

## 5 Metodologia Utilizada no Trabalho

### 5.1 Modelagem das Moléculas

#### 5.1.1 Dendrímeros

Foram simuladas estruturas da geração 0 (G0) até a geração 4 (G4) para três estados de protonação, foram construídas através do programa Hyperchem(HyperChem(TM) Professional). Para o pH básico ( $\text{pH} > 12$ ), as aminas primárias e terciárias não foram protonadas. Quando consideramos o pH neutro ( $\text{pH} \sim 7$ ) as aminas primárias estão protonadas e terciárias não são protonadas. Para o caso do pH ácido ambas as aminas são protonadas ( $\text{pH} \sim 5$ ), conforme a Tabela 3, onde são apresentadas as gerações 0 dos três estados de protonação. A figura 22 representa as gerações de dendrímeros 0 até 4, para o pH neutro.

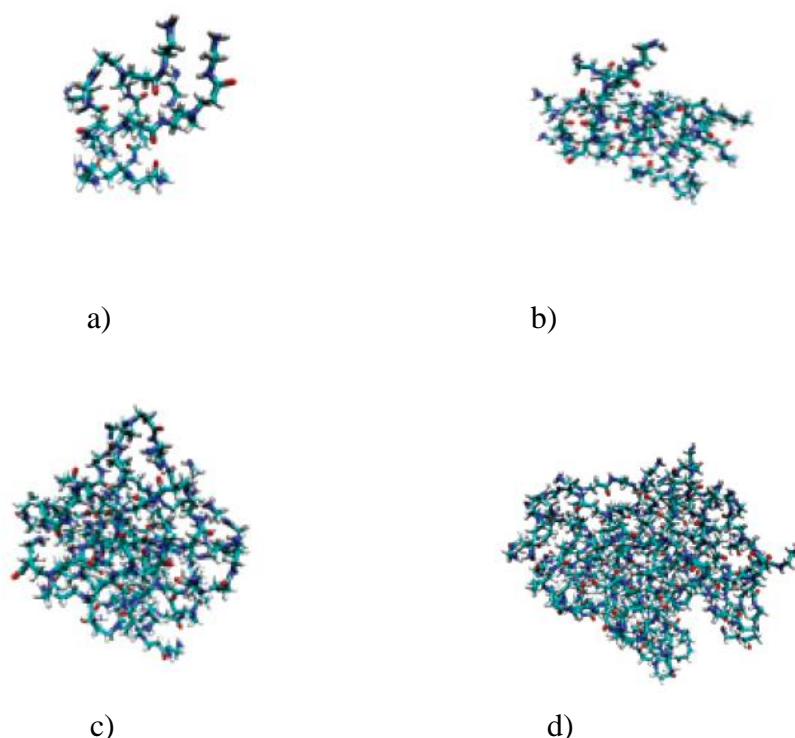


Figura 22: Dendrímeros PAMAM geração 1 a 4.

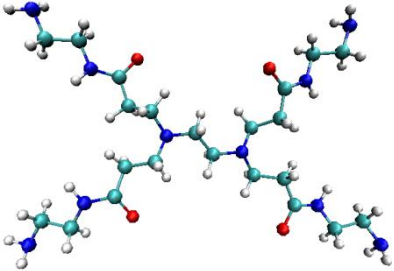
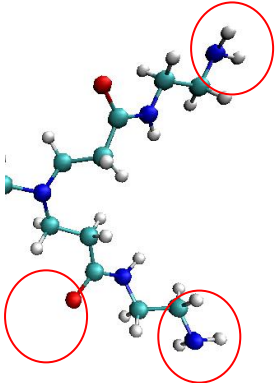
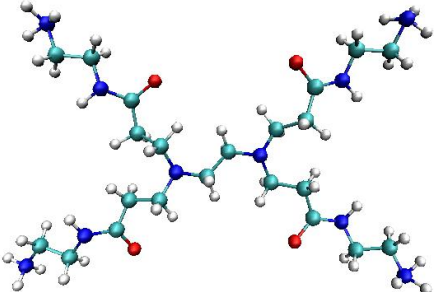
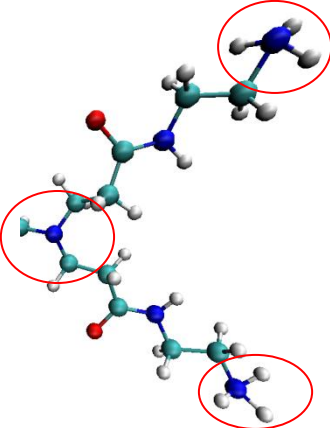
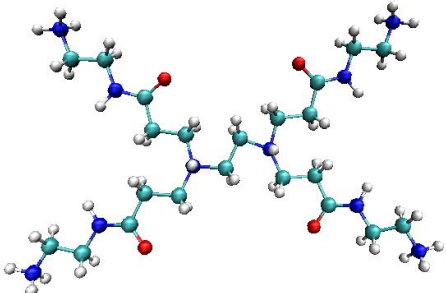
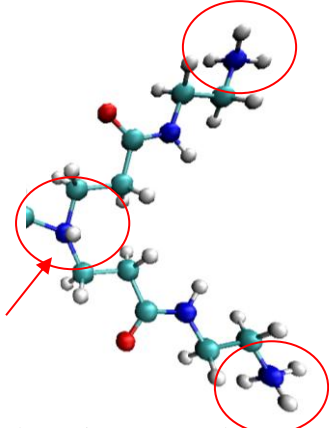
Estrutura de Geração 0	Protonação	pH
	 <p data-bbox="831 663 1082 689">Aminas não protonadas</p>	Básico
	 <p data-bbox="778 1167 1098 1193">Aminas primárias protonadas</p>	Neutro
	 <p data-bbox="778 1671 1050 1697">Todas aminas protonadas</p>	Ácido

Tabela 3: Estruturas dos dendrímeros PAMAM.

A Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6 mostram a quantidade de átomos por geração, bem como as suas respectivas cargas.

Gerações ( pH básico)	Número de átomos	Cargas
0	84	0
1	228	0
2	516	0
3	1092	0
4	2244	0

Tabela 4: Número de átomos e cargas por geração do dendrímero G0 até G4.

Gerações ( pH neutro)	Número de átomos	Cargas
0	88	+4
1	248	+8
2	568	+16
3	1124	+32
4	2308	+64

Tabela 5: Número de átomos e cargas por geração do dendrímero G0 até G4.

Gerações ( pH ácido)	Número de átomos	Cargas
0	90	+6
1	242	+14
2	546	+30
3	1154	+62
4	2370	+126

Tabela 6: Número de átomos e cargas por geração do dendrímero G0 até G4.

### 5.1.2 Rifampicina

O primeiro objetivo deste trabalho foi investigar a conformação tridimensional de dendrímeros PAMAM que os tornam promissores

transportadores de rifampicina, um dos principais fármacos para o tratamento da tuberculose.

Em um segundo objetivo, foi otimizada a estrutura da rifampicina e realizada sua inserção nos modelos de dendrímeros para avaliar sua capacidade de transporte. A inserção foi feita através de um algoritmo desenvolvido neste trabalho que permite reduzir o tempo de simulação por dinâmica molecular.

A molécula de rifampicina foi obtida do banco de dados de drogas (DRUG BANK, 2012). Este fármaco foi escolhido por ser o medicamento de primeira linha no tratamento da tuberculose inibindo a atividade da RNA polimerase nas células bacterianas, mas não interferindo nas células de mamíferos. 89% do medicamento liga-se às proteínas alvo. A molécula de rifampicina possui 117 átomos na sua conformação não protonada. Resultados obtidos em nosso grupo mostram que os dendrímeros podem transportar até 20 moléculas experimentalmente. A figura 23 mostra o modelo otimizado de rifampicina, onde os pontos em amarelo são os ângulos de torção.

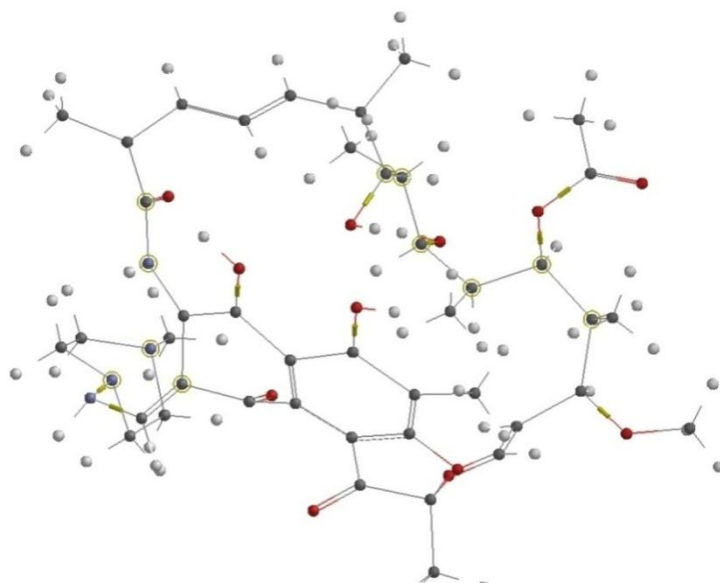


Figura 23: Molécula de Rifampicina, onde os ângulos flexíveis estão em amarelo.

## 5.2. Dinâmica Molecular dos Dendrímeros

A dinâmica molecular foi realizada em duas etapas, a primeira denominada fase de equilíbrio, onde ocorre uma relaxação das moléculas do solvente em torno da estrutura. A segunda fase é denominada fase de produção, onde após a

estrutura entrar em equilíbrio são medidas as propriedades termodinâmicas de interesse. O custo computacional associado à simulação é demonstrado na Tabela 7. Os computadores utilizaram 100% de consumo dos 4 processadores durante todo o tempo de simulação, sendo que os computadores que dispomos simulam em média 1ns por dia.

Protonação	Tempo Total	Proc	Consumo	Clock	Número átomos
Básico	58ns	4	100%	2.66	106458
Neutro	58ns	4	100%	2.66	106088
Ácido	58ns	4	100%	2.66	106030

Tabela 7: Tabela do custo computacional das simulações. Onde Tempo Total denota o tempo de simulação da fase de equilíbrio mais a fase de produção, em nanossegundos. Proc é o número de processadores. Consumo determina o consumo de CPU durante o tempo de simulação. Clock (Mhz) é o número de operações realizadas por segundo.

### 5.3

#### Campo de Força Utilizado

O campo de força utilizado para a modelagem dos dendrímeros foi o OPLS-AA (all atoms force field) que foi parametrizado para diversos tipos de sistemas químicos. Estes sistemas incluem pequenas moléculas, peptídeos e dendrímeros (Roberts et al., 2009), (Peng et al., 2005). O campo de força é descrito pelas equações 1.41, 1.42, 1.43. A energia potencial total é descrita como no capítulo de modelagem computacional. Este campo possui apenas algumas modificações para uma melhor avaliação da energia potencial.

$$V = \sum_{\text{Ligações}} K_b (b - b_0)^2 \quad (36)$$

$$V_s = \sum_{\text{Ligações}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (37)$$

A equação 36 e 37 descreve as contribuições de estiramento angular e de comprimento de ligação do OPLS-AA.

A contribuição dos ângulos diedrais é descrita como na equação 1.42.

$$V = \sum_{\text{Diedrais}} \frac{V_1}{2} (1 + \cos\varphi) + \frac{V_2}{2} (1 + \cos 2\varphi) + \frac{V_3}{2} (1 + \cos 3\varphi) \quad (38)$$

As contribuições de energia potencial dos átomos não ligados são dadas pelas contribuições do potencial de Lennard Jones e forças eletrostáticas.

$$V = \sum_{ij} \left\{ \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{S_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{S_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right\} f_{ij} \quad (39)$$

A função  $f_{ij}$  é um fator de ponderação para as interações.  $4\epsilon_{ij}$  é a profundidade do poço de energia potencial, e  $S_{ij}$  são os parâmetros de Lennard Jones.

## 5.4

### Carga dos Dendrímeros e Rifampicina

O método de Mulliken foi utilizado para o cálculo das cargas dos dendrímeros e da rifampicina, através do método de DFT(b3lyp) com a base 3-21G, utilizando o programa Gaussian (Frisch et al., 2003). Primeiro, toma-se uma estrutura de geração 2, onde são calculadas as cargas e em seguida expande-se as cargas destes braços para os demais, das gerações subsequentes, de tal forma que os braços mais externos da G2, correspondam aos braços mais externos da G3 e G4.

Após o cálculo de cargas é necessário montar um arquivo de topologia onde são descritos todos os parâmetros do campo de força OPLS-AA. Para criar este arquivo foi utilizado um programa denominado MKTOP, desenvolvido pelo labmol/UFRJ (Ribeiro et al., 2008).

## 5.5

### Inserção do Sistema em Solvente

Após a determinação das estruturas G4 dos dendrímeros, estas foram inseridas em uma caixa cúbica. Foram consideradas distâncias nas três direções (x,y,z) de 1nm entre o dendrímero e a periferia da caixa. Na estrutura com todas as aminas desprotonadas pH básico (pH > 12), o sistema já se encontrava neutralizado, não havendo necessidade da inserção de íons. Para o caso do pH neutro (pH em torno de 7) foram inseridos 64 íons de cloro para a neutralização do sistema. Quando o estado considerado foi o pH ácido (pH < 7) foram inseridos 126 íons de cloro para a neutralização do sistema. A Tabela 8 mostra as propriedades dos três estados de protonação para a geração G4. O modelo de água

SPC (Berendsen et al., 1981), como descrito na metodologia, foi utilizado para a inserção de solvente no sistema.

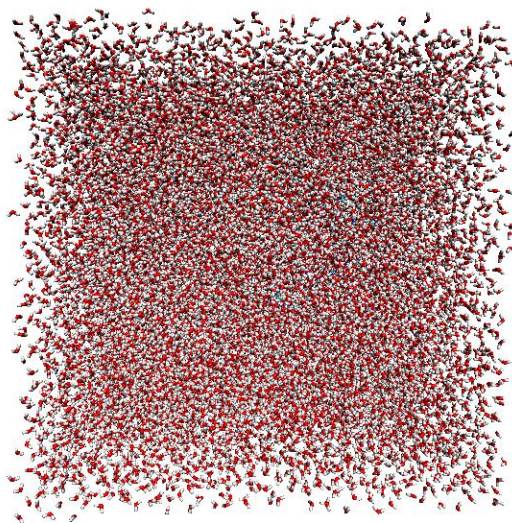


Figura 24: Caixa de Simulação Utilizada.

#### Propriedades dos Sistemas

Protonação	N <sup>o</sup> Átomos	Cargas	Íons	Água	Total Átomos
<b>Básico</b>	2244	0	0	34738	106458
<b>Neutro</b>	2308	64	64	34572	106088
<b>Ácido</b>	2370	126	126	34511	106030

Tabela 8: Propriedades dos sistemas a serem simulados. Onde protonação determina o estado de protonação dos sistemas para os dendrímeros da geração 4 (G4).

## 5.6 Otimização

Após a inserção dos dendrímeros na caixa de água, estes sistemas foram otimizados. Foram executados então 100.000 passos do algoritmo *steepest descent*, seguidos de 100.000 passos do algoritmo gradiente conjugado. Esta metodologia foi utilizada devido ao fato do *steepest descent* tender a ficar retido em mínimos locais. Utilizando-se então o gradiente conjugado pode-se tentar encontrar um ponto de mínimo mais satisfatório. O método utilizado para o cálculo do potencial eletrostático em sistemas periódicos foi o PME (particle mesh Edwald), onde o raio de Coulomb usado foi de 0.1 nm.

## 5.7 Dinâmica Molecular dos Dendrímeros

O programa utilizado para realizar as dinâmicas moleculares foi o Gromacs (Lindahl et al., 2001). O tratamento eletrostático utilizado foi o PME (Essmann et al., 1995). Os raios de corte foram de 1,0 e 1,4 nm, para o potencial eletrostático e de Lennard-jones, respectivamente. Foram aplicadas condições periódicas de contorno. O modelo de água utilizado foi o SPC (Berendsen et al., 1981). O acoplamento de Berendsen foi utilizado para manter a temperatura a 310K e pressão a 1atm (Berendsen, 1984). O algoritmo LINCS(Hess, 2008) foi utilizado para restringir os comprimentos de ligações covalentes durante a dinâmica. O tamanho da caixa utilizado foi de 1x1x1nm, entre o soluto e as bordas da caixa.

### 1) Fase de equilíbrio

Para evitarmos distorções na molécula durante a dinâmica na fase de equilíbrio, foram impostas restrições aos átomos pesados da estrutura. Foi desenvolvido um programa que procura na estrutura os átomos pesados e impõe a estes uma força ( $1000\text{KJ}/\text{nm}^2$ ) para que estes se tornem fixos durante a fase de equilíbrio. Estes átomos permanecem em sua posição inicial enquanto o solvente é relaxado em torno da estrutura. Durante a fase de equilíbrio podem ocorrer movimentos indesejados, o que ocorre devido a erros de integração numérica ou por aquecimento do sistema. Por estes motivos são necessários algoritmos de controle de temperatura e pressão, que mantêm estas na medida desejada. Foram usados os algoritmos de Berendsen (Berendsen et al., 1981), para acoplamento de temperatura e pressão, o que manteve estas a 310K e 1atm respectivamente. Esta dinâmica foi executada até que o sistema entre em estado de equilíbrio, onde foram medidas propriedades de interesse, como RMSD, energia total, energia cinética.

### 2) Fase de Produção

Nesta fase os dendrímeros não sofrem restrições impostas e podem se movimentar livremente durante a dinâmica dentro da caixa. Nesta fase, a temperatura e pressão foram monitoradas. Os algoritmos usados são os mesmos da fase de equilíbrio. Como esta dinâmica não possui restrições de posições para os átomos e pelo fato de o sistema ser altamente flexível é necessário um tempo



de dinâmica maior (44ns) até o sistema atingir o equilíbrio onde as propriedades são medidas. O passo de integração usado foi de (0,002 ps).

## 5.8

### Medidas das Propriedades

Algumas medidas foram tomadas para a verificação do estado de equilíbrio das estruturas. Para medir a compactação espacial da estrutura, foi utilizado o raio de giro, como mostra a equação 40.

$$R_G(t_1, t_2) = \left( \frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (40)$$

Onde temos a massa  $m_i$  do átomo  $i$  e  $r_i$  é a posição do átomo  $i$  em relação ao centro de massa do dendrímero.

Outra medida utilizada foi o RMSD (Root Mean Square Deviation) (Spoel et al., 2006) que calcula a diferença entre as posições iniciais com as coordenadas atualmente observadas.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad (41)$$

Onde  $N$  é o número de átomos do sistema em questão,  $(x,y,z)$  são as coordenadas espaciais do sistema e  $i$  e  $j$  são dois átomos do sistema em questão. Além destas medidas foram realizadas médias de energia total, energia cinética e superfície acessível ao solvente.

## 5.9

### Construção do Algoritmo de Acoplamento

As dinâmicas moleculares realizadas neste trabalho demandaram um grande custo computacional, sendo simulados 58 ns para cada estado de protonação. Além destas simulações foram realizados mais 56 ns para o estudo de liberação e 56 ns para encapsulamento, o que fez com que o tempo total sem contar as otimizações, perfizesse 114 dias de simulações ininterruptas para cada estado de protonação.

pH	Nanossegundo	Nano/dia	Total dias
Básico	114	1	114
Neutro	114	1	114
Ácido	114	1	114

Tabela 9: Tempo total de simulação dos sistemas. Onde Nanossegundo denota o tempo total da simulação, Nano/dia a quantidade a cada dia e Total dias o número total de dias para simular os sistemas.

As moléculas do dendrímero G4 são capazes de transportar até 20 moléculas de rifampicina experimentalmente, como observadas pelo grupo do laboratório Dendriquim, observação que usamos para validar nosso modelo e algoritmo, quanto a reproduzir o que foi observado experimentalmente e assim esclarecer as bases moleculares que permitem este transporte e observar as suas interações moleculares não previstas experimentalmente.

A inserção das moléculas de rifampicina foi de difícil realização devido a termos 2340 átomos das moléculas de rifampicina a serem inseridas dentro de um dendrímero com apenas 2370 átomos. Este fato tornou o acoplamento nas cavidades de difícil solução devido às colisões atômicas, que precisaram ser tratadas pelo algoritmo, de modo a evitar que o sistema tenha átomos com valências erradas, o que acarretaria erros na dinâmica molecular, gerando erros nos resultados ou a “explosão” do sistema.

Os atuais algoritmos de otimização utilizados em dinâmicas moleculares não possuem capacidade de corrigir erros de valência por não poder quebrar ligações através de cálculos clássicos.

No momento não existem algoritmos para este tipo de acoplamento, sendo que as moléculas são inseridas nestes transportadores aleatoriamente por algoritmos de química computacional, o que leva muitas vezes, a estruturas que não estão no mínimo de energia, aumentando o tempo de otimização e de dinâmica molecular. O trabalho realizado por (Karatasos et al., 2009), utilizou uma distribuição esférica aleatória de moléculas de ibuprofeno dentro da estruturas do dendrímero, o que não garante estruturas mais estáveis para dinâmica.

O algoritmo construído neste trabalho acopla as estruturas de rifampicina dentro do dendrímero, sem colisões atômicas e, além disto, tem como resultado

final o complexo mais estável (dendrímero + 20 rifampicinas), o que contribui para uma grande redução do tempo de simulação para a obtenção dos resultados.

A inserção aleatória de moléculas na caixa de simulação deverá conter um maior número de moléculas de solvente, aumentando o custo computacional. A Tabela 10, mostra a diferença de tempo de computação entre a simulação de moléculas aleatórias e inseridas com o algoritmo na fase de produção.

Aleatoriamente na caixa	Acopladas com Algoritmo
15 dias e 21 horas	3 dias e 13 horas

Tabela 10: Tempos de dinâmicas moleculares comparadas. Moléculas inseridas aleatoriamente dentro da caixa contra moléculas acopladas com o algoritmo.

### 5.9.1

#### Algoritmo 1

O algoritmo construído neste trabalho insere 20 moléculas de rifampicina dentro do dendrímero, onde estas moléculas têm total flexibilidade de movimento. O receptor permanece rígido, mas são usadas conformações diferentes. Devido ao caráter estocástico do algoritmo este foi executado 500 vezes. A saída é a estrutura mais estável avaliada através de um campo de força. Os passos do algoritmo estão listados a seguir.

#### 1. Inserção das moléculas

Dado  $X \in R^3$ , com  $r > 0$ , têm-se as moléculas geradas na bola fechada pelo conjunto da equação 42.

$$y \in R^3: \|X - Y\| \leq r \quad (42)$$

Onde  $r$  é o raio máximo estipulado para que as moléculas sejam geradas, dentro dos limites do dendrímero. Após a inserção de cada molécula de rifampicina, estas sofrem rotações de corpo rígido, isto é, rotações aleatórias no intervalo  $[0^0, 360^0]$ , seguindo uma matriz de rotação através de ângulos de Euler. Estes ângulos  $(\alpha, \beta, \gamma)$  de Euler são gerados aleatoriamente como mostrado no item 2.

#### 2. Rotação de Corpo Rígido

Dada uma base canônica de  $\mathbb{R}^3$   $E = \{e_1, e_2, e_3\}$  e  $F = \{f_1, f_2, f_3\}$  uma base ortonormal. A mudança de base pode ser definida por  $T: \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}^3$   $T(e_i) = f_i$ . Isto é, dadas as coordenadas  $(x, y, z)$  de um sistema, então suas novas coordenadas serão  $(x', y', z')$  dadas por três matrizes de rotação  $R_x, R_y, R_z$ , que são as matrizes de rotação em torno do eixo  $x, y$  e  $z$  respectivamente.

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\alpha & -\sin\alpha \\ 0 & \sin\alpha & \cos\alpha \end{bmatrix} = R_x \quad (43)$$

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \cos\beta & 0 & \sin\beta \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & \cos\beta \end{bmatrix} = R_y \quad (44)$$

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \cos\gamma & -\sin\gamma & 0 \\ \sin\gamma & \cos\gamma & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} = R_z \quad (44)$$

Podemos multiplicar estas matrizes, permitindo assim rotações da molécula em três dimensões.

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\beta\cos\gamma & \cos\gamma\sin\alpha\sin\beta - \cos\alpha\sin\gamma & \cos\alpha\cos\gamma\sin\beta + \sin\alpha\sin\gamma \\ \cos\beta\sin\gamma & \cos\alpha\cos\gamma + \sin\alpha\sin\beta\sin\gamma & -\cos\gamma\sin\alpha + \cos\alpha\sin\beta\sin\gamma \\ -\sin\beta & \cos\beta\sin\alpha & \cos\alpha\cos\beta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix} = \quad (45)$$

Portanto esta matriz define as rotações do algoritmo em três dimensões.

### 3. Flexibilidade das moléculas de rifampicina

Os ângulos flexíveis que sofrem rotação são os ângulos da cadeia lateral da molécula. Na figura esta representada uma das rotações da molécula de rifampicina que o algoritmo executa para dota-lá de total flexibilidade.

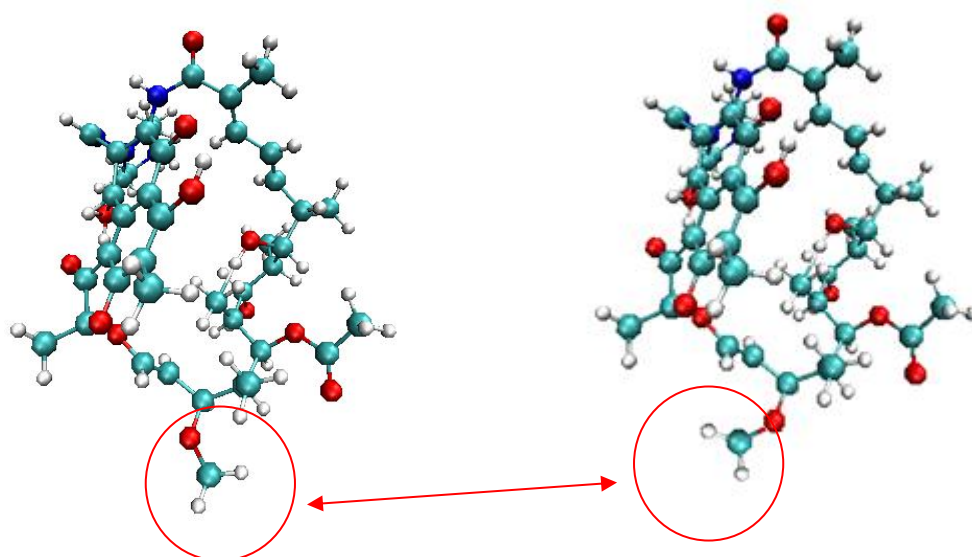


Figura 25: Rotações da cadeia lateral da rifampicina.

O algoritmo executa o seguinte procedimento: Seja  $V=\{a_i, \dots, a_n\}$  um conjunto de átomos da cadeia lateral. Então uma transformação que leva  $a_i$  para a origem é dada por

$$T: \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}^3: T(a_i) = 0. \text{ (Leva } a_i \text{ para origem)}$$

$$T(a_i) = a_i - a_1 \text{ (Todos os átomos são transladados para origem)}$$

$$T(R_{x,y,z}) = \{a_i\} \text{ onde } i = 2, \dots, n \text{ (Rotaciona a cadeia lateral)}$$

Onde  $R_{x,y,z}$  representa a matriz de rotação em torno da origem dada por:

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \cos\beta\cos\gamma & \cos\gamma\sin\alpha\sin\beta - \cos\alpha\sin\gamma & \cos\alpha\cos\gamma\sin\beta + \sin\alpha\sin\gamma \\ \cos\beta\sin\gamma & \cos\alpha\cos\gamma + \sin\alpha\sin\beta\sin\gamma & -\cos\gamma\sin\alpha + \cos\alpha\sin\beta\sin\gamma \\ -\sin\beta & \cos\beta\sin\alpha & \cos\alpha\cos\beta \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{bmatrix} = \quad (46)$$

#### 4. Avaliação do complexo

Após as moléculas serem inseridas e rotacionadas no dendrímero, o complexo de inclusão é avaliado. Pelo fato da característica estocástica do algoritmo, este é executado 500 vezes, e em cada uma destas execuções o complexo formado é avaliado. Ao final o complexo encontrado de menor energia

potencial, isto é, o mais estável é usado como estrutura inicial para a dinâmica molecular do complexo.

Os complexos formados são avaliados através do campo de força de energia potencial Dreiding (Mayo et al., 1990), (Hinchliffe, 2003) que foi utilizado como uma função no programa aqui desenvolvido, e está no programa Gaussian (Farkas et al., 1999). O campo de força Dreiding é parametrizado para todos os tipos de átomos mais utilizados para sistemas biológicos, moléculas orgânicas e inorgânicas. A expressão seguinte mostra como o Dreiding calcula as suas contribuições energéticas, para uma descrição mais apurada ver a seção campo de força.

$$E = E_B + E_A + E_T + E_I + E_Q + E_{vdw} + E_{HB} \quad (47)$$

Onde  $E_B$  é a energia necessária para comprimir ou alongar uma ligação,  $E_A$  é a contribuição na energia potencial que representa as ligações angulares,  $E_T$  e  $E_I$  são as contribuições relacionadas aos ângulos Diedrais.  $E_{vdw}$  é a contribuição de van der Waals para a energia,  $E_Q$  são as contribuições eletrostáticas e  $E_{HB}$  a contribuição de ligações de hidrogênio explícitas. Este campo avalia então as interações que ocorrem entre as moléculas.

### 5.9.2 Algoritmo 2

Devido ao alto custo de acoplar muitas moléculas nas cavidades dos dendrímeros, foi desenvolvido um segundo algoritmo que após certo número de execuções gera todas as moléculas próximas aos pontos de mínimo encontrados, integrando uma inteligência de busca no algoritmo. Este procedimento faz com que possam ser explorados de maneira satisfatória os mínimos na superfície de energia e também tem o objetivo de reduzir o tempo de execução por gerar as moléculas somente em posições próximas aos ótimos de energia, tornando assim o algoritmo mais robusto em encontrar os pontos de mínimos. O algoritmo segue dois procedimentos cada vez que é executado.

1) Gera as moléculas aleatoriamente no espaço de busca, que são então rotacionadas e têm sua energia calculada como no algoritmo anterior. Após um determinado número de execuções, as energias  $E$  são ordenadas e inseridas em um vetor.

$$E = \begin{bmatrix} E_1 \\ \dots \\ E_n \end{bmatrix} \quad (48)$$

Tal que  $E_1 < \dots < E_n$ , com  $n$  sendo o número de execuções do algoritmo. São então selecionadas certo número de energias igual ao número de moléculas geradas. Estas energias que estão relacionadas aos pontos onde uma determinada molécula foi gerada, determinam os novos locais onde as moléculas da rifampicina serão geradas.

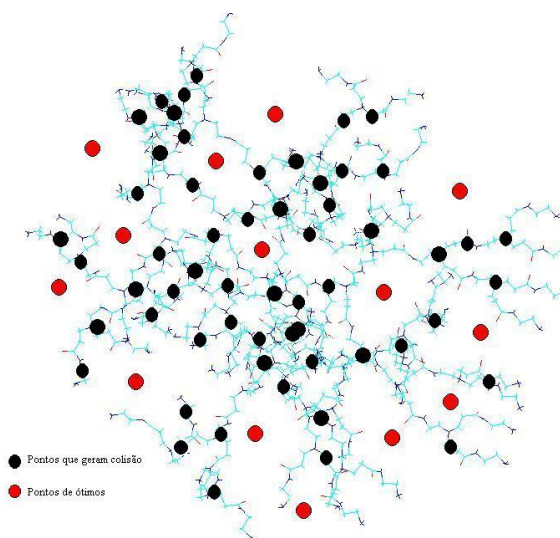


Figura 26: Moléculas sendo geradas em todo o espaço de busca. Em preto temos os pontos onde serão geradas moléculas fora de possíveis pontos de ótimos.

2 Nestes pontos escolhidos anteriormente (vermelhos na figura) as novas moléculas serão distribuídas, sofrendo suas respectivas rotações. Estas moléculas são geradas nestes pontos de ótimos e deslocadas por um fator aleatório através de uma distribuição de probabilidades, que gera moléculas próximas aos mínimos de energia, mas também permite que estas sejam geradas em sua vizinhança, explorando de forma satisfatória estes pontos e suas vizinhanças. Após esta distribuição as moléculas são avaliadas em energia pelo campo de força, e ao final do algoritmo aquele complexo de menor energia gerado após 500 execuções deste, será o complexo inicial para a dinâmica molecular.

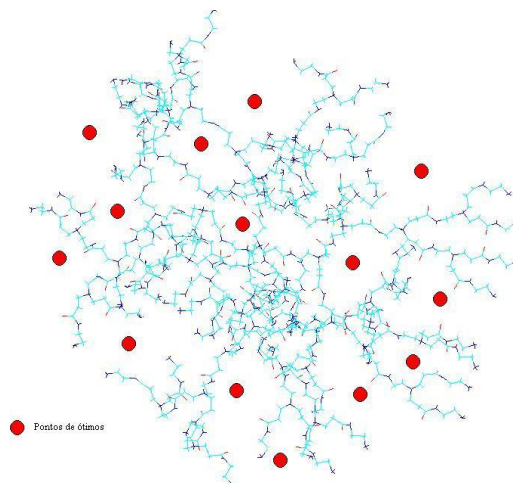


Figura 27: Moléculas geradas somente nos pontos de ótimos, durante 500 execuções do algoritmo.

### 5.10

#### Modelagem por Dinâmica Molecular dos Complexos Formados em Diferentes pH.

Após serem tomadas as estruturas de menor energia construídas pelo algoritmo anterior, foram realizadas simulações de dinâmica molecular com as estruturas para dois estados de protonação, neutro e ácido.

Através de estudos observados com as dinâmicas dos dendrímeros, e por estudos de macrófagos, que são as células que fagocitam o *Mycobacterium tuberculosis* após este entrar em contato com os pulmões, foi percebido que o meio (pH) para os fármacos serem liberadas deveria ser o mesmo do interior dos macrófagos, devido ao pH controlar a abertura e fechamento dos dendrímeros, liberando assim as moléculas. Outro fator importante é que a rifampicina é solúvel em meio ácido (pH ~5). Através destes fatos foi observado através de simulações de dinâmica molecular se os modelos verificam o que ocorre na natureza carregando as moléculas enquanto pH neutro e liberando quando encontrar o meio ácido.

### 5.11

#### Modelagem Molecular do Complexo de Inclusão

O programa utilizado para realizar as dinâmicas moleculares foi o Gromacs (Lindahl et al., 2001). Estes complexos foram otimizados através dos algoritmos de steepest descent em 100.000 passos de integração seguidos de 100.000 passos do gradiente conjugado. O tratamento eletrostático utilizado foi o PME (Essmann et al., 1995). Os raios de corte foram de 1,0 e 1,4 nm, para o potencial



eletrostático e de Lennard-jones, respectivamente. Foram aplicadas condições periódicas de contorno. O modelo de água utilizado foi o SPC (Berendsen et al., 1981). O acoplamento de Berendsen foi utilizado para a manter a temperatura a 310K e a pressão em 1atm (Berendsen, 1984). O algoritmo LINCS foi utilizado para restringir os comprimentos de ligações covalentes durante a dinâmica.

### **1) Fase de equilíbrio**

Após acoplar as moléculas de rifampicina na estrutura do dendrímero através do algoritmo desenvolvido, este sistema foi inserido dentro de uma caixa cúbica de água, com as medidas de 1nm entre a periferia das moléculas e as bordas da caixa. Foram inseridos íons de cloro para neutralizar o sistema. Foram então impostas restrições aos átomos pesados da estrutura do dendrímero. Estas restrições foram realizadas através de um programa desenvolvido. Enquanto os átomos pesados da estrutura do dendrímero permanecem fixos às posições originais, através de um potencial harmônico as moléculas de rifampicina e do solvente são relaxadas em torno da estrutura. Nestas dinâmicas também ocorrem erros de integração e de forças de fricção que aumentam a temperatura. Por este motivo a temperatura e pressão foram monitoradas durante todo o tempo de dinâmica através de algoritmos de acoplamento. A dinâmica foi executada até o estado de equilíbrio do complexo de inclusão. Ao fim desta, foi medido o RMSD e a energia total do sistema para verificar o equilíbrio e iniciar a fase de produção.

### **1) Fase de Produção**

Para a fase de produção, onde os resultados serão medidos após a equilibração do sistema, a molécula do dendrímero movimentada-se livremente dentro da caixa com os íons e moléculas do solvente. A temperatura e pressão foram novamente controladas através do algoritmo de Berendesen. Ao final muitas medidas foram tomadas para avaliar o complexo de inclusão no pH neutro (~7) e no pH ácido em torno de (~5).