

6. Resultados e Discussão

6.1 Otimização

Para cada estado de protonação dos dendrímeros foram feitas otimizações antes de iniciadas as dinâmicas moleculares. Os dendrímeros, após a montagem foram minimizados afim de que as ligações atômicas destes fossem otimizadas bem como a sua geometria espacial. Os resultados estão apresentados nas tabelas 11 e 12.

pH	Algoritmo	E.Potencial (kJ mol ⁻¹)
Básico	<i>Steep-Descent</i>	-2,1106958 10 ⁶
Neutro	<i>Steep-Descent</i>	-2,1200708 10 ⁶
Ácido	<i>Steep-Descent</i>	-2,1101801 10 ⁶

Tabela 11: Minimização de energia com o algoritmo Steep-Descent.

pH	Algoritmo	E.Potencial (kJ mol ⁻¹)
Básico	<i>Gradient</i>	-2,1106958 10 ⁶
Neutro	<i>Gradient</i>	-2,1533110 10 ⁶
Ácido	<i>Gradient</i>	-2,1101801 10 ⁶

Tabela 12: Minimização de energia com o algoritmo Conjugated Gradient.

Pode ser notado que, utilizando o algoritmo *Conjugated Gradient*, somente as simulações em pH neutro sofreram minimização de energia, significando que o *Steepest-Descent* foi suficiente para corrigir imperfeições na estrutura do sistema.

6.2 Simulações no Vácuo

Esta seção é apresentado o resultado da dinâmica realizada no vácuo. O objetivo desta simulação foi de comparar com as simulações após inclusão de solvente (água). Esta simulação é importante, pois a sua comparação com dinâmicas de solvente explícito mostram a interação do solvente com a estrutura dos dendrímeros. Nesta simulação foi utilizada a constante de permissividade do vácuo (ϵ), simulando o sistema a uma temperatura de 310 K.

Foi medido o RMSD (*root mean square deviation*), energia cinética, energia total e raio de giro com a estrutura inicial. Foram feitos 8ns de simulação onde no

final as estruturas entraram em equilíbrio sendo assim medidas as suas propriedades.

6.2.1 Energia Cinética

Energia Cinética (Simulação no Vácuo)

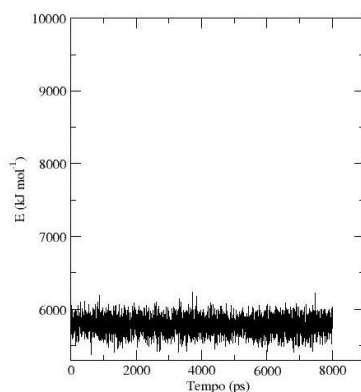


Figura 28: Energia Cinética do sistema no vácuo.

6.2.2 Energia Total do Sistema

O gráfico da Figura 29 mostra a energia total do sistema no vácuo. A trajetória foi monitorada durante 8ns de simulação. Ao final foi observado que com algumas variações devido à flexibilidade da estrutura os valores de energia total estavam em torno de um determinado valor médio o que caracterizou o equilíbrio deste sistema.

Energia Total (Simulação no Vácuo)

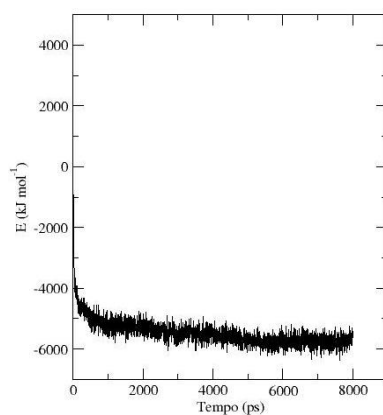


Figura 29: Energia total do sistema no vácuo.

6.2.3

Raio de Giro

O raio de giro mede o quão compacta é uma estrutura. Foi medido o raio de giro para a estrutura do dendrímero simulada no vácuo. A figura 30 denota o raio de giro durante todo o tempo da simulação, onde pode ser notado que a estrutura toma uma determinada conformação a partir de 500 ps de simulação.

Raio de Giro (nm)

Geração	R.Giro	Desv	Rx	Desv	Ry	Des	Rz	Desv
G4	1,522	$\pm 0,03$	1,248	$\pm 0,02$	1,368	$\pm 0,03$	1,096	$\pm 0,03$

Tabela 13: Raio de giro em nanômetros. Onde Des é o desvio padrão. Rx , Ry,Rz representam os raios de giro nos eixos x,y e z respectivamente.Médias calculadas no sistema em equilíbrio durante uma trajetória de 8ns.

Raio de giro (Simulação no Vácuo)

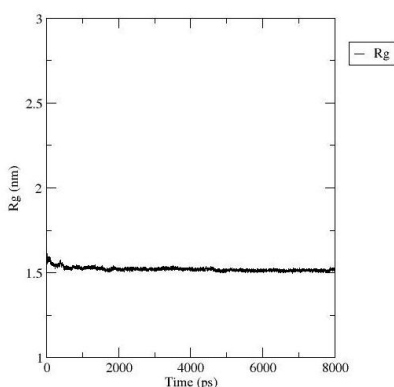


Figura 30: Raio de giro do sistema no vácuo.

6.2.4

Distribuição Radial

A medida da densidade radial $g(r)$ descreve a distribuição atômica em torno de um ponto determinado. Neste caso a distribuição foi realizada em torno do centro de massa do dendrímero.

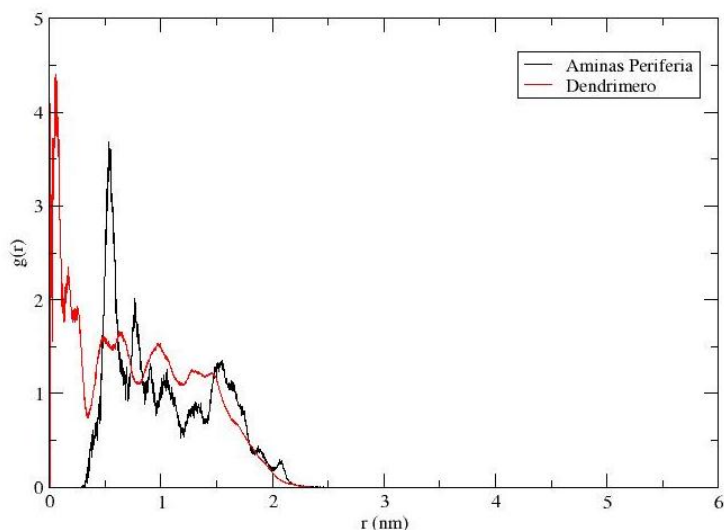


Figura 31: Distribuição radial em torno do centro de massa do dendrimeros.

A Figura 31 apresenta a distribuição radial das aminas da superfície do dendrimeros (curva em negro) bem como a sua distribuição radial em torno do centro de massa. A curva vermelha no gráfico mostra que a maior densidade atômica do dendrimeros ocorre próximo ao núcleo. Esta distribuição é característica de uma estrutura mais fechada, com poucas cavidades. As aminas primárias da superfície, que são os grupamentos responsáveis pelas interações com outras moléculas encontram-se distribuídas com maior frequência em torno de meio nanômetro. Este fato mostra que aminas primárias da superfície se voltaram para dentro da estrutura, visto que a distribuição atômica do dendrimeros ocorre até o limite de vinte nanômetros. A distribuição das aminas de superfície mais próximas ao interior se deve a interações entre estes grupamentos e carbonilas no interior da estrutura, como se vê na Figura 32.

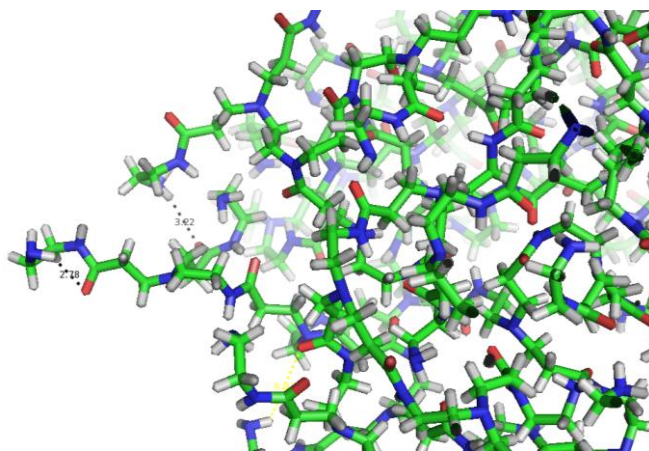


Figura 32: Ligações de hidrogênio entre aminas primárias e carbonila.

6.2.5 Distribuição Espacial

Nesta seção é apresentada a estrutura média obtida pela simulação do dendrímero no vácuo. A imagem mostra uma estrutura compacta onde as amins primárias da superfície encontram-se voltadas para dentro, mostrando que provavelmente há interações com grupamentos do interior do dendrímero formando ligações de hidrogênio.

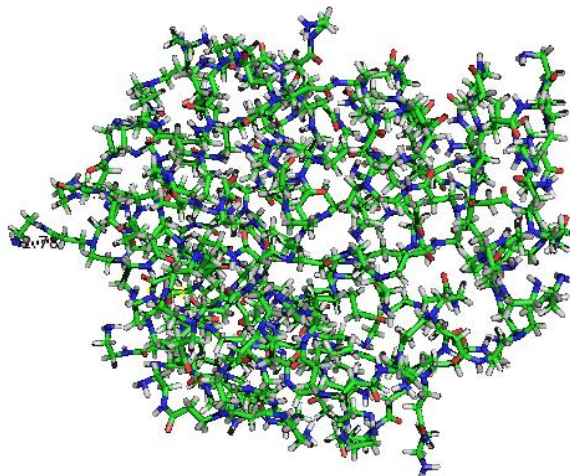


Figura 33: Distribuição espacial do dendrímero.

6.3 Simulação com Solvente Explícito, Fase de equilíbrio

Foram realizadas dinâmicas de 50ns para cada um dos três estados de protonação da geração 4 do dendrímero PAMAM. Foram modelados três estados de protonação, básico (aminas sem protonação), ácido (aminas primárias e terciárias protonadas), neutro (aminas primárias protonadas e terciáriasdesprotonadas). A dinâmica molecular consistiu em duas etapas, a primeira onde todos os átomos do dendrímero ficaram restritos à posição inicial (constante de força do oscilador = 1000KJ/(mol nm²) e 6ns segundos de simulação), enquanto as moléculas de água eram relaxadas em torno da estrutura (fase de equilíbrio). A segunda etapa permitiu que as moléculas do solvente movimentassem livremente dentro da caixa até chegarem ao equilíbrio (fase de produção, 44ns). Ao final foram medidos os últimos 8ns da simulação em equilíbrio.

6.3.1

Energia Total do sistema no Equilíbrio (Solvente Explícito)

O sistema foi simulado até atingir o equilíbrio. Pode se notar nas Figura 34, Figura 35 e Figura 36 que o valor de energia total dos sistemas durante 6000ps oscilam em torno de um ponto o que caracterizou o equilíbrio dos mesmos.

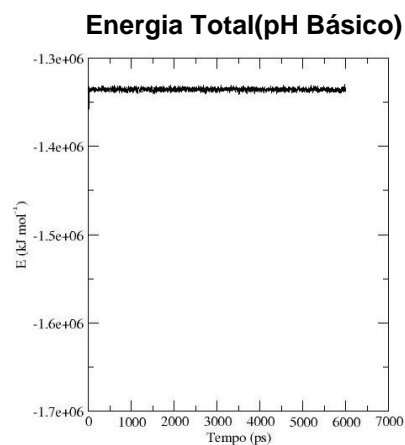


Figura 34: Energia total do sistema, para o pH básico.

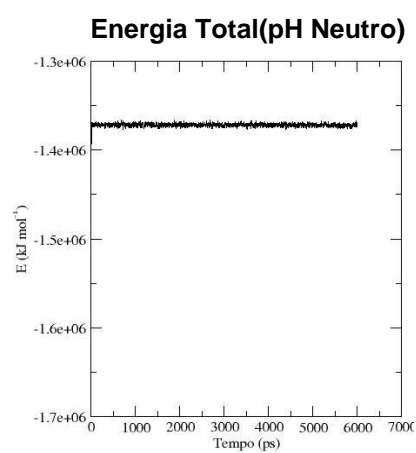


Figura 35: Energia total do sistema em pH neutro.

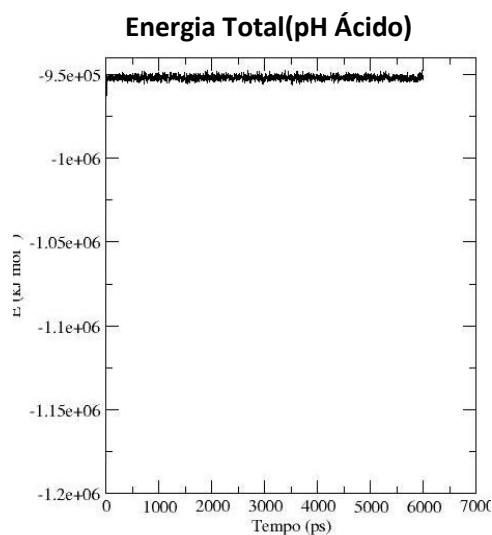


Figura 36: Energia total do sistema para o pH ácido.

6.3.2

Energia Cinética do sistema no Equilíbrio (Solvente Explícito)

Como observado anteriormente para a energia total do sistema, quando considerada a energia relativa à movimentação dos átomos, esta se encontra oscilando em torno de um valor fixo determinando assim o equilíbrio do sistema. A Figura 37, Figura 38 e Figura 39 denotam este equilíbrio.

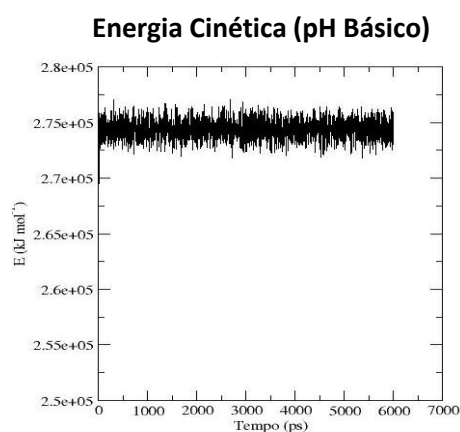


Figura 37: Energia Cinética do sistema para o pH básico.

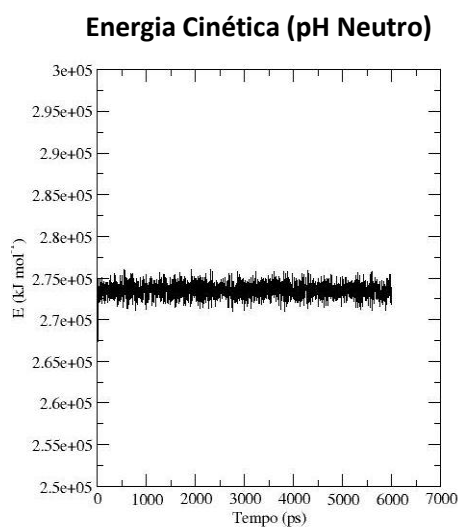


Figura 38: Energia Cinética do sistema para o pH neutro.

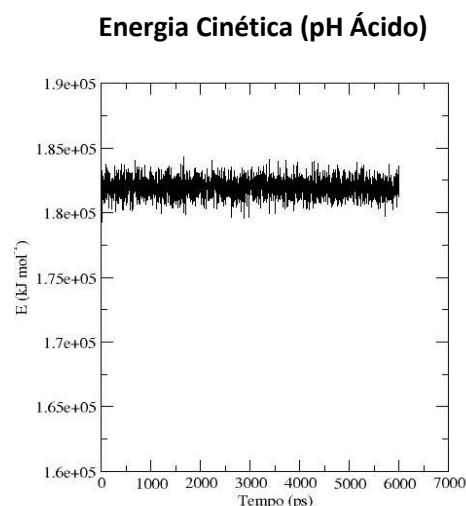


Figura 39: Energia Cinética (pH ácido).

6.3.3

Análise do RMSD na Fase de Equilíbrio (Solvente Explícito)

O RMSD define a diferença espacial entre duas estruturas. Nestas análises foram tomadas medidas do RMSD contra a estrutura inicial. As análises mostram através dos gráficos da Figura 40, Figura 41 e Figura 42 que os sistemas encontram-se sem grandes variações de RMSD durante a trajetória de 6000ps, caracterizando um equilíbrio, e que as moléculas do solvente foram acomodadas em seus respectivos sítios de interação. O RMSD gira em torno de 0,065nm para cada estado de

protonação, mostrando também que nesta fase da dinâmica, 1000ps já seriam suficientes para atingir o equilíbrio.

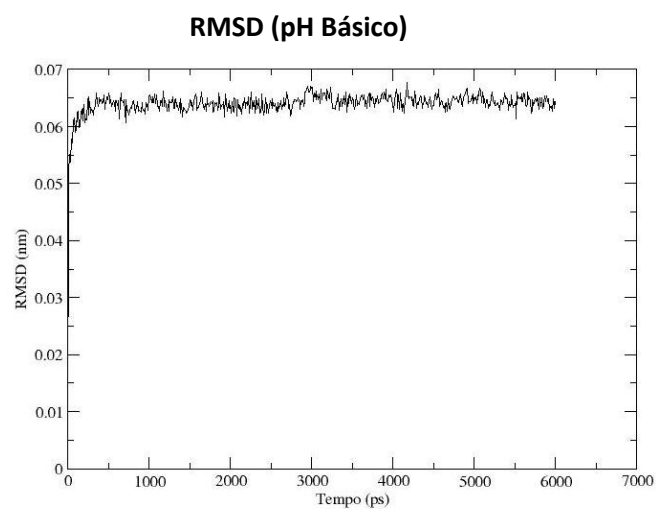


Figura 40: RMSD contra a primeira estrutura da dinâmica, pH básico.

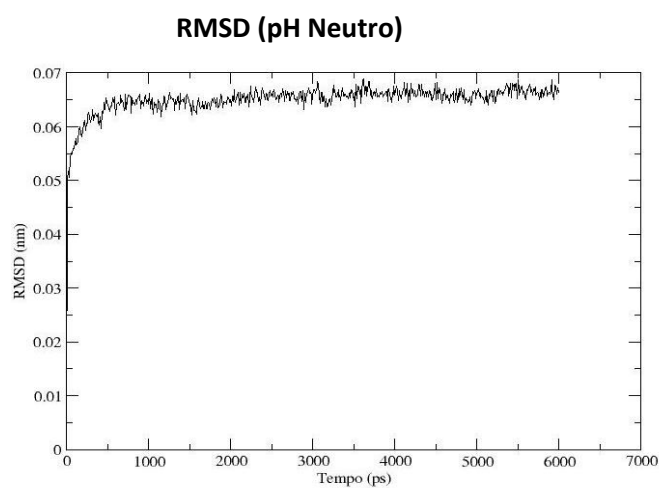


Figura 41: RMSD contra a primeira estrutura da dinâmica, pH neutro

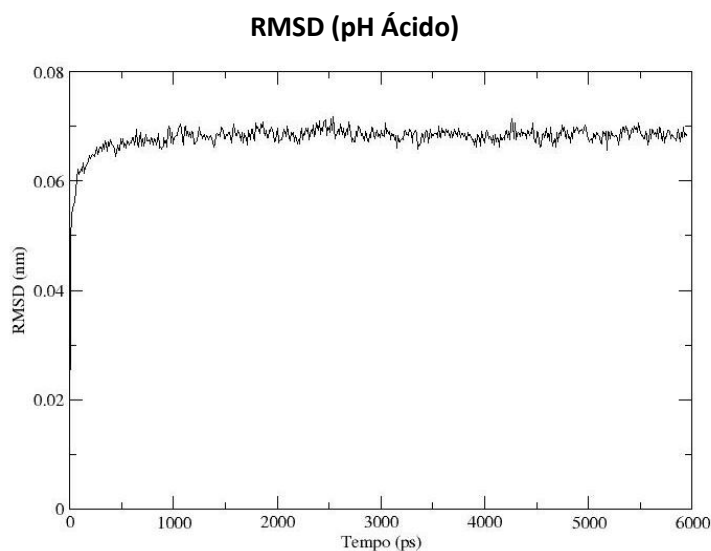


Figura 42: RMSD contra a primeira estrutura da dinâmica, pH ácido.

6.4

Simulação com Solvente Explícito, Fase de Produção

Nesta seção estão apresentados os resultados da fase de produção, onde os dados obtidos são calculados para serem medidas as propriedades termodinâmicas do sistema. A simulação foi feita durante 44000 ps, onde os 8000 ps finais foram utilizados para descrever as propriedades termodinâmicas dos sistemas. A temperatura utilizada foi de 310 K a uma pressão de 1atm.

6.4.1

Energia Total dos Sistemas (Solvente Explícito)

São mostrados os resultados da energia total onde todo o sistema possui liberdade de movimento de seus átomos, para atingir sua conformação equilibrada. Através da Figura 43, Figura 44 e 44 podem ser notadas as variações de energia total medida durante o tempo de simulação, mostrando assim que esta energia oscila em torno de um valor que caracteriza seu equilíbrio.

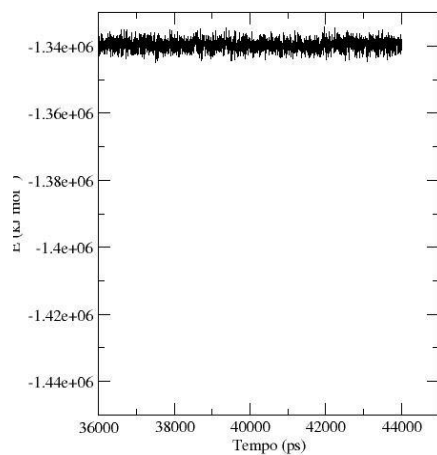
Energia Total (pH Básico)

Figura 43: Energia Total para o pH básico

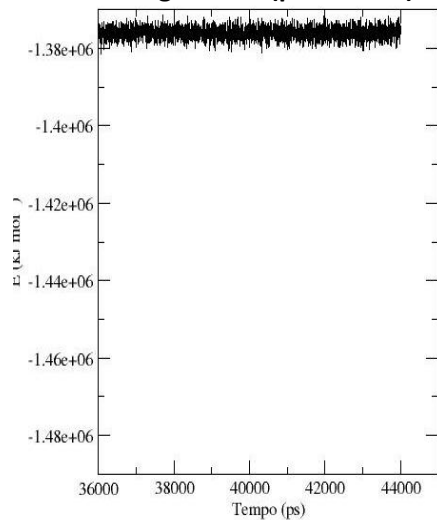
Energia Total (pH Neutro)

Figura 44: Energia total para o pH neutro

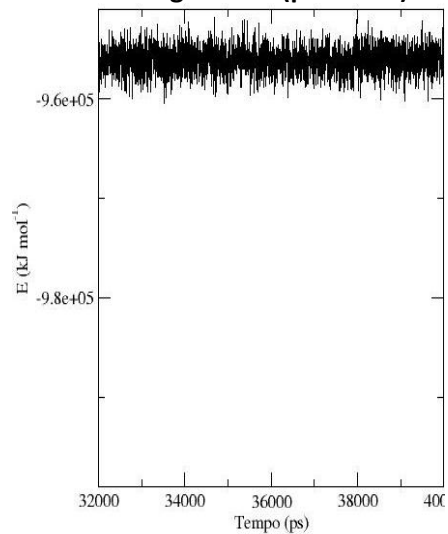
Energia Total (pH Ácido)

Figura 45: Energia total para o pH neutro.

6.4.2 Energia Cinética dos Sistemas (Solvente Explícito)

A energia cinética do sistema também foi medida para a verificação de suas propriedades quanto ao equilíbrio do sistema. Os últimos 8 ns foram usados para verificar o equilíbrio. Pode ser visto que o valor da energia cinética oscila em torno de um ponto o que caracteriza o equilíbrio. As Figura 46, Figura 47 e Figura 48, mostram os resultados através dos gráficos.

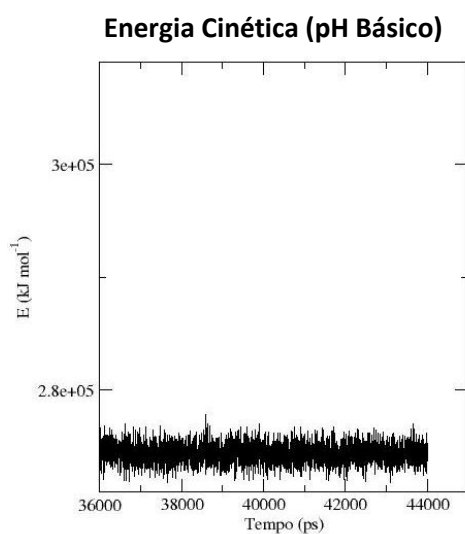


Figura 46: Energia cinética para o pH básico

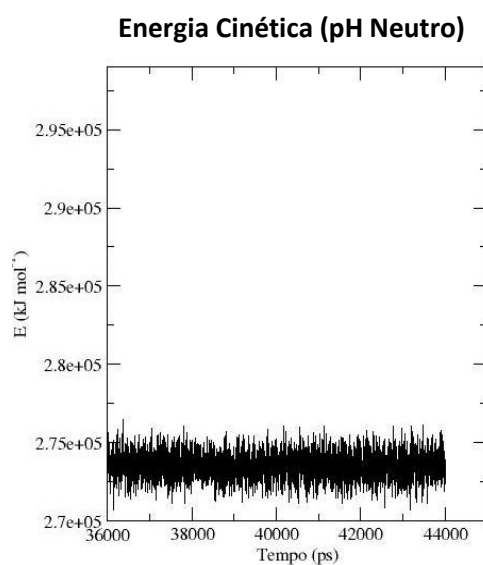


Figura 47: Energia cinética para o pH neutro.

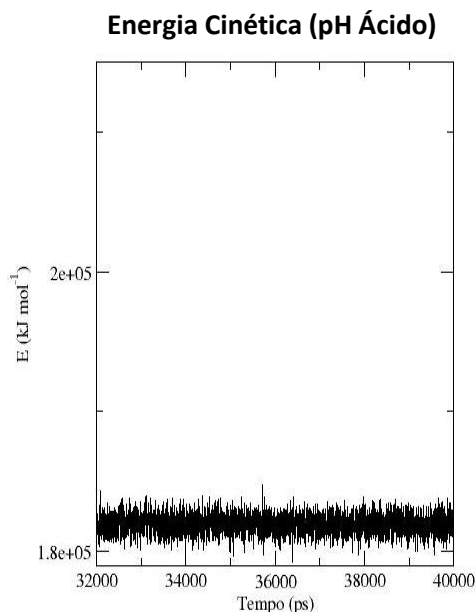


Figura 48: Energia cinética para o pH ácido.

6.4.3 Raio de Giro

As Figura 49, Figura 50 e Figura 51 descrevem as trajetórias das estruturas durante os oito nano segundos finais da dinâmica, quando as estruturas já se encontravam em equilíbrio. O raio de giro mede a compactação espacial do dendrímero durante a dinâmica. Este foi medido para caracterizar que o dendrímero não sofreu variações durante estas trajetórias, atingindo certa configuração espacial que não se altera durante o curso desta dinâmica.

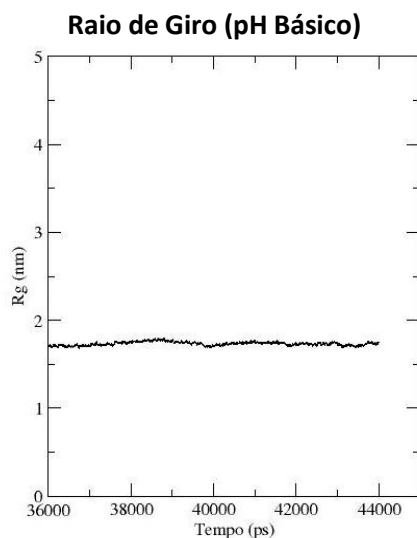


Figura 49: Raio de giro para o pH básico

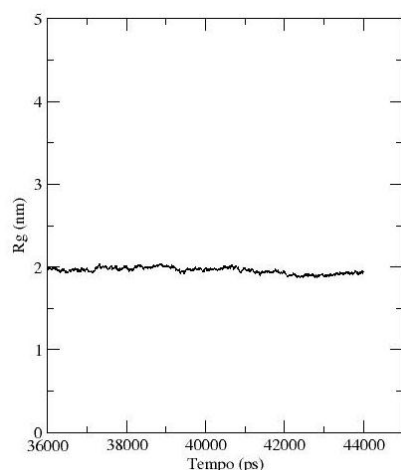
Raio de Giro (pH Neutro)

Figura 50: Raio de giro para o pH neutro.

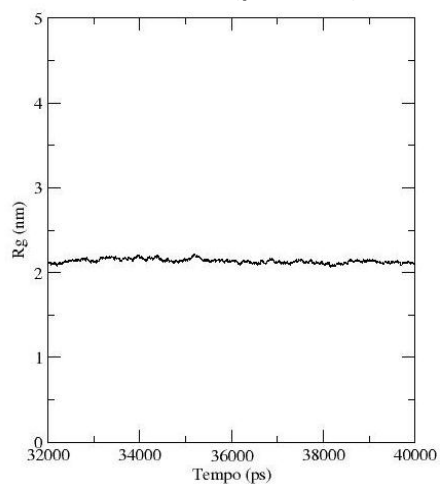
Raio de Giro (pH Ácido)

Figura 51: Raio de giro para o pH ácido

Os resultados estão apresentados na Tabela 14 com os seus respectivos estados de protonação, juntamente com a simulação no vácuo, mostrando que o solvente e íons preenchem as cavidades aumentando as dimensões do dendrímero.

Protonação	Rg(nm)	Des	Ref	Des
Vácuo	1,52	± 0,03	----	-----
Básico	1,73	± 0,02	1,69	± 0,01
Neutro	1,96	± 0,03	1,70	± 0,01
Ácido	2,13	± 0,03	1,90	± 0,008

Tabela 14: Raio de giro , onde Rg é o raio de giro, Des é o erro e Ref (Prabal, 2005).

Analisando a tabela 14, dos raios de giro, pode ser visto que, inserindo o solvente explicitamente, há um aumento 12,13% no tamanho do dendrímero em pH alcalino, onde este é totalmente desprotonado, relativamente ao seu tamanho no vácuo. Um aumento de 22,40%, em pH neutro, quando apenas as aminas primárias da superfície estão protonadas e de 28,63%, quando as aminas primárias e terciárias estão protonadas. Foi observada uma significativa penetração de água no interior do dendrímero, favorecida pelas interações entre a água e as aminas primárias e terciárias do dendrímero. Repulsões entre grupamentos aminas terciárias e primárias protonadas nas estruturas provocam um aumento do raio de giro do dendrímero, o que pode ser comprovado pelo aumento dos raios de giro nos diferentes níveis de protonação. A presença de contra íons Cl^- no interior do dendrímero aumenta à medida que aumenta a protonação das aminas o que será discutido na próxima seção. Os resultados obtidos por (Prabal, 2005) para o pH básico foram de até 15% e pH ácido de 30%, em relação ao vácuo.

6.4.4 Análise de Íons na Estrutura

A tabela 15 descreve o número médio de íons Cl^- que estão a um raio de 2nm do centro de massa do dendrímero, nos 8ns finais de simulação.

pH	N ^o íons	Desvio
Básico	0	±0
Neutro	6	±2
Ácido	41	±16

Tabela 15: Número de íons inseridos no dendrímero.

Os cloretos foram inseridos de forma aleatória na caixa no início da simulação. O pH ácido faz com que o dendrímero dobre o número de íons dentro de sua estrutura, comparado ao pH neutro. Este fato se deve à protonação das aminas interiores ao dendrímero no pH ácido, permitindo que as interações repulsivas entre aminas da superfície e interior carregadas expanda o volume do dendrímero. Esta expansão provoca a entrada de um maior número de íons que interagem eletrostaticamente com aminas protonadas no interior do dendrímero aumentando ainda mais seu volume.

6.4.5 Distribuição Radial de Moléculas de Água

Esta análise do número de moléculas de água foi realizada através da média destas nos 8 ns finais de simulação. Nesta seção são apresentados os resultados de densidades atômicas através da distribuição radial em torno do centro de massa do dendrímero.

Distribuição Radial das Moléculas de Água

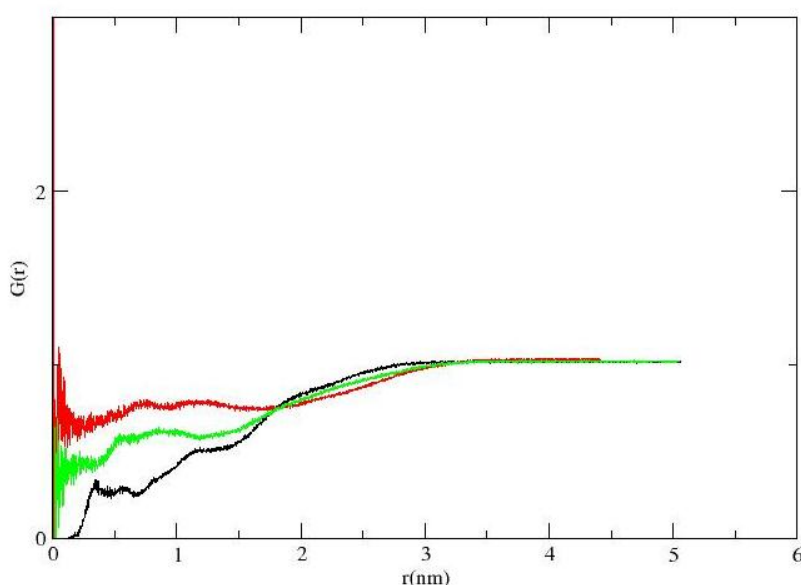


Figura 52: Função radial de átomos das moléculas de água. A curva em vermelho representa o pH ácido, o pH neutro é representado em verde e em preto o básico.

A Figura 52, mostra que a curva em negro, que representa o pH básico, possui densidade atômica reduzida quando comparada aos outros estados de protonação. Este comportamento sugere menor penetração de moléculas de água na estrutura, devido à estrutura mais fechada. A curva em verde no gráfico da figura 51 mostra uma maior densidade atômica à medida que se aproxima do núcleo (origem no gráfico) comparada ao pH básico. Este resultado indica uma maior penetração de moléculas de água em comparação com o caso anterior. A maior densidade atômica em torno do núcleo do dendrímero é representada pela curva em vermelho. Esta curva corresponde ao pH ácido e neste caso as aminas interiores e exteriores do dendrímero estão protonadas. Esta protonação faz com

que repulsões entre estes grupamentos facilitem a entrada de moléculas de água na estrutura do dendrímero contribuindo para aumentar ainda mais seu volume.

6.4.6 Distribuição Radial dos Diferentes pH Do Dendrímero

Esta seção descreve a distribuição radial atômica dos diferentes estados de protonação do dendrímero em relação ao seu centro de massa.

Distribuição Radial

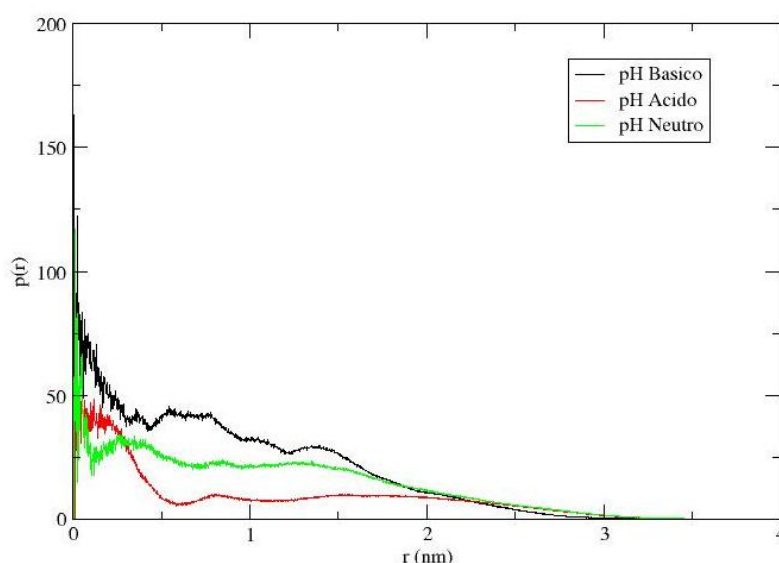


Figura 53: Distribuição radial do dendrímero, considerando o solvente inserido na estrutura. Onde a distância do centro de massa do dendrímero é dada em nanômetros.

Considerando o pH básico (curva em negro) pode ser notado uma grande concentração atômica que se reduz à medida que a curva se distancia do centro.

Para o dendrímero em pH ácido (curva em vermelho), tem-se uma maior concentração próxima ao núcleo mas menos densa comparada ao pH básico, decrescendo ao longo da trajetória, o que mostra uma estrutura mais aberta, com átomos mais espalhados,

Em pH neutro, onde a curva em verde representa a distribuição atômica, pode notar-se uma acentuada distribuição próxima ao núcleo, decaindo posteriormente. Sua densidade ao longo da curva tem um valor que supera o pH ácido a partir dos 0,5 nm, o que mostra, que esta

estrutura, comparada ao pH ácido é mais compacta. Mas torna-se mais aberta quando comparada ao pH básico.

6.4.7 Análise Visual das Estruturas

A Figura 54 mostra a estrutura média do dendrímero em pH básico, com um aumento de volume na estrutura que torna a molécula assimétrica. Comparando com a geometria obtida na simulação a vácuo, pode ser visto um dendrímero menos arredondado, no caso do solvente explícito.

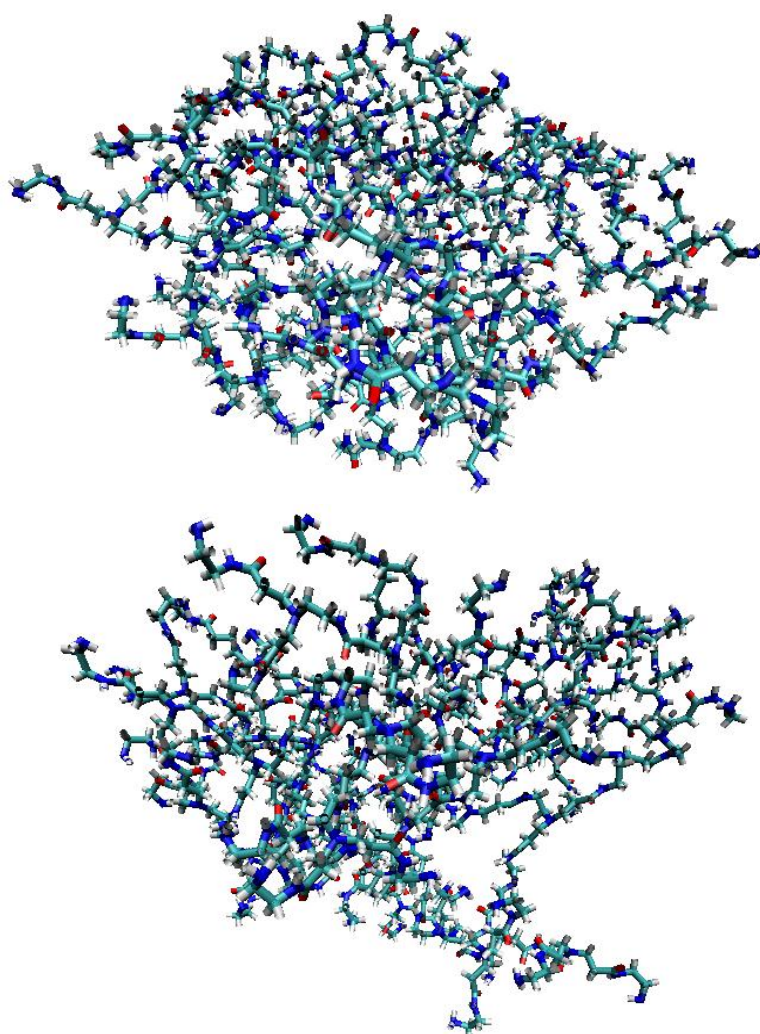


Figura 54: Estruturas do dendrímero PAMAM no vácuo acima e estrutura com solvente explícito abaixo, para o dendrímero em pH neutro.

A estrutura do dendrímero simulada em pH neutro em solvente explícito (Figura 55) apresentou um núcleo menos denso e um aumento

no raio de giro de 22,48% se comparado à estrutura simulada no vácuo. A redução da densidade atômica próximo ao núcleo pode ter sido ocasionada pela entrada de moléculas de água no interior do dendrímero como descrito na seção 5.4.5. As cavidades são assimétricas sendo que uma parte da periferia comporta cavidades maiores e a outra extremidade apresenta maior concentração atômica. As simulações em pH neutro são de grande interesse neste trabalho por se tratar do pH fisiológico. Neste pH as amins primárias da superfície do dendrímero estão protonadas e as amins terciárias do interior não foram protonadas.

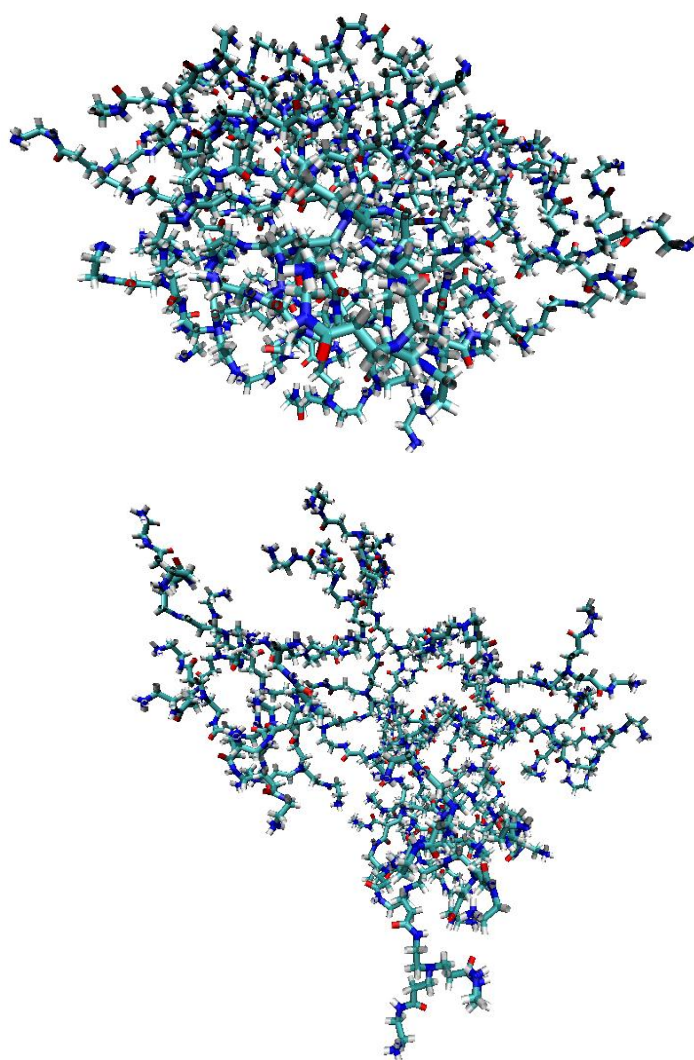


Figura 55: Estruturas do dendrímero PAMAM no vácuo acima e estrutura com solvente explícito abaixo, para o dendrímero em pH neutro.

Em pH ácido tanto as aminas primárias quanto as terciárias estão protonadas e a repulsão entre as aminas terciárias e primárias protonadas faz com que a molécula inche e se expanda. A estrutura do dendrímero obtida no pH ácido, utilizando a simulação corrobora esta descrição. A próxima seção analisa a distribuição dos braços do dendrímero.

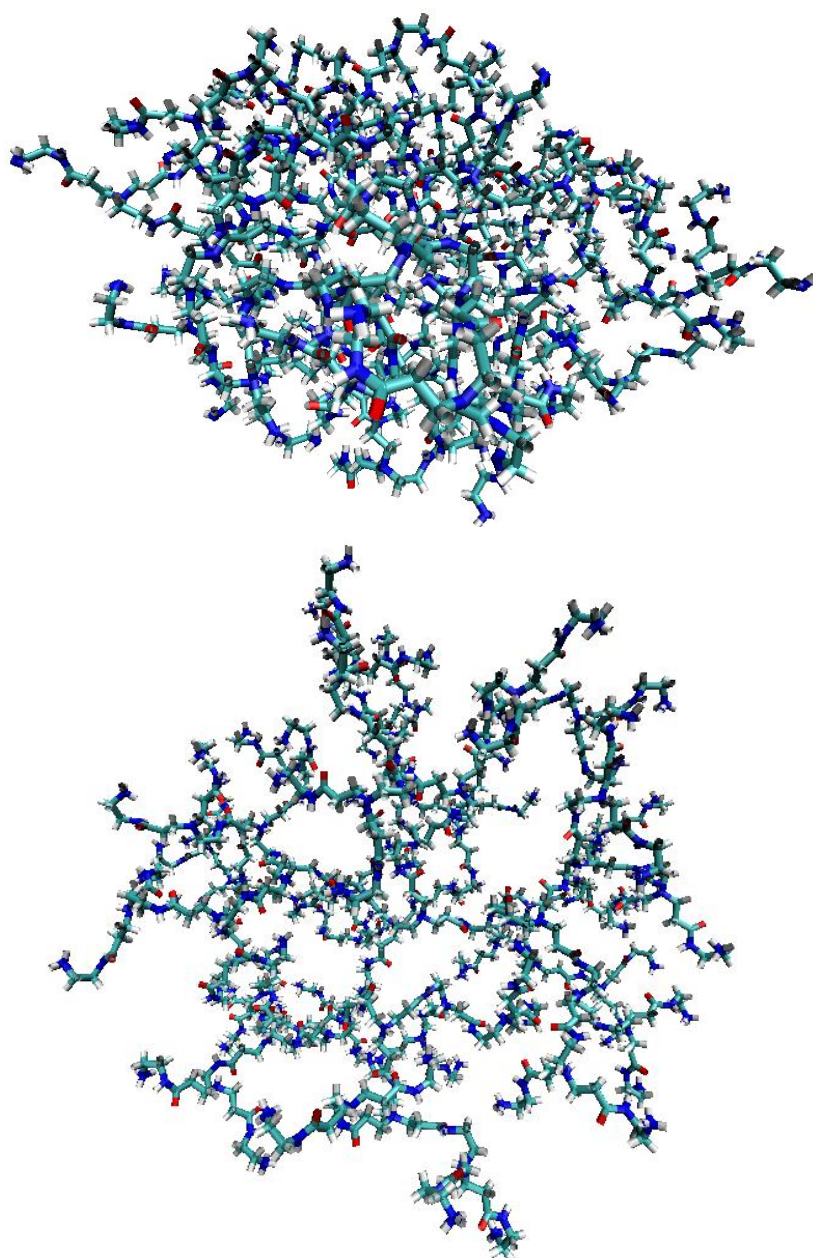


Figura 56: Estruturas do dendrímero PAMAM no vácuo acima e estrutura com solvente explícito abaixo, para o dendrímero em pH ácido.

6.4.8

Distância Média das Aminas da Periferia do Dendrímero ao Centro.

A diferença entre as estruturas espaciais dos dendrímeros está relacionada ao fato de as aminas da superfície estarem localizadas em posições mais internas da estrutura conforme o pH. O algoritmo construído para esta análise calcula a distância média entre as aminas primárias e o centro de coordenadas do dendrímero durante a dinâmica.

pH	D(A,C)	Desvio
Básico	1,9940	±0,045
Neutro	2,3910	±0,050
Ácido	3,5049	±0,104

Tabela 16: Distância média das aminas da periferia ao centro do dendrímero em nanômetros. Onde D(A,C) denota a distância média das aminas ao centro

Nesta análise (Tabela 16) encontrou-se a maior distância em pH ácido, devido à repulsão entre as aminas protonadas do centro e as aminas da superfície, aumentando assim a distância média comparado com os outros estados de protonação, fazendo com que estas aminas interajam mais fortemente com o solvente. No caso do pH neutro, as aminas da periferia estão protonadas o que permite um maior número de ligações de hidrogênio com o solvente comparado ao pH básico onde as aminas não estão protonadas, o que pode ter contribuído para a abertura dos braços do dendrímero. Comparado aos outros pH, o dendrímero em pH básico tem suas aminas mais próximas do centro, o que pode ter sido ocasionado por uma menor interação com as moléculas de água que circundam a periferia. Este fato está relacionado ao interior do dendrímero estar formando ligações de hidrogênio entre as aminas primárias da superfície e carbonilas no interior da estrutura.

6.4.9

Análise do Volume das estruturas

A análise do volume das estruturas tem como objetivo verificar os resultados obtidos através do raio de giro sobre o aumento das estruturas em diferentes protonações das aminas.

pH	Volume (nm) ³
Básico	3392,359
Neutro	3739,191
Ácido	4186,601

Tabela 17: Volume dos dendrímeros em nanômetros para os diferentes pH.

A Tabela 17, relata os diferentes volumes em função do pH. Há um aumento de 9,27% para o pH neutro comparado ao básico, o que mostra além dos resultados de raio de giro que houve uma penetração maior de moléculas do solvente no interior devido ao aumento do dendrímero. Um aumento de 18,9% em volume é observado quando comparados o pH ácido com o básico e de 10,68% em relação ao pH neutro. Repulsões entre os grupamentos aminas carregados contribuem para este aumento de volume no caso do pH ácido. Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados na seção sobre o raio de giro das estruturas.

6.4.10 Ligações de Hidrogênio Intermoleculares

Nesta seção são analisadas as ligações de hidrogênio intermoleculares (dendrímero e solvente) durante os 8 ns finais de simulação por dinâmica molecular, quando o sistema encontrava-se em equilíbrio. A distância considerada para a formação de uma ligação de hidrogênio foi de 0,35 nm, com uma variação angular de até 30 graus. Estas análises são de fundamental importância por mostrar as diferentes quantidades de ligações de hidrogênio durante a simulação.

pH	Média	Desvio
Básico	416,079	±10,536
Neutro	450,850	±9,312
Ácido	471,251	±10,428

Tabela 18: Número de ligações de hidrogênio encontradas durante a dinâmica molecular nos oito picos segundos finais. Onde pH denota o estado de protonação, Média é a média do número de ligações de hidrogênio durante a dinâmica a cada picos segundos.

Comparando o dendrímero em pH básico e em pH ácido pode ser notada uma diferença de 34 ligações a mais, na média, para o pH ácido. Este resultado indica que o dendrímero em pH ácido é mais solúvel, em

comparação ao pH básico e neutro. A grande importância deste resultado está no fato de o pH ácido ser o pH encontrado no interior dos macrófagos e onde a rifampicina é ativa. Quando comparamos o pH ácido e o neutro, temos na média 20 ligações de hidrogênio a mais no pH ácido comparado ao neutro. No pH ácido as amins terciárias interiores ao dendrímero, também estão protonadas. Estes resultados indicam que no caso do pH ácido a estrutura tem uma maior solubilidade comparada aos outras protonações o que é um resultado promissor visto que é neste pH que o dendrímero libera as moléculas.

6.4.11

Ligações de Hidrogênio Intramoleculares

Nesta seção são analisadas as ligações de hidrogênio intramoleculares (entre átomos do dendrímero) durante os 8ns finais de simulação por dinâmica molecular, com o sistema em equilíbrio. A distância considerada para a formação de uma ligação de hidrogênio foi de 0,35 nm, uma variação angular de até 30 graus. A importância desta análise está em verificar o que ocorre com as diferentes protonações das amins no interior da estrutura do dendrímero.

pH	Média	Desvio
Básico	30, 539	±9,292
Neutro	14, 100	±2,327
Ácido	5, 495	±1,773

Tabela 19: Número de ligações de hidrogênio encontradas durante a dinâmica molecular nos oito picos segundos finais. Onde pH denota o estado de protonação, Média é a média do número de ligações de hidrogênio durante a dinâmica a cada picos segundos.

Quando todas as amins terciárias no interior estão protonadas (pH ácido), decresce o número de ligações de hidrogênio por haver repulsões entre as amins da superfície e estes grupamentos internos, fazendo com que a interação com o solvente seja mais favorável, diminuindo assim ligações de hidrogênio internas como mostra a tabela 20 o que leva à abertura da estrutura.

Considerando o pH onde somente as amins da superfície estão protonadas (pH neutro), a interação com o solvente aumenta,

comparando com o caso onde aminas da superfície não estão protonadas, pH básico.

No pH básico, onde nenhuma amina é protonada interações entre estas aminas e grupamentos carregados levam o aumento da interação interna, ocorrendo também menor interação com o solvente externo devido ao caráter apolar das aminas da superfície, o que torna a estrutura mais compacta.

6.4.12 Distribuição das Aminas de Superfície.

Aminas primárias são responsáveis por interações do dendrímero com drogas acopladas em sua superfície. Estas aminas também têm sua importância por serem responsáveis pela entrada do dendrímero em membranas celulares ou por formação de micelas com lipídeos. Nesta análise é dada a distribuição radial em torno do centro de massa do dendrímero, permitindo assim verificar o número de átomos das aminas primárias a uma determinada distância.

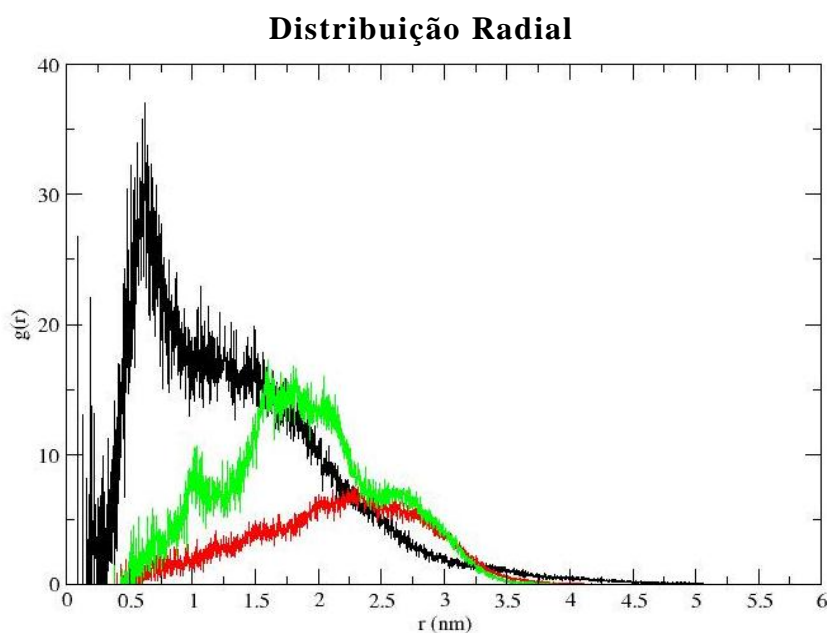


Figura 57: Distribuição radial em torno do centro de massa do dendrímero. Em negrito a curva que representa o pH básico. Em verde a os pontos que representam o pH neutro e em vermelho o gráfico do pH ácido.

A maior densidade encontrada para o pH básico (negrito no gráfico) está mais próxima ao centro de massa comparada as outras

distribuições. Isso indica que as aminas da superfície estão mais voltadas para o centro da estrutura, o que denota um menor número de ligações de hidrogênio com o solvente.

Considerando o caso do pH neutro (curva em verde), a maior densidade ocorre um pouco mais afastado sugerindo aminas de superfície mais distantes do centro de massa e conseqüentemente uma estrutura mais aberta. No caso do pH ácido (curva em vermelho) as densidades maiores estão a uma distância maior comparados aos outros pH o que indica que as aminas não se voltaram para dentro ficando mais expostas ao solvente. Estes resultados estão de acordo com a análise da distância média das aminas da superfície ao centro do dendrímero (análise 5.4.5).

6.4.13 Superfície Acessível ao Solvente

Nesta análise é discutida a superfície acessível ao solvente que determina a área em nanômetros quadrados (nm^2) sobre o qual um contato entre o dendrímero e solvente ocorre. O tamanho da sonda utilizada foi de 0,14 nanômetros. Este valor usado foi devido à distância entre duas moléculas de água em solução, este valor é comumente utilizado quando se trata do solvente água. A Figura 58 exemplifica o processo.

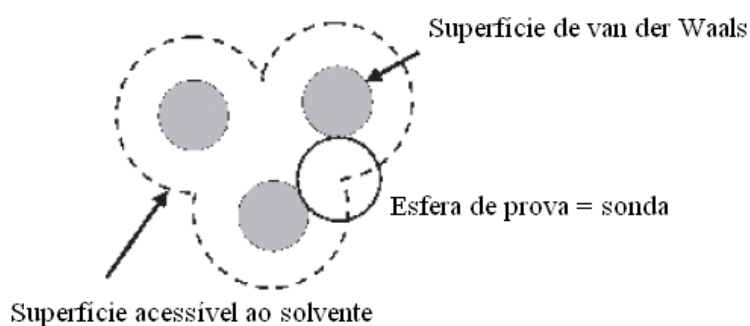


Figura 58: Superfície acessível ao solvente

pH	Área Total	Desvio	Energia	Desvio
Básico	149,74	±3,69	-375,91	±9,28
Neutro	167,50	±2,03	-420,50	±5,11
Ácido	200,54	±3,31	-503,43	±8,31

Tabela 20: Tabela da área acessível ao solvente, em nm^2 . Onde energia é a energia de interação entre solvente e dendrímero por área acessível.

Como observado na Tabela 20, a energia de interação para o pH ácido é menor comparada as demais, significando uma interação mais favorável com a água o que pode indicar o estado de maior solubilidade entre os pH considerados. Quando comparados os valores do pH básico com os demais nota-se que este estado possui uma menor energia de interação com o solvente por área acessível, indicando uma estrutura com uma menor capacidade de se solubilizar em água.

6.5

Algoritmo de acoplamento na estrutura dos dendrímeros

6.5.1

Busca com raio de 0,5 nm do centro

Nesta análise é gerado um conjunto determinado de moléculas considerando-se um raio de distribuição de no máximo cinco angstroms a partir do centro do dendrímero. Com esta análise poderemos observar o número máximo de moléculas que podem ser encapsuladas próximas ao núcleo, o que esclarece o número total que estas cavidades podem comportar.

Taxa de Sucesso do Algoritmo ($raio \leq 0,5nm$)

Número de Moléculas	Conf1	Conf2	Conf3
2	95,4%	98,0%	97,8%
5	56,8%	77,6%	79,4%
10	20,0%	17,8%	24,0%
20	-----	0,20%	0,20%
21	-----	-----	-----

Tabela 21: Análise com raio de no máximo 5 angstroms do centro do dendrímero. Onde conf 1, é a primeira conformação considerada. Conf 2 a segunda conformação e conf 3 a terceira.

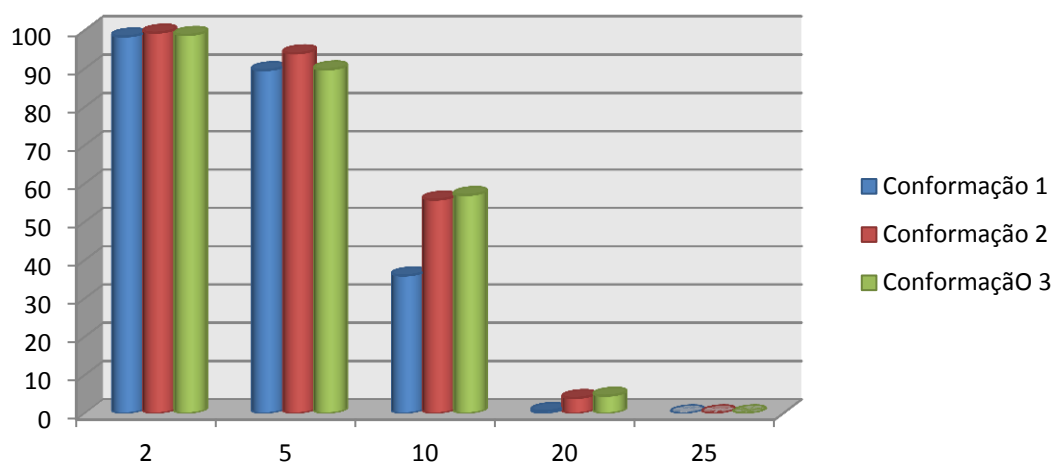


Gráfico 1: Análise da inserção de rifampicinas a cinco angstroms do centro do dendrímero.

Quando são inseridas duas moléculas a esta distância Tabela 21 a conformação2 obteve a maior taxa de sucesso, indicando que o algoritmo teve sucesso em acoplar estas moléculas de forma mais eficaz sem colisões atômicas. A conformação 3 obteve os melhores resultados em acoplar as moléculas de rifampicina. Estes resultados mostram que a esta distância esta conformação possui cavidades mais adequadas ao acoplamento. Através destes resultados podemos observar que dado este raio de até 5 angstroms do centro, o número máximo que conseguiríamos acoplar seriam vinte moléculas. Visto este fato e tendo em vista que os limites máximos do dendrímero ainda não foram atingidos, a análise subsequente aumenta o raio de distribuição das moléculas de maneira a acoplar um maior número destas no interior.

6.5.2

Busca com raio de 0,1 nm do centro

Nesta análise o raio de distribuição considerado é de 0,1 nm do centro do dendrímero, com o intuito de acoplar um maior número de moléculas no interior de cavidades dos dendrímeros.

Taxa de Sucesso do Algoritmo ($raio \leq 0,1nm$)

Número de Moléculas	Conf1	Conf2	Conf3
2	98,4%	99,4%	98,8%
5	89,6%	94,0%	89,8%
10	36,0%	55,8%	57,0%
20	0,60%	4,0%	4,6%
21	-----	-----	-----

Tabela 22: Análise com raio de no máximo 10 angstroms do centro. Onde conf 1, é a primeira conformação considerada. Conf 2 a segunda conformação e conf 3 a terceira.

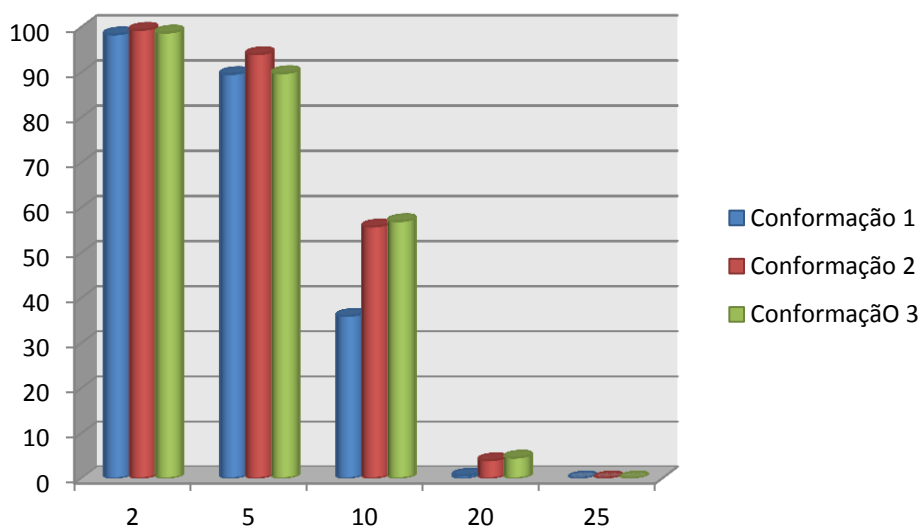


Gráfico 2: Análise da inserção de rifampicinas a dez angstroms do centro do dendrímero.

Observando os dados da Tabela 22 nota-se que o algoritmo obteve uma taxa de sucesso maior comparada a análise com um raio de distribuição de apenas 5 angstroms do centro do dendrímero. Estes resultados mostram que a esta distância, o dendrímero tem cavidades mais satisfatórias para o acoplamento das moléculas de rifampicina. Considerando o número de moléculas acopladas, não é possível acoplar um número de 21 moléculas no interior da estrutura.

6.5.3

Busca com raio de 0,15 nm do centro

Esta análise considera uma distribuição de moléculas de rifampicina afastadas de no máximo 0,15 nm do centro. Este afastamento máximo permite que as moléculas sejam geradas nos limites da estrutura do dendrímero, isto é, o raio máximo para que estas não sejam geradas fora do dendrímero, analisando assim toda a superfície, quanto ao acoplamento.

Taxa de Sucesso do Algoritmo ($raio \leq 0,15nm$)

Número de Moléculas	Conf1	Conf2	Conf3
2	99,8%	99,2%	99,6%
5	94,6%	95,4%	96,6%
10	81,4%	84,6%	82,4%
20	18,4%	36,6%	37,0%
21	-----	-----	-----

Tabela 23: Análise com raio de no máximo 10 angstroms do centro. Onde conf 1, é a primeira conformação considerada. Conf 2 a segunda conformação e conf 3 a terceira.

Comparando os dados obtidos pelo algoritmo na tabela acima, pode ser notado que a conformação 3 obteve o melhor desempenho para acoplar o maior número de moléculas no interior da estrutura do dendrímero. Outro resultado importante esta relacionado ao algoritmo não conseguir acoplar um número de 21 moléculas de rifampicina na estrutura do dendrímero.

6.5.4

Análise de Energia para a inserção de 20 moléculas

Energia Mínima em 500 Execuções ($raio \leq 0,15nm$)

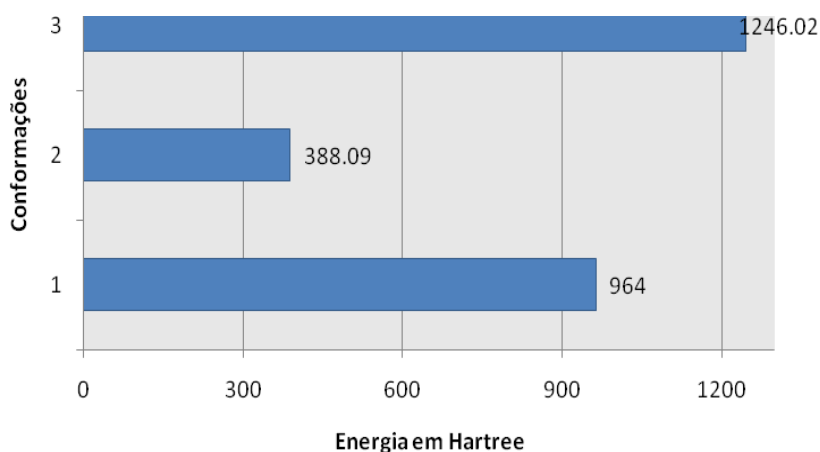


Figura 59: Gráfico de energia potencial das conformações 1, 2 e 3.

Esta análise indica que o complexo mais estável foi obtido com a conformação 2, que obteve melhor desempenho em acoplar as 20 moléculas de rifampicina.

6.5.5

Algoritmo de Acoplamento com tratamento de colisões atômicas.

Algoritmos de otimizações atuais utilizados em dinâmica molecular não possuem a capacidade de obter uma geometria correta da molécula se esta possuir em sua estrutura átomos com valências incorretas. Neste algoritmo aqui construído, as moléculas são inseridas de forma que a distância de inserção entre elas e o dendrímero seja maior do que a maior ligação covalente entre os átomos do dendrímero. Este algoritmo de detecção resolve os problemas de possíveis colisões que podem ocorrer entre átomos do dendrímero e moléculas a serem transportadas

O algoritmo é executado procurando a maior distância covalente entre átomos do dendrímero que neste caso foi de 1,575 Å, e insere as moléculas de rifampicina no transportador, respeitando a inserção de moléculas com esta distância. A rotina acrescentada no algoritmo desenvolvido neste trabalho é a seguinte:

INCIO DA ROTINA

Se $D_{d,r} > 1,575\text{Å}$

Então Inserir moléculas de rifampicina

Se $D_{r,r} > 1,575\text{Å}$

Então Inserir moléculas de rifampicina

FIM ROTINA

Onde $D_{d,r}$ é a distância euclidiana entre o dendrímero e molécula de rifampicina e $D_{r,r}$ a distância entre duas moléculas de rifampicina.

Energia Mínima em 500 Execuções ($r \leq 0,15 \text{ nm}$)

Conf	Colisões Atômicas			Sem colisões Atômicas		
	E.min	Média	Desv	E.min	Média	Desv
Conf1	964,42	3735,34	$\pm 678,88$	66,71	104,38	$\pm 17,04$
Conf 2	388,09	3082,66	$\pm 719,03$	61,87	104,55	$\pm 18,85$
Conf3	1246,0	3363,78	$\pm 917,21$	58,20	104,93	$\pm 18,00$

Tabela 24: Algoritmo com inserção aleatória de distâncias comparado ao algoritmo que insere moléculas sem estas colisões. conf: são as conformações do dendrímero testadas, E.min é a energia mínima encontrada. Média é a média em quinhentas execuções do algoritmo e Desv o desvio padrão.

De acordo com a tabela 24, a detecção de colisão foi realizada de forma satisfatória o que pode ser observado através da taxa de sucesso de 100% para todas as conformações, quando consideramos inserções seguindo a distância de 0,175 nm. Para todas as conformações consideradas, houve uma melhora na média de energia, em quinhentas execuções do algoritmo, de 97,21%, o que indica que o algoritmo encontrou em cada execução energias potenciais menores, o que indica complexos mais estáveis para todas as conformações. A energia mínima, quando considerado o algoritmo sem colisões atômicas, obteve como melhor resultado a conformação 3, com uma melhora máxima em termos de energia potencial de 98,26%. Estes resultados são importantes devido ao fato de se as moléculas no início de dinâmicas moleculares estão em posições satisfatórias, o custo computacional associado é reduzido drasticamente, levando a resultados satisfatórios muito mais rapidamente.

Conformações	Colisões Atômicas	Sem colisões
	Sucesso(%)	Sucesso(%)
Conformação 1	18,4	100
Conformação 2	36,6	100
Conformação 3	37,0	100

Tabela 25: Taxa de sucesso para o algoritmo sem colisões atômicas comparadas com o algoritmo que insere moléculas no dendrímero a uma distância de 0,1575 nm.

6.5.6 Distribuição de Cauchy

Nesta análise de acoplamento de moléculas, o algoritmo é executado 500 vezes em duas fases:

1) Gera 20 moléculas aleatoriamente no espaço de busca, estas são então sofrem rotações e tem sua energia calculada. Após um número de 250 execuções as energias E são ranqueadas e inseridas em um vetor.

2) São tomadas estas energias, que estão associadas a posições de determinada molécula em uma posição ótima e então as novas moléculas serão distribuídas neste pontos, seguindo uma distribuição de Cauchy. Esta distribuição gera moléculas nos pontos de energia e em sua vizinhança, explorando assim de maneira mais eficaz a superfície de energia. A Equação 6.1 denota a distribuição de Cauchy.

$$C(\alpha, \beta, X) = \frac{\beta}{\pi(\beta^2 + (X - \alpha)^2)} \quad (49)$$

Onde os parâmetros $\beta \neq 0$ e α foram gerados aleatoriamente no intervalo $[0,1]$. A tabela 26 mostra os resultados deste algoritmo.

Distribuição de Cauchy

Conformações	Sem-Cauchy	Cauchy
Conformação 1	66,713	56,701
Conformação 2	61,872	56,600
Conformação 3	58,201	57,131

Tabela 26: Algoritmo com distribuição de Cauchy comparado ao algoritmo onde as moléculas eram distribuídas aleatoriamente.

Através da tabela 26 pode ser notado que quando as moléculas são geradas em pontos de mínimos seguindo uma distribuição de Cauchy, a energia mínima é reduzida de 16, 9 e 2 por cento para as conformações 1, 2 e 3 respectivamente. Este fato indica que para todas as conformações consideradas o algoritmo encontra complexos mais estáveis quando considerada a distribuição de Cauchy.

Para avaliar o desempenho da distribuição de Cauchy, foram realizadas outras distribuições e verificado o desempenho destas em

encontrar uma estrutura de energia mínima comparada à distribuição de Cauchy. Esta análise é discutida na próxima seção.

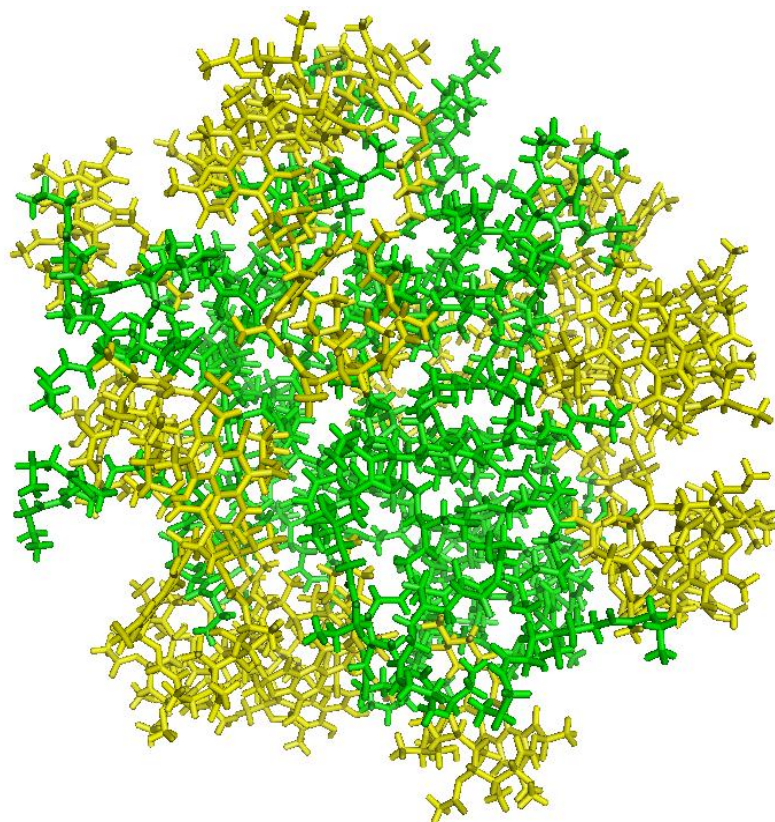


Figura 60: Estrutura mais estável encontrada pelo algoritmo.

6.5.7 Distribuições Estatísticas

Nestas análises as vinte moléculas de rifampicina são distribuídas de acordo com o método anterior, mas com o espalhamento das moléculas nos pontos de mínimos seguindo outras distribuições, para uma avaliação do desempenho do algoritmo.

Distribuição	Conf 1	Conf2	Conf 3
Cauchy	56,701	56,600	57,131
Chi	56,854	60,263	58,800
Exponencial	56,855	61,055	60,209
Gamma	59,439	61,830	58,426
Laplace	56,854	62,511	61,362
Poisson	62,698	61,555	60,009

Tabela 27: Distribuições estatísticas utilizadas no trabalho. Onde os números na tabela representam a menor energia encontrada após 500 execuções do algoritmo em Hartree.

Pode ser notado pela tabela 27, que considerando a conformação 1, a energia mínima, que mostra o complexo mais estável, considerando a distribuição de Cauchy obteve um melhor resultado comparado a outras distribuições, onde a melhora chega a 0.15 Hartree. Considerando a conformação 2 pode ser percebida uma diferença de energia mínima encontrada de 5,9 Hartrees. Considerando a conformação 3 a energia obteve uma melhora de 4,23 Hartree. Estes resultados indicam que utilizando este algoritmo à melhor distribuição para encontrar o complexo mais estável, energia mínima é a distribuição de Cauchy. Com estes resultados foi então considerada a conformação 2, como o complexo a ser simulado durante a dinâmica molecular. Estes resultados são tratados na próxima seção.

Dinâmica Molecular do Complexo de Inclusão

Temperatura: 310K

Pressão: 1atm

Algoritmo de acoplamento de pressão: Berendsen

Algoritmo de acoplamento de Temperatura: Berendsen

Tempo Total simulado: 56 ns ~ 56 dias.

Algoritmo de Restrição = LINCS

6.6

Simulações de Complexos Rifampicina-Dendrímero

6.6.1

Complexo de Inclusão

O modelo construído neste trabalho para o dendrímero em pH neutro, onde as aminas primárias da periferia encontram-se protonadas, simula as condições que o dendrímero vai encontrar quando este estiver no pH fisiológico. Foram inseridas 20 moléculas de rifampicina de acordo com os algoritmos mostrados na seção anterior. Após esta inserção foram realizadas dinâmicas moleculares, para avaliar se o complexo de inclusão se mantém ao longo do tempo, mostrando assim que o dendrímero é capaz de encapsular em sua superfície 20 moléculas de rifampicina, como mostrado experimentalmente.

Após a inserção do complexo com 20 moléculas na caixa de água, que tem dimensões de 10 angstroms da periferia das moléculas até as bordas da caixa, foram inseridos íons de cloro para neutralizar o sistema. Após esta etapa foram realizadas dinâmicas moleculares em duas etapas.

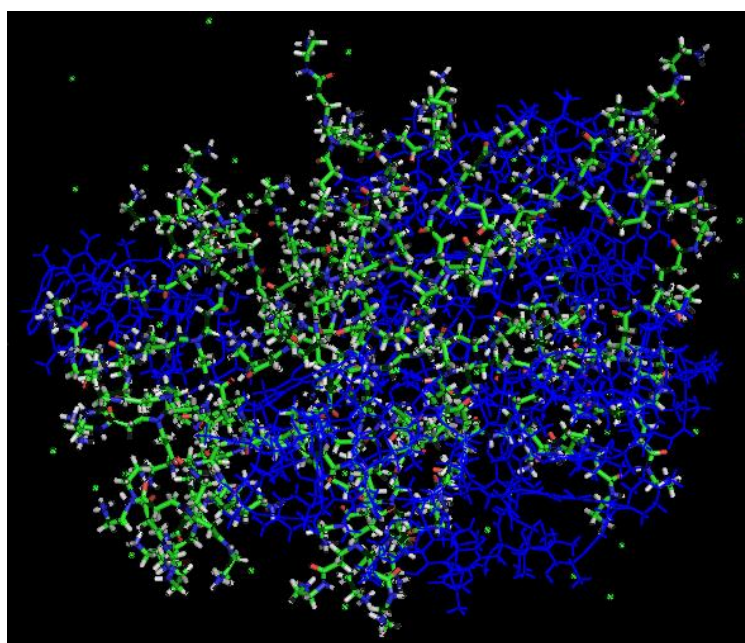
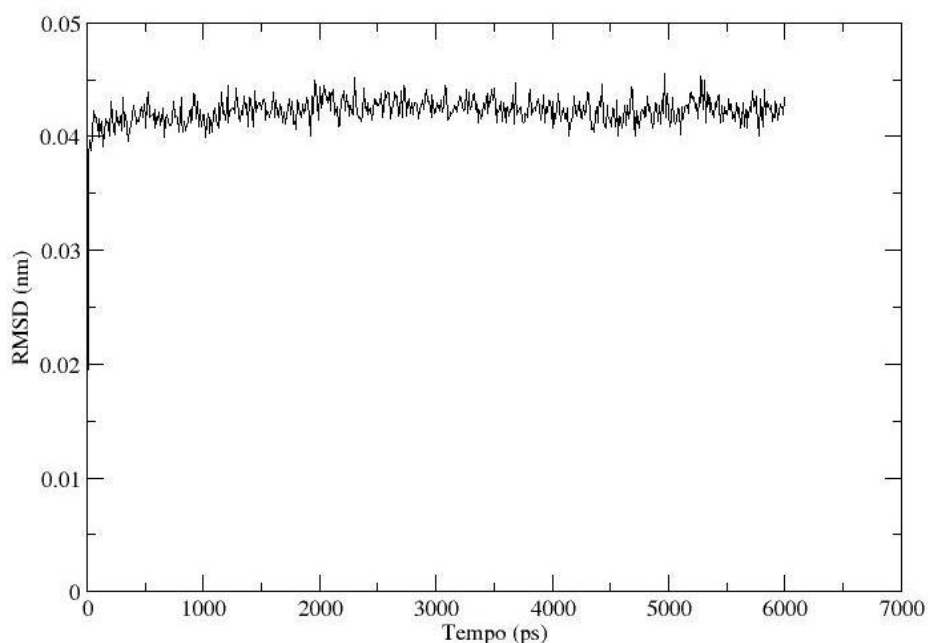


Figura 61: Estrutura média do complexo de inclusão após 56 nano segundos de simulação. Em azul, vinte moléculas de rifampicinas encapsuladas na estrutura do dendrímero em pH neutro.

6.6.2 Análise de RMSD (Fase de Equilíbrio)

Nesta fase de dinâmica, as posições dos átomos pesados do dendrímero foram mantidas fixas, enquanto as moléculas de rifampicina e do solvente eram relaxadas em torno da estrutura. As dinâmicas foram realizadas durante 6000 ps, e ao final foi medido o RMSD. O resultado de RMSD mostra que os valores estão oscilando em torno de um ponto o que caracteriza o equilíbrio. A Figura 62 mostra o RMSD contra o quadro anterior para o complexo em pH neutro.



.Figura 62:RMSD na fase de equilíbrio do complexo de Inclusão.

6.6.3 Energia Cinética e Total do Sistema na (Fase de Equilíbrio)

A energia cinética e total foram medidas para avaliar o equilíbrio durante estes 6 ns iniciais na fase de equilíbrio. Estas energias após certo instante oscilaram em torno de um valor constante, o que caracteriza o equilíbrio deste sistema.

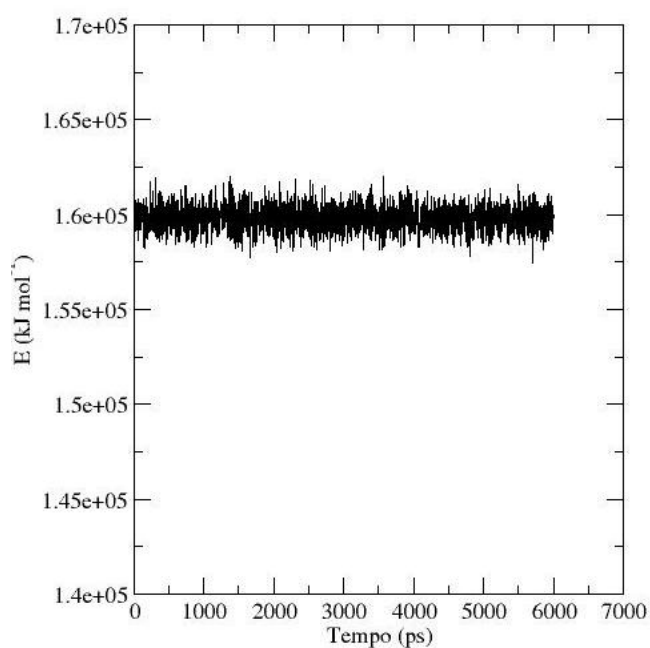


Figura 63: Gráfico de energia cinética.

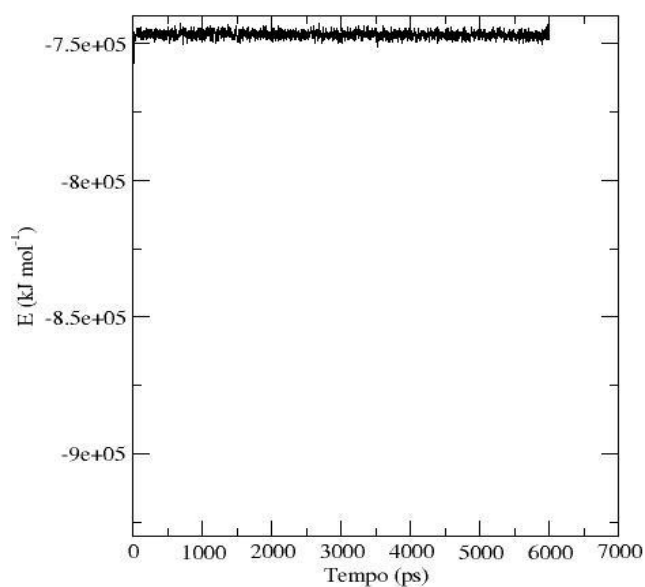


Figura 64: Energia total do sistema simulado.

6.6.4

Fase de Produção

Na fase de produção, o dendrímero pode sofrer movimentos de todos os átomos de sua estrutura, assim como o solvente e as moléculas de rifampicina, ao final de 50 nano segundos de simulação foram medidas propriedades de raio de giro, energia total e cinética para

verificar assim o equilíbrio do sistema. As médias foram tomadas durante os 10 nano segundos finais da simulação.

6.6.5 Análise de RMSD (Fase de Produção)

O RMSD foi calculado comparando a estrutura das moléculas que estão encapsuladas no dendrímero com a estrutura deste, onde é observado que não há uma mudança brusca curva ao longo da trajetória o que caracteriza um equilíbrio neste intervalo de tempo.

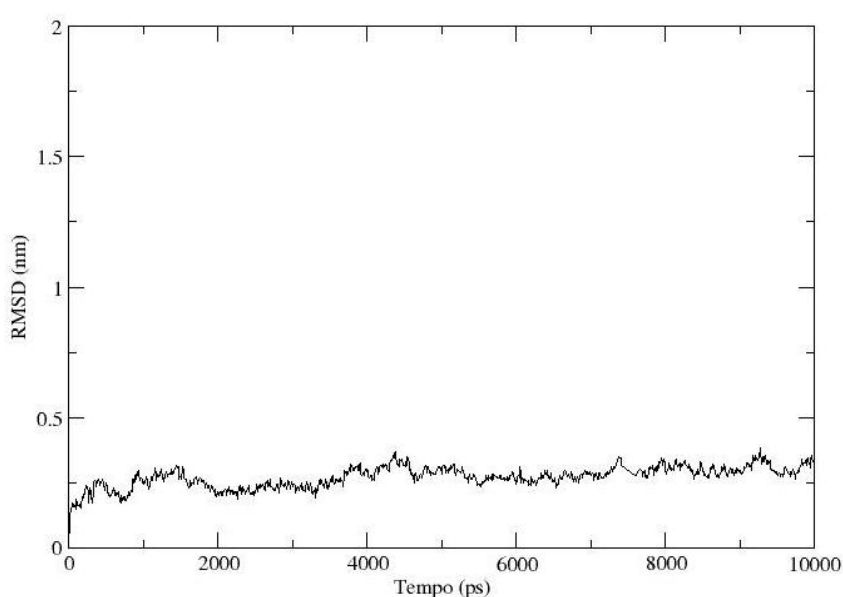


Figura 65: RMSD durante a trajetória entre rifampicinas e dendrímero.

6.6.6 Energia Cinética e Total do Sistema (Fase de Produção)

As energias cinética e total do complexo de inclusão se encontravam oscilando em torno de um valor durante estes 10 ns finais de simulação o que caracterizou o equilíbrio do sistema.

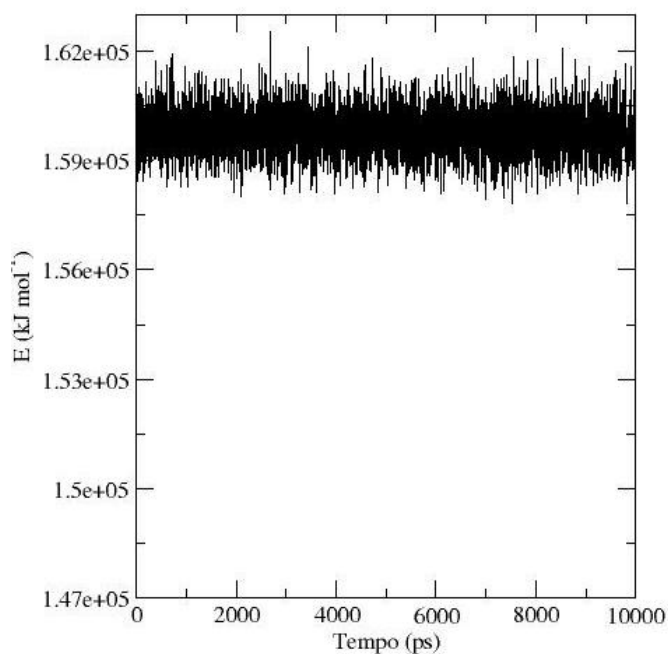


Figura 66: Energia cinética do sistema na fase de produção.

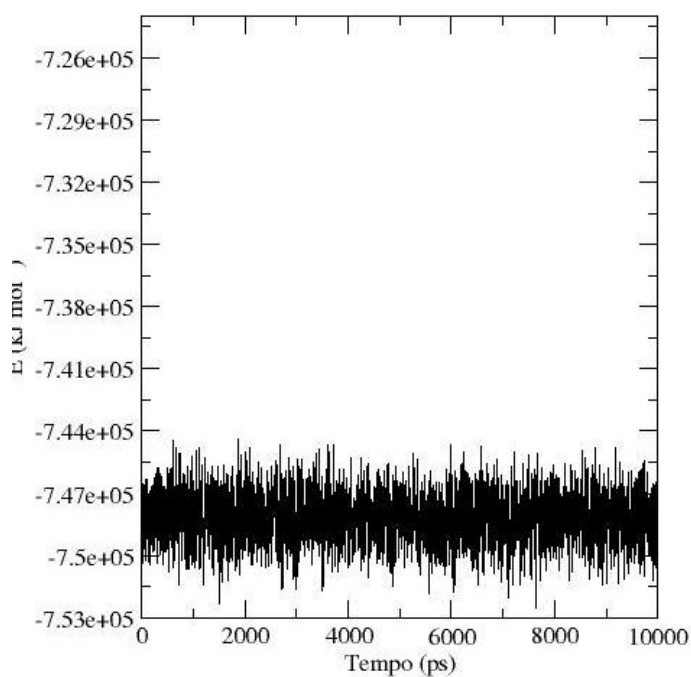


Figura 67: Energia total do sistema.

6.6.7

Raio de Giro

O objetivo desta análise é avaliar se o dendrímero sofreu alguma compactação ou não em função das moléculas inseridas encapsuladas dentro de sua estrutura. A tabela 28 mostra a média dos resultados.

De	Des	DRFP	Des	RX	Des	RY	Des	Rz	Des
1,9	$\pm 0,03$	2,0	$\pm 0,01$	1,7	$\pm 0,02$	1,6	$\pm 0,03$	1,5	$\pm 0,03$

Tabela 28: Raio de giro. Onde De é o raio de giro do dendrímero, DRFP é o raio de giro do dendrímero com as 20 moléculas de rifampicina incluídas e Des é o desvio padrão.

Observando a tabela 28, pode-se observar que o dendrímero quando tem 20 moléculas de rifampicina encapsuladas em seu interior aumenta seu raio de giro em 2,5%, o que não é um grande aumento na sua topologia, podendo indicar que as moléculas estão interagindo mais fortemente na superfície do PAMAM, com aminas primárias.

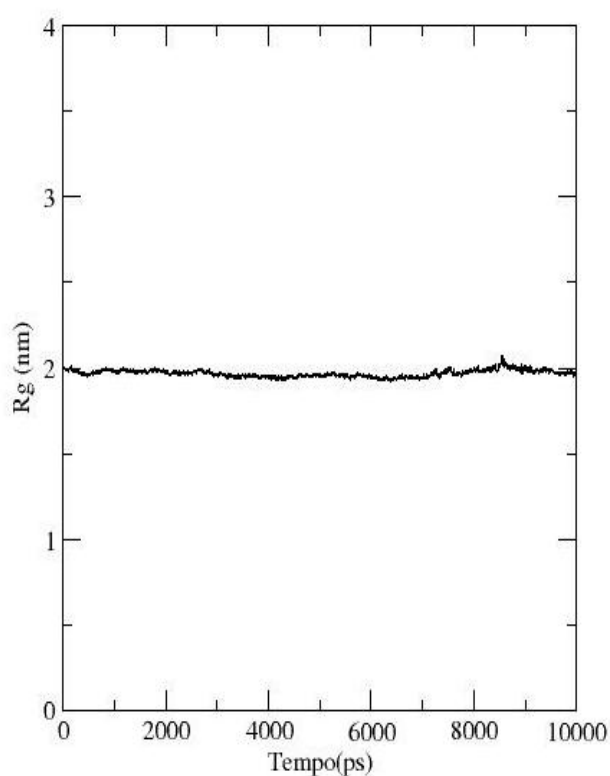


Figura 68: Raio de giro do dendrímero com 20 moléculas de rifampicina encapsuladas em seu interior.

6.6.8

Número de Moléculas de Água Interiores ao Dendrímero

Nesta análise é avaliada a penetração de moléculas de solvente no interior do dendrímero, sem e com as 20 moléculas encapsuladas em sua estrutura. Esta análise é tomada traçando-se um raio em torno do centro de massa do dendrímero considerando a estrutura média da simulação.

Rifampicina	5A	0,75nm	1nm	15nm	20nm
SEM	14	42	95	299	766
COM	2	7	20	138	478

Tabela 29: Número de moléculas de água inseridas no interior do dendrímero. Onde SEM significa a estrutura do dendrímero sem moléculas de rifampicina acopladas. COM é a estrutura quando as moléculas estão inseridas

Observando a tabela 29, pode ser notado que quando são inseridas moléculas de rifampicina à medida que se aproxima do núcleo do dendrímero, há uma grande dificuldade de penetração de moléculas de água.

Este resultado está ligado à geometria das cavidades estarem preenchidas e por interações entre as moléculas de rifampicina e aminas primárias da superfície, que impedem a entrada de moléculas do solvente. As rifampicinas podem estar fazendo entre outras, ligações de hidrogênio com o dendrímero evitando estas ligações com moléculas do solvente.

Analisando a média de ligações de hidrogênio, pode ser notado através da tabela 30 que quando inseridas 20 moléculas de rifampicina na estrutura do dendrímero, o número de ligações de hidrogênio com o solvente é 30 vezes menor em média considerando o caso onde o dendrímero possui em sua estrutura moléculas de rifampicina. Este fato, além do preenchimento das cavidades por moléculas de rifampicina explica o fato da redução de moléculas do solvente nas cavidades.

Rifampicina	Média	Desvio
SEM	471,251	$\pm 9,31$
COM	441,177	$\pm 9,72$

Tabela 30: Ligações de hidrogênio, com dendrímero complexado com rifampicina e sem estas moléculas. Onde média denota o número de ligações de hidrogênio médias durante a dinâmica.

6.6.9 Mudanças Estruturais das Moléculas de Rifampicina

Devido à grande mobilidade da estrutura do dendrímero, nesta análise avaliamos as diferenças de conformação das moléculas de rifampicina encapsuladas no interior do dendrímero devido à mobilidade. O RMSD foi utilizado para avaliar estas mudanças geométricas e foi implementado em um programa através da equação 1.46. A tabela 31 mostra as mudanças geométricas das moléculas de rifampicina no início da dinâmica e na estrutura tomada como média da simulação.

$$RMSD = \left[\frac{1}{M} \sum_{I=1}^N \|r_{i,E1} - r_{i,E2}\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (50)$$

Onde E_1 e E_2 representam a estrutura 1 e 2 respectivamente. M é o número de átomos de uma das moléculas.

Molécula de Rifampicina	RMSD
1	30,31
2	27,25
3	19,22
4	37,54
5	35,91
6	41,81
7	35,68
8	21,81
9	28,71
10	31,93
11	26,89
12	23,79
13	39,94
14	29,69
15	35,03
16	31,11
17	27,49
18	21,61
19	34,97
20	39,89

Tabela 31: RMSD entre moléculas de rifampicina.



Figura 69: RMSD entre a conformação inicial e a estrutura média da dinâmica.

Através da Tabela 31 e da Figura 69 pode se observar que a grande flexibilidade do dendrímero durante a simulação por dinâmica molecular leva a uma grande mobilidade das moléculas acopladas em seu interior durante estes 56 ns de simulação. Estas mudanças geométricas mantêm a formação do complexo de inclusão, pois ocorrem através de interações eletrostáticas entre dendrímero-dendrímero, dendrímero molécula de rifampicina e rifampicina-rifampicina. Estes resultados sugerem também um algoritmo de acoplamento que considere o receptor flexível.

6.6.10 Distribuição Radial

Na figura é apresentada a distribuição radial em torno do centro de massa do dendrímero, onde estão inseridas as 20 moléculas. As distribuições indicam mudanças de conformação na estrutura do dendrímero, quando comparada a curva radial do dendrímero com vinte moléculas de rifampicina e este sem moléculas.

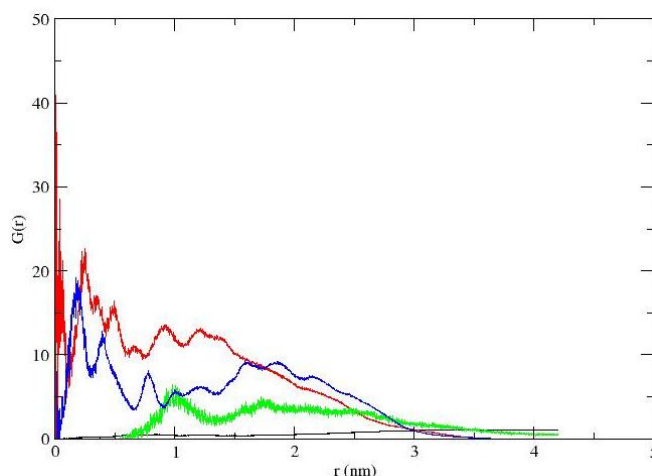


Figura 70: Distribuição radial do complexo de inclusão, onde em vermelho esta representada a curva do dendrímero, em preto a do solvente, em verde os íons e em azul as moléculas de

Nesta análise, características estruturais do dendrímero são modificadas. Através da curva vermelha no gráfico nota-se uma distribuição de átomos do dendrímero um pouco mais afastada do centro, o que indica uma mudança estrutural na geometria do dendrímero após as moléculas de rifampicina serem inseridas, indicando um dendrímero em pH neutro com suas maiores densidades atômicas um pouco mais afastadas do centro.

Através curva em azul no gráfico pode ser notada uma distribuição das moléculas de rifampicina mais afastada do centro do dendrímero. A maior densidade de átomos ocorre a menos de 0,5 nm do centro. Os três picos na curva em azul denotam uma maior concentração de átomos de rifapicina nestas regiões, indicando que as moléculas estão encapsuladas mais para a periferia do dendrímero.

Os íons de Cl^- estão distribuídos em torno de 1nm do centro de massa do dendrímero, o que pode indicar que moléculas de rifampicina mais interiores dificultam a entrada destes mais interiormente na estrutura do dendrímero.

Considerando as moléculas de água, pode ser notado através da curva em negro que estas possuem uma densidade pouco acentuada quanto mais se aproxima do centro de massa do dendrímero. Este resultado indica que o solvente circunda a periferia do dendrímero.

6.6.11 Análise de ligações de hidrogênio

Devido à irregularidade das cavidades do dendrímero e por ele apresentar um número relativo de cavidades não polares, faz com que o dendrímero tenha capacidade de encapsular moléculas também por interações hidrofóbicas. Aminas terciárias e grupos amida nas cavidades internas do dendrímero PAMAM G4 podem interagir com átomos específicos (nitrogênio e oxigênio) ou grupos funcionais (carboxilas e hidroxilas) que são encontrados na molécula de rifampicina, estas interações ocorrem através de ligações de hidrogênio. A molécula de rifampicina é pouco solúvel em água, e o encapsulamento destas no interior do dendrímero pode aumentar sua solubilidade como pode ser notado na tabela 32.

Ligações de Hidrogênio	Tempo de vida(ps)	Média	Desv
DEN-DEN	16,38	13,85	±2,91
DEN-RFP	4,72	6,08	±1,78
RFP-RFP	5,88	37,69	±3,82

Tabela 32: Tabela que apresenta os resultados das ligações de hidrogênio no 10 ns finais de simulação, DEN-DEN representam as ligações entre os átomos do dendrímero, DEN-RFP ligações de hidrogênio entre dendrímero e rifampicina e RFP-RFP ligações de hidrogênio entre moléculas de rifampicina. Tempo de vida significa a duração média de uma ponte de hidrogênio.

1) Dendrímero-Dendrímero

As ligações de hidrogênio intramoleculares do dendrímero estão relacionadas com as interações do grupamento amina terminal do dendrímero com átomos de oxigênio da sua própria estrutura. Estas interações ocorrem quando durante a dinâmica molecular do dendrímero os seus braços entram na estrutura, formando assim estas ligações.

2) RFP-RFP-Dendrímero

Uma das interações que mantém o complexo de rifampicina-dendrímero formado são as ligações hidrogênio entre as moléculas do dendrímero e a rifampicina e as interações entre rifampicina-rifampicina, o que faz com que o complexo seja mais fortemente mantido.

6.6.12

Deslocamento Médio das Moléculas no Complexo

Para esta análise foi desenvolvido um algoritmo que calcula a média das distâncias de uma determinada molécula ao centro de massa do dendrímero, a cada passo de simulação. Essa média é tomada durante os 10 ns finais da simulação, com a molécula em equilíbrio. Foram consideradas como encapsuladas moléculas a uma distância média inferior a 3,9 nm do centro de massa do dendrímero de acordo com a distribuição radial realizada anteriormente.

Molécula	Início	Médias	Desv
1	3,536	0,838	$\pm 0,020$
2	3,618	1,588	$\pm 0,027$
3	1,193	2,284	$\pm 0,037$
4	2,442	2,518	$\pm 0,047$
5	2,937	1,698	$\pm 0,027$
6	3,333	2,773	$\pm 0,054$
7	2,183	2,019	$\pm 0,034$
8	1,154	2,423	$\pm 0,037$
9	2,169	2,157	$\pm 0,024$
10	1,525	3,651	$\pm 0,204$
11	2,151	2,740	$\pm 0,136$
12	3,444	2,318	$\pm 0,047$
13	2,410	3,130	$\pm 0,158$
14	2,965	1,100	$\pm 0,024$
15	2,606	2,352	$\pm 0,033$
16	3,768	1,904	$\pm 0,039$
17	3,159	2,922	$\pm 0,064$
18	1,876	2,474	$\pm 0,040$
19	3,836	1,384	$\pm 0,027$
20	2,661	2,005	$\pm 0,033$

Tabela 33: Distância média em nanômetros entre moléculas e o centro de massa do dendrímero. Onde início representa a conformação inicial e médias são as médias das distâncias a cada passo da dinâmica.

Pode ser notado através dos resultados da tabela 33 que a flexibilidade do receptor provoca mudanças na conformação e deslocamento das moléculas de rifampicina no interior da estrutura do dendrímero. Este fato está ligado a forças atrativas e repulsivas entre moléculas e braços do dendrímero. Esta flexibilidade pode levar as moléculas a interações que estas não realizavam em uma determinada conformação. A tabela 33 indica que 65% das moléculas entraram

ainda mais na estrutura do dendrímero ao longo da dinâmica molecular e 35% destas se deslocaram mais para fora devido a dar espaço para o acoplamento mais adequado de algumas destas moléculas. Analisando a distribuição radial pode-se notar que com um afastamento de 3,9 nm do centro as moléculas se encontram na periferia do dendrímero, estes resultados mostram que umas grandes partes destas rifampicinas estavam interagindo com aminas da superfície do dendrímero. A próxima seção faz uma discussão das interações que mantêm o complexo estável.

Dinâmica Molecular da Liberação Controlada

Temperatura: 310K

Pressão: 1atm

Algoritmo de acoplamento de pressão: Berendsen

Algoritmo de acoplamento de Temperatura: Berendsen

Tempo Total simulado: 56 nano segundos ~ 56 dias.

6.7

Liberação das moléculas de Rifampicina (Dendrimer em pH Ácido).

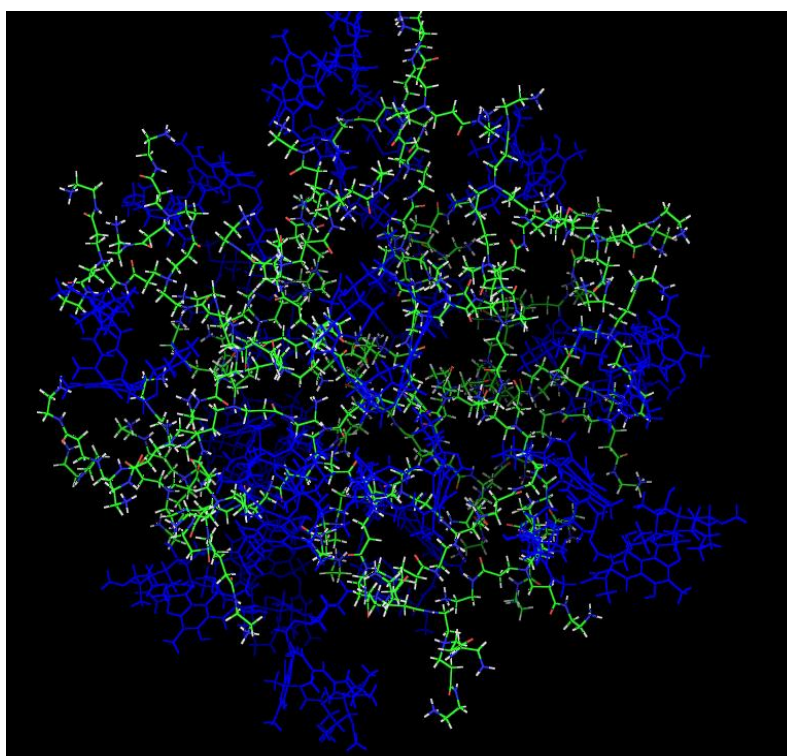
6.7.1

Liberação das Rifampicinas

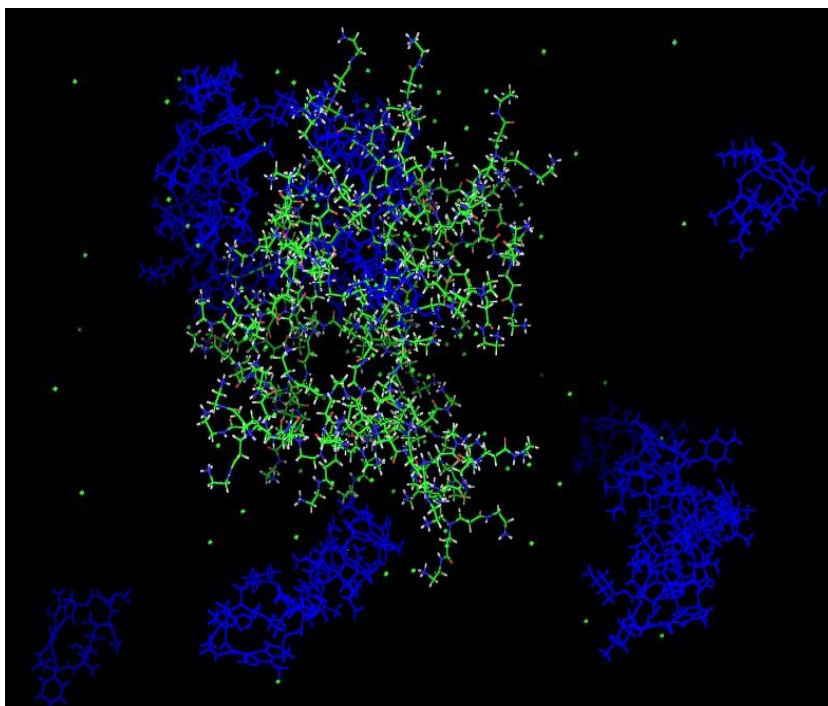
A rifampicina possui atividade em pH 5, que é o pH encontrado no interior dos macrófagos. Considerando este pH a molécula sofre uma protonação (pH em torno de 5).

A molécula do dendrímico devido a ação do pH ácido teve suas aminas primárias e terciárias totalmente protonadas, o que está de acordo com a literatura para este pH.

Após a modelagem das moléculas o algoritmo desenvolvido neste trabalho foi utilizado para a inserção de 20 moléculas de rifampicina na estrutura do dendrímico, após esta inclusão o complexo foi simulado através de dinâmica molecular em duas fases como nas análises anteriores.



a) Complexo de inclusão no início da simulação, onde as moléculas de rifampicina são representadas em azul.



b) Estrutura média da dinâmica durante 4 nano segundos, representando a liberação controlada.

Figura 71: Estruturas de liberação do complexo.

6.7.2

Energia Cinética e Total do Sistema (Fase de Equilíbrio)

As energias cinética e total do complexo de inclusão se encontravam oscilando em torno de um valor durante estes 4 nano segundos de simulação o que caracterizou o equilíbrio do sistema.

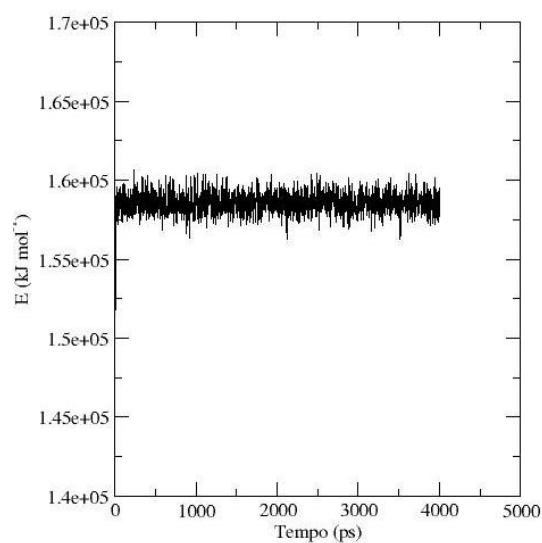


Figura 72: Energia cinética do sistema.

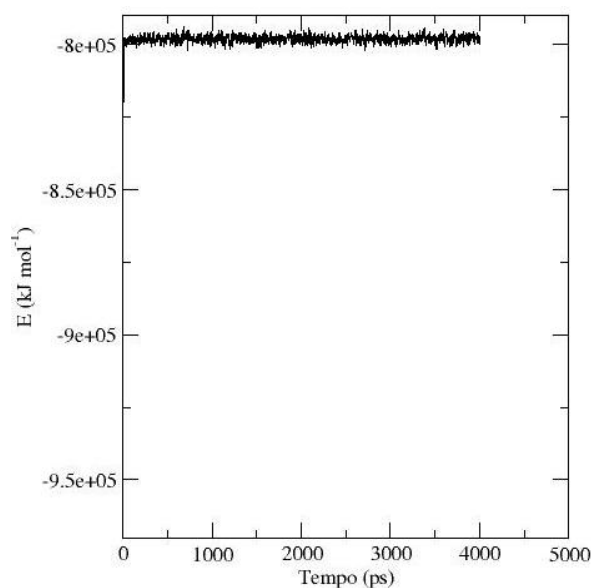


Figura 73: Energia total do sistema.

6.7.3 Análise de RMSD (Fase de Equilíbrio)

Nesta análise foi observado o gráfico de RMSD das moléculas de rifampicina e o dendrímero, a cada passo de simulação. O objetivo é avaliar se as moléculas estão acopladas durante esta dinâmica ou se estão sendo liberadas da estrutura.

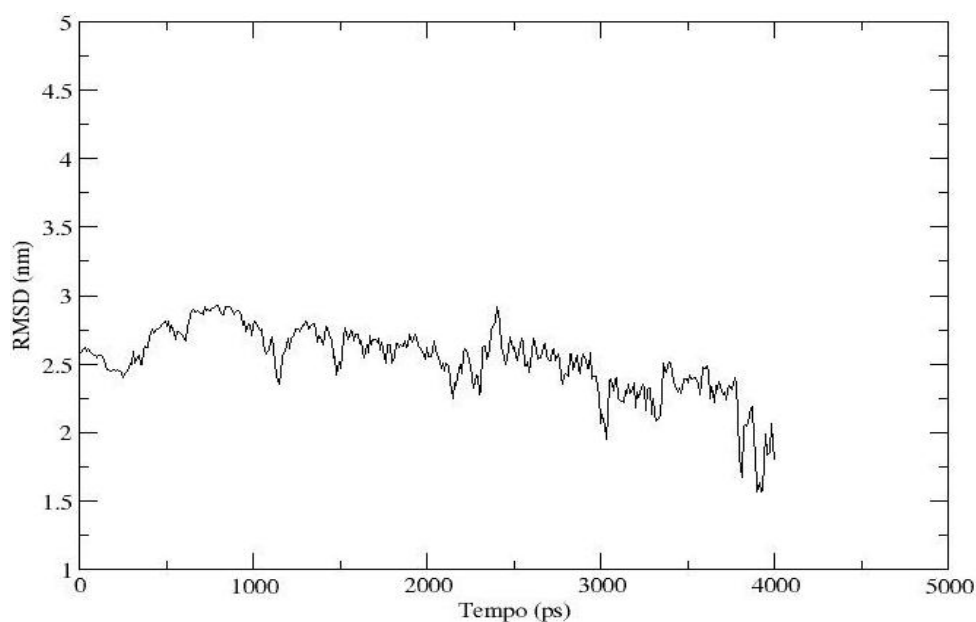


Figura 74: Gráfico de RMSD das moléculas de dendrímero contra a estrutura do dendrímero comparadas a cada quadro da dinâmica.

Pode ser observado através da figura 75, que a curva de RMSD sofre grandes oscilações. Este fato indica que as moléculas estão mudando muito suas conformações à medida que a dinâmica prossegue o que pode indicar que através da protonação do sistema, a repulsão entre estes grupos pode ter levado a liberação das moléculas.

6.7.4

Raio de Giro (Fase de Equilíbrio)

A análise de raio de giro descreve se houve algum aumento ou redução da estrutura quando se tem 20 moléculas de rifampicina acopladas no interior.

Den	Desv	DRFP	Desv
2,13	±0,003	2,19	±0,001

RX	Desv	RY	Desv	Rz	Desv
1,90	±0,001	1,77	±0,001	1,68	±0,001

Tabela 34: Raio de giro comparando dendrímero com moléculas inseridas e sem estas. Onde Den é o raio de giro sem moléculas de rifampicina e DRFP denota o raio de giro quando estas moléculas estão no interior do dendrímero.

De acordo com a Tabela 34, pode se notar que o aumento do raio de giro quando estão inseridas as 20 moléculas de rifampicina no dendrímero não é expressivo o que pode significar que estas estão preferencialmente na periferia deste sendo expulsas das cavidades através de interações com aminas da periferia do dendrímero.

6.7.5

Liberação Sustentada (Fase de Equilíbrio)

Nesta análise é avaliada a distância das moléculas de rifampicina ao centro de massa do dendrímero indicando quantas dessas já foram liberadas.

No caso do tratamento da tuberculose o tratamento é longo e pode durar até 6 meses, mas assim que o paciente sofre melhora logo abandona os medicamentos e o bacilo se torna resistente a estes. Um transportador ideal seria aquele que transportasse a droga até o alvo de interesse, mas não liberando o medicamento de uma só vez, mas através de uma liberação controlada, isto é, que liberasse as drogas em quantidades ao longo do tempo, mantendo assim a dose terapêutica por

mais tempo, o que permitiria diminuir a quantidade de doses do medicamento por aumentar o trânsito da droga no organismo.

Nesta análise é avaliada a capacidade do dendrímero quanto a este fato. Considerando que as moléculas são liberadas quando estão a uma distância média maior que 3,9 nm do centro de massa do dendrímero, de acordo com a distribuição radial.

Molécula	Início(nm)	Médias(nm)	Desvio(nm)	Liberação
1	2,425	4,019	±0,417	
2	1,906	3,856	±0,124	
3	2,241	3,446	±0,111	
4	3,483	5,041	±0,291	LIBERADA
5	3,084	4,079	±0,366	
6	3,073	4,536	±0,305	LIBERADA
7	2,650	2,615	±0,085	
8	2,630	3,637	±0,338	
9	2,006	2,907	±0,142	
10	3,900	2,385	±0,067	
11	2,822	5,418	±0,366	LIBERADA
12	2,021	4,065	±0,271	LIBERADA
13	2,877	2,486	±0,0,93	
14	1,595	1,986	±0,092	
15	3,796	3,431	±0,145	
16	3,728	2,671	±0,071	
17	3,082	5,714	±0,297	LIBERADA
18	2,562	3,443	±0,178	
19	3,729	2,495	±0,118	
20	3,538	4,437	±0,377	LIBERADA

Tabela 35: Distância média das moléculas de rifampicina ao centro de massa do dendrímero. Onde LIBERADA significa as moléculas que foram liberadas do complexo.

De acordo com a tabela 35 já nesta fase, as moléculas de rifampicina começaram a ser liberadas. Seis moléculas foram liberadas nesta fase, indicando um bom resultado devido a esta análise mostrar uma liberação sustentada. Este tipo de liberação é o que se espera de um bom nanocarreador, isto é, que libere as moléculas por partes mantendo assim a dose terapêutica por mais tempo.

Destas moléculas 14 ficaram mais afastadas, comparadas ao início da simulação durante estes 4 nano segundos de simulação, o que é mais um fator para a liberação controlada das moléculas de rifampicina.

6.7.6 Ligações de Hidrogênio (Fase de equilíbrio)

Devido à protonação de aminas do interior do dendrímero, a repulsão destas com as aminas da superfície fazem com que haja repulsão entre estes grupamentos provocando a abertura da estrutura do dendrímero, o que pode ser um dos fatores que leva a liberação da droga. Devido também a estas protonações e a protonação da molécula de rifampicina grupamentos que faziam ligações de hidrogênio agora sofrem repulsões destas aminas contribuindo para liberar as moléculas de rifampicina. A tabela 36 descreve os resultados do número de ligações de hidrogênio, mostrando que há uma redução de 77,51% na média durante a dinâmica no número de ligações.

pH	Ligações hidrogênio complexo	Desvio
Ácido	1,36	±1,05
Neutro	6,08	±1,78

Tabela 36: Ligações de hidrogênio médias comparadas.

6.7.7 Energia Cinética e Total do Sistema (Fase de Produção)

As energias cinética e total do complexo de inclusão se encontravam oscilando em torno de um valor após estes 50 ns de simulação onde os 10 ns finais forma medidos para avaliar o equilíbrio do sistema.

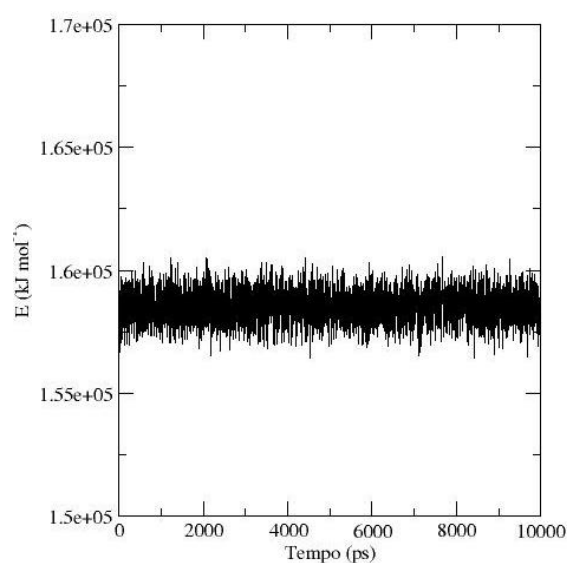


Figura 75: Energia cinética Fase de produção.

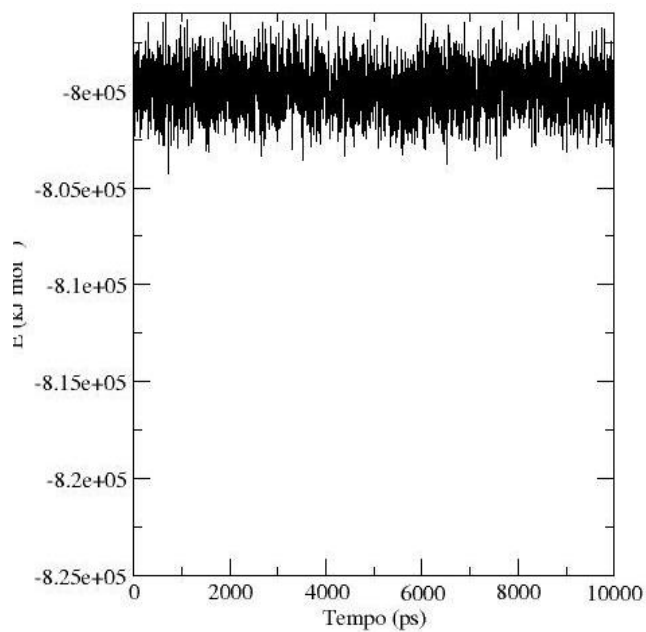


Figura 76: Energia total do sistema.

6.7.8 RMSD(Fase de Produção)

Nesta análise é avaliado o desvio quadrático médio entre as moléculas de rifampicina e o dendrímero com o intuito de avaliar a liberação controlada da molécula do dendrímero.

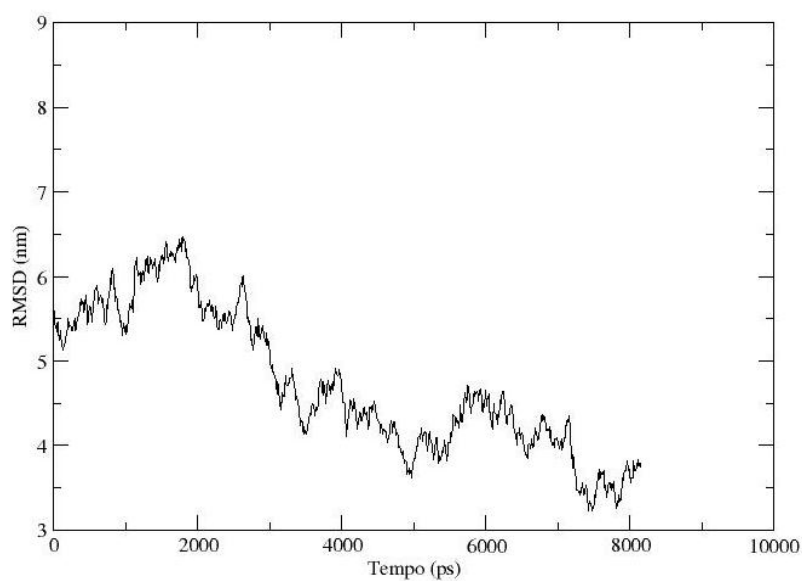


Figura 77: RMSD das moléculas de rifampicina em relação ao dendrímero.

Através do gráfico da Figura 77, pode ser notado que a partir de 2000 picos segundos de simulação, o gráfico começa uma grande oscilação. Este fato indica uma variação das moléculas de rifampicina levando em consideração o local onde estas estão encapsuladas. Estas moléculas podem então estar sendo liberadas continuamente, mas não uma liberação imediata, mas sim sustentada, o que mostra que o dendrímero realmente tem capacidade de manter a dose terapêutica por mais tempo de moléculas de rifampicina.

6.7.9

Continuação da Liberação Sustentada (Fase de Produção)

Mol	Média	Desvio	Liber	Média (44ns)	Desvio	Liber
1	4,019	±0,417		69,55	±2,49	Liberada
2	3,856	±0,124		25,42	±2,33	
3	3,446	±0,111		42,05	±2,41	Liberada
4	5,041	±0,291	Liberada	63,31	±3,50	Liberada
5	4,079	±0,366		67,42	±6,55	Liberada
6	4,536	±0,305	Liberada	71,95	±4,98	Liberada
7	2,615	±0,085		28,94	±4,20	
8	3,637	±0,338		61,16	±5,83	Liberada
9	2,907	±0,142		44,76	±4,81	Liberada
10	2,385	±0,067		63,66	±4,82	Liberada
11	5,418	±0,366	Liberada	48,85	±5,42	Liberada
12	4,065	±0,271	Liberada	58,54	±4,41	Liberada
13	2,486	±0,093		49,25	±4,75	Liberada
14	1,986	±0,092		33,16	±2,15	
15	3,431	±0,145		15,32	±2,20	
16	2,671	±0,071		22,84	±2,05	
17	5,714	±0,297	Liberada	40,74	±1,40	Liberada
18	3,443	±0,178		44,38	±1,66	Liberada
19	2,495	±0,118		42,30	±0,95	Liberada
20	4,437	±0,377	Liberada	55,90	±6,33	Liberada

Tabela 37: Liberação das moléculas de rifampicina do complexo. Onde as distâncias são médias destas moléculas ao centro de massa do dendrímero. Onde mol representa o número da molécula, Liber se a molécula foi ou não liberada do complexo.

De acordo com a tabela 37, após 44 ns de simulação, mais moléculas foram liberadas do complexo, o que mostra os resultados que eram pretendidos no trabalho. Após este tempo, 15 moléculas foram liberadas, sendo que inicialmente 6 destas já haviam sido libertadas do complexo. As outras moléculas ainda encapsuladas sofreram uma mudança de posição sendo que podem estar complexadas por forças eletrostáticas ou ligações de hidrogênio no interior do dendrímero. Este fato é promissor, pois indica que o dendrímero pode manter a dose terapêutica por um longo tempo, liberando algumas moléculas tardiamente.

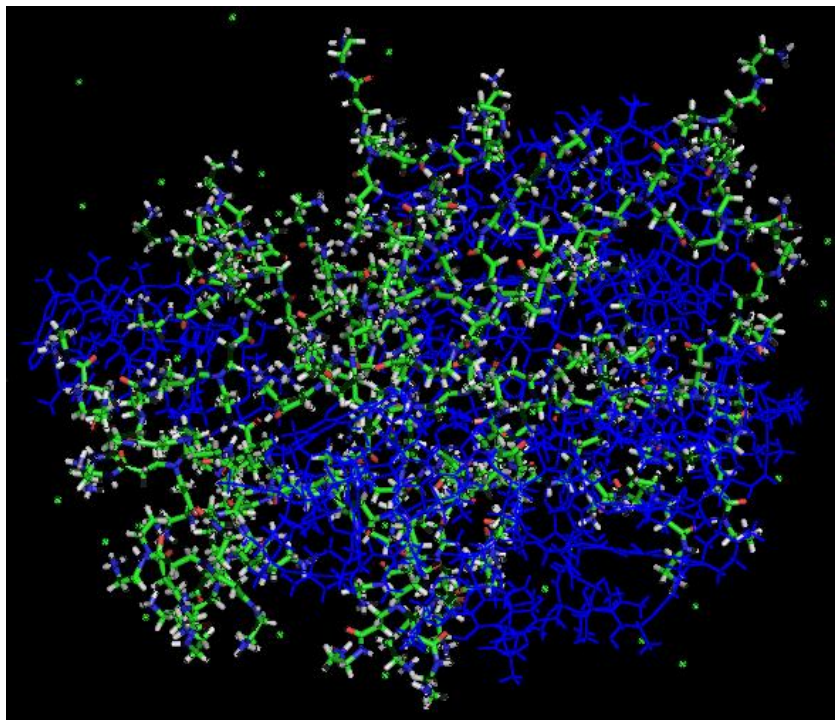


Figura 78: Complexo de inclusão com 20 moléculas de rifampicina. Onde o pH considerado é neutro.

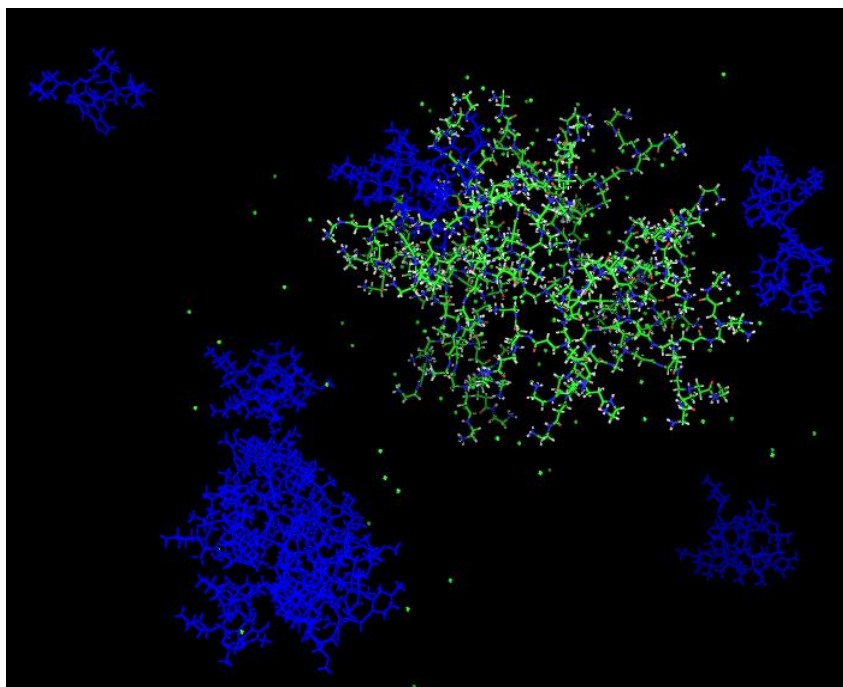


Figura 79: Liberação sustentada das moléculas de rifampicina após 44 ns .