reação ( $V_{C\ rf}$ ) calcula as interações Coulômbicas entre pares de partículas dentro da esfera definida por  $R_c$  considerando suas respectivas cargas, a constante dielétrica no interior da esfera e a exterior, de acordo com a equação:

$$V_{C\ rf} = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_{rf} r_{ij}} \left[ 1 + \frac{\epsilon_{rf} - \epsilon_r}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r} \frac{r_{ij}^3}{r_c^3} \right] - f \frac{q_i q_j}{\epsilon_{rf} r_c} \frac{3\epsilon_{rf}}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r}$$

em que,  $r_c$  o raio de corte;  $\epsilon_r$  a constante dielétrica dentro da esfera de corte;  $\epsilon_{rf}$  a constante dielétrica fora do raio de corte [110].

## 4 Metodologia

### 4.1 Sistemas simulados

Os sistemas simulados neste trabalho são compostos de filamentos de quitosana, DPPC, íons cloreto e água. Os filamentos de quitosana foram formados por 15 resíduos dispostos aleatoriamente, com ângulos  $\varphi$  e  $\phi$  iguais a  $90^\circ$ , e GA de 20 % (ou seja, 12 resíduos de GlcN e 3 de GlcNAc). Todos os resíduos de GlcN foram protonados visando reproduzir uma solução ácida ( $\text{pH} \leq 3,5$ ) de quitosana. O modelo de membrana utilizado foi construído a partir de uma bicamada contendo apenas DPPC, pré-equilibrada por 40 ns e com área média por lipídio de  $64.5 \text{ nm}^2$  [111]. As 512 moléculas de lipídio foram colocadas em duas camadas contendo 256 cada em uma grade de  $16 \times 16$  lipídios em uma caixa de simulação com dimensões aproximadas de  $13 \times 13 \times 10 \text{ nm}$  em que o plano da membrana é o plano xy (vetor normal 0, 0, 1). Os íons cloro foram adicionados para neutralizar a carga total do sistema.

O set inicial de todas as simulações foi composto por uma quantidade variada de filamentos de quitosana colocados a poucos angstroms da bicamada de DPPC, conforme a Figura 10. Levando em consideração a quantidade de água por filamento de quitosana foi calculada sua concentração aproximada em cada simulação. A relação encontrada é de 1 filamento de quitosana equivale a 5 mg de quitosana por mL de água. Desta forma, foram simulados sistemas contendo 0, 2, 6 e 10 cujas concentrações são respectivamente de 0 mg/mL (DPPC puro), 10 mg/mL, 30 mg/mL e 50 mg/mL. A composição molecular de cada sistema está disposta na Tabela 4.

Tabela 4 – Tabela com a composição dos sistemas simulados. Todos os sistemas continham uma membrana de DPPC com 512 lipídios que foram incluídos no número total de partículas.

As concentrações de quitosana são aproximadas.

Nº de cadeias de quitosana	Concentração de quitosana (mg/mL)	Nº de moléculas de água	Nº total de átomos
0	0	28324	110572
2	10	27951	109969
6	30	27254	108910
10	50	26404	107392



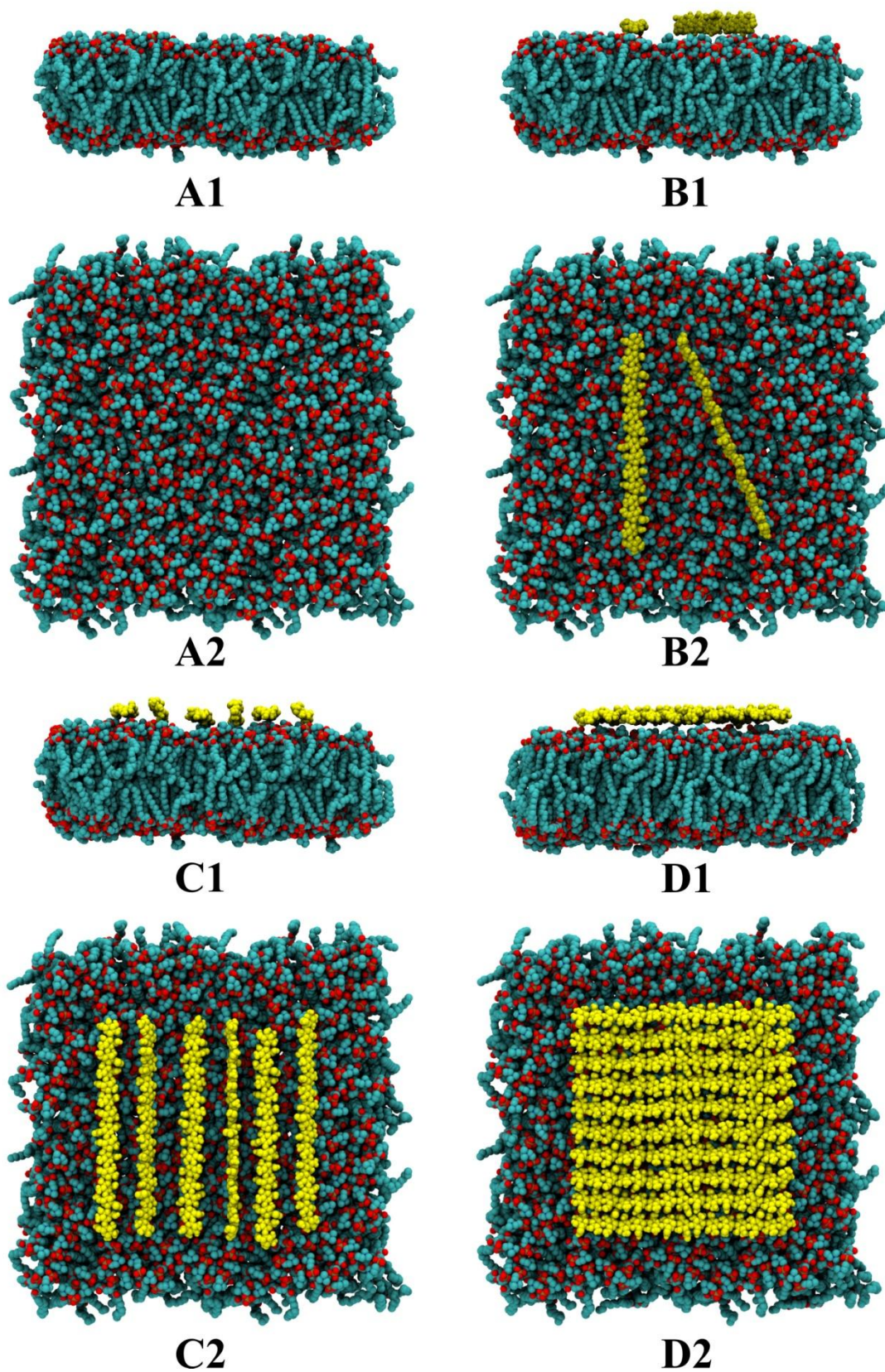


Figura 10 – *Snapshot* das configurações iniciais dos sistemas simulados. Os átomos estão representados como esferas de van der Waals. Sendo que A(1-2) é apenas DPPC e B(1-2), C(1-2) e D(1-2), são 10, 30, 50 mg/mL de quitosana.

## 4.2 Simulações por Dinâmica Molecular

Todas as simulações e análises foram realizadas utilizando o pacote computacional GROMACS 4.5.x [103, 112]. O conjunto de parâmetros de campo de força utilizado para quitosana é derivado do GROMOS e foi desenvolvido por Franca e colaboradores [65, 72, 113]. Assim como os parâmetros para o DPPC que é derivado da versão 53a6 do GROMOS, com mudanças na distribuição das cargas parciais nos átomos da cabeça polar dos lipídios e com mudanças nos parâmetros de vdW nas carbonilas dos ésteres [111]. O campo de força utilizado é do tipo *united-atoms*, o que significa que alguns grupos de átomos são considerados como uma só partícula. No caso do GROMOS, todos os hidrogênios não polares, ou seja, os hidrogênios ligados ao carbono dos grupos  $-CH$ ,  $-CH_2$  e  $-CH_3$  são parametrizados juntos ao carbono com uma só partícula, entretanto todos os hidrogênios polares ficam explícitos. Esta aproximação torna possível simular sistemas bem maiores devido à “economia” de partículas.

Os sistemas tiveram sua energia minimizada através de 10000 passos utilizando o algoritmo *steepest descent*. Este processo ocorreu em duas etapas, uma sem o solvente, para haver corrigir pequenos artifícios na conformação dos sistemas iniciais, e após a adição de solvente e dos íons para neutralizar as cargas positivas dos grupos GlcN protonados, foi realizada outra minimização de energia. Após a minimização de energia, e adição do solvente, o mesmo foi relaxado por 10 ps a 50 K, depois 150 K e por último a 298 K. O acoplamento de temperatura foi feito a cada 0,1 ps utilizando o algoritmo *V-rescale* [114]. Todos os átomos, com exceção dos hidrogênios, foram mantidos em suas posições por uma constante de  $1,0 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$  aplicada nas direções x, y e z.

A DM foi feita a partir da metodologia descrita anteriormente com a utilização do algoritmo de *leapfrog* [97] com passos de 2 fs. O algoritmo LINCS foi aplicado para controlar as restrições nas ligações. A velocidade em relação ao centro de massa (CM) do sistema foi zerada a cada passo e as configurações foram gravadas a cada 2 ps para futuras análises. O *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT) foi utilizado em todas as simulações. A temperatura foi mantida em 310 K, e o acoplamento foi feito a cada 0,1 ps e separadamente para o soluto, a quitosana, a membrana e os íons. Foi utilizado o algoritmo de *V-rescale* [114] para manter a temperatura constante durante toda a simulação. Esta temperatura foi escolhida para simular as condições térmicas de uma célula de mamífero. O acoplamento de pressão foi aplicado pelo algoritmo de Berendsen de forma semianisotrópica, ou seja, o acoplamento no plano xz e

yz é diferente do plano xy, que é o plano da membrana. A constante de compressibilidade utilizada foi de  $4,5 \times 10^{-10} \text{ bar}^{-1}$ , e o tempo de acoplamento de 2,0 ps, visando mantê-la em 1 bar.

As interações não ligadas foram submetidas a um raio de corte de 1,4 nm usando o esquema *twin-range* [115]. O tratamento das interações do tipo vdW foi feito a cada passo baseada na lista de pares que foi atualizada a cada 5 passos (10 fs). As interações de alcance intermediário até o raio de corte foram tratadas simultaneamente a cada atualização da lista de pares, e consideradas constantes nos intervalos. Assim, as interações de longo alcance foram tratadas pelo método do campo de força generalizado com uma constante dielétrica de 66 [108].

O sistema contendo apenas DPPC foi simulado por 100 ns, o contendo 2 cadeias de quitosana, (10 mg/mL) por 150 ns e os de 6 e 10 cadeias (30 e 50 mg/mL respectivamente) por 250 ns. Cada sistema leva determinado tempo para atingir o estado de equilíbrio termodinâmico e conseqüentemente estrutural, os quais são necessários para a obtenção de dados consistentes. Dessa forma, o tempo de simulação foi estendido tal qual a complexidade dos sistemas que continham quitosana. As flutuações na área por lipídio foram utilizadas como parâmetro para a determinação do estado de equilíbrio estrutural do sistema.

### 4.3 Ferramentas computacionais de Análises dos Dados

#### 4.3.1 Área por Lipídio

A área média por lipídio ( $A_L$ ) foi determinada através da seguinte fórmula:

$$A_L = \frac{XY}{n_l}$$

sendo  $A_L$  a área média ocupada por cada lipídio no plano da membrana (xy) num determinado passo da simulação; XY é a área do plano da membrana calculada pela multiplicação de seu comprimento na direção x e y;  $n_l$  é o número de lipídios em uma camada da membrana. Em todas as simulações  $n_l$  é 256 (512 lipídios no total, 256 em cada camada) e a  $A_L$  foi calculada a cada 2 ps para todos os sistemas. Como a DM foi realizada sob o *ensemble* NPT, em que pressão e temperatura são mantidas constantes, o volume da caixa de simulação varia de acordo com a evolução conformacional do sistema. Os comprimentos laterais médios da caixa foram obtidos através da sub-rotina *g\_energy*, do pacote computacional GROMACS. Não

houve mudanças significativas no comprimento do eixo z, que é normal ao plano da membrana.

#### 4.3.2 *Ligações de Hidrogênio*

Um átomo aceptor (A), que possua um par de elétrons não ligado, pode interagir favoravelmente com um átomo doador (D) se este for portador de um hidrogênio ácido. Como pré-requisito para que haja a formação da ligação de hidrogênio A e D tem que ser átomos eletronegativos (como por exemplo, N e O). Se o átomo de hidrogênio está ligado a um átomo muito eletronegativo, ou seja, com carga parcial negativa, o hidrogênio adquire carga parcial positiva o que o torna ácido. A força das ligações de hidrogênio está relacionada com fatores estruturais e termodinâmicos bem como com a natureza dos átomos doadores (D) e aceptores (A) de prótons. Ligações de hidrogênio fortes têm energia de interação que variam entre 20 e 40 kcal mol<sup>-1</sup>, e são geralmente formadas quando os átomos D e A estão carregados ou estão presentes em grupos carregados. O tipo mais comum são as ligações de hidrogênio moderadas com energia variando de 5 a 15 kcal.mol<sup>-1</sup>, sendo geralmente formadas entre doadores e aceitadores neutros. As ligações de hidrogênio fracas (de 1 a 5 kcal.mol<sup>-1</sup>) são usualmente formadas quando a diferença de eletronegatividade entre o átomo doador e o hidrogênio é pequena.

As ligações de hidrogênio foram analisadas através do programa g\_hbond do pacote computacional GROMACS. Este programa analisa as trajetórias obtidas por DM e calcula todas as ligações de hidrogênio entre todos os possíveis doadores D e aceptores A do grupo de átomos ou moléculas selecionados. Para determinar se há a formação de ligação de hidrogênio é utilizado um critério geométrico descrito por:

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

em que  $r$  é a distância entre D e A e  $\alpha$  o ângulo formado entre D-H-A [116, 117]. Esses parâmetros podem ser mais bem visualizados na Figura 11. Considerando que as ligações de hidrogênio estão correlacionadas com as cargas parciais dos átomos envolvidos, foram utilizadas estas medidas para analisar o comportamento molecular dos grupos polares carregados da quitosana e do DPPC. Os grupos com os quais foram mensuradas as interações de hidrogênio estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Definição e quantidade dos grupos cujas ligações de hidrogênio foram analisadas. As quantidades de  $\text{PO}_4^-$  e carbonilas são relativas ao lado da bicamada que interagiu com a quitosana.

Grupo	Átomos constituintes	Quantidade de grupos no sistema		
		10 mg/mL	30 mg/mL	50 mg/mL
Água	OW, HW1, HW2	27951	27254	26404
$\text{NH}_3^+$	N2, H22, H23, H24	24	72	120
$\text{OH}$	O4, Ho4; O6, Ho6; O3, Ho3.	62	186	310
$\text{PO}_4^-$	P2, O31, O32, O33, O34	256	256	256
Carbonilas	C11, O12; C21, O21	512	512	512

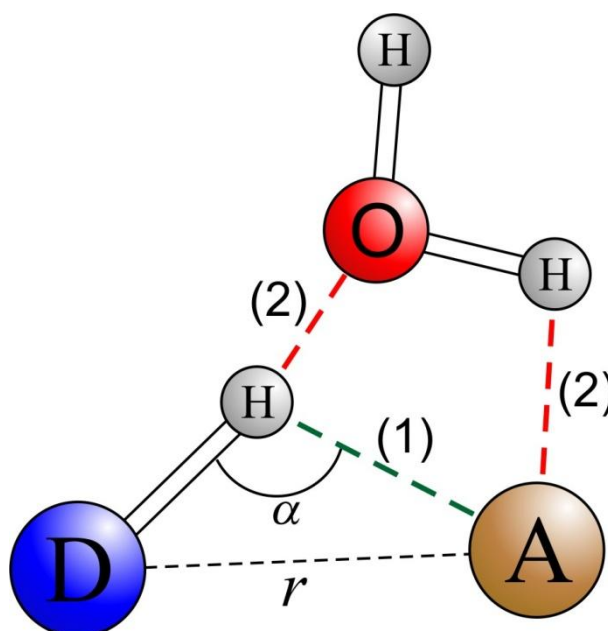


Figura 11 – Arranjo geométrico das ligações de hidrogênio. (1) Ligação normal entre duas partículas. (2) Ponte formada por ligação de hidrogênio via a água.



#### 4.3.3 Função de Distribuição Radial de Pares

Características da estrutura de líquidos e sistemas biológicos em geral, podem ser obtidas através das funções de distribuição radial de pares. Como estrutura, compreendemos a disposição média relativa entre as moléculas. A função de distribuição radial de pares  $g_{ij}(r)$  descreve a variação na distribuição dos átomos  $j$  a uma distância  $r$  do átomo  $i$ , em relação à densidade total do átomo  $j$  no sistema. E pode ser descrita de acordo com a equação:

$$g_{ij}(r) = \frac{N_{ij}(r, r + \Delta r)}{4\pi r^2 \Delta r \rho_j}$$

em que  $r$  é a separação entre os átomos;  $N_{ij}(r, r + \Delta r)$  é o número médio de átomos  $j$  encontrados na camada esférica entre  $r$  e  $r + \Delta r$  centrada no átomo  $i$ ;  $4\pi r^2 \Delta r$  é o elemento de volume da camada esférica; e  $\rho_j$  é a densidade numérica de átomos  $j$  contidos na esfera de  $r_{max}$ . A Figura 12 mostra em duas dimensões como são definidas as variáveis descritas acima que são utilizadas para o cálculo de  $g_{ij}(r)$ .

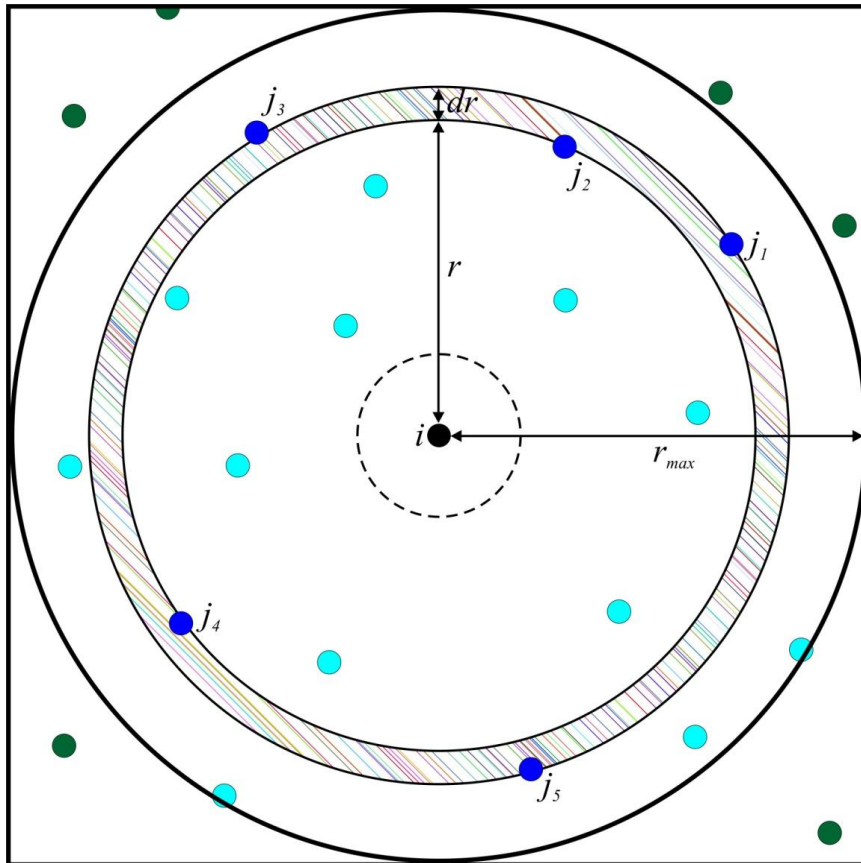


Figura 12 – Representação bidimensional do raio e dos elementos para o cálculo de  $g_{ij}(r)$ . Os átomos azuis (claro e escuro) serão utilizados para calcular a densidade  $\rho_j$ , sendo que os

átomos  $j_{(1-5)}$  contribuem para  $g_{ij}(r+dr)$ .

Se a distribuição dos átomos  $j$  a uma distancia  $r'$  é a mesma que seria esperada para uma distribuição uniforme,  $g_{ij}(r)$  tenderá a 1, pois  $N_{ij}(r, r+\Delta r)/4\pi r^2 \Delta r$  tende a  $\rho_j$ . Esta distância  $r'$  varia de acordo com a distribuição dos átomos  $i$  e  $j$  no sistema analisado [118]. No caso da aplicação computacional deste método algumas considerações são necessárias. O algoritmo divide a caixa de simulação em esferas cujo  $r_{max}$  vale metade do comprimento da caixa, para evitar problemas com as condições periódicas de contorno. A densidade  $\rho_j$  é calculada como a média das densidades do átomo  $j$  para todas as distancias  $r$  e ao redor de todos os átomos  $i$ . A função  $g_{ij}(r)$  obtida é a média temporal de todos os valores extraídos passo a passo da trajetória da simulação. O número de vezes que ocorre o par de átomos em função da distância  $r$  é armazenado em um histograma. Esse histograma é incrementado ao longo da simulação, e por fim, é normalizado para o número  $N$  de moléculas envolvidas no cálculo de  $g(r)$ , bem como para o número de passos utilizados para o cálculo de  $g(r)$ .

É possível utilizar como referência para o  $g(r)$  o centro de massa de determinados grupos. Pode-se também calcular  $g(r)$  condicionado a determinados ângulos, o que é muito útil na caracterização estrutural de sistemas muito dinâmicos, tais como misturas de líquidos. Neste trabalho, foi utilizada a sub-rotina do GROMACS que calcula a distribuição radial de pares entre os átomos ou grupos escolhidos. Todas as distribuições radiais de pares foram calculadas para os últimos 5 ns de simulação, ou seja, de 95 a 100 ns para o DPPC, de 145 a 150 ns na simulação do DPPC com quitosana a 10 mg/mL e de 245 a 250 ns para 30 e 50 mg/mL de quitosana. Desta forma garante-se que as inferências estruturais derivadas da análise do  $g(r)$  sejam consistentes, por serem derivadas do sistema em equilíbrio estrutural.

#### 4.3.4 Coeficiente de difusão lateral

Em um sistema bidimensional homogêneo o coeficiente de difusão lateral  $D_{lat}$  pode ser definido através da relação de Einstein para movimentos brownianos em duas dimensões e tempo relativamente longos (Figura 13), que tem a seguinte forma:

$$D_{lat} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{4} \frac{d}{dt} \langle (r(t + \tau) - r(\tau))^2 \rangle_\tau$$

em que  $\langle (r(t + \tau) - r(\tau))^2 \rangle$  é o desvio quadrático médio do CM;  $t$  é o tempo final; e  $\tau$  é o tempo inicial [119]. O  $D_{lat}$  é calculado pela média do desvio quadrático médio obtido para todos os tempos iniciais  $\tau$  e posição  $r(t)$  do CM no tempo  $t$  de todas as moléculas de

lipídio. Para melhorar as estatísticas o tempo  $\tau$  é deslocado para zero a cada 25 ps. Antes do cálculo  $D_{lat}$ , uma correção das coordenadas dos lipídios tem que ser inserida, pois apesar da velocidade do CM do sistema ser restabelecido para zero a cada passo, o CM das camadas pode adquirir velocidade em sentidos contrários, o que mantém a velocidade do CM total igual zero [120, 121]. Entretanto este movimento randômico das camadas cria uma supradifusividade artificial que precisa ser corrigida. Neste contexto, removem-se estes movimentos resultantes da artificialidade subtraindo as velocidades do CM das monocamadas de forma correlacionada.

Para o cálculo do  $D_{lat}$  para as moléculas de DPPC no plano da membrana, foi utilizada a ferramenta de análise `g_msd`, pertencente ao pacote computacional GROMACS. E todas as medidas foram feitas nos últimos 10 ns de simulação.

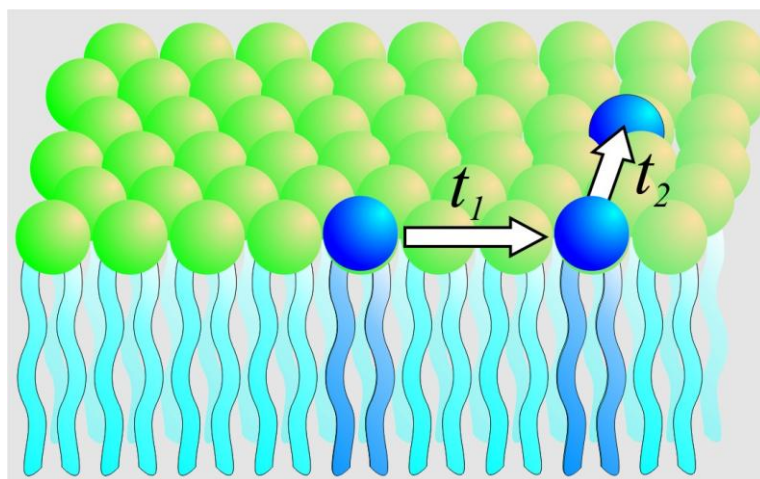


Figura 13 – Representação esquemática do processo de difusão lateral dos lipídios ao longo de uma monocamada.

#### 4.3.5 Parâmetro de Ordem

No estudo de propriedades de membrana o parâmetro de ordem ( $S_n$ ) é proporcional ao parâmetro de ordem de deutério ( $S_{cd}$ ) e está relacionado com o grau de ordenamento do sistema. Quanto menor seu valor, menos alinhadas as cadeias alifáticas dos lipídios estão em relação ao vetor normal ao plano da membrana e, por conseguinte tem menor mobilidade. Sendo que zero indica nenhuma ordem nos carbonos e 1, um estado de ordenação absoluta em



relação ao eixo normal. A expressão utilizada para o cálculo do parâmetro de ordem pode ser expressa como:

$$S_n = \frac{3\langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1}{2}$$

em que  $\theta_i$  é o ângulo entre o eixo molecular  $i$  e o vetor normal ao plano da bicamada. O eixo molecular  $i$  é definido para a  $n$ -ésima unidade  $\text{CH}_2$  pelo vetor do carbono em  $(n-1)$  para o  $(n+1)$ , o que pode ser visualizado na Figura 14. O  $S_{cd}$  é obtido para um carbono da cadeia apolar lipídica a partir da média de todos os  $S_n$  dos carbonos de mesmo tipo no *ensemble* em todos os passos analisados da trajetória [122, 123]. As medidas de  $S_{cd}$  para os sistemas simulados foram feitas com uso da sub-rotina `g_order` contida no pacote computacional GROMACS, nos últimos 50 ns de todas as simulações. Os parâmetros obtidos foram comparados com dados experimentais provenientes de espectroscopia de  $^2\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ -RMN das cadeias marcadas [122].

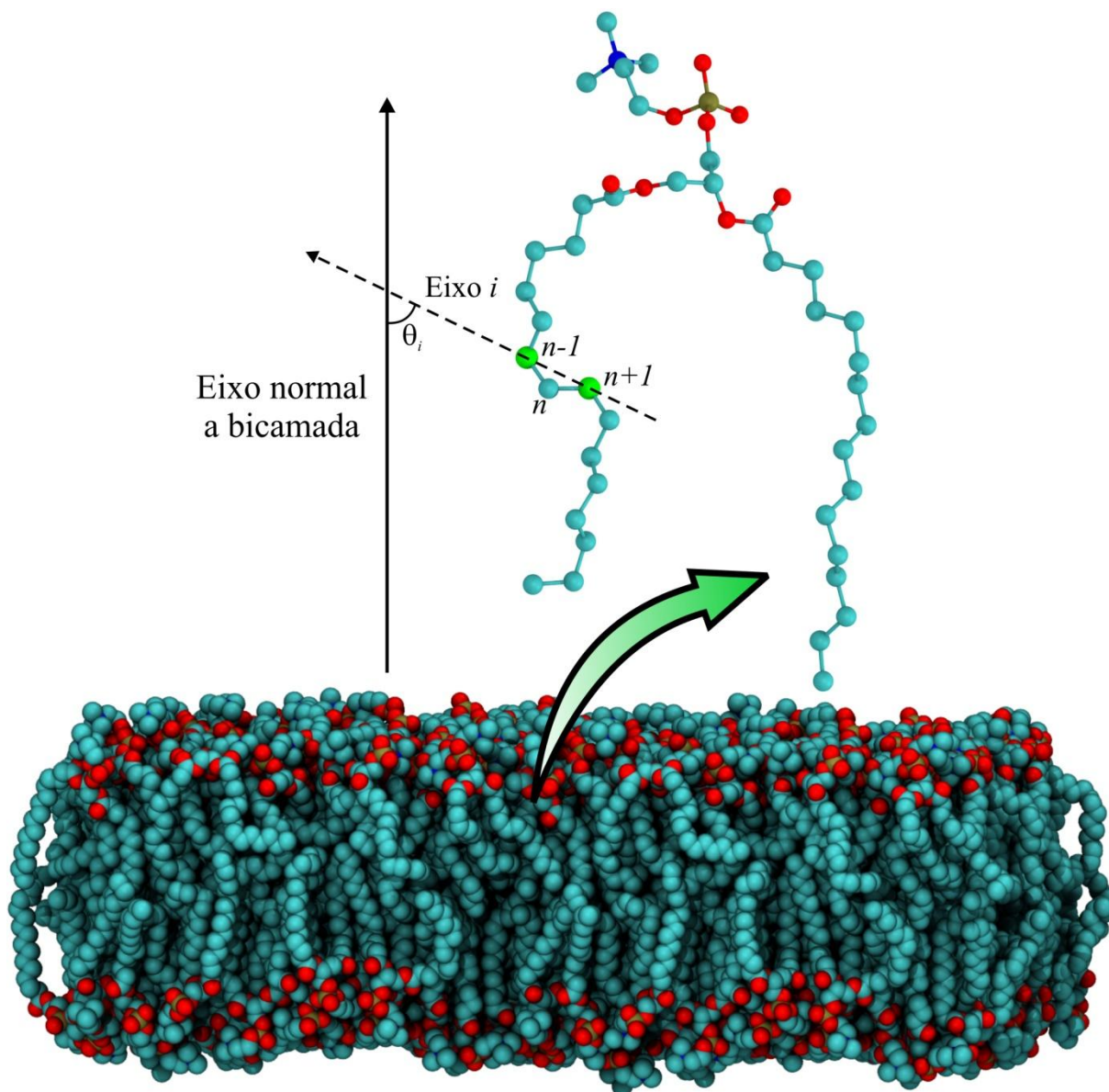


Figura 14 – Definição do eixo normal da membrana e do eixo molecular  $i$  para o carbono  $n$  formado entre os carbonos  $n+1$  e  $n-1$  (em verde) da cadeia alifática.

## 5 *Resultados e Discussões*

A qualidade dos modelos utilizados para a simulação de bicamadas lipídicas, em termos de reprodução dos parâmetros experimentais, depende do campo de força e de alguns parâmetros de simulação tais como o tratamento eletrostático e o acoplamento de pressão [92, 124, 125]. Dessa forma, se o campo de força estiver adequado, os parâmetros reproduzirão os dados experimentais; porém ajustar os termos de van der Waals e a distribuição das cargas parciais nos lipídios não é nada trivial, e a resolução destes parâmetros ainda caminha para a idealidade. Considerando isso, as propriedades determinadas neste trabalho, são:  $A_L$ , coeficiente de difusão lateral e parâmetro de ordem para os carbonos alifáticos [126]. Em geral, essas propriedades são obtidas experimentalmente a partir de metodologias mais avançadas envolvendo espectroscopia de RMN. Atualmente estas são muito bem caracterizadas, ainda que haja erros associados ao caráter dinâmico das mesmas [31, 120]. Assim, a análise destes parâmetros nas simulações realizadas permitiu avaliar o efeito de diferentes concentrações de quitosana nas propriedades físico-químicas da membrana, bem como a viabilidade do modelo utilizado [111].

Todas as simulações foram feitas exatamente sob os mesmos parâmetros de campo de força e de DM. O modelo de membrana utilizado nas simulações continha inicialmente a  $A_L$  bem próxima ao valor experimental de  $0,633/0,64 \text{ nm}^2$  [127-129]. O equilíbrio estrutural do sistema está relacionado com a flutuação da  $A_L$ , sendo este o critério que foi adotado para determinar o tempo produtivo de simulação, ou seja, o tempo em que o sistema está em equilíbrio termodinâmico e estrutural. A evolução da  $A_L$  para todos os sistemas está apresentada na Figura 15 e os valores médios na Tabela 6. Nota-se que todas as simulações tiveram diminuição na  $A_L$  em relação aos sistemas iniciais, e relativa estabilidade a partir de determinado tempo de simulação (apenas flutuações térmicas na  $A_L$ ). Estes tempos ocorreram por volta de 50 e 100 ns para as simulações com somente DPPC e 10 mg/mL de quitosana, respectivamente, e 150 ns para as simulações contendo 30 e 50 mg/mL de quitosana. A simulação contendo somente DPPC foi utilizada como modelo de referência para as demais. Desta forma, a diminuição na  $A_L$  bem como as alterações nas outras propriedades dos sistemas contendo quitosana, se deve exclusivamente a interação com a mesma. As concentrações de quitosana visaram reproduzir a mesma proporção do trabalho de Pavinatto *et. al.*, que propõem que interações eletrostáticas não são suficientes para explicar a bioatividade da quitosana frente a membranas [15]. A área por lipídio média obtida na

simulação do DPPC está entre 4,8 e 5,6% menor que os valores obtidos experimentalmente. Este é um resultado aceitável visto que a temperatura de simulação é menor que a temperatura das medidas experimentais, o que confere menor mobilidade aos lipídios e maior proximidade temperatura de transição de fase [130].

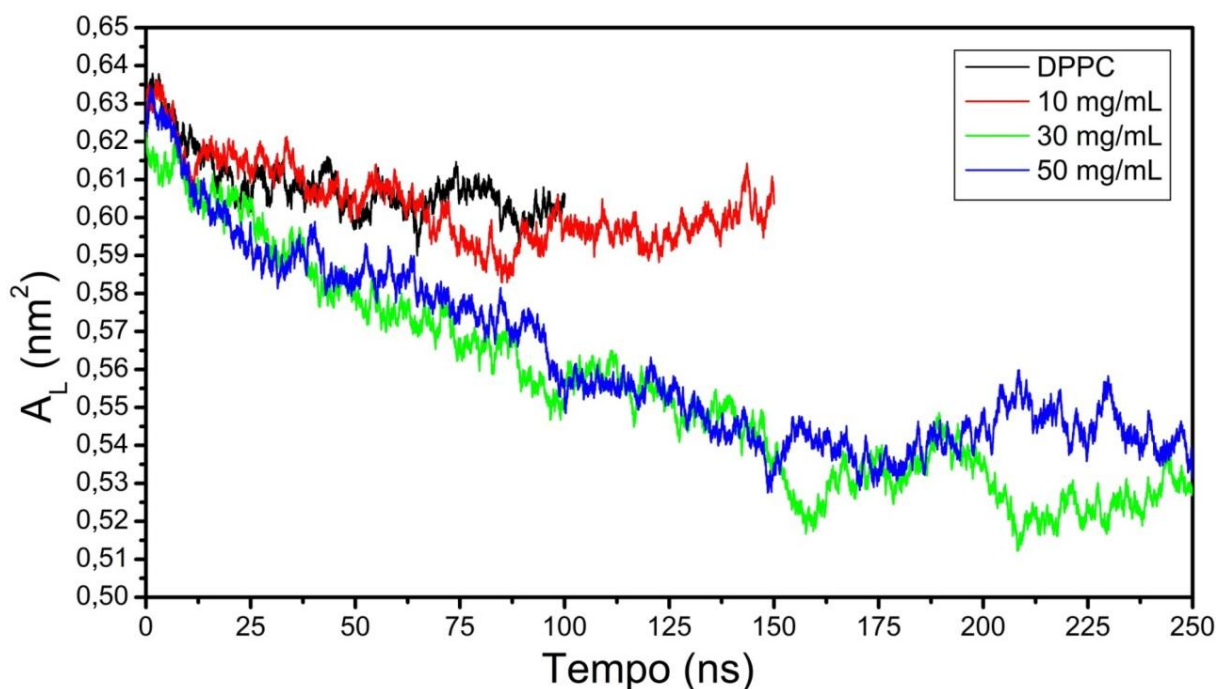


Figura 15 – Variação da área média por lipídio ( $A_L$ ) pelo tempo de simulação e concentração de quitosana nos sistemas simulados.

Tabela 6 – Tabela com o valor médio da área por lipídio. A concentração é de quitosana em relação à água e as médias foram extraídas após 50, 100, 150 e 150 ns para os sistemas DPPC, 10, 30 e 50 mg/mL, respectivamente.

Sistemas	Média da área por lipídio ( $\text{nm}^2$ )	Desvio padrão
Experimental	0,633/0,64	—
DPPC	0,604	$\pm 0,00396$
10 mg/mL	0,598	$\pm 0,00418$
30 mg/mL	0,525	$\pm 0,00692$
50 mg/mL	0,546	$\pm 0,00582$

Para avaliar o efeito da quitosana na conformação das cadeias apolares dos lipídios foram descritos os parâmetros de ordem do DPPC, e foi observado que para o DPPC puro o

erro médio, em relação ao experimental é de 6,8 e 6,9 % para as cadeias sn1 e sn2 respectivamente. Os valores experimentais usados para comparação foram obtidos a uma temperatura de 313 K [122]. Estas porcentagens de erro são aceitáveis visto que o modelo utilizado depende de inúmeros parâmetros, principalmente os termos atrativos e repulsivos de vdW, que podem resultar em uma artificialidade na simulação conferindo um pouco mais de mobilidade aos carbonos da cauda lipídica. As análises dos resultados decorrentes da interação da membrana com a quitosana foram feitas em relação ao modelo, fornecendo uma tendência geral dependente da concentração e do mecanismo de interação.

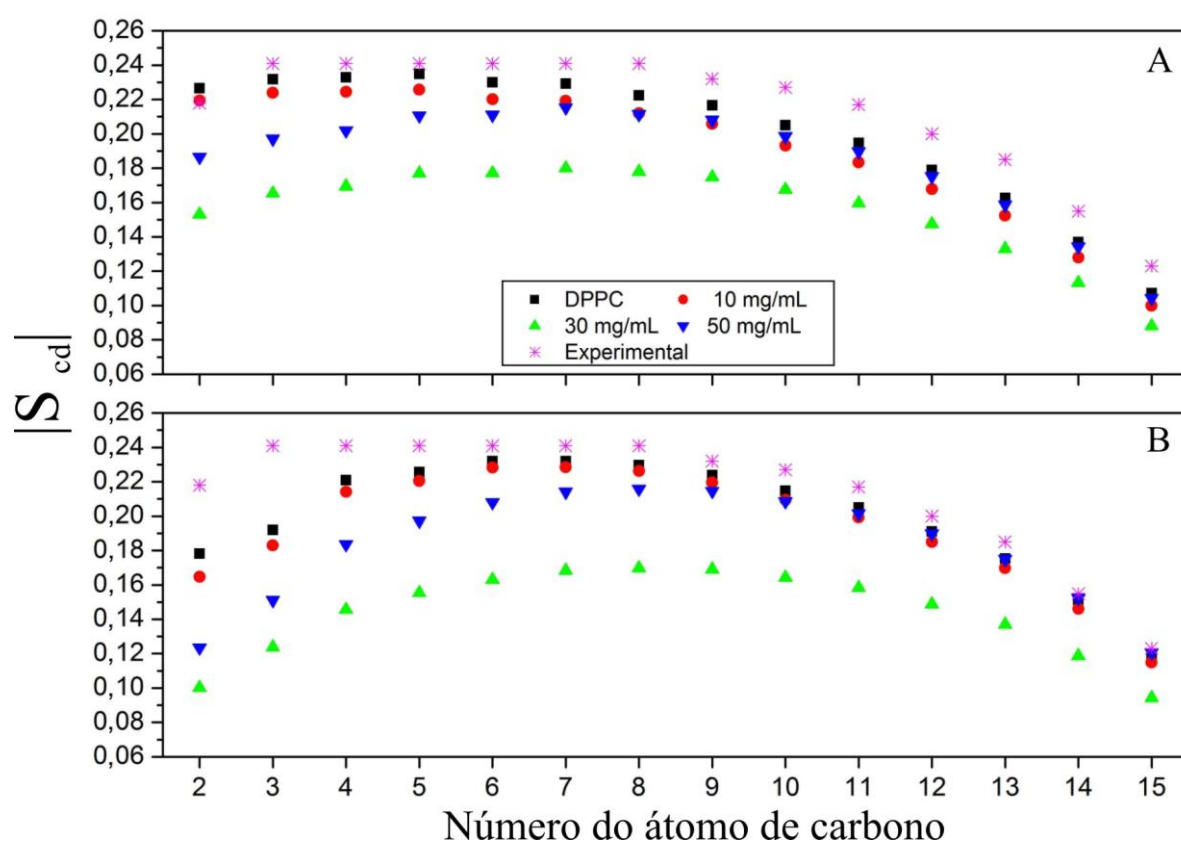


Figura 16 – Módulo do valor de  $S_{cd}$  para os átomos de carbono das cadeias alifáticas do DPPC nos sistemas simulados. Cadeia sn-1 (A) e sn-2 (B).

A diminuição na  $A_L$  está relacionada com a forte interação da cabeça polar do DPPC com os grupos polares da quitosana, fazendo com que os lipídios se agrupem ao redor da mesma, concentrando-os próximos à quitosana. O parâmetro de ordem dos carbonos mais próximos da cabeça polar indica que estes estão menos organizados em relação ao plano da membrana. Isto sugere que a penetração da quitosana na membrana pode estar induzindo uma inclinação da cabeça dos lipídios, bem como arrastando moléculas de águas para o interior da



bicamada. Esta inclinação faz com que as cadeias alifáticas adotem conformações menos paralelas ao eixo normal da bicamada. Este efeito pode está evidenciado na Figura 17A, em que as setas brancas indicam lipídios cujo direcionamento dos carbonos alifáticos tende ao paralelismo em relação ao eixo normal a membrana. A Figura 17C mostra como os carbonos mais próximos à cabeça polar estão desalinhados com o eixo normal devido à interação com a quitosana, o que resulta em um menor valor de  $|S_{cd}|$  para os mesmos.

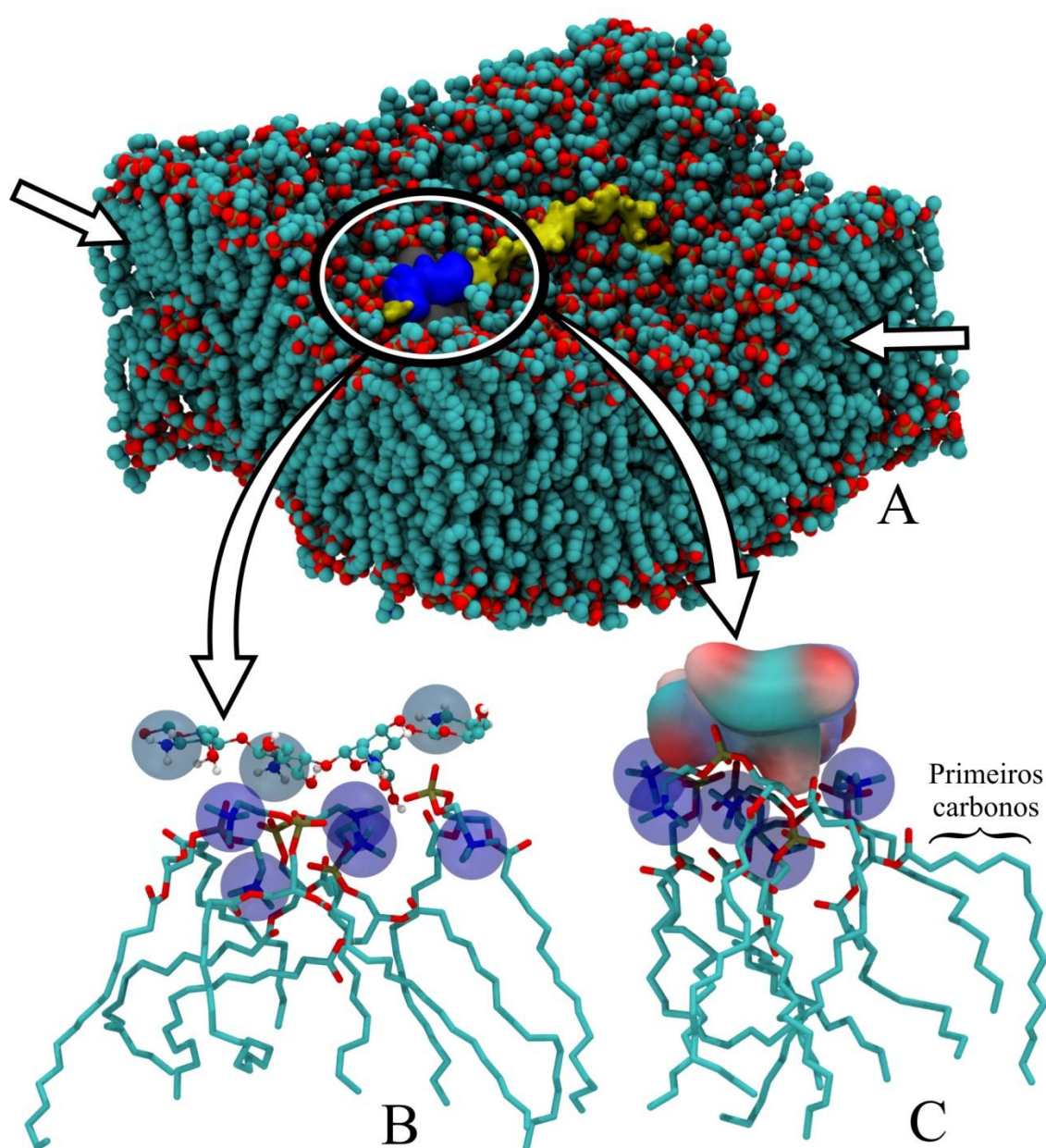


Figura 17 – Lipídios imediatamente abaixo da quitosana. A) Estrutura extraída da simulação contendo DPPC e 30 mg/mL de quitosana aos 225 ns, B) e C) são diferentes ângulos da região demarcada, em que os outros lipídios e a água foram removidos para melhor

visualização de suas conformações e posições. As bolas azuis (em B e C) destacam a posição dos grupos  $\text{-NH}_3^+$  da quitosana e  $\text{-N(CH}_3)_3^+$  do DPPC. Em C, a quitosana foi representada a partir do volume aproximado que a mesma ocupa (cálculo baseado nos raios de vdW dos átomos constituintes).

As grandes deformações na bicamada bem como o impedimento de que a quitosana penetre mais, ou atravesse a bicamada estão relacionados principalmente à repulsão eletrostática entre os grupos  $\text{-NH}_3^+$  da quitosana e o grupo  $\text{-N(CH}_3)_3^+$ , do DPPC, como mostra a Figura 17A e Figura 17B. Os lipídios com a cabeça polar diretamente abaixo da quitosana sofrem de forma mais efetiva os efeitos de repulsão e atração eletrostáticas, devido aos grupos carregados, e simultaneamente fazem ligação de hidrogênio com a quitosana. Este processo faz com que estes lipídios (de forma direta) e seus vizinhos (aqueles que não necessariamente estão abaixo da quitosana) adquiram conformações e posições diferentes em relação à membrana, o que reflete diretamente nos parâmetros de ordem como discutido posteriormente e mostrado na Figura 17C. Além disso, a quitosana blinda as cargas da cabeça polar dos lipídios que interagem diretamente com ela, repelindo os grupos positivos para baixo, e se mantendo na posição por ligações de hidrogênio com o grupo fosfato e as carbonilas do DPPC. Desta forma os lipídios imediatamente abaixo da quitosana são empurrados para baixo do plano da membrana (Figura 17B). Com isso, os lipídios vizinhos aos da interação direta, interagem mais fortemente com água, pois a interação entre cabeça polar - cabeça polar foi substituída pela interação cabeças polar – quitosana. Este lipídio cuja interação com outro foi substituída pela interação com a água pode elevar-se um pouco em relação ao plano da membrana gerando ondulações/deformações bastante expressivas. Esta interação mais efetiva com o solvente incorre em um aumento da mobilidade da parte polar e conseqüentemente da difusão lateral dos lipídios (Tabela 7).

Tabela 7 – Tabela contendo os valores de  $D_{\text{lat}}$  para os lipídios que compunham as bicamadas presentes nas simulações. O valor experimental obtido a 421 K [131].

Sistemas	Coef. Difusão Lateral ( $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ )
Experimental	9,9 – 12
DPPC	1,43 ( $\pm 2,000$ )
10 mg/mL	4,908 ( $\pm 4,459$ )
30 mg/mL	4,052 ( $\pm 2,731$ )
50 mg/mL	3,595 ( $\pm 3,248$ )

A água tem importante papel no mecanismo de interação, podendo agir como interface entre o DPPC e a quitosana. Desta forma, a quitosana se mantém adsorvida na membrana tanto por interações diretas, quanto por aquelas mediadas pela água, conforme mostra a Figura 18B e na Figura 19. Complexas redes de ligações de hidrogênio são responsáveis por manter a quitosana cravada na membrana. A Figura 19 sugere que pode haver mais de uma molécula de água envolvida no mecanismo de interação/adsorção da quitosana. Os resíduos mostrados na Figura 19 se encontram abaixo das cabeças polares e interagem diretamente com as carbonilas do DPPC, este é um comportamento molecular que se repete nos resíduos terminais de algumas das cadeias simuladas (independe da concentração). A maioria dos resíduos do polissacarídeo permanece adsorvido à superfície da membrana após a simulação atingir o equilíbrio, enfatizando as interações efetivas com a bicamada (na concentração de 10 mg/mL de quitosana todos os resíduos estão adsorvidos). Estas interações são suficientes para contrabalancear a repulsão eletrostática entre as cargas positivas na quitosana e no DPPC. As Figura 17, Figura 18 e Figura 19, foram feitas a partir de estruturas extraídas em determinados instantes da trajetória, e representam uma tendência geral no comportamento molecular do sistema, visto que nas simulações as interações ocorrem de maneira altamente dinâmica, principalmente no que diz respeito ao solvente.



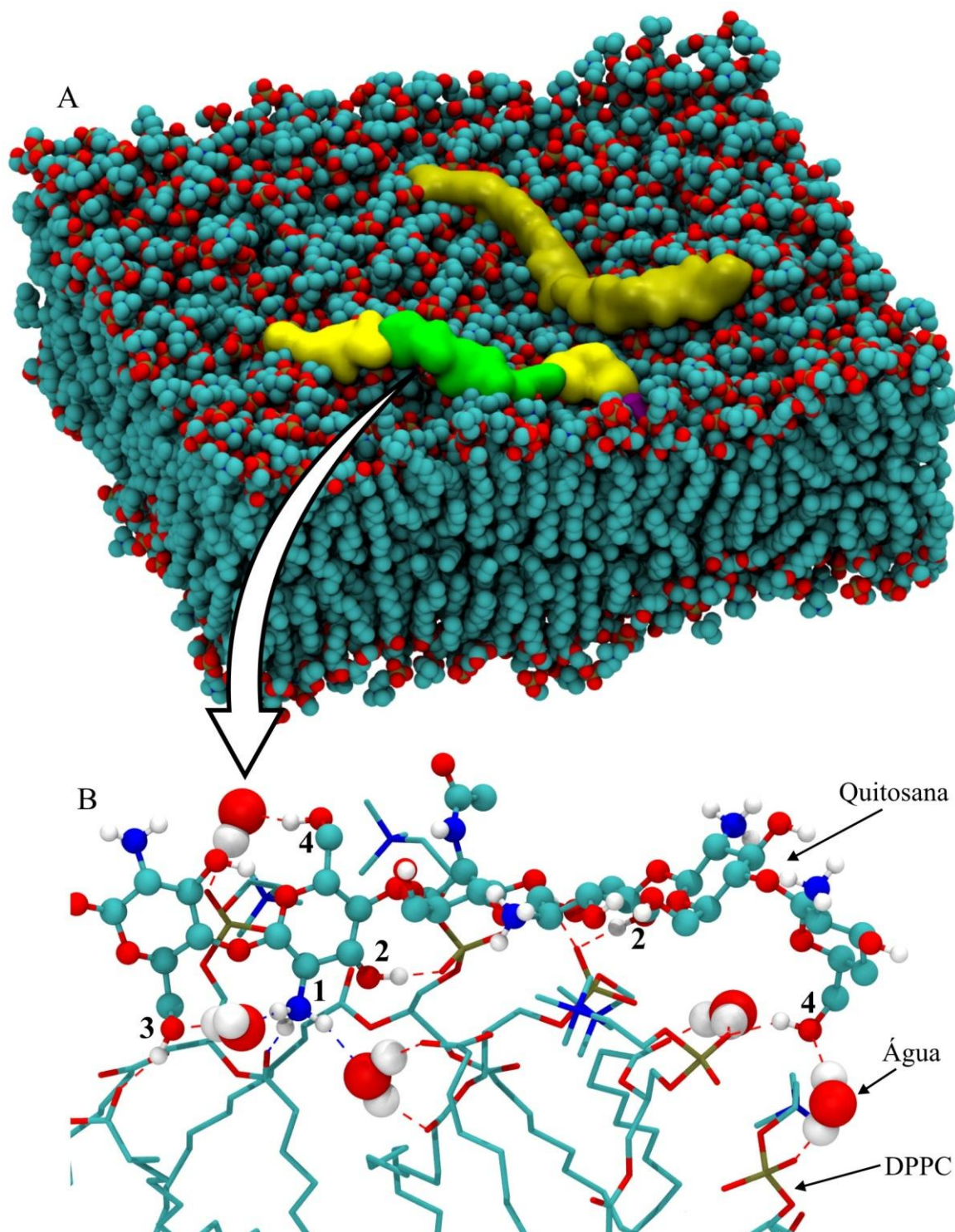


Figura 18 – A) Estrutura da membrana + 10 mg/mL de quitosana (amarelo) após 150 ns de simulação. B) Interações específicas de 6 resíduos de quitosana com o DPPC. As ligações de hidrogênio foram numeradas sendo que: 1 – Grupo  $\text{-NH}_3^+$  com a carbonila do DPPC, diretas e intermediadas pela água, e com a hidroxila Ho6-O6 intermediada pela água. 2 – Grupo Ho3-O3 e fosfato. 3 - Grupo Ho3-O3 e a carbonila. 4 – Hidroxilas da quitosana e grupos fosfato do DPPC via água.

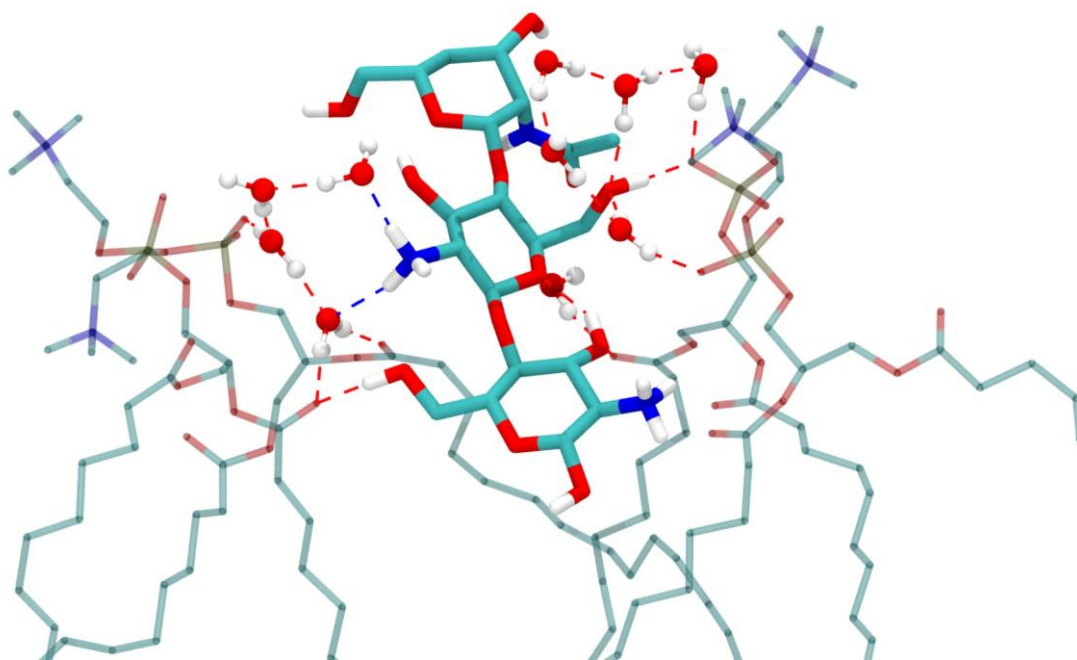


Figura 19 – Rede de ligações de hidrogênio entre água, DPPC e Quitosana aos 150 ns da simulação do sistema DPPC + quitosana 10 mg/mL. Na esquerda 4 moléculas de água formam uma rede envolvendo dois lipídios e o grupo amino da quitosana. Enquanto que a rede formada no lado direito envolve uma das hidroxilas da quitosana e 5 moléculas de água.

Devido à carga dos grupos amino da quitosana e fosfato do DPPC, se pressupõe que esta seria a principal via de interação. Há evidências experimentais sugerindo que a quitosana interage efetivamente com a cabeça polar dos lipídios diminuindo o grau de liberdade de movimentação do grupo fosfato [90]. Entretanto, outros trabalhos propõem que somente estas interações eletrostáticas não são suficientes para explicar o mecanismo de ação da quitosana [15]. A análise do número médio de ligações de hidrogênio ( $\overline{HB}$ ), para os grupos polares presentes nos componentes dos sistemas, visa compreender melhor quais são as forças que competem com as interações puramente eletrostáticas (carga - carga). Os resultados de  $\overline{HB}$  em função dos grupos  $-NH_3^+$  e  $-OH$  da quitosana estão mostrados nas Figura 20 e Figura 21 respectivamente.

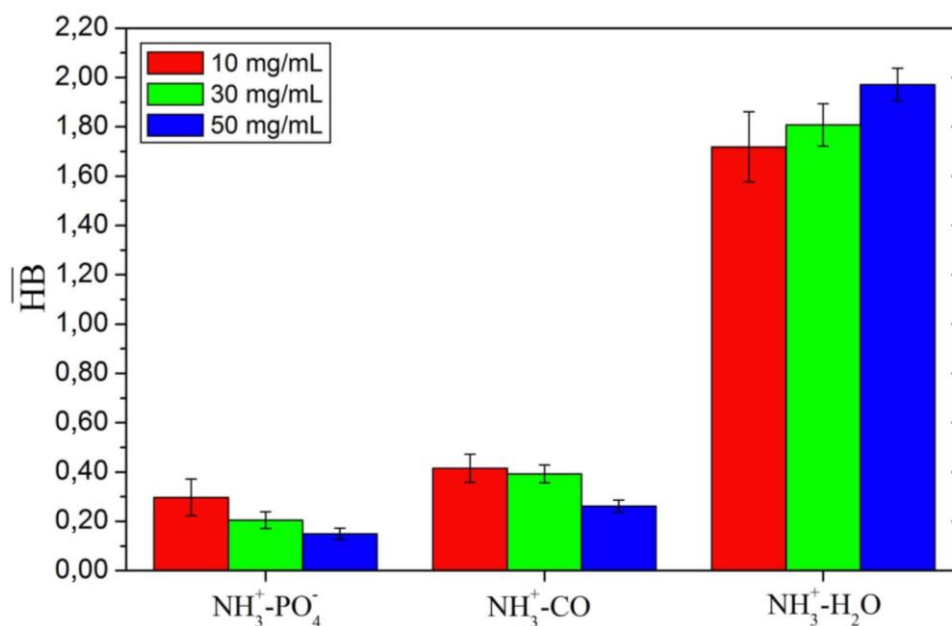


Figura 20 – Número médio de Ligações de Hidrogênio por grupo amino da quitosana nos últimos 25 ns de simulação. Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul 50 mg/mL de quitosana.

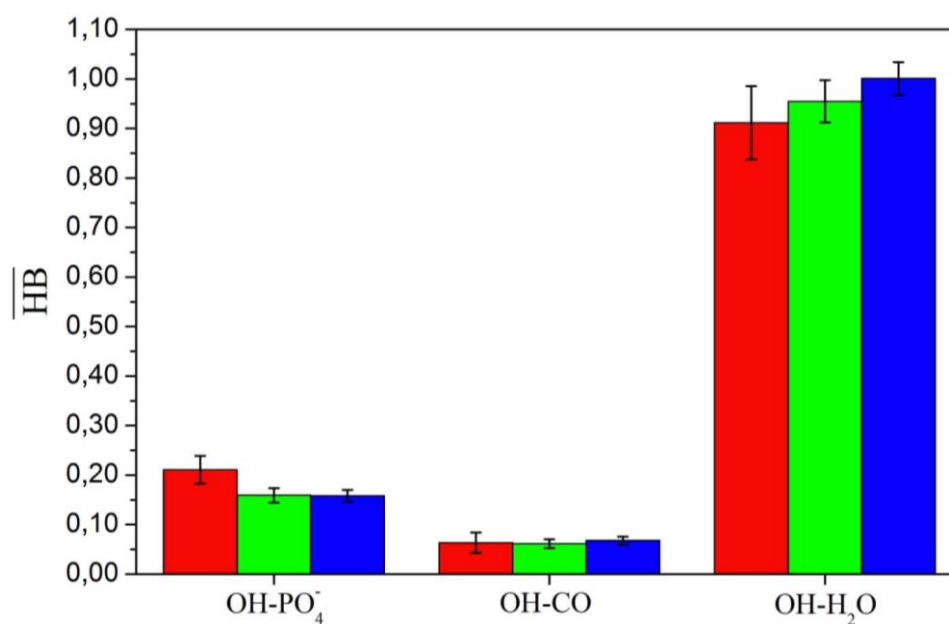


Figura 21 – Número médio de Ligações de Hidrogênio por hidroxila da quitosana nos últimos 25 ns de simulação. Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul 50 mg/mL de quitosana.

De acordo com o  $\overline{HB}$  obtidos pela simulação, o número de interações entre o grupo amino e a carbonila dos lipídios (CO) é maior do que com o grupo fosfato,

independentemente da concentração (Figura 20). Considerando todas as simulações, a média do  $\overline{HB}$  por grupamento amino com o fosfato é de 0,22 ( $\pm 0.043$ ) enquanto que para o par  $\text{NH}_3^+ - \text{CO}$ , é de 0,36 ( $\pm 0.039$ ). Isto significa que nas simulações realizadas, há aproximadamente uma ligação de hidrogênio com a carbonila para cada 3 resíduos de GlcN, contra uma ligação com o fosfato para cada 4 resíduos. Por outro lado, os grupos hidroxila da quitosana realizam mais ligações com o fosfato do que com as carbonilas do lipídio. Novamente, se considerarmos todas as concentrações de quitosana, o  $\overline{HB}$  para cada hidroxila (O3-Ho3, O6-Ho6 e as da ponta O4-Ho4) com o  $-\text{PO}_4^-$  é 0,17 ( $\pm 0,018$ ), enquanto que para o com a carbonila (CO) é de 0,064 ( $\pm 0,012$ ), o que significa dizer que a cada 3 resíduos (6 hidroxilas) há aproximadamente uma ligação de hidrogênio do tipo  $\text{HO}-\text{PO}_4^-$  e a cada 8 resíduos há uma do tipo  $\text{HO}-\text{CO}$ . Comparando as ligações de hidrogênio por resíduo temos que, as do tipo  $\text{HO}-\text{PO}_4^-$  ocorrem em maior número do que o par  $\text{NH}_3^+ - \text{PO}_4^-$  (uma ligação  $\text{HO}-\text{PO}_4^-$  /3 GlcN versus uma ligação  $\text{NH}_3^+ - \text{PO}_4^-$  /4 GlcN). Enquanto que o grupo  $-\text{NH}_3^+$  faz o dobro de ligações com a carbonila que os grupos  $-\text{OH}$  dos resíduos da quitosana. Desta forma se propõe que as ligações de hidrogênio têm papel tão importante quanto às puramente eletrostáticas.

Além disso, a interação da quitosana com a água aumenta proporcionalmente à sua concentração, enquanto que o  $\overline{HB}$  com o lipídio diminui. O somatório do  $\overline{HB}$  do grupo  $-\text{NH}_3^+$  é praticamente o mesmo para as três simulações (média do  $\overline{HB}_{\text{total}} = 2,41$ ), por isso o aumento que ocorre nas interações do grupo  $-\text{NH}_3^+$  com a água está correlacionado com a diminuição da interação deste grupo com o fosfato e a carbonila. O aumento da interação  $-\text{NH}_3^+ - \text{H}_2\text{O}$ , também pode estar relacionado com a interação da quitosana com ela mesma. Na Figura 22, estão dispostos os valores para o  $\overline{HB}$  por resíduo; da quitosana com ela mesma, que leva em conta as interações intra e intermolecular (entre cadeias); e também para a interação intramolecular entre a hidroxila da quitosana e o oxigênio do anel glicosídico no próximo resíduo. Os valores são praticamente os mesmos, sugerindo que não há interação direta entre as cadeias de quitosana. A Figura 23, confirma a proposição de que um aumento na concentração da quitosana implica numa melhor interação da mesma com a água. A integração da área do primeiro pico, localizado entre 0,25 e 0,35 nm (2,5 e 3,5 Å), nos permite calcular o número médio de moléculas de água que são coordenadas pelo grupo amino e hidroxilas da quitosana, ou seja, o número de coordenação para a primeira camada de solvatação. O número de moléculas de água coordenadas aumenta com a concentração, e a primeira camada de solvatação se encontra exatamente dentro do alcance médio das ligações

de hidrogênio (parâmetro definido na seção 4.3.2, pág. 50). Nota-se que a quantidade de água que interage com o a hidroxila O3-Ho3, aumenta com a concentração, entretanto, é bem menor se comparado à hidroxila O6Ho6, isto ocorre, pois a mobilidade da primeira é comprometida pela sua interação com o O5 do próximo resíduo de quitosana e também com o DPPC, como veremos posteriormente.

Considerando o trabalho de Franca *et. al.*, que propõe que as interações entre as cadeias de quitosana – quitosana e das cadeias de quitina – quitina são intermediadas por moléculas de água, principalmente quando as mesmas se encontram solvatadas, pode-se propor que o aumento na interação da quitosana com a água seja equivalente ao aumento da interação da quitosana com ela mesma [65, 72]. Ou seja, o acréscimo na concentração de quitosana, reduz a intensidade das suas interações específicas com o DPPC, pois há um acréscimo na interação quitosana – quitosana que ocorre por intermédio da água. Ressaltando que esta interação pode ser atrativa ou repulsiva, predominando o fator repulsivo para a quitosana no pH simulado. Ou seja, parte das cadeias de quitosana interagem com a membrana e impedem as outras mais externas de se aproximarem e interagirem, por blindar a carga dos lipídios. Nestas simulações, a concentração foi determinante na forma de interação da quitosana com a membrana. A análise de algumas distribuições radiais de pares pode fornecer *insights* acerca da interdependência entre o mecanismo de interação e a concentração.

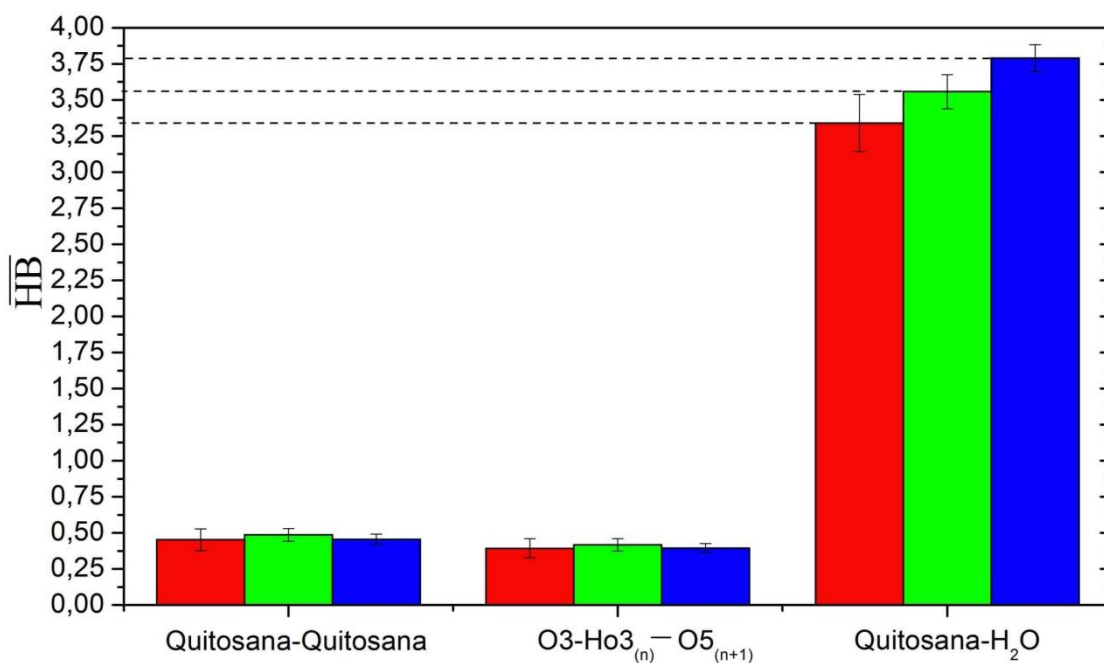


Figura 22 – Número médio de ligações de hidrogênio nos últimos 25 ns de simulação. Os valores de  $\overline{HB}$  para quitosana - quitosana incluem as ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul 50 mg/mL de quitosana



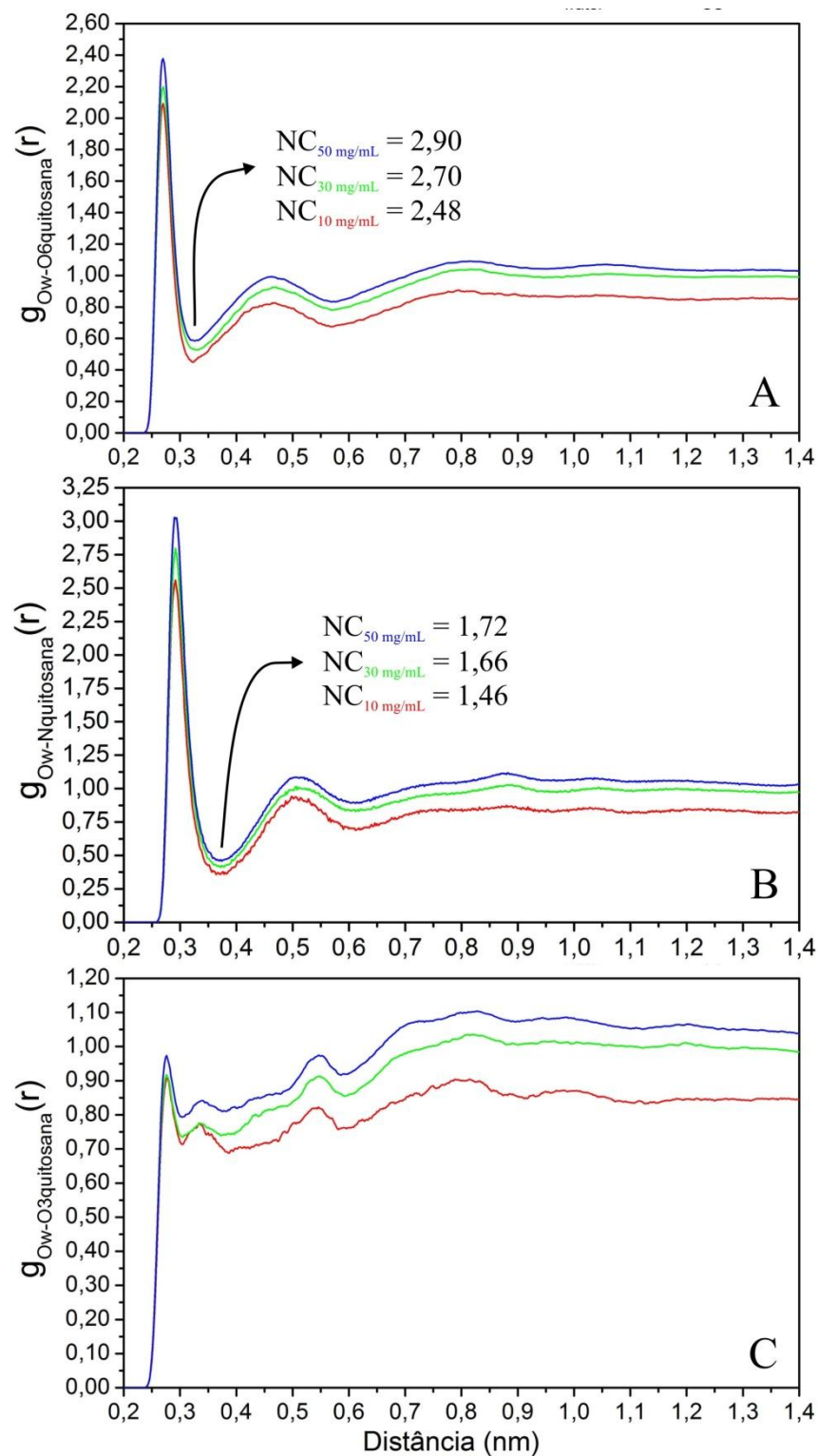


Figura 23 – Função de distribuição radial de pares entre o oxigênio da água (OW), oxigênio das hidroxilas (O3, O6) e o nitrogênio da quitosana (N). NC é o número de coordenação para a primeira camada de solvatação para as concentrações de quitosana indicadas.

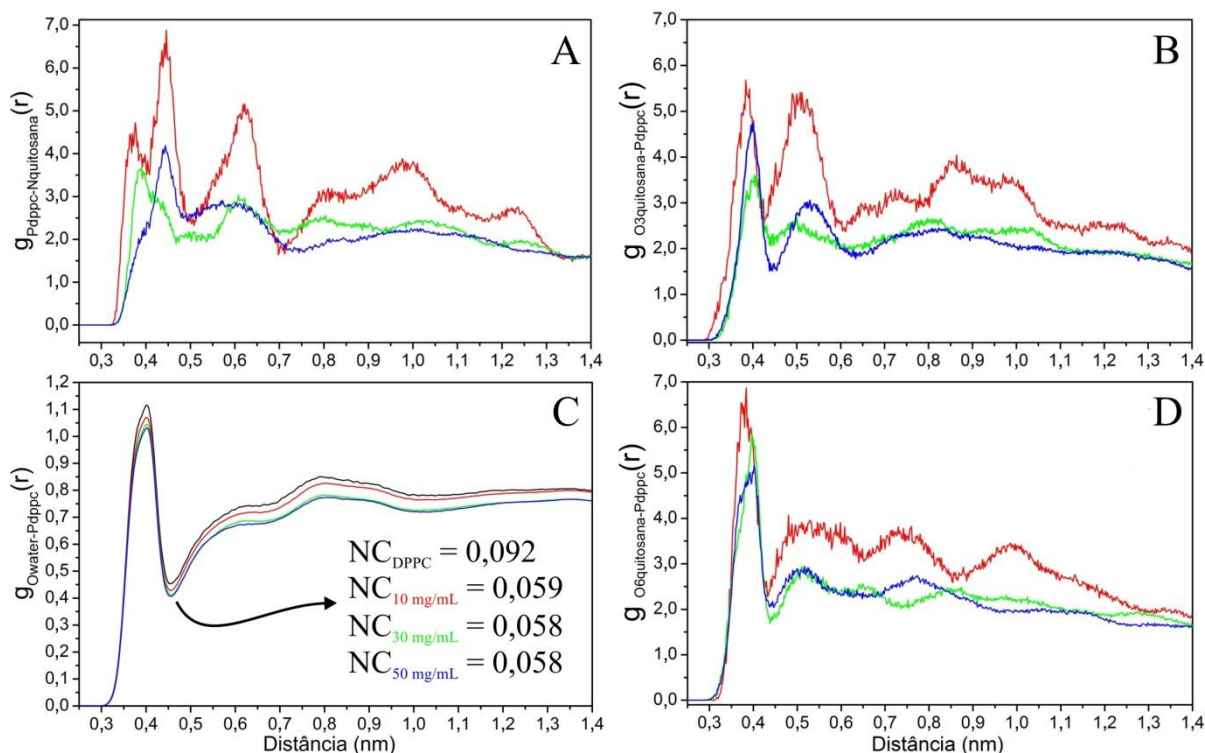


Figura 24 – Função de distribuição radial de pares entre o átomo de fósforo e os principais átomos dos grupos polares passíveis de interação com o  $-\text{PO}_4^-$ . Em vermelho: 10 mg/mL; verde: 30 mg/mL; e azul: 50 mg/mL de quitosana e em preto (gráfico C): somente DPPC. Os números de coordenação (NC) mostrados em C, são referentes à quantidade de moléculas de água interagindo diretamente com o  $-\text{PO}_4^-$ .

Nas simulações realizadas, o grupo  $-\text{PO}_4^-$  do DPPC, pode interagir com a água e com os grupos polares da quitosana. A Figura 24 apresenta os valores de  $g(r)$  entre o átomo de fósforo e os átomos doadores de hidrogênio que estão envolvidos na interação com o grupo fosfato. De forma geral a interação do grupo amino e das hidroxilas com o fosfato é menos expressiva à medida que se aumenta a concentração, pois há uma diminuição nos valores de  $g(r)$ . Na Figura 24A, nota-se que primeiro pico é entre 0,35 e 0,4 nm para 10 e 30 mg/mL, e este está relacionado com a ligação de hidrogênio direta entre  $-\text{NH}_3^+$  e oxigênio do  $-\text{PO}_4^-$ . Na concentração de 50 mg/mL de quitosana (azul), o primeiro pico está deslocado para 0,45 nm, pois nesta concentração a interação entre NAc e  $-\text{PO}_4^-$  ocorre com mais frequência. Na distância de 0,60 nm a interação do doador N2 com o receptor O (oxigênios ligados ao P), é intermediada pela água, cuja distância média do oxigênio ao fósforo é 0,40 nm (Figura 24C). Este comportamento molecular também acontece em 10 mg/mL, e em maior intensidade, pois a quitosana nesse sistema encontra-se na interface, e por não adentrar muito na membrana fica

mais viável o trânsito das moléculas de água entre as diferentes interações dos grupos polares. Sugere-se que a ligação de hidrogênio direta entre  $\text{-NH}_3^+$  e oxigênio do  $\text{-PO}_4^-$  esteja relacionada com o efeito de redução da  $A_L$ . Na concentração de 30 mg/mL de quitosana, somam-se os efeitos de massa molar (mais massa sob a membrana) e das interações específicas entre  $\text{-NH}_3^+$  e oxigênio do  $\text{-PO}_4^-$ , que também ocorrem por intermédio da água, com isso há um maior efeito na redução da  $A_L$ . Ao passo que, na concentração de 50 mg/mL, há mais quitosana sobre a membrana mas a repulsão eletrostática não permite que a interação seja mais eficaz, havendo poucas interações diretas entre o  $\text{-NH}_3^+$  e oxigênio do  $\text{-PO}_4^-$  (menor número de ligações de hidrogênio, como mostra a Figura 20). Este seria um possível motivo para que  $A_L$  em 50 mg/mL ( $0,546 \text{ nm}^2$ ) seja levemente maior que em 30 mg/mL ( $0,525 \text{ nm}^2$ ). A intensidade do primeiro pico para 30 mg/mL (verde) em B (O3-P) é menor que o de 50 mg/mL. A diminuição da intensidade da interação O3-Ho3 com  $\text{-PO}_4^-$  pode estar ocorrendo devido à interação direta do  $\text{-NH}_3^+$  com  $\text{-PO}_4^-$ , que ocorrem em 30 mg/mL mais não é expressiva a 50 mg/mL. Em 50 mg/mL, a interação do  $\text{-NH}_3^+$  com  $\text{-PO}_4^-$  é mediada pela água, e preferencialmente ocorre através dos resíduos de GlcNAc, com isso tal interação se torna mais dinâmica, o que resulta em mais espaço (em termos de impedimento estérico) para que a hidroxila O3-Ho3 também possa interagir com o  $\text{-PO}_4^-$ .

As distâncias dos primeiros picos na Figura 24, são um pouco maiores que 0,35 nm, pois estão relacionadas com a ligação de hidrogênio entre OH da quitosana e os oxigênios do  $\text{-PO}_4^-$ . Os picos próximos a 0,60 nm, em A e B, estão relacionados com as interações que ocorrem por intermédio da água. Na simulação de 10 mg/mL de quitosana, todos os resíduos estiveram em interação direta com o DPPC após poucos nanossegundos de simulação. A intensidade do primeiro e do segundo pico para 10 mg/mL em B é praticamente a mesma, ou seja, praticamente todos os resíduos têm seus vizinhos interagindo com o DPPC de maneira semelhante, via O3-Ho3 –  $\text{PO}_4^-$ , ou O3-Ho3 –  $\text{H}_2\text{O}$  –  $\text{PO}_4^-$ . Em D, nota-se que, ainda que com a base larga, há picos próximos de 0,55, 0,80 e 0,11 nm. Esses picos são menos definidos, pois as hidroxilas O6-Ho6 têm mais mobilidade, por estarem ligadas a um carbono fora do anel glicosídico. Assim, com mais graus de liberdade conformacional, as distâncias de interação podem variar bastante. Este efeito é praticamente desprezível nas outras concentrações, pois há menos resíduos interagindo efetivamente com o DPPC, e mais com a água (Figura 23). Na Figura 24C, pode-se observar que o aumento na concentração parece diminuir fracamente a interação do fosfato com a água, entretanto os números de coordenação são diminuídos pela metade. Isso faz com que não haja grandes alterações na camada de



solvatação do grupo fosfato, pois a mesma é pouco expressiva devido ao efeito de blindagem de carga e de impedimento estérico causado pelo grupo  $-N(CH_3)_3^+$ .

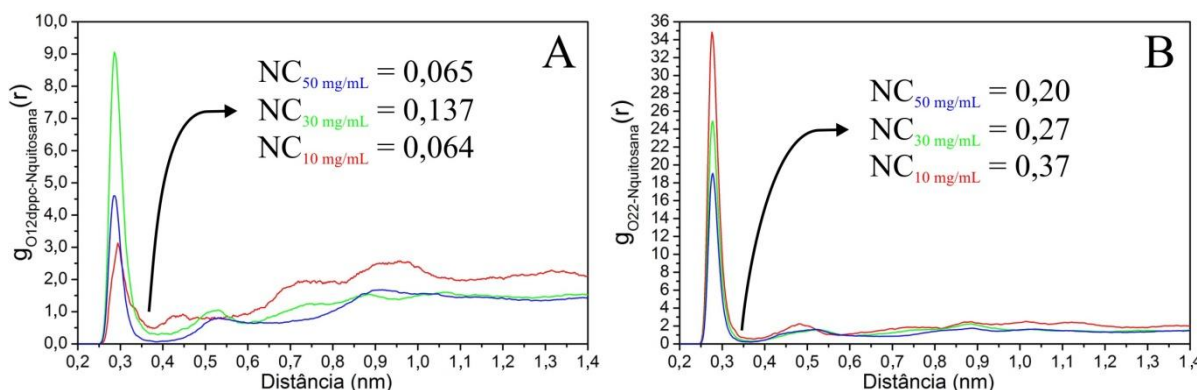


Figura 25 – Função de distribuição radial de pares entre o átomo de N dos grupos  $NH_3^+$  e NAc da quitosana com os átomos O12 e O22 da carbonila dos lipídios, da cadeia sn1 e sn2 respectivamente. Os valores do número de coordenação (NC) são do  $N_{\text{quitosana}}$  em relação ao O22.

As análises dos  $\overline{HB}$  sugerem que a interação do grupo  $NH_3^+$  interage preferencialmente com as carbonilas do lipídio. A Figura 25 mostra a função de distribuição radial de pares entre o nitrogênio dos grupos amino e N-acetil da quitosana e os oxigênios da carbonila dos lipídios. Os picos bem definidos por volta de 0,28 nm em A e B, sugerem que a interação é bastante efetiva e realizada via ligação de hidrogênio. Conforme discussões anteriores, a intensidade das interações efetivas diminui com o aumento da concentração, e isso pode ser notado novamente na Figura 25B. A intensidade da interação específica entre o doador ( $N_{\text{quitosana}}$ ) e o aceitador ( $O22_{\text{DPPC}}$ ) diminui à medida que a concentração de quitosana aumenta, acompanhando a tendência geral, previamente discutida. Há uma preferência na interação via carbonila da cadeia sn2 independentemente da concentração. Isso pode estar ocorrendo, pois a carbonila desta cadeia fica mais próxima da interface membrana (cabeça polar) – água, que é a região onde a quitosana se aloja na membrana, e a outra (sn1), por estar mais interna oferece maior impedimento estérico. Entretanto, na Figura 25A, pode-se notar que não há uma correlação linear da interação com a concentração e que em 30 mg/mL de quitosana este tipo de interação ocorre em maior número que nas outras concentrações. Esta pode ser uma importante contribuição para o efeito da diminuição da  $A_L$  em 30 mg/mL seja maior que em 50 mg/mL. A quantidade de quitosana sobre a membrana bem como a interação direta do  $-NH_3^+$  com os grupos fosfato (que não ocorre expressivamente em 50 mg/mL) convergem para

uma agregação maior dos lipídios ao redor da quitosana. Em 10 mg/mL a quitosana está adsorvida na membrana e seus efeitos agregativos não ultrapassam 2 ou 3 moléculas de DPPC ao redor de cada resíduo, enquanto que nas outras concentrações a quitosana fica bem mais espalhada na superfície da bicamada expandindo sua área de efeito.

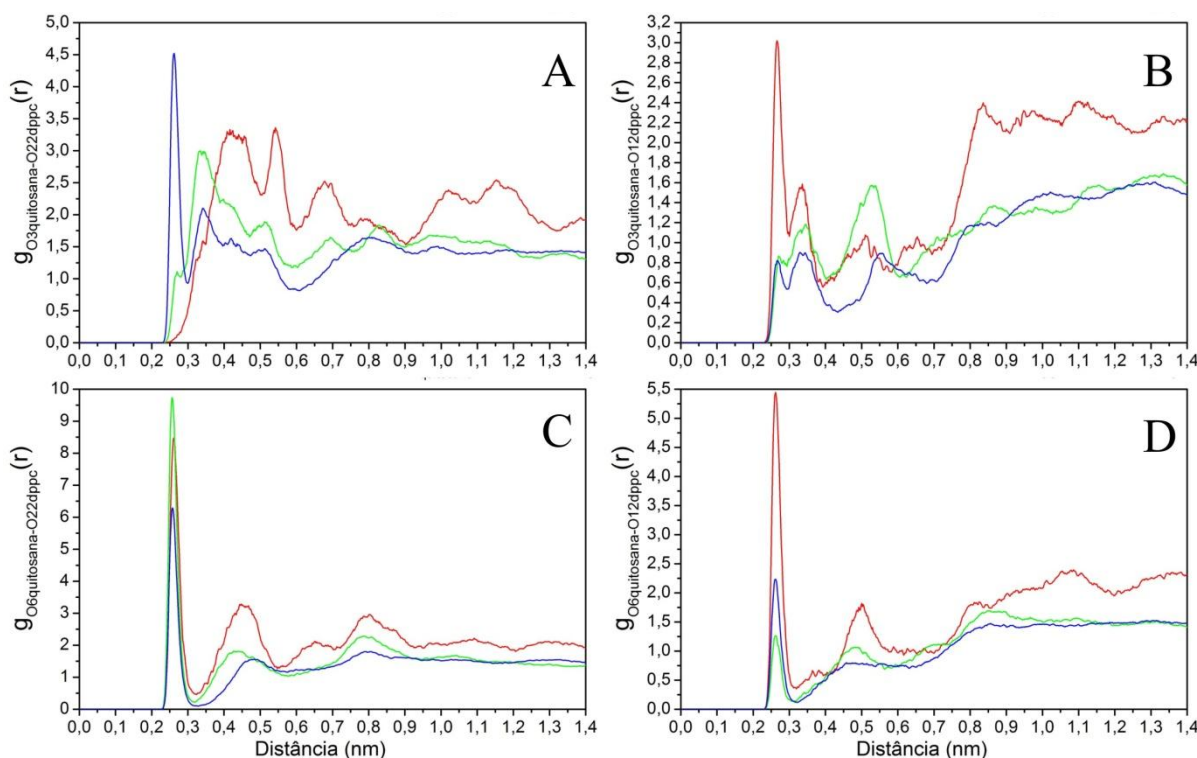


Figura 26 – Distribuição radial de pares para entre os átomos de oxigênio das hidroxilas (O3 e O6) da quitosana e os átomos de oxigênio das carbonilas das cadeias sn1 e sn2 do DPPC (O12 e O22 respectivamente).

As hidroxilas da quitosana (O3-Ho3 e O6-Ho6, definidas na Figura 4) têm um comportamento molecular bem diferente quando comparadas ao grupo  $\text{-NH}_3^+$ , mas suas vias de interação são correlacionadas. Na Figura 26 estão dispostos os valores da função de distribuição radial de pares entre os átomos O3 e O6 da quitosana e os átomos O12 e O22 da carbonila do DPPC. O primeiro pico de interação entre o O3 da quitosana e o O22 do DPPC (Figura 26A), está próximo de 0,35nm em 30 mg/mL e 0,45nm em 10 mg/mL. Isto possivelmente está ocorrendo devido há uma competição entre as interações N-O22, O3-O22 e O6-O22 em 30 mg/mL. De modo que, para 10 mg/mL e 30 mg/mL de quitosana, N-O22 e O6-O22 prevalecem sobre O3-O22. Ao contrário de 50 mg/mL, em que O3-O22 e O6-O22 prevalecem sobre N-O22, como se as hidroxilas direcionassem a interação. Entretanto,

quando o grupo  $\text{NH}_3^+$  ou NAc interage com a carbonila da cadeia sn1, que é mais interna, a interação O6-Ho6 – O12 fica desfavorecida, pois estes grupos estão em lados opostos do anel glicosídico da quitosana (Figura 25A e Figura 26D).

De acordo com o mecanismo proposto, sugere-se que inicialmente ocorre a aproximação da quitosana na membrana devido a interações eletrostáticas, no entanto, a mesma se mantém adsorvida através de um sinergismo entre as interações de Coulomb e de Ligação de Hidrogênio. A intensidade da interação diminui com o aumento da concentração e as alterações estruturais podem estar relacionadas com o aumento da quantidade de quitosana sobre a membrana, e da intensidade das interações diretas entre o grupo amino da quitosana e as carbonilas mais internas do lipídio.

## 6 Conclusões

Através das simulações realizadas foi possível sugerir um mecanismo de interação da quitosana com a membrana de DPPC. O aumento na concentração da quitosana induz mudanças estruturais expressivas na bicamada lipídica, caracterizadas por ondulações acentuadas, e reorganização das cabeças lipídicas, o que resulta na redução da área média por lipídio. A variação estrutural dos lipídios faz com que as cadeias alifáticas do DPPC estejam bem menos organizadas em relação ao eixo normal da membrana. Os movimentos translacionais dos lipídios no plano da membrana são fracamente alterados, pois os valores de difusão lateral dos lipídios são muito próximos independentemente da concentração.

O efeito, a intensidade e a importância das interações moleculares que possivelmente são responsáveis pela atividade biológica da quitosana foram avaliados com detalhes durante as simulações computacionais. Os resultados do número médio de ligações de hidrogênio entre a quitosana e o DPPC, sugerem que esta interação tem papel tão importante quanto às puramente eletrostáticas. Ao contrário do esperado, o grupamento  $\text{-NH}_3^+$ , interage preferencialmente com as carbonilas do lipídio, enquanto que as hidroxilas da quitosana interagem com o  $\text{-PO}_4^-$ . Desta forma, há uma interação por ligação de hidrogênio dos tipos  $\text{NH}_3^+ - \text{CO}$  e  $\text{OH} - \text{PO}_4^-$  para cada 3 resíduos de quitosana; uma do tipo  $\text{NH}_3^+ - \text{PO}_4^-$  para cada 4 resíduos; e uma  $\text{OH} - \text{CO}$  para cada 8 resíduos. A carbonila da cadeia sn2 interage mais efetivamente com a quitosana por estar mais próxima da superfície da membrana. Porém, interações específicas entre  $\text{NH}_3^+$  e a carbonila da cadeia sn1, bem como a interação direta  $\text{-NH}_3^+$  entre  $\text{-PO}_4^-$ , podem estar mais relacionadas com alterações mais proeminentes na estrutura da membrana. Apesar das hidroxilas e o grupo amino da quitosana terem comportamentos químicos diferentes frente sua interação com a membrana, seus modos de ação estão correlacionados. Deste modo, quando o grupo  $\text{NH}_3^+$  ou NAc interage com a carbonila da cadeia sn1, que é mais interna, a interação O6-Ho6 – O12 fica desfavorecida.

De maneira geral, o aumento na concentração de quitosana diminui sua interação efetiva com a membrana, pois passa a haver repulsão entre as cadeias da quitosana. Ainda que, continue havendo interações quitosana – quitosana por intermédio de moléculas de água. A repulsão entre as cargas positivas do polissacarídeo induziu outro tipo de interação na concentração de 50 mg/mL de quitosana. Nesta concentração, as interações através do resíduo de GlcNAc ocorrem com maior frequência que via GlcN, reduzindo os efeitos da quitosana na área por lipídio e no parâmetro de ordem dos mesmos. As interações intermoleculares não são

a única forma de ação da quitosana nos parâmetros estruturais da membrana. Parte do efeito de concentração na estrutura da membrana está relacionada com a área de ação da mesma, que aumenta proporcionalmente ao número de cadeias de quitosana sobre a membrana.

A água tem papel importante nos mecanismos de interação da quitosana com a membrana. A quitosana pode arrastar moléculas de água para regiões mais internas da membrana. Deste modo, a água pode agir como intermediária, através de ligações de hidrogênio, entre o grupo  $\text{-NH}_3^+$  e o  $\text{-PO}_4^-$  do DPPC, por exemplo. Na concentração de 10 mg/mL, a interação direta grupos N-acetil com o DPPC é levemente mais expressiva que as que ocorrem via  $\text{-NH}_3^+$ . E este efeito ocorre, pois a interação  $\text{-NH}_3^+$  é intermediada pela água.

Conclui-se que as simulações computacionais envolvendo a quitosana foram suficientes para a formulação de um mecanismo de ação que envolve o papel de algumas das possíveis interações específicas bem como os efeitos de concentração da quitosana. Espera-se que a proposta aqui apresentada possa servir para direcionar ações experimentais, bem como contribuir na construção da relação entre os mecanismos moleculares que envolvem a ação da quitosana em bicamadas lipídicas e sua bioatividade.

## 7 Referências Bibliográficas

- [1] CIARDELLI, G.; CHIONO, V. Materials for peripheral nerve regeneration. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 1, p. 13-26, 2006.
- [2] HEATH, C. A.; RUTKOWSKI, G. E. The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 163-168, 1998.
- [3] DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.
- [4] MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 167-182, 2009.
- [5] HIRANO, S.; IWATA, M.; YAMANAKA, K.; TANAKA, H.; TODA, T.; INUI, H. Enhancement of Serum Lysozyme Activity by Injecting a Mixture of Chitosan Oligosaccharides Intravenously in Rabbits. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 2623-2625, 1991.
- [6] VANDEVORD, P. J.; MATTHEW, H. W. T.; DESILVA, S. P.; MAYTON, L.; WU, B.; WOOLEY, P. H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 3, p. 585-590, 2002.
- [7] KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.
- [8] TIKHONOV, V. E.; STEPNOVA, E. A.; BABAK, V. G.; YAMSKOV, I. A.; PALMA-GUERRERO, J.; JANSSEN, H. B.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; SALINAS, J.; GERASIMENKO, D. V.; AVDIENKO, I. D.; VARLAMOV, V. P. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl-derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 66-72, 2006.
- [9] YUAN, Y.; ZHANG, P. Y.; YANG, Y. M.; WANG, X.; GU, X. S. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4273-4278, 2004.
- [10] TIAN, B. C.; LUO, Q. H.; SONG, S. S.; LIU, D. D.; PAN, H.; ZHANG, W. J.; HE, L.; MA, S. L.; YANG, X. G.; PAN, W. S. Novel surface-modified nanostructured lipid carriers with partially deacetylated water-soluble chitosan for efficient ocular delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 1040-1049, 2012.
- [11] ERMAN, A. Chitosan and its possible use in medicine. **Zdravniški Vestnik-Slovenian Medical Journal**, v. 80, n. 6, p. 489-498, 2011.
- [12] JAYAKUMAR, R.; CHENNAZHI, K. P.; MUZZARELLI, R. A. A.; TAMURA, H.; NAIR, S. V.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 1-8, 2010.

- [13] HUANG, Y. Z.; GAO, J. Q.; LANG, W. Q.; NAKAGAWA, S. Preparation and characterization of liposomes encapsulating chitosan nanoparticles. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 387-390, 2005.
- [14] DIEBOLD, Y.; JARRIN, M.; SAEZ, V.; CARVALHO, E. L. S.; OREA, M.; CALONGE, M.; SEIJO, B.; ALONSO, M. J. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). **Biomaterials**, v. 28, n. 8, p. 1553-1564, 2007.
- [15] PAVINATTO, A.; PAVINATTO, F. J.; BARROS-TIMMONS, A.; OLIVEIRA, O. N. Electrostatic Interactions Are Not Sufficient to Account for Chitosan Bioactivity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 1, p. 246-251, 2010.
- [16] MERTINS, O.; LIONZO, M. I. Z.; MICHELETTO, Y. M. S.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Chitosan effect on the mesophase behavior of phosphatidylcholine supramolecular systems. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 29, n. 2, p. 463-469, 2009.
- [17] TIERA, V. A. D.; WINNIK, F. M.; TIERA, M. J. Interaction of amphiphilic derivatives of chitosan with DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 100, n. 1, p. 309-313, 2010.
- [18] PAVINATTO, F. J.; PAVINATTO, A.; CASELI, L.; DOS SANTOS, D. S.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; OLIVEIRA, O. N. Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1633-1640, 2007.
- [19] HENRIKSEN, I.; SMISTAD, G.; KARLSEN, J. Interactions between Liposomes and Chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 101, n. 3, p. 227-236, 1994.
- [20] COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The Cell: A Molecular Approach**. ASM Press, 2007. ISBN 9780878932207.
- [21] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman, 2010. ISBN 9780716771081.
- [22] GAWRISCH, K. The dynamics of membrane lipids. In: YEAGLE, P. L. (Ed.). **The structure of biological membranes**. 2nd. Boca Raton-London-New York-Singapore: CRC Press, 2005. p.147-171.
- [23] PETTY, H. R. **Molecular Biology of Membranes**. Springer, 1993. ISBN 9780306444296.
- [24] VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 9780470570951.
- [25] LODISH, H.; BERK, A. **Molecular Cell Biology (Loose Leaf)**. W. H. Freeman, 2012. ISBN 9781464102325.

- [26] NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. **Biochemistry for the medical sciences**. Wiley, 1983. ISBN 9780471900580.
- [27] BOCKMANN, R. A.; HAC, A.; HEIMBURG, T.; GRUBMULLER, H. Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 3, p. 1647-1655, 2003.
- [28] PASTOR, R. W.; VENABLE, R. M.; KARPLUS, M. Model for the Structure of the Lipid Bilayer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 3, p. 892-896, 1991.
- [29] SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.
- [30] REISS-HUSSON, F.; LUZZATI, V. Phase transitions in lipids in relation to the structure of membranes. **Adv Biol Med Phys**, v. 11, p. 87-107, 1967.
- [31] ESSMANN, U.; BERKOWITZ, M. L. Dynamical properties of phospholipid bilayers from computer simulation. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 4, p. 2081-2089, 1999.
- [32] LINDAHL, E.; SANSOM, M. S. P. Membrane proteins: molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 4, p. 425-431, 2008.
- [33] YOO, J.; CUI, Q. Membrane-Mediated Protein-Protein Interactions and Connection to Elastic Models: A Coarse-Grained Simulation Analysis of Gramicidin A Association. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 1, p. 128-138, 2013.
- [34] MUZZARELLI, R. A. A. Natural Chelating Polymers. **Pergamon Press**, p. 83, 1973.
- [35] KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.
- [36] CUNHA, R. A.; SOARES, T. A.; RUSU, V. H.; PONTES, F. J. S.; FRANCA, E. F.; LINS, R. D. The Molecular Structure and Conformational Dynamics of Chitosan Polymers: An Integrated Perspective from Experiments and Computational Simulations. In: KARUNARATNE, D. N. (Ed.). **The Complex World of Polysaccharides**. InTech, 2012. cap. 9, ISBN 978-953-51-0819-1.
- [37] TOFFEY, A.; SAMARANAYAKE, G.; FRAZIER, C. E.; GLASSER, W. G. Chitin derivatives. I. Kinetics of the heat-induced conversion of chitosan to chitin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 60, n. 1, p. 75-85, 1996.
- [38] CHANG, K. L. B.; TSAI, G.; LEE, J.; FU, W.-R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Research**, v. 303, n. 3, p. 327-332, 1997.
- [39] CHO, Y. W.; JANG, J.; PARK, C. R.; KO, S. W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 609-614, 2000.



- [40] MUZZARELLI, R. A. A.; ROCCHETTI, R. Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by 1st Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, n. 6, p. 461-472, 1985.
- [41] WEI, Z.; WANG, C.; ZOU, S.; LIU, H.; TONG, Z. Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules. **Polymer**, v. 53, n. 6, p. 1229-1235, 2012.
- [42] HERNANDEZ-LAUZARDO, A. N.; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; GUERRA-SANCHEZ, M. G. Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 25, p. 4243-4247, 2011.
- [43] VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3596-3607, 2011.
- [44] WANG, Q. Z.; CHEN, X. G.; LIU, N.; WANG, S. X.; LIU, C. S.; MENG, X. H.; LIU, C. G. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 2, p. 194-201, 2006.
- [45] GUO, Z.; XING, R.; LIU, S.; ZHONG, Z.; JI, X.; WANG, L.; LI, P. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 694-697, 2008.
- [46] BAGHERI-KHOULENJANI, S.; TAGHIZADEH, S. M.; MIRZADEH, H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 773-778, 2009.
- [47] ABD-ELMOHDY, F. A.; EL SAYED, Z.; ESSAM, S.; HEBEISH, A. Controlling chitosan molecular weight via bio-chitosanolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 539-542, 2010.
- [48] MUZZARELLI, R. A. A.; SIPOS, L. Chitosan for the collection from seawater of naturally occurring zinc, cadmium, lead and copper. **Talanta**, v. 18, n. 9, p. 853-858, 1971.
- [49] MUZZARELLI, R. A.; ROCCHETT, R. Use of chitosan columns for removal of mercury from waters. **Journal of Chromatography**, v. 96, n. 1, p. 115-121, 1974.
- [50] SAKAGUCHI, T.; HORIKOSHI, T.; NAKAJIMA, A. Studies on the Accumulation of Heavy-Metal Elements in Biological-Systems: Adsorption of Uranium by Chitin Phosphate and Chitosan Phosphate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 2191-2195, 1981.
- [51] ZENG, D.; WU, J.; KENNEDY, J. F. Application of a chitosan flocculant to water treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 135-139, 2008.

- [52] CHATTERJEE, S.; LEE, M. W.; WOO, S. H. Adsorption of congo red by chitosan hydrogel beads impregnated with carbon nanotubes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1800-1806, 2010.
- [53] LU, L. C.; WANG, C. I.; SYE, W. F. Applications of chitosan beads and porous crab shell powder for the removal of 17 organochlorine pesticides (OCPs) in water solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1984-1989, 2011.
- [54] WAN NGAH, W. S.; TEONG, L. C.; HANAFIAH, M. A. K. M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1446-1456, 2011.
- [55] DA SILVA, R. B.; LIMA NETO, A. F.; SOARES DOS SANTOS, L. S.; DE OLIVEIRA LIMA, J. R.; CHAVES, M. H.; DOS SANTOS JR, J. R.; DE LIMA, G. M.; DE MOURA, E. M.; DE MOURA, C. V. R. Catalysts of Cu(II) and Co(II) ions adsorbed in chitosan used in transesterification of soy bean and babassu oils – A new route for biodiesel syntheses. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 6793-6798, 2008.
- [56] HOVEN, V. P.; TANGPASUTHADOL, V.; ANGKITPAIBOON, Y.; VALLAPA, N.; KIATKAMJORNWONG, S. Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 44-53, 2007.
- [57] ARAUJO, J. V.; LOPES-DA-SILVA, J. A.; ALMEIDA, M. M.; COSTA, M. E. V. Preparation and characterization of chitosan-based scaffolds for biomedical applications. **Advanced Materials Forum Iii, Pts 1 and 2**, v. 514-516, p. 1005-1009, 2006.
- [58] BLACKWEL, J. Structure of beta-chitin or parallel chain systems of poly-beta-(1-4)-N-acetyl-d-glucosamine. **Biopolymers**, v. 7, n. 3, p. 281-298, 1969.
- [59] BRUGNEROTTO, J.; DESBRIERES, J.; HEUX, L.; MAZEAU, K.; RINAUDO, M. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution. **Macromolecular Symposia**, v. 168, p. 1-20, 2001.
- [60] BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUELLES-MONAL, W.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.
- [61] GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. Refinement of Structure of Beta-Chitin. **Biopolymers**, v. 14, n. 8, p. 1581-1595, 1975.
- [62] RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
- [63] MOGILEVSKAYA, E. L.; AKOPOVA, T. A.; ZELENETSKII, A. N.; OZERIN, A. N. The crystal structure of chitin and chitosan. **Polymer Science Series A**, v. 48, n. 2, p. 116-123, 2006.

- [64] SUGIYAMA, J.; BOISSET, C.; HASHIMOTO, M.; WATANABE, T. Molecular directionality of beta-chitin biosynthesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 286, n. 1, p. 247-255, 1999.
- [65] FRANCA, E. F.; LINS, R. D.; FREITAS, L. C. G.; STRAATSMA, T. P. Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 12, p. 2141-2149, 2009.
- [66] OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, K. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1-2, p. 1-8, 2004.
- [67] OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; MIYAZAWA, T.; YUI, T.; OGAWA, K. Molecular and crystal structure of hydrated chitosan. **Macromolecules**, v. 30, n. 19, p. 5849-5855, 1997.
- [68] FRANCA, E. F.; LEITE, F. L.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, O. N.; FREITAS, L. C. G. Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 19, p. 8894-8899, 2011.
- [69] KAWAHARA, M.; YUI, T.; OKA, K.; ZUGENMAIER, P.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S.; OKUYAMA, K.; OGAWA, K. Fourth 3D structure of the chitosan molecule: Conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 7, p. 1545-1550, 2003.
- [70] FRANCA, E. F.; LINS, R. D.; FREITAS, L. C. G. Chitosan Molecular Structure as a Function of N-Acetylation. **Biopolymers**, v. 95, n. 7, p. 448-460, 2011.
- [71] SKOVSTRUP, S.; HANSEN, S. G.; SKRYDSTRUP, T.; SCHIOTT, B. Conformational Flexibility of Chitosan: A Molecular Modeling Study. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 3196-3207, 2010.
- [72] FRANCA, E. F.; LINS, R. D.; FREITAS, L. C. G. Molecular structure of chitosan nanoparticles in solution. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 237, p. 752-752, 2009.
- [73] FADDA, E.; WOODS, R. J. Molecular simulations of carbohydrates and protein-carbohydrate interactions: motivation, issues and prospects. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 15-16, p. 596-609, 2010.
- [74] RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- [75] KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.
- [76] KRAJEWSKA, B.; WYDRO, P.; JANCZYK, A. Probing the Modes of Antibacterial Activity of Chitosan. Effects of pH and Molecular Weight on Chitosan Interactions

- with Membrane Lipids in Langmuir Films. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4144-4152, 2011.
- [77] MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. **Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use**, v. 186, p. 151-209, 2005.
  - [78] MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3829-3835, 2004.
  - [79] KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.
  - [80] HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: Effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 344-353, 2004.
  - [81] XIA, W. S.; LIU, P.; ZHANG, J. L.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 170-179, 2011.
  - [82] KNORR, D. Dye Binding-Properties of Chitin and Chitosan. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 1, p. 36-37, 1983.
  - [83] MAGHAMI, G. G.; ROBERTS, G. A. F. Studies on the Adsorption of Anionic Dyes on Chitosan. **Makromol. Chem.**, v. 189, n. 10, p. 2239-2243, 1988.
  - [84] CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2806-2814, 2008.
  - [85] LIU, H.; DU, Y. M.; WANG, X. H.; SUN, L. P. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 147-155, 2004.
  - [86] PALMA-GUERRERO, J.; HUANG, I. C.; JANSSEN, H. B.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; READ, N. D. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 8, p. 585-594, 2009.
  - [87] KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; CZERWICKA, M.; KACZYŃSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials on Their Biomedical Activity. In: LASKOVSKI, A. (Ed.). **Biomedical Engineering, Trends in Materials Science: InTech**, 2011. cap. 2, ISBN 978-953-307-513-6.
  - [88] BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 4, p. 438-443, 1999.

- [89] PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; OLIVEIRA, O. N. Chitosan in Nanostructured Thin Films. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 8, p. 1897-1908, 2010.
- [90] MERTINS, O.; SCHNEIDER, P. H.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Interaction between phospholipids bilayer and chitosan in liposomes investigated by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 294-299, 2010.
- [91] PALMA-GUERRERO, J.; LOPEZ-JIMENEZ, J. A.; PEREZ-BERNA, A. J.; HUANG, I. C.; JANSSEN, H. B.; SALINAS, J.; VILLALAIN, J.; READ, N. D.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1021-1032, 2010.
- [92] VAN GUNSTEREN, W. F.; BAKOWIES, D.; BARON, R.; CHANDRASEKHAR, I.; CHRISTEN, M.; DAURA, X.; GEE, P.; GEERKE, D. P.; GLATTLI, A.; HUNENBERGER, P. H.; KASTENHOLZ, M. A.; OSTENBRINK, C.; SCHENK, M.; TRZESNIAK, D.; VAN DER VEGT, N. F. A. Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 25, p. 4064-4092, 2006.
- [93] PEREZ, A.; LUQUE, F. J.; OROZCO, M. Frontiers in Molecular Dynamics Simulations of DNA. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 2, p. 196-205, 2012.
- [94] CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ, K. M.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. A 2nd Generation Force-Field for the Simulation of Proteins, Nucleic-Acids, and Organic-Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 19, p. 5179-5197, 1995.
- [95] LEACH, A. R. **Molecular Modelling. Principles and Applications**. 2nd. Addison Wesley Longman Limited, 2001.
- [96] VERLET, L. Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98-&, 1967.
- [97] HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications. In: ALDER, B.; FERNBACH, S., *et al* (Ed.). **Methods in Computational Physics**. New York/London: Academic Press, v.9, 1970.
- [98] BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269-6271, 1987.
- [99] BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. **Intermolecular Forces**, p. 331-342, 1981.
- [100] FERGUSON, D. M. Parameterization and Evaluation of a Flexible Water Model. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 501-511, 1995.

- [101] LAWRENCE, C. P.; SKINNER, J. L. Flexible TIP4P model for molecular dynamics simulation of liquid water. **Chemical Physics Letters**, v. 372, n. 5-6, p. 842-847, 2003.
- [102] MARK, P.; NILSSON, L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954-9960, 2001.
- [103] VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.
- [104] RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of *n*-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, p. 327-341., 1977.
- [105] ANDERSEN, H. C. Rattle - a Velocity Version of the Shake Algorithm for Molecular-Dynamics Calculations. **Journal of Computational Physics**, v. 52, n. 1, p. 24-34, 1983.
- [106] HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.
- [107] HINCHLIFFE, A. **Molecular Modelling for Beginners**. John Wiley & Sons, 2003. ISBN 9780470843109.
- [108] TIRONI, I. G.; SPERB, R.; SMITH, P. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A Generalized Reaction Field Method for Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Physics**, v. 102, n. 13, p. 5451-5459, 1995.
- [109] ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L.; DARDEN, T.; LEE, H.; PEDERSEN, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. **Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577-8593, 1995.
- [110] LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.
- [111] KUKOL, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 3, p. 615-626, 2009.
- [112] HESS, B. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 237, 2009.

- [113] LINS, R. D.; HUNENBERGER, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 13, p. 1400-1412, 2005.
- [114] BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 2007.
- [115] VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer-Simulation of Molecular-Dynamics - Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 29, n. 9, p. 992-1023, 1990.
- [116] LUZAR, A.; CHANDLER, D. Hydrogen-bond kinetics in liquid water. **Nature**, v. 379, n. 6560, p. 55-57, 1996.
- [117] VAN DER SPOEL, D.; VAN MAAREN, P. J.; LARSSON, P.; TIMNEANU, N. Thermodynamics of hydrogen bonding in hydrophilic and hydrophobic media. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 9, p. 4393-4398, 2006.
- [118] BARLETTE, V. E.; FREITAS, L. C. G. Statistical thermodynamics of liquids using the Monte Carlo method. I. Methodology. **Quimica Nova**, v. 22, n. 2, p. 254-262, 1999.
- [119] HOCKNEY, R. W.; EASTWOOD, J. W. **Computer Simulation Using Particles**. A. Hilger, 1988. ISBN 9780852743928.
- [120] ANEZO, C.; DE VRIES, A. H.; HOLTJE, H. D.; TIELEMAN, D. P.; MARRINK, S. J. Methodological issues in lipid bilayer simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 35, p. 9424-9433, 2003.
- [121] LINDAHL, E.; EDHOLM, O. Molecular dynamics simulation of NMR relaxation rates and slow dynamics in lipid bilayers. **Journal of Chemical Physics**, v. 115, n. 10, p. 4938-4950, 2001.
- [122] DOULIEZ, J. P.; LEONARD, A.; DUFOURC, E. J. Restatement of Order Parameters in Biomembranes - Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings. **Biophysical Journal**, v. 68, n. 5, p. 1727-1739, 1995.
- [123] CHAU, P. L.; HARDWICK, A. J. A new order parameter for tetrahedral configurations. **Molecular Physics**, v. 93, n. 3, p. 511-518, 1998.
- [124] FORREST, L. R.; SANSOM, M. S. P. Membrane simulations: bigger and better? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, n. 2, p. 174-181, 2000.
- [125] CHANDRASEKHAR, I.; KASTENHOLZ, M.; LINS, R. D.; OOSTENBRINK, C.; SCHULER, L. D.; TIELEMAN, D. P.; VAN GUNSTEREN, W. F. A consistent potential energy parameter set for lipids: dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 force field. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 32, n. 1, p. 67-77, 2003.

- [126] BENZ, R. W.; CASTRO-ROMAN, F.; TOBIAS, D. J.; WHITE, S. H. Experimental validation of molecular dynamics simulations of lipid bilayers: A new approach. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 2, p. 805-817, 2005.
- [127] NAGLE, J. F.; TRISTRAM-NAGLE, S. Structure of lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 3, p. 159-195, 2000.
- [128] KUCERKA, N.; TRISTRAM-NAGLE, S.; NAGLE, J. F. Closer look at structure of fully hydrated fluid phase DPPC bilayers. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 11, p. L83-L85, 2006.
- [129] PETRACHE, H. I.; DODD, S. W.; BROWN, M. F. Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by H-2 NMR spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 6, p. 3172-3192, 2000.
- [130] PANDEY, P. R.; ROY, S. Headgroup Mediated Water Insertion into the DPPC Bilayer: A Molecular Dynamics Study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 12, p. 3155-3163, 2011.
- [131] KUO, A. L.; WADE, C. G. Lipid Lateral Diffusion by Pulsed Nuclear Magnetic-Resonance. **Biochemistry**, v. 18, n. 11, p. 2300-2308, 1979.