

## 6 Resultados e Discussões

### 6.1. Verificação e Validação

Antes de fazer conclusões sobre observações de uma série de resultados obtidos de experimentos, é importante validar os modelos usados. A validação de modelos é especialmente importante quando se usam modelos computacionais.

Em pesquisas experimentais muitas vezes é evidente quando um experimento apresenta resultados imprecisos. No entanto, as análises utilizando modelos computacionais podem apresentar resultados aparentemente representativos dos sistemas reais ainda contendo muitos erros na metodologia. Em consequência nas simulações computacionais a validade dos resultados é de muita importância.

Segundo van Gunsteren (VAN GUNSTEREN; MARK, 1998), cinco quesitos devem ser validados quando simulações moleculares são usadas: a qualidade do nível teórico; a precisão do campo de força usado; o grau estatístico de amostragem e de convergência da simulação; a qualidade do programa computacional usado; e quão bem o programa computacional é utilizado.

Por isso é importante validar a metodologia usada comparando alguns parâmetros dos resultados obtidos com resultados experimentais. Somente depois destas validações e verificações é possível concluir sobre as questões dos fenômenos analisados.

A Difusão apresentada pelos fosfolípidios nos modelos é de DPPC e DPPC/DPPG/Colesterol é apresentado na seguinte tabela:

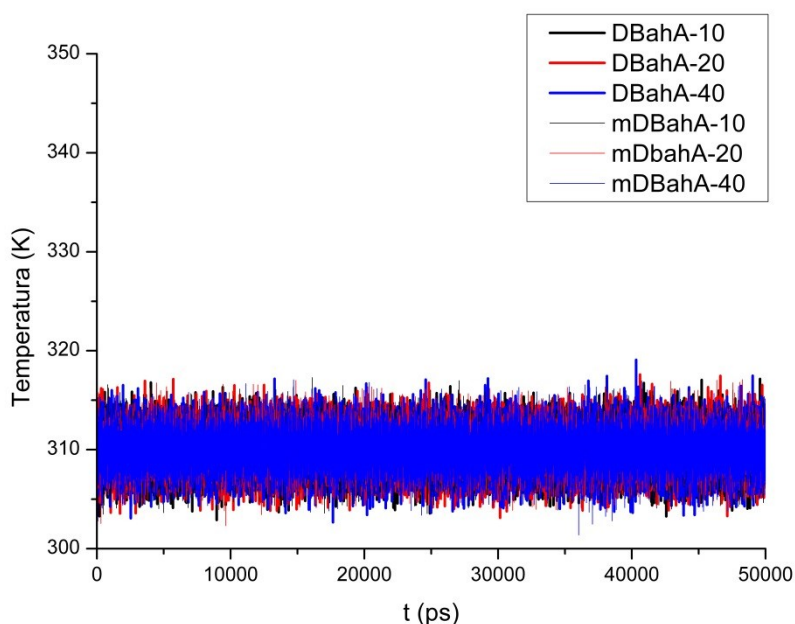
Modelo	DPPC	DPPC/DPPG/Colesterol
Difusão lateral ( $10^8 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	3±1	2±2

**Tabela 6-1 Coeficientes de difusão dos fosfolípidios nos modelos de DPPC e de DPPC/DPPG/Colesterol.**

### 6.1.1. Temperatura

Embora seja usado um acoplamento de temperatura, é possível que a temperatura de alguns grupos de moléculas não seja a mesma. No entanto, os compostos foram separados em dois grupos, as temperaturas do solvente e dos fosfolipídios que são acopladas independentemente.

Figura 6-1 mostra que a temperatura prevista de 310 K é encontrada no decorrer das simulações, e que os sistemas mantiveram-se acoplados na temperatura de 310 K.

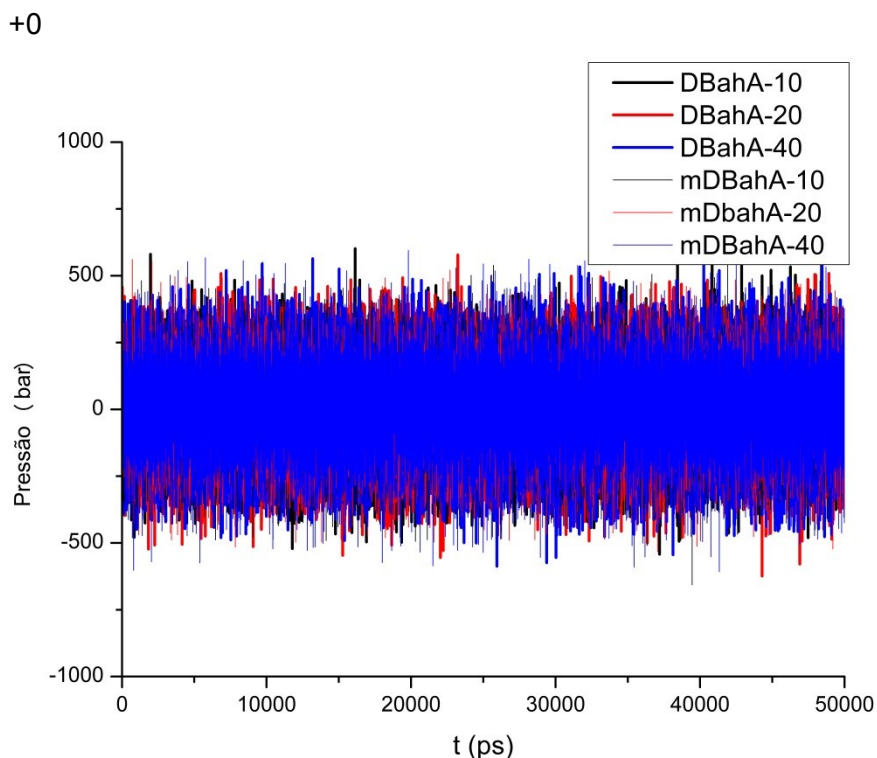


**Figura 6-1** Temperatura no decorrer da simulação para os sistemas simulados. As simulações com DbahA são representadas por linhas grossas e as do metabólito por linhas finas. Os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas são representados em preto, vermelho e azul, respectivamente.

### 6.1.2. Pressão

A pressão é uma propriedade difícil de acoplar, e sempre apresenta-se com flutuação grande. Alguns acoplamentos de pressão utilizam os valores de temperatura, então a pressão costuma ser dependente do acoplamento de temperatura que é usado. Nestas simulações, a temperatura e a pressão foram acopladas, mantendo acoplamentos relativamente restritos. Além disso, o acoplamento de temperatura (cada 0,5 ps) foi feito com maior frequência que o

acoplamento de pressão (cada 2 ps) para evitar artefatos nos valores da pressão.



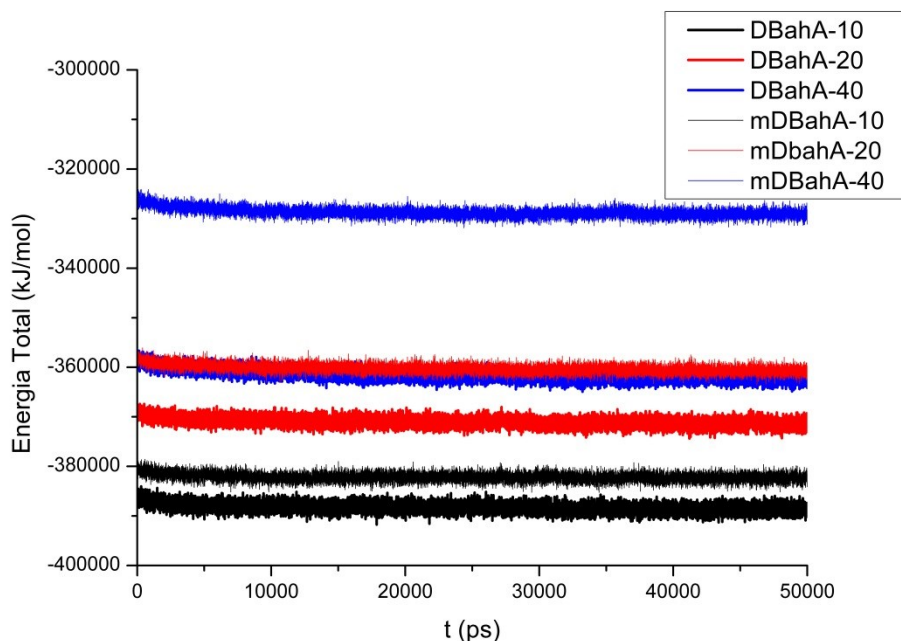
**Figura 6-2 Pressão no decorrer da simulação para os sistemas simulados. As simulações com DbahA são representadas por linhas grossas e as do metabólito por linhas finas. Os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas são representados em preto, vermelho e azul, respectivamente.**

Como foi ressaltado anteriormente o acoplamento de pressão depende muito do acoplamento de temperatura, fazendo com que os valores de pressão fltuem. No entanto, pode-se observar que os valores de pressão mostraram o mesmo comportamento em todos os sistemas (Figura 6-2).

### 6.1.3. Energia

Um parâmetro importante no momento de determinar se o sistema está em um estado de equilíbrio é o valor da energia no decorrer da simulação. Não obstante é necessário notar que o acoplamento usado é NPT, e não NVE, e portanto uma flutuação na energia não necessariamente significa um estado não representativo do acoplamento, mas é provável que represente um estado de transição, que não pode ser usado para calcular as propriedades do fenômeno em questão.

Como foi mencionado no capítulo da dinâmica molecular, a energia é resultado da soma da energia cinética das partículas e da energia potencial das interações entre as partículas. No seguinte gráfico mostra-se a energia total de cada um dos sistemas.



**Figura 6-3** Energia total no decorrer da simulação para os sistemas simulados. As simulações com DbahA são representadas por linhas grossas e as do metabólito por linhas finas. Os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas são representados em preto, vermelho e azul, respectivamente.

Na Figura 6-3 observa-se como os sistemas mantiveram a energia constante nos primeiros nanossegundos de simulação, indicando que os sistemas mantiveram-se estáveis no decorrer da simulação.

#### 6.1.4. Função de distribuição radial

No estado líquido os compostos estão menos ordenados do que no estado sólido. Não obstante eles apresentam algum grau de ordem estrutural. Uma forma de calcular a ordem estrutural de compostos na fase líquida é através da função de distribuição radial (RDF), que descreve a probabilidade de encontrar uma partícula  $j$  entre as distâncias  $r$  e  $r + dr$  de uma partícula  $i$ .

Em sistemas isotrópicos, como no caso de água líquida, a função de distribuição radial é medida sobre o volume que existe entre as esferas de raios  $r$  e  $r + dr$ . Este valor nos indica como as moléculas de água distribuem-se em

camadas. No entanto, as membranas não são sistemas isotrópicos em três dimensões.

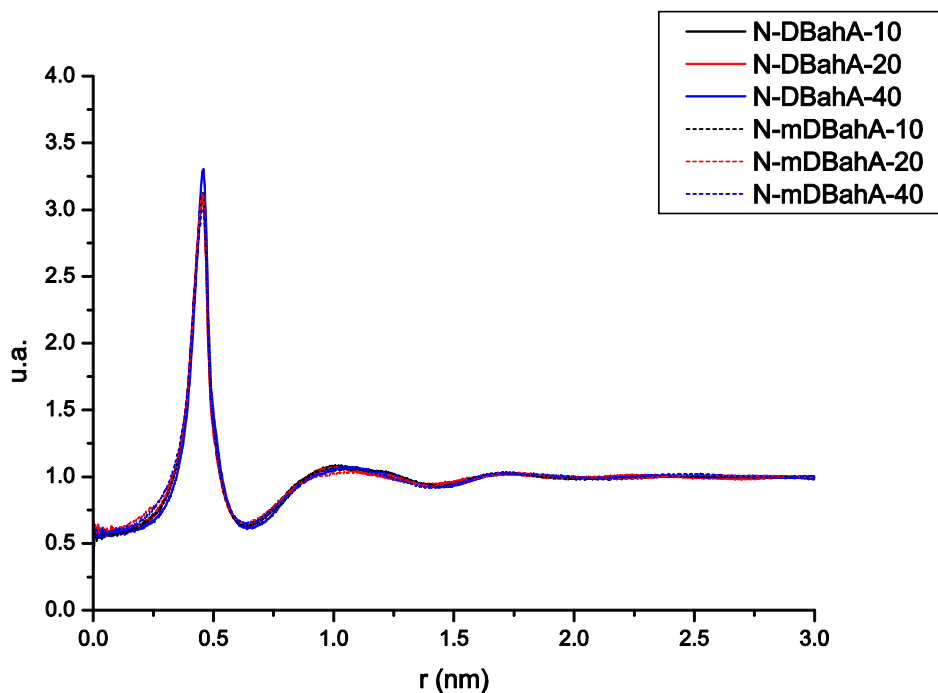
As funções de distribuição radial são ferramentas muito versáteis para analisar as características de uma grande variedade de fenômenos que ocorrem nos sistemas simulados. As seguintes características podem ser analisadas: o ordenamento entre os grupos carregados eletricamente dos fosfolípidios, o ordenamento das moléculas de água em relação a estes grupos, o nível de interação entre moléculas de dibenzo[a,h]antraceno ou de metabólito, etc.

As membranas têm a característica de serem sistemas isotrópicos em duas dimensões. As propriedades, características e fenômenos que ocorrem no plano horizontal ( $xy$ ) da camada são regulares nas duas dimensões. No entanto, o plano  $xy$  da camada e a dimensão normal à camada apresentam características diferentes. Portanto, para analisar o nível de ordem da bicamada é conveniente limitar a função de distribuição radial de acordo com a isotropia da membrana. Assim é conveniente calcular a função de distribuição radial sobre a área normal ao plano da bicamada. No caso destas simulações foram calculadas funções de distribuição radial sobre o plano  $xy$ , utilizando a distribuição radial  $RDF_{xy}$  é definida por (MARTINEZ-SEARA; RO, 2013):

$$RDF_{xy}(r) = \frac{\left\langle \frac{N_{dr}(r)}{A_{dr}(r)} \right\rangle}{\left( \frac{N_{tot}}{A_{tot}} \right)}$$

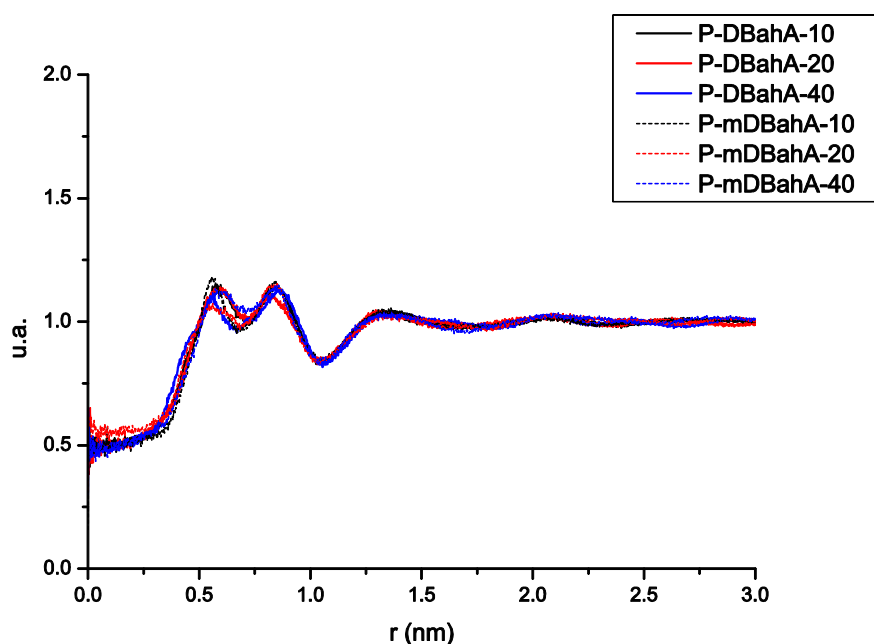
onde  $N_{dr}$  é o número de partículas que encontram-se entre os raios  $r$  e  $r + dr$ ,  $A_{dr}$  é a área do anel formado entre os raios  $r$  e  $r + dr$ ,  $N_{tot}$  é o número de partículas encontradas até o raio de corte  $R$ ,  $A_{tot}$  é a área total até o raio de corte  $R$ . Estas distribuições foram calculadas usando a função `g_rdf` do pacote de aplicações GROMACS.

Nesta dissertação é apresentada a função de distribuição radial duas dimensões, utilizando só os valores das coordenadas  $x$  e  $y$ , isto pela natureza semi-isotrópica dos sistemas. Assim, para calcular o rádio foi somente utilizada as dimensões paralelas ao plano da membrana. Resultando realmente na projeção da função de distribuição radial no plano da membrana. Este tipo de gráfico deve apresentar claramente as distribuições dentro do plano da membrana e na direção perpendicular à membrana de forma independente.



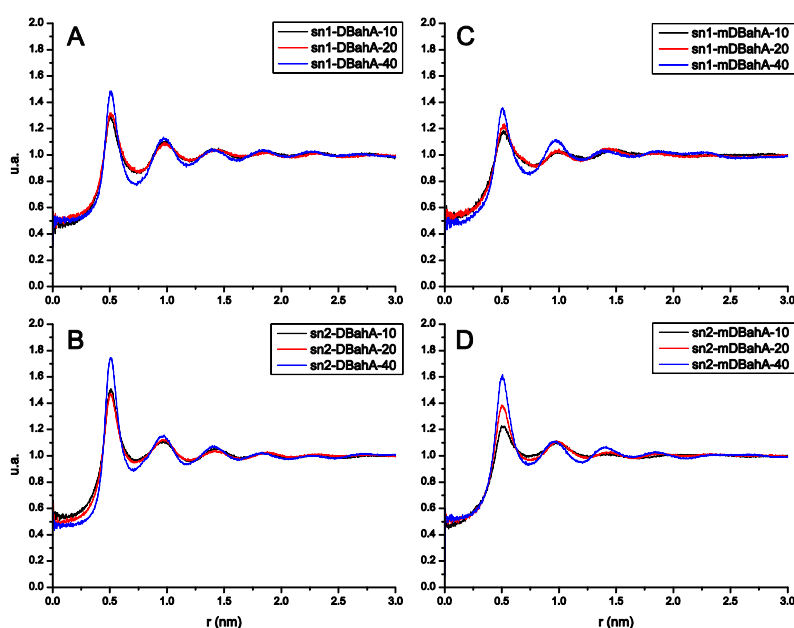
**Figura 6-4** Função de distribuição radial (FDR) entre os átomos de nitrogênio e fósforo (N-P) das cabeças polares de moléculas de DPPC nos sistemas com as moléculas de DBahA e de mDBahA. N-DBahA refere-se a FDR dos sistemas com DBahA e N-mDBahA a FDR dos sistemas com mDBahA. Apresenta as funções de distribuição radial entre fósforo e nitrogênio (P-N) para 10, 20 e 40 moléculas de DBahA e do mDBahA distribuídos aleatoriamente na bicamada fosfolipídica. Em relação a bicamada fosfolipídica sem DBahA e mDBahA.

Na Figura 6-4 não foi observado nenhuma influência do dibenzo[a,h]antraceno ou do metabólito. Esta falta de influência sobre ordenamento entre os átomos de fósforo e nitrogênio deve-se ao fato que o dibenzo[a,h]antraceno e o metabólito encontram-se suficientemente afastados das cabeças polares, não influenciando o ordenamento. O pico maior é resultado da existência de um fósforo e um nitrogênio na mesma molécula de DPPC.



**Figura 6-5 Função de distribuição radial (FDR) entre os átomos de fósforo (P-P) das cabeças polares de moléculas de DPPC nos sistemas com as moléculas de DBahA e de mDBahA. P-DBahA refere-se a fdr dos sistemas com DBahA e P-mDBahA a fdr dos sistemas com mDBahA.**

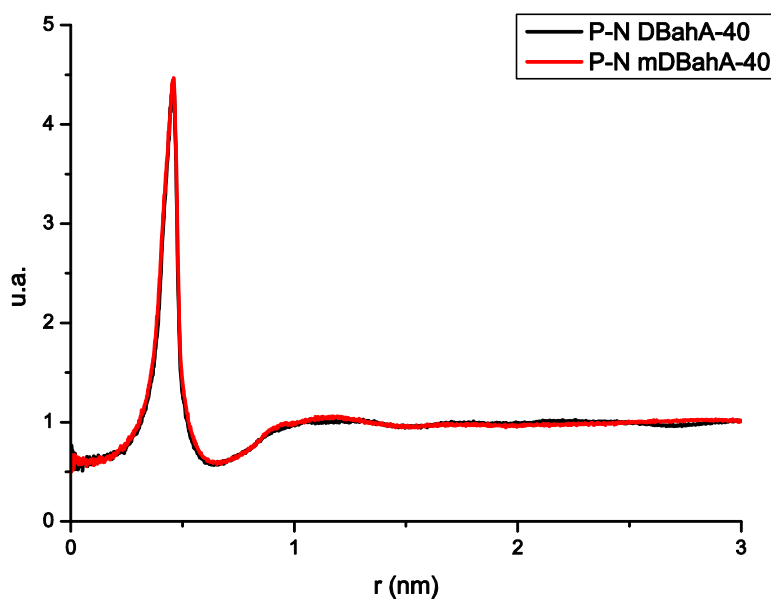
A Figura 6-5 apresenta as funções de distribuição radial entre fósforo e fósforo (P-P) para 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e do metabólito distribuídos aleatoriamente na bicamada fosfolipídica. O número de moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e do metabólito tem maior influência no ordenamento do que encontrado pela análise da função de distribuição radial entre átomos de fósforo e nitrogênio (P-N). Nesta distribuição o metabólito modifica em grau maior a distância entre átomos de fósforo. Esta modificação é resultado da localização do metabólito em relação ao dibenzo[a,h]antraceno. O metabólito fica posicionado mais perto das cabeças polares do que o dibenzo[a,h]antraceno, e o espaço usado pelo metabólito aumenta a distância entre as cabeças polares. Em consequência, a função de distribuição radial entre os átomos de fósforo do metabólito é mais modificada do que a do dibenzo[a,h]antraceno.



**Figura 6-6** Funções de distribuição radial (FDR) entre os centros de massa das cadeias hidrocarbônicas sn-1 (A,C) e sn2 (B,D) para 10, 20 e 40 moléculas de (A,B) DBahA e (C,D) do mDBahA).

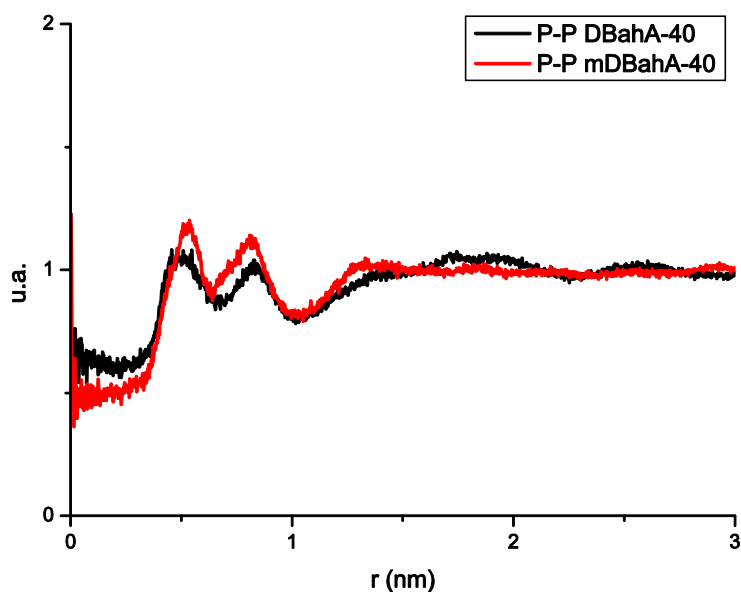
As funções de distribuição radial (FDR) entre os centros de massa das cadeias hidrocarbônicas sn-1 e sn-2 para 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e do metabólito distribuídos aleatoriamente na bicamada fosfolipídica são mostradas na Figura 6-6. Na função de distribuição radial entre os centros de massa das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios, foi observado um aumento da intensidade dos picos proporcional ao número de moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito. Este aumento na intensidade dos picos significa um maior ordenamento e uma menor fluidez ou liberdade de movimento das cadeias hidrocarbônicas. Este ordenamento é maior nos modelos com dibenzo[a,h]antraceno do que naqueles com metabólitos porque as moléculas de dibenzo[a,h]antraceno situam-se em locais mais próximos das cadeias hidrocarbônicas. Em consequência, dibenzo[a,h]antraceno interage mais com as cadeias hidrocarbônicas, diminuindo a liberdade de movimento das mesmas.





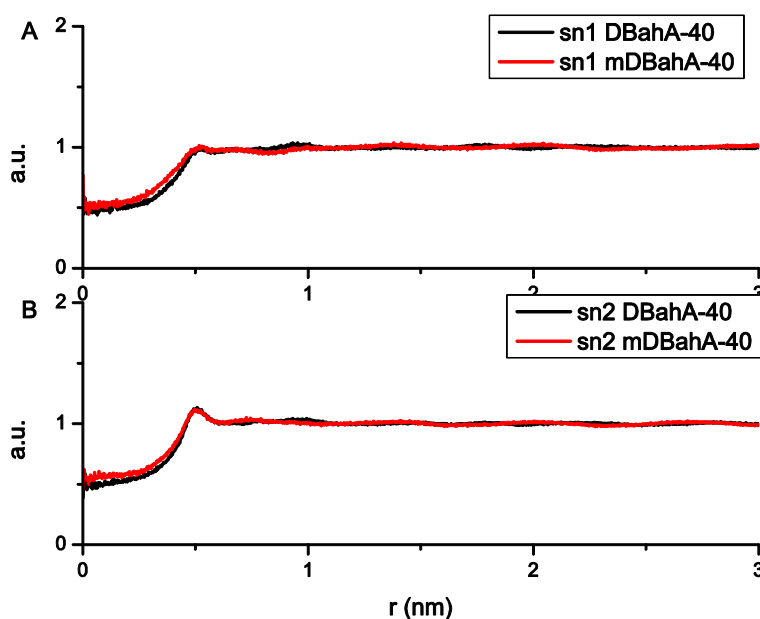
**Figura 6-7** Função de distribuição radial (FDR) entre os átomos de nitrogênio e fósforo (N-P) das cabeças polares de moléculas de DPPC e DPPG nos sistemas com as moléculas de DBahA e de mDBahA. N-DbahA refere-se a FDR dos sistemas com DBahA e N-mDBahA a fdr dos sistemas com mDBahA.

Como é observado no (Figura 6-7), tampouco foi visto nos sistema DPPC/DPPG/Colesterol uma grande modificação na FDR entre o fósforo e nitrogênio, apesar do número de átomos de nitrogênio no sistema com DPPC/DPPG/Colesterol ser a metade do que é encontrado no sistema DPPC (64 átomos de nitrogênio no sistema DPPC).



**Figura 6-8 Função de distribuição radial (FDR) entre os átomos de fósforos (P-P) das cabeças polares de moléculas de DPPC e DPPG nos sistemas com as moléculas de DBahA e de mDBahA. P-DBahA refere-se a fdr dos sistemas com DBahA e P-mDBahA a fdr dos sistemas com mDBahA.**

Na Figura 6-8 observam-se picos maiores no perfil de FDR do metabólito do que o DBahA, indicando um ordenamento maior na distância entre moléculas de fosfolipídios, ou pelo menos no distanciamento entre as cabeças polares, resultado que origina-se da preferência do metabólito a setores mais perto das cabeças polares do que os setores preferidos pelas moléculas do dibenzo[a,h]antraceno no sistema DPPC/DPPG/Colesterol.



**Figura 6-9 (A) Funções de distribuição radial (FDR) entre os centros de massa das cadeias hidrocarbônicas sn-1 do DPPC e do DPPG para 40 moléculas de DBahA e do mDBahA no sistema DPPC/DPPG/Colesterol. (B) Funções de distribuição radial (FDR) entre os centros de massa das cadeias hidrocarbônicas sn-2 do DPPC e do DPPG para 40 moléculas de DBahA e do mDBahA no sistema DPPC/DPPG/Colesterol.**

Nos sistemas DPPC/DPPG/Colesterol (Figura 6-9) não foi observada muita ordem na distribuição das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolípidos DPPC e DPPG, nem muita diferença entre os sistemas com DBahA ou metabólito.

#### **6.1.5. Área superficial xy, Área por fosfolípido.**

É importante notar que, pelos acoplamentos da pressão e temperatura usados, a flutuação da área deve ocorrer em escala de tempo de aproximadamente 5 ou 100 vezes superior ao acoplamento de temperatura. Os acoplamentos foram feitos com uma frequência de 2 ps para a pressão e 0,5 ps para a temperatura (ver Quadro 11). Assim, a tensão superficial flutua na mesma escala de tempo do que da pressão e da área porque calcula-se a tensão superficial com os valores do tensor virial da pressão. No entanto, o valor médio da área superficial deve ser suficientemente representativo.

A área total foi calculada utilizando a função `g_energy` do GROMACS. A área por fosfolípido e a área por molécula da monocamada foram calculadas

dividindo a área total da caixa do sistema paralela à membrana pelo número de fosfolipídios e número de moléculas por camada, respectivamente.

HPA	DBahA			mDBahA		
Número de Moléculas	10	20	40	10	20	40
Área do sistema (nm <sup>2</sup> )	39,59 ± 0,85	39,70 ± 0,66	38,91 ± 0,44	41,12 ± 0,50	40,82 ± 0,62	41,04 ± 0,44
Área por molécula de DPPC (nm <sup>2</sup> )	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,64 ± 0,01
Área por molécula da monocamada (nm <sup>2</sup> )	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01

**Tabela 6-2** Área do sistema (nm<sup>2</sup>), Área por Fosfolípido (nm<sup>2</sup>) e área por molécula (nm<sup>2</sup>) nos sistemas com DPPC e DBahA e fosfolípido inicialmente na fase lipídica.

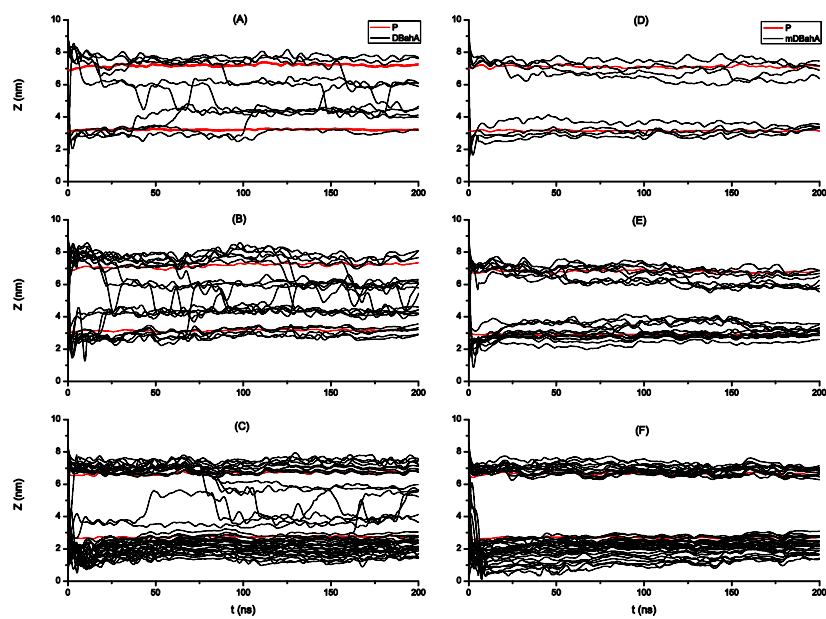
## 6.2.

### Comportamento e influência do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito

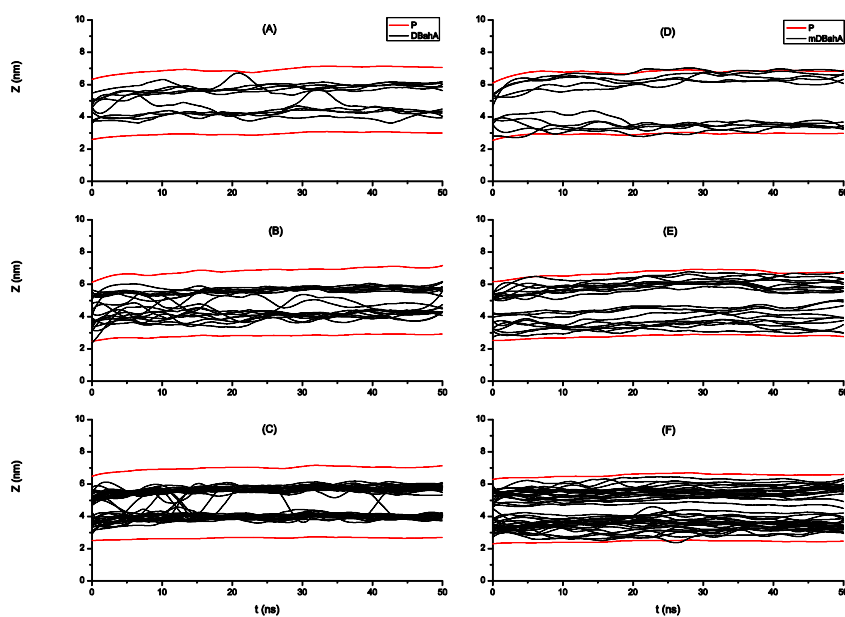
#### 6.2.1.

##### Preferência de fase

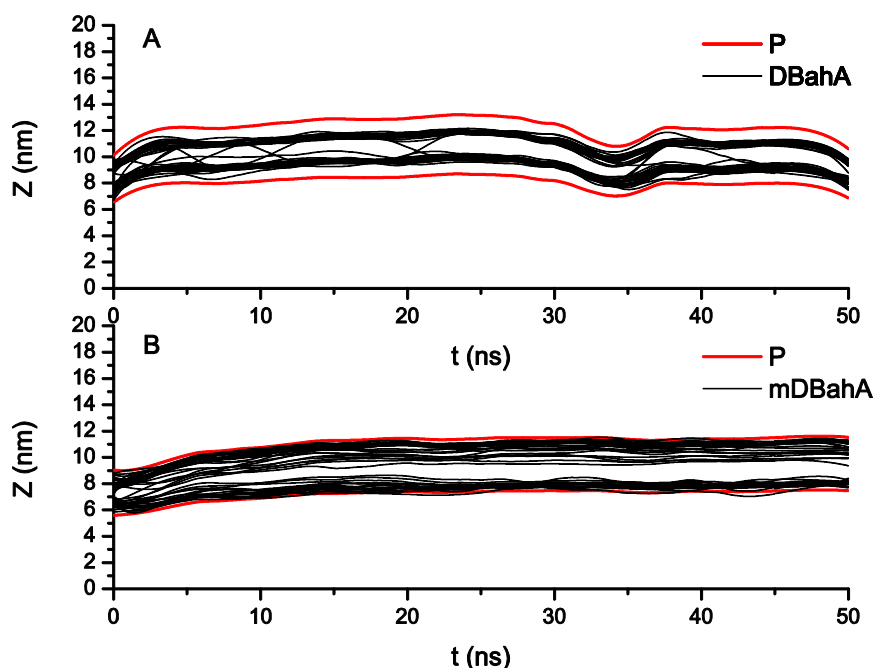
Ren e colaboradores (REN et al., 2010) mostraram que antraceno prefere permanecer na fase interior da membrana, como é de se esperar. O comportamento encontrado para o dibenzo[a,h]antraceno é semelhante ao do benzo(a)pireno (SOSNOWSKI; KOLIŃSKI; GRADOŃ, 2012), ou seja, a velocidade de transferência da fase aquosa para a fase lipídica aumenta quando a concentração de benzo(a)pireno na fase aquosa aumenta. A Figura 6-10 e Figura 6-11 mostram as trajetórias para 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito que foram transferidos da fase aquosa para a bicamada fosfolipídica através da dinâmica molecular.



**Figura 6-10** Trajetórias de 10 (A), 20 (B) e 40 (C) moléculas de DBahA, e 10 (D), 20 (E), e 40 (F) moléculas de mDBahA durante 200ns de simulação para os sistemas de DPPC com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase aquosa. As linhas vermelhas indicam a posição do centro de massa dos átomos de fósforo na cabeça polar de DPPC, e as linhas pretas indicam a posição do centro de massa de cada molécula de DBahA e seu metabólito.



**Figura 6-11** Trajetórias de 10 (A), 20 (B) e 40 (C) moléculas de DBahA, e 10 (D), 20 (E), e 40 (F) moléculas de mDBahA durante 200ns de simulação para os sistemas de DPPC com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase lipídica. As linhas vermelhas indicam a posição do centro de massa dos átomos de fósforo na cabeça polar de DPPC, e as linhas pretas indicam a posição do centro de massa de cada molécula de DBahA e seu metabólito.



**Figura 6-12** Trajetórias de 10 (A), 20 (B) e 40 (C) moléculas de DBahA, e 10 (D), 20 (E), e 40 (F) moléculas de mDBahA durante 50ns de simulação para os sistemas de DPPC com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase lipídica. As linhas vermelhas indicam a posição do centro de massa dos átomos de fósforo na cabeça polar de DPPC, e as linhas pretas indicam a posição do centro de massa de cada molécula de DBahA e seu metabólito.

Não foi observado um aumento linear da difusão interfacial em função das concentrações iniciais do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito na fase aquosa. Isto está em contraste com o que ocorre com gases e íons, e portanto apresenta um comportamento bastante complexo. A difusão interfacial diminuiu com o aumento das concentrações do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito devido a formação de agregados com massa e tamanho diferentes na interface entre as fases aquosa e lipídica. A formação de agregados foi observada nas duas fases, na fase aquosa e dentro do modelo de membrana celular.

É importante notar que o tempo das simulações é da ordem de nanossegundos. No entanto, os agregados de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito podem difundir de forma mais discreta e em escalas de tempo mais longas do que as simuladas (SEYDEL; WIESE, 2002). Por causa disto, a concentração não mudou suavemente, e em consequência observou-se

mudanças bruscas nas concentrações de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito nas fases. Isto foi causado pela transferência de aglomerados entre as fases.

O fluxo difussional  $J$  de uma coleção de moléculas (número de moléculas por unidade de área e unidade de tempo) em uma fase é geralmente função da concentração do composto, como mostra a primeira Lei de Fick:

$$J = -D \left( \frac{dc}{dz} \right)$$

Este comportamento linear é muito frequente em gases e em casos simples. No entanto, o comportamento em fluidos complexos, tais como membranas fosfolipídicas, é diferente porque as interações intermoleculares e a formação de agregados são importantes. No caso de soluções diluídas, as interações intermoleculares entre moléculas da mesma espécie podem ser de repulsão ou de atração. Quando as interações de repulsão dominam, os coeficientes de difusão apresentam valores maiores do que os calculados supondo um comportamento linear. Ao contrário, quando as interações de atração dominam, os coeficientes de difusão são menores do que os calculados.

Nas simulações com o DBahA e do metabólito inicialmente na fase aquosa foi observada uma rápida formação de aglomerados. Como é esperado para a formação de agregados (SEYDEL; WIESE, 2002), a difusão interfacial do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito não aumentou linearmente. A explicação desse comportamento vem do fato que a formação de agregados diminuiu muito a difusão interfacial porque a membrana celular é uma fase semisotrópica. Normalmente, o tamanho das moléculas não altera muito o comportamento da difusão entre fases isotrópicas, assim um agregado difundindo-se entre fases simplesmente separaria as moléculas de fosfolipídios que se encontram no espaço posteriormente ocupado. Já no caso da bicamada fosfolipídica, onde o comportamento é semisotrópico, a difusão entre camadas (no eixo  $z$ ) é mais lenta que a difusão lateral. Quando um agregado difunde-se para a bicamada fosfolipídica, o agregado deve afastar os fosfolipídios do espaço que posteriormente vai ocupar. Como existe uma certa dificuldade dos fosfolipídios movimentarem-se na direção normal a bicamada fosfolipídica, sua difusão lateral é mais favorável. No entanto, pela estrutura volumosa dos fosfolipídios, será criado um “vácuo” na parte interior da bicamada fosfolipídica. Em consequência, será necessário uma maior energia do que a usual para ocorrer a difusão lateral. Além disso, quanto maior o tamanho do agregado, maior o tamanho da cavidade a ser formado.

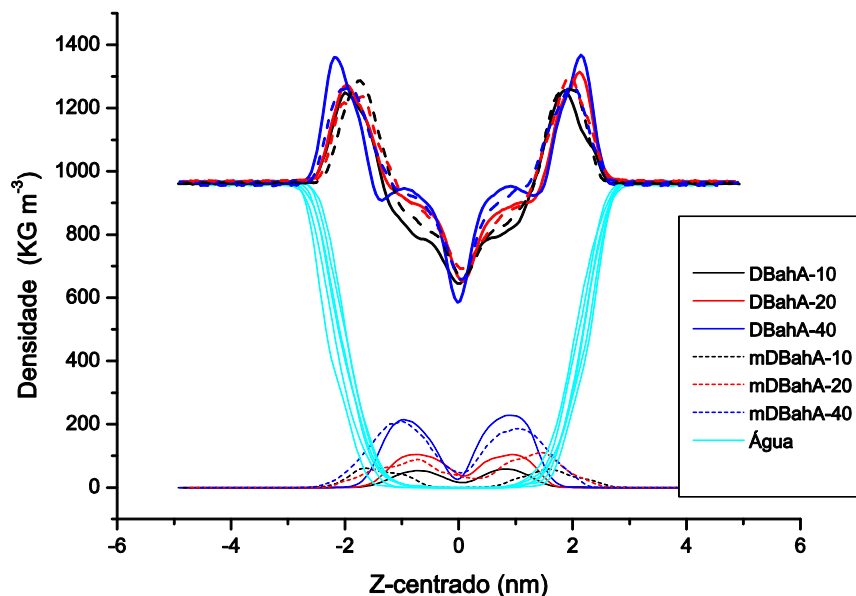


### 6.2.2. Orientação

Nos sistemas com os HPAs inicialmente na fase aquosa foi observado que algumas moléculas de dibenzo[a,h]antraceno orientavam-se seguindo alguns padrões no momento de entrada na fase lipídica. No caso dos metabólitos, que são levemente polares, estes seguiram a mesma orientação que os fosfolipídios na fase lipídica. Os grupos epóxido e hidroxila do metabólito posicionaram-se próximos das cabeças polares dos fosfolipídios, e na direção, da fase aquosa. Isto pode indicar que as moléculas polares precisam de maior tempo em relação as que não têm nenhuma polaridade para se difundir verticalmente quando chegam direcionadas inadequadamente (com a parte mais polar em direção a bicamada). Esse comportamento é similar ao que acontece com os fosfolipídios. A difusão lateral dos fosfolipídios ocorre em escalas de tempo muito menores do que o movimento *flip-flop* dos fosfolipídios, não sendo possível observar facilmente este fenômeno na escala de tempo simulada.

Devido a esta observação os metabólitos foram orientados de acordo com sua polaridade na construção das estruturas para as simulações inicialmente na fase lipídica. Tanto as moléculas de dibenzo[a,h]antraceno como as de seu metabólito orientam-se de forma que a parte mais alongada de sua estrutura é alinhada perpendicularmente ao plano da membrana, exceto na interface interna entre camadas dos modelos ou nos agregados.

### 6.2.3. Gráfico de densidades



**Figura 6-13** A densidade do sistema em função da posição Z. A linha em azul claro representa os valores de densidade das moléculas de água, as linhas grossas representam os valores de densidade do sistema e as linhas finas os valores de densidade das moléculas de DBahA e de seu metabólito. Os valores de densidades dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas estão em cores preta, vermelha e azul, respectivamente. Os sistemas com DBahA estão com linhas sólidas e o mDBahA é representado com linhas tracejadas.

A Figura 6-13 apresenta a distribuição da densidade ao longo do eixo -z para 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito em comparação com o perfil de densidade da água no eixo -z. Nesta figura, observa-se novamente a tendência das moléculas de dibenzo[a,h]antraceno situarem-se mais próximas ao centro da bicamada fosfolipídica. As deformações, Figura 6-13, sobre os perfis de densidades do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito ocorrem devido à formação de agregados.

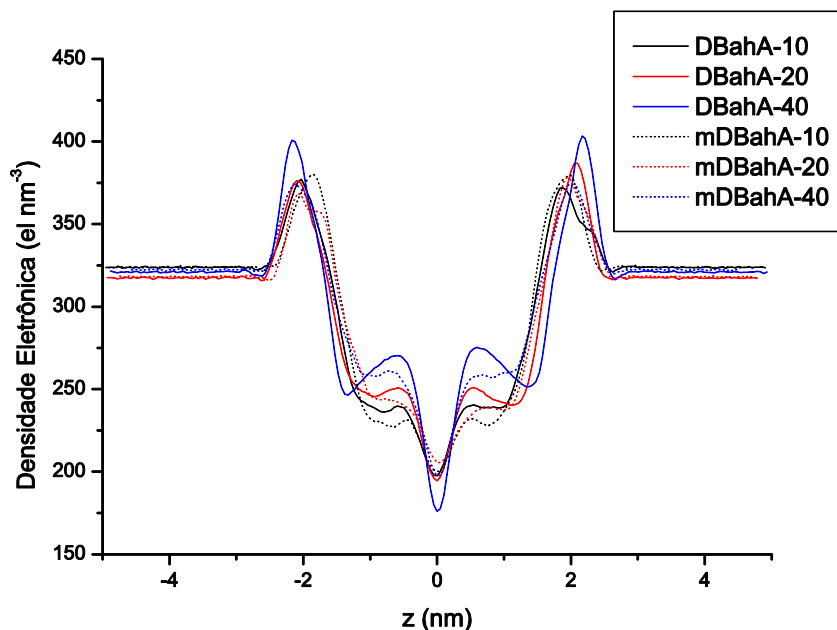
Com o auxílio dos picos de densidade, também é observado que a espessura da bicamada fosfolipídica aumenta proporcionalmente com a concentração do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito. O aumento da

espessura é maior para o dibenzo[a,h]antraceno quando comparado ao aumento induzido pelos seus metabólitos.

#### **6.2.4. Perfil de densidade eletrônica**

Substituindo a massa dos átomos pelo número de elétrons que contem cada partícula pode-se obter o perfil de densidade eletrônica da bicamada fosfolipídica no eixo normal ao plano  $xy$ . O perfil de densidade eletrônica pode ser medido experimentalmente através da transformada de Fourier da dispersão de raios X (POGER; MARK, 2010) e da ressonância magnética nuclear (LEEKUMJORN; SUM, 2006). A interação de um composto (normalmente um fármaco) com membrana celular pode ser estudada comparando o perfil de densidade eletrônica da membrana na presença e na ausência do composto (SEYDEL; WIESE, 2002).

Os perfis de densidade eletrônica foram calculados com o conteúdo de elétrons ideal para cada tipo de partícula. Consequentemente, a densidade é medida como se os elétrons estivessem no centro das partículas tanto, para as que representam só os átomos, como para as que representam um conjunto de átomos. A diferença dos gráficos de densidade (massa) e do perfil de densidade eletrônica é obtido facilmente de análises experimentais (SEYDEL; WIESE, 2002). A Figura 6-14 representa a distribuição da densidade eletrônica para 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito ao longo do eixo  $-z$ .



**Figura 6-14** A densidade eletrônica do sistema em função da posição  $Z$ . Os valores de densidades eletrônica dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas estão em cores preta, vermelha e azul, respectivamente. Os sistemas com DBahA estão com linhas sólidas e o mDBahA é representado com linhas tracejadas.

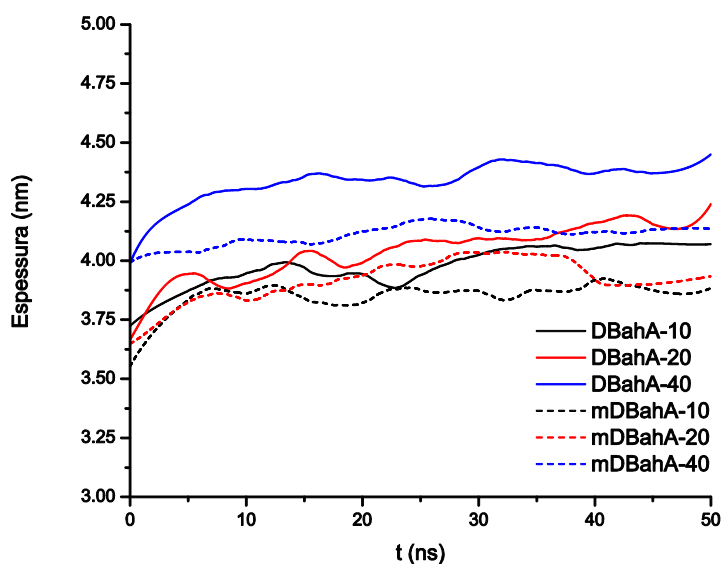
Os compostos aromáticos possuem densidade eletrônica maior que os hidrocarbonetos saturados. Além disso, a concentração dos elétrons deslocalizados situa-se nos anéis aromáticos. Semelhante aos gráficos de densidade (Figura 6-13), os gráficos da posição do centro de massa (Figura 6-11), é observado no gráfico de densidade eletrônica (Figura 6-14) que o dibenzo[a,h]antraceno situa-se na parte mais interna dos modelos, e o seu metabólito em um local mais próximo da interface.

### 6.2.5.

#### Espessura da bicamada fosfolipídica

A espessura da membrana padrão é de aproximadamente 5 nm (KOOLMAN; RÖHM, 2005), para o DPPC é de 3,7 nm (KUCERKA; TRISTRAM-NAGLE; NAGLE, 2006), e diversas simulações de dinâmica molecular produzem uma espessura próxima de 3,5 nm para diferentes fosfatidilcolinas (POGER; MARK, 2010). Qualquer variação da espessura da membrana provocada por algum artefato resultará em uma série de observações de fenômenos artificiais. Por exemplo, se o acoplamento de pressão não é bem implementado, resulta-se em uma separação das camadas lipídicas, e uma

translação artificial das moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito. Portanto, é necessário que este parâmetro não flutue em excesso. Se for escolhida uma altura do sistema menor à adequada se trasladará a uma flutuação muito grande do comprimento da membrana, e quando o valor da tensão superficial é muito importante é recomendado utilizar um valor de comprimento no eixo normal ao plano da membrana (Z) 2 vezes superior do que os valores de comprimento dos eixos paralelos ao plano da membrana (XY). Também é recomendável acoplar a pressão semisotropicamente nas simulações de membranas. Nestas simulações, o acoplamento de pressão do eixo  $-z$  é independente dos eixos  $-x$  e  $-y$ .



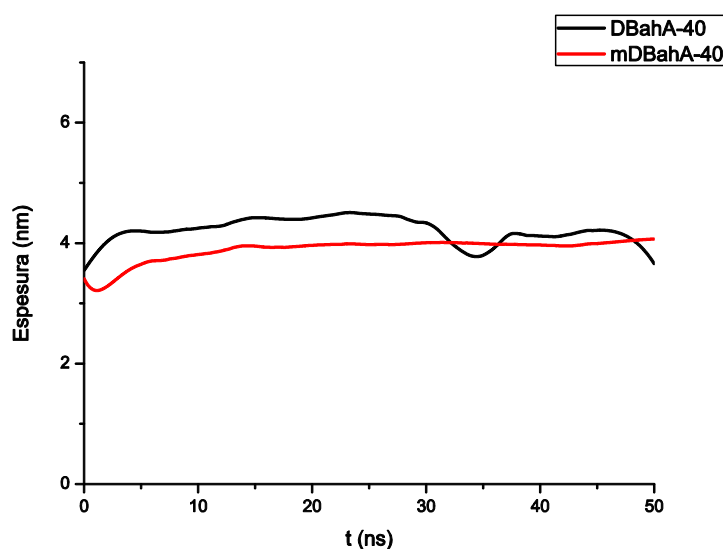
**Figura 6-15** A espessura da bicamada de DPPC durante o tempo de simulação. Os valores de espessura dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas estão em cores preta, vermelha e azul, respectivamente. Os sistemas com DBahA estão com linhas sólidas e o mDBahA é representado com linhas tracejadas. As espessuras foram calculadas com a diferença dos valores de posição Z do centro de massa do conjunto de átomos de fósforo das camadas superior e inferior.

A Figura 6-15 apresenta a mudança da espessura da bicamada fosfolipídica ao longo de 50 ns para os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito. Foi observado que as moléculas de dibenzo[a,h]antraceno aumentam a espessura da bicamada fosfolipídica mais do que as moléculas do metabólito. O aumento da espessura é devido às localizações onde o dibenzo[a,h]antraceno e o metabólito distribuem-se na

bicamada fosfolipídica. Como o dibenzo[a,h]antraceno prefere se situar na parte interna da bicamada fosfolipídica, é mais fácil afastar os fosfolipídios devido à flexibilidade das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios. Também, a formação de agregados na parte interna da bicamada fosfolipídica modifica a espessura da bicamada. Pode-se dizer que a maior mudança da espessura ocorre na direção normal da bicamada em relação ao centro de massa do agregado. Isto é resultado do espaço ocupado pelo agregado e não das interações intermoleculares entre as moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito. Tabela 6-3 mostra as espessuras calculadas com os últimos 30 ns de simulação para todos os sistemas apresentados na Figura 6-15.

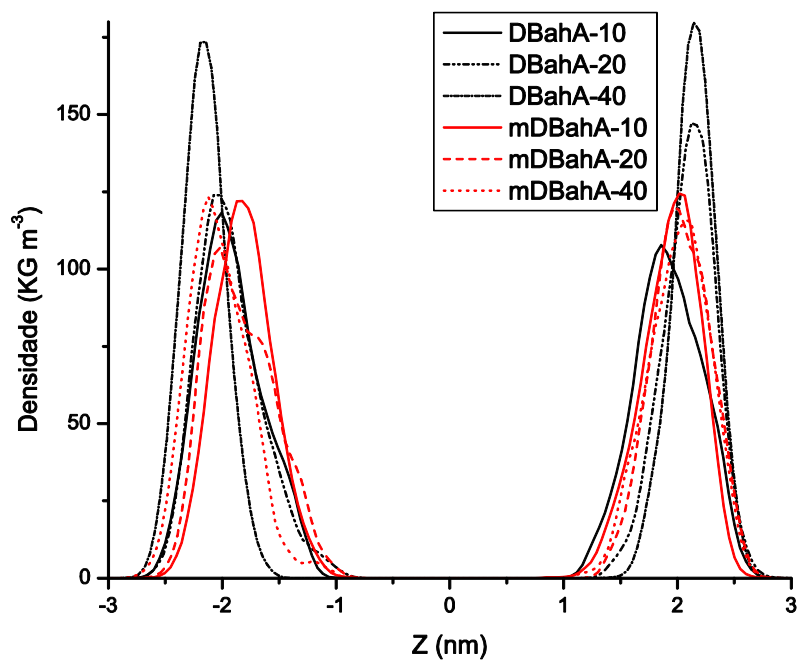
HPA	DbahA			mDBahA		
Número de Moléculas	10	20	40	10	20	40
Espessura da Membrana (nm)	4.02 +/- 0.22	4.12 +/- 0.15	4.38 +/- 0.07	3.87 +/- 0.12	3.97 +/- 0.15	4.13 +/- 0.07

**Tabela 6-3 Espessuras (em nm) para cada sistema de DPPC com o DBahA e do mDBahA na fase lipídica, calculadas com os últimos 30 ns de simulação.**

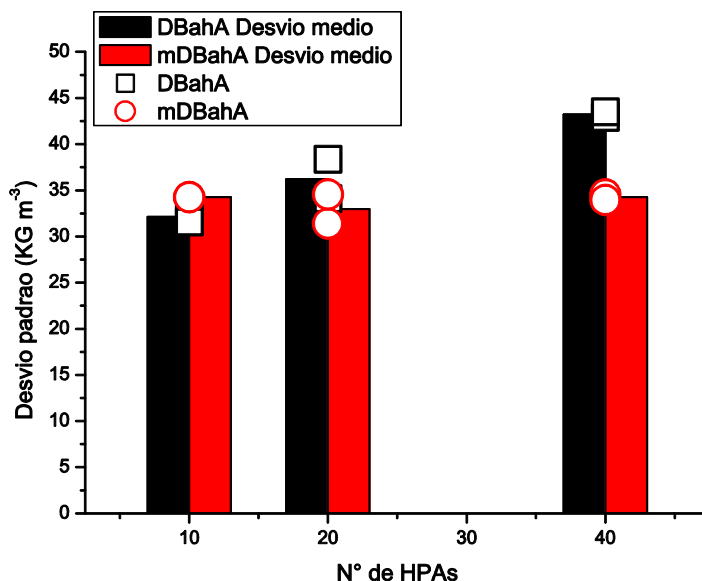


**Figura 6-16 A espessura da bicamada de DPPC/DPPG/Colesterol durante o tempo de simulação para o sistema com 40 moléculas de DBahA (em preto) e do mDBahA (em vermelho). As espessuras foram calculadas com a diferença dos valores de posição Z do centro de massa do conjunto de átomos de fósforo das camadas superior e inferior.**

Figura 6-16 mostra que a espessura da bicamada fosfolipídica é suavemente maior quando está interagindo com moléculas de dibenzo[a,h]antraceno em comparação ao seu metabólito na maior parte do tempo. Isto deve-se ao fato que o DBahA aglomera-se na parte central da bicamada de DPPC/DPPG/Colesterol.



**Figura 6-17** Densidade em função do eixo Z considerando os átomos de fósforo. Os sistemas com DBahA estão em preto e o mDBahA em vermelho. Os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas estão representados com linhas sólidas, traços e pontos, respectivamente.



**Figura 6-18** Desvio padrão para cada pico de densidade apresentado na Figura 6-17. O eixo horizontal contém o número de átomos em cada sistema. Os valores do desvio padrão para cada pico de densidade estão representados com círculo e um quadrado para o DBahA e mDBahA, respectivamente. As barras representam a média dos valores dos picos. Em preto, os valores do DBahA e em vermelho os valores do mDBahA.

Dos desvios padrões apresentados na Figura 6-18 pode ser visto que estão menos localizados a medida que aumenta a concentração. Um desvio padrão menor indica que os átomos de fósforo mantêm uma posição em Z mais constante, significando que os metabolitos deformam menos a forma planar da membrana. Com os desvios padrões (Figura 6-18), a maior largura dos picos de densidade de fósforo apresentadas pelos sistemas com maior concentração (Figura 6-17) e dos gráficos de posição do centro de massa do DBahA e metabolitos (Figura 6-11)

Do gráfico de densidade dos átomos de fósforo Figura 6-17 e do gráfico do desvio padrão Figura 6-18 é notado que os átomos de fósforo tem maior deslocalização na dimensão Z quando se aumenta a concentração dos HPAs ou metabolitos, indicando que os HPAs interagem de forma setorizada com a membrana.



### 6.2.6. Parâmetro de ordem

Normalmente, o parâmetro de ordem é utilizado para medir a correspondência das simulações com os resultados experimentais. Este parâmetro pode ser obtido diretamente das medições de ressonância magnética nuclear de fosfolípidios deutêrados seletivamente. O parâmetro de ordem derivado de simulações calcula-se com a equação:

$$S^{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2(\theta) - 1 \rangle$$

onde  $\theta$  é o ângulo entre o vetor da ligação carbono-deutério e a normal da bicamada,  $S^{CD}$  representa o valor médio dentre todos os fosfolípidios durante o tempo analisado. Os valores de  $S^{CD}$  podem ser de -0,5, quando a cadeia hidrocarbônica está totalmente ordenada (fase sólida), a valores de -0,2 nas bicamadas fosfolípídicas que são normalmente encontradas na fase fluida (VERMEER et al., 2007).

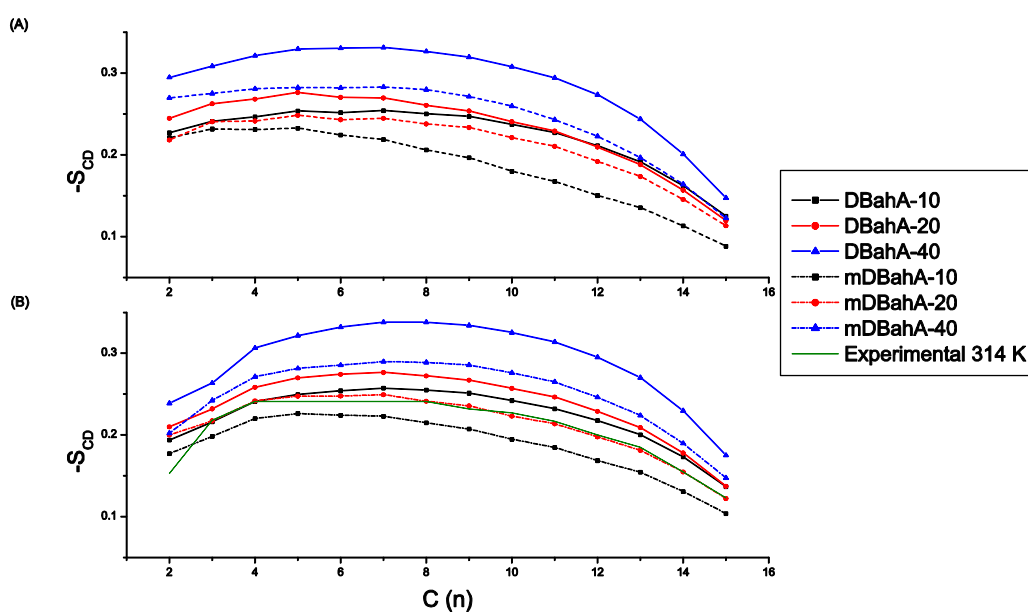


Figura 6-19 Parâmetro de ordem ( $S_{CD}$ ) dos fosfolípidios em função do índice de átomos de carbono para a cadeia hidrocarbônica 1 (sn1) do DPPC (A) e para a cadeia hidrocarbônica 2 (sn2) do DPPC (B) dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de DBahA e de seu metabólito. Os valores para os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas estão em cores preta, vermelha e azul, respectivamente. Os sistemas com DBahA estão com linhas sólidas e o DBahA é representado com linhas tracejadas.

Na Figura 6-19 mostra o parâmetro de ordem ( $-S_{CD}$ ) para as duas cadeias hidrocarbônicas das bicamadas fosfolipídicas em função do índice de átomos de carbono para os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito. É observado que o dibenzo[a,h]antraceno e o seu metabólito aumentam a ordem da bicamada fosfolipídica com o aumento de concentração destes compostos. Isto significa que o aumento da concentração inicial de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito na fase aquosa torna a bicamada fosfolipídica menos fluida. A diminuição da fluidez do modelo de membrana celular com o aumento da concentração de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito deve ser resultado da rigidez destas moléculas em comparação com as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios. Também, existe a diminuição do espaço entre as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios com o aumento da quantidade de moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito. As Tabelas 6-3 e 6-4 mostram os valores numéricos dos parâmetros de ordem para estes sistemas.

C-1	dBahA 10	dBahA 20	dBahA 40	mdBahA 10	mdBahA 20	mdBahA 40
2	0,227	0,245	0,295	0,221	0,218	0,270
3	0,241	0,263	0,308	0,232	0,241	0,275
4	0,246	0,268	0,321	0,231	0,241	0,281
5	0,254	0,276	0,329	0,233	0,248	0,282
6	0,252	0,270	0,331	0,224	0,243	0,282
7	0,254	0,270	0,331	0,219	0,245	0,283
8	0,250	0,261	0,327	0,206	0,238	0,280
9	0,247	0,254	0,320	0,197	0,234	0,271
10	0,237	0,241	0,308	0,180	0,221	0,260
11	0,227	0,229	0,294	0,168	0,210	0,243
12	0,211	0,210	0,274	0,150	0,192	0,223
13	0,191	0,188	0,244	0,135	0,174	0,197
14	0,162	0,157	0,201	0,113	0,146	0,164
15	0,125	0,119	0,147	0,088	0,113	0,123

**Tabela 6-4 Valores do parâmetro de ordem para a cauda 1 (sn1) dos sistemas de DPPC com DBahA e mDBahA inicialmente na fase lipídica.**

C-2	dBahA 10	dBahA 20	dBahA 40	mdBahA 10	mdBahA 20	mdBahA 40	Experime ntal 314 K
2	0,194	0,210	0,239	0,218	0,200	0,202	0,153
3	0,216	0,232	0,263	0,241	0,217	0,242	0,218
4	0,241	0,258	0,306	0,241	0,242	0,271	0,241
5	0,249	0,270	0,322	0,248	0,247	0,281	0,241
6	0,254	0,274	0,332	0,243	0,248	0,285	0,241
7	0,257	0,276	0,338	0,245	0,249	0,290	0,241
8	0,255	0,272	0,338	0,238	0,241	0,289	0,241
9	0,251	0,267	0,334	0,234	0,236	0,286	0,232
10	0,242	0,257	0,325	0,221	0,223	0,276	0,227
11	0,232	0,246	0,314	0,210	0,214	0,265	0,217
12	0,217	0,229	0,295	0,192	0,198	0,246	0,200
13	0,200	0,209	0,270	0,174	0,181	0,224	0,185
14	0,173	0,178	0,230	0,146	0,155	0,190	0,155
15	0,137	0,137	0,175	0,113	0,122	0,147	0,123

**Tabela 6-5 Valores do parâmetro de ordem para a cauda 2 (sn2) dos sistemas de DPPC com o DBahA e mDBahA inicialmente na fase lipídica.**

Foi observado que o dibenzo[a,h]antraceno têm maior influência que seu metabólito sobre a ordem das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios. Esta maior influência deve ser resultado do local em que o dibenzo[a,h]antraceno se distribui nos modelos. A existência de agregados de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito faz com que a influência sobre o parâmetro de ordem seja menor do que caso eles estivessem espalhados completamente sobre a fase fosfolipídica. Portanto, os agregados diminuem a concentração aparente do dibenzo[a,h]antraceno e do metabólito dentro da fase lipídica. Isto está de acordo com o que é encontrado na literatura pois duas moléculas de HPA agregadas tem a mesma atividade sobre a membrana do que uma molécula de outro HPA com o mesmo volume molecular.(SEYDEL; WIESE, 2002).

C-1	DBahA		mDBahA	
	DPPC	DPPG-	DPPC	DPPG
2	0,24119	0,28268	0,24402	0,27693
3	0,27469	0,27886	0,26882	0,27292
4	0,29735	0,31202	0,28233	0,29045
5	0,32017	0,31218	0,29393	0,27797
6	0,32723	0,32747	0,29163	0,28041
7	0,33764	0,32337	0,28994	0,26185
8	0,33566	0,32614	0,28189	0,25589
9	0,33492	0,31542	0,274	0,23633
10	0,32634	0,30708	0,25971	0,22515
11	0,31498	0,2887	0,24769	0,20368
12	0,29348	0,26964	0,22921	0,18692
13	0,26496	0,23735	0,20655	0,15998
14	0,22321	0,20021	0,1747	0,13479
15	0,16903	0,14694	0,13357	0,09848

**Tabela 6-6 Valores do parâmetro de ordem para a cauda 1 (sn1) dos sistemas de DPPC/DPPG/Colesterol.**

C-2	DBahA		mDBahA	
	DPPC	DPPG-	DPPC	DPPG
2	0,21969	0,26386	0,2048	0,23402
3	0,24335	0,28175	0,22993	0,25913
4	0,28217	0,30395	0,26053	0,26935
5	0,30719	0,31973	0,27598	0,27922
6	0,32451	0,33207	0,28441	0,27933
7	0,33501	0,33796	0,28659	0,27635
8	0,33951	0,338	0,28389	0,26623
9	0,33689	0,33309	0,27837	0,25651
10	0,33031	0,32266	0,26656	0,24251
11	0,31847	0,30804	0,25226	0,22907
12	0,3029	0,28722	0,23111	0,20993
13	0,27722	0,25933	0,20845	0,18898
14	0,24149	0,22049	0,17732	0,1594
15	0,18581	0,1668	0,13708	0,12265

**Tabela 6-7 Valores do parâmetro de ordem para a cauda 2 (sn2) dos sistemas com DPPC/DPPG/Colesterol.**

Nos sistemas com DPPC/DPPG/Colesterol foi observado mesmo comportamento que o observado no modelo de DPPC com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase lipídica, isto é, os metabólitos desorganizam e interagem em maior extensão o meio das cadeias hidrocarbônicas.

### 6.2.7. Difusão $xy$

A difusão lateral é uma propriedade muito importante das membranas celulares. A difusão lateral determina o grau de interação entre setores diferentes da membrana, a facilidade de movimento das proteínas da membrana celular e a velocidade de difusão de moléculas pequenas. Além disso, o movimento lateral dos fosfolipídios é um fenômeno observável na escala de tempo em que as bicamadas fosfolipídicas são simuladas por modelos atomísticos.

A difusão lateral de um composto é medido por (MARTINEZ-SEARA; RO, 2013):

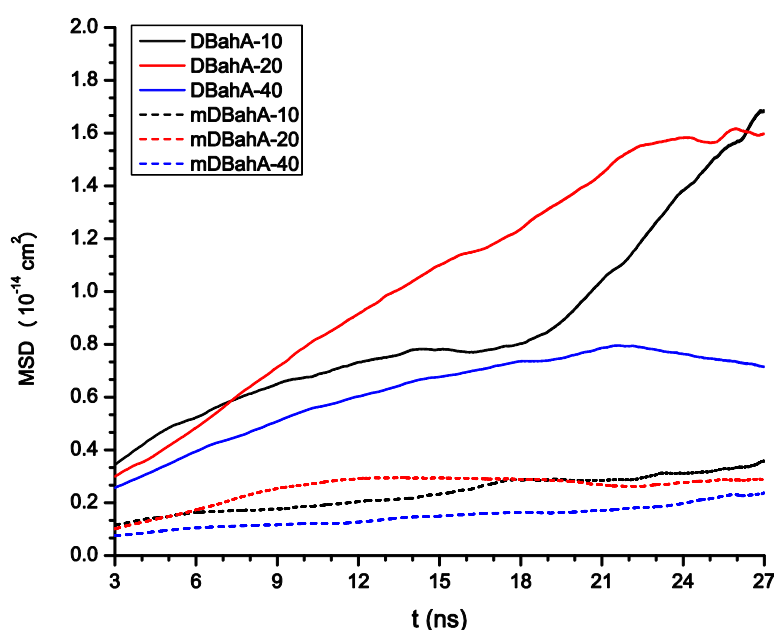
$$D(\tau) = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \left( \frac{MSD(\tau)}{4\tau} \right)$$

onde MSD é o quadrado do deslocamento médio do centro de massa do dibenzo[a,h]antraceno e do metabólito sobre o plano  $xy$  da bicamada de fosfolipídios, e  $\tau$  é o tempo transcorrido na simulação.

O MSD é calculado a partir de simulações de dinâmica molecular através da equação:

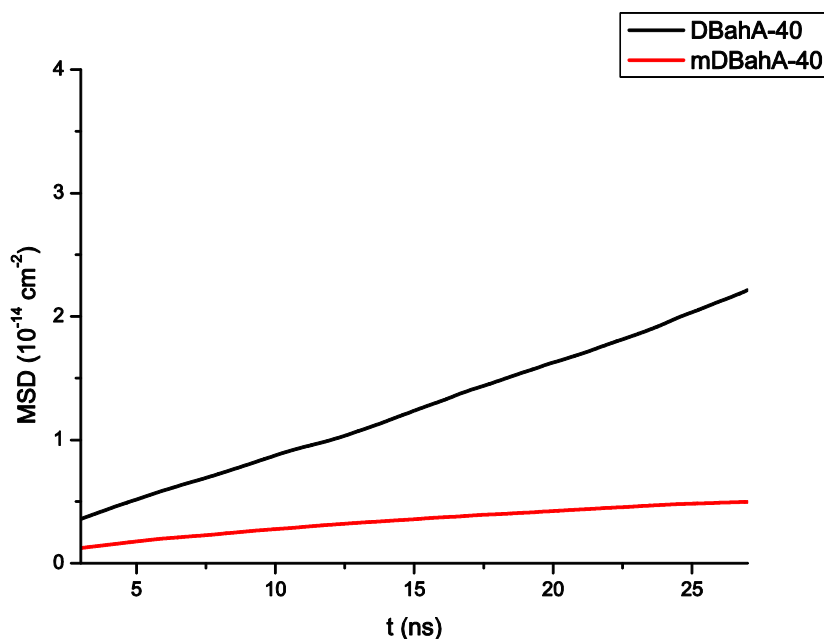
$$MSD(\tau) = \langle |r(t_0) - r(t_0 + \tau)|^2 \rangle_{t_0n}$$

onde  $r$  é a posição do centro de massa do dibenzo[a,h]antraceno e do metabólito no plano  $xy$  da bicamada de fosfolipídios e  $t_0$  é o tempo inicial da simulação.



**Figura 6-20** Quadrado do deslocamento médio das moléculas de DBahA e de seu metabólito no plano  $xy$  da bicamada fosfolipídica de DPPC nos últimos 24 ns de simulação. Os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de DBahA e de seu metabólito estão em cores preta, vermelha e azul, respectivamente. Os sistemas com DBahA estão com linhas sólidas e o mDBahA é representado com linhas tracejadas.

Na Figura 6-20 apresenta o quadrado do deslocamento médio do centro de massa do dibenzo[*a,h*]antraceno e de seu metabólito sobre o plano  $xy$  da bicamada de fosfolípidios (modelo do DPPC) para os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[*a,h*]antraceno e de seu metabólito. Nesta figura pode ser visto que o dibenzo[*a,h*]antraceno possui uma maior difusão lateral do que o seu metabólito. Esta diferença de difusão lateral é resultado da localização em que se situam o dibenzo[*a,h*]antraceno e o seu metabólito. O dibenzo[*a,h*]antraceno possui maior difusão lateral por interagir majoritariamente com as cadeias hidrofóbicas dos fosfolípidios, que possuem maior liberdade de movimento do que as cabeças polares. O metabólito interage mais com a cabeça polar dos fosfolípidios, ficando mais “preso” eletrostaticamente a elas. Consequentemente, o metabólito possui um coeficiente de difusão menor do que o dibenzo[*a,h*]antraceno.



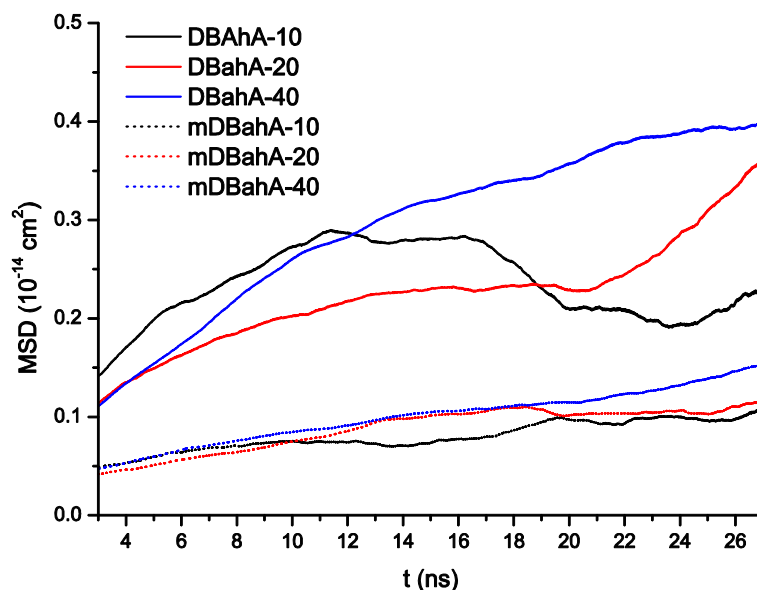
**Figura 6-21** Quadrado do deslocamento médio de 40 moléculas de DBahA (em preto) e de seu metabólito (em vermelho) no plano xy da bicamada fosfolipídica de DPPC/DPPG/Colesterol nos últimos 40 ns de simulação.

Foi observado o mesmo comportamento do dibenzo[a,h]antraceno em relação a seu metabólito para a bicamada de fosfolipídico DPPC/DPPG/Colesterol na Figura 6-21. Além disso, os coeficientes de difusão lateral do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito são maiores na bicamada de fosfolípidios DPPC/DPPG/Colesterol do que na modelo de DPPC. Este resultado está de acordo com a maior fluidez da bicamada DPPC/DPPG/Colesterol em relação ao modelo de DPPC.

Difusão lateral (10 <sup>8</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	DPPC		DPPC/DPPG/Colesterol	
	DBahA	mDBahA	DBahA	mDBahA
	5±8	1,4±0,4	20,6±7,2	1,7±2,0

**Tabela 6-8** Coeficientes de difusão no eixo z para DBahA e seu metabólito nas bicamadas fosfolipídicas de DPPC e de DPPC/DPPG/Colesterol.

### 6.2.8. Difusão na normal

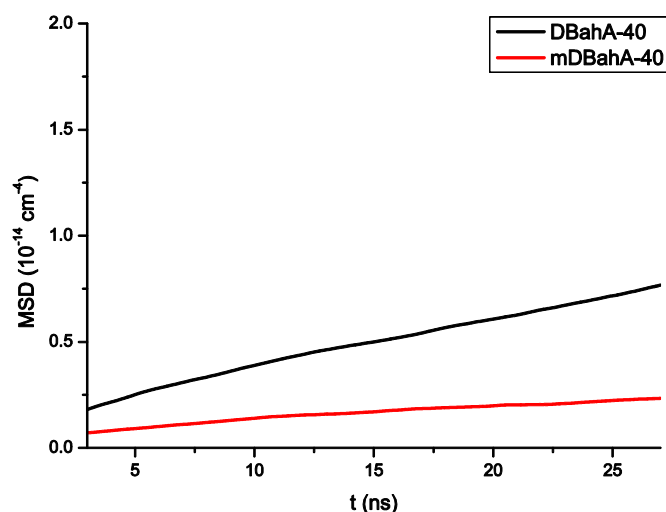


**Figura 6-22** Quadrado do deslocamento médio das moléculas de DBahA e de seu metabólito no eixo z da bicamada fosfolipídica de DPPC nos últimos 20 ns de simulação. Os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de DBahA e de seu metabólito estão em cores preta, vermelha e azul, respectivamente. Os sistemas com DBahA estão com linhas sólidas e o mDBahA é representado com linhas tracejadas.

Figura 6-22 mostra o quadrado do deslocamento médio do centro de massa do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito no eixo z da bicamada de fosfolipídios para os sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito no modelo de DPPC. Figura 6-23 mostra o quadrado do deslocamento médio do centro de massa do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito no eixo z da bicamada de fosfolipídios para os sistemas com 40 moléculas de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito no modelo de DPPC/DPPG/Colesterol. Semelhantemente ao que ocorreu com a difusão lateral, foi observado que os dibenzo[a,h]antraceno também possuem uma maior difusão normal (eixo z) ao plano xy da bicamada de fosfolipídio DPPC comparada ao seu metabólito. Neste caso, a maior difusão normal do dibenzo[a,h]antraceno é resultado das maiores interações eletrostáticas do metabólito com a cabeça polar da bicamada fosfolipídica em comparação com o metabólito, indicando assim que o dibenzo[a,h]antraceno



possui liberdade maior de movimento do que o metabólito. O dibenzo[a,h]antraceno possui preferência de se manter na posição central da membrana. No entanto, a liberdade de movimento não se traduz em maior permeabilidade, mas sim em uma maior facilidade de se transladar entre setores da membrana.

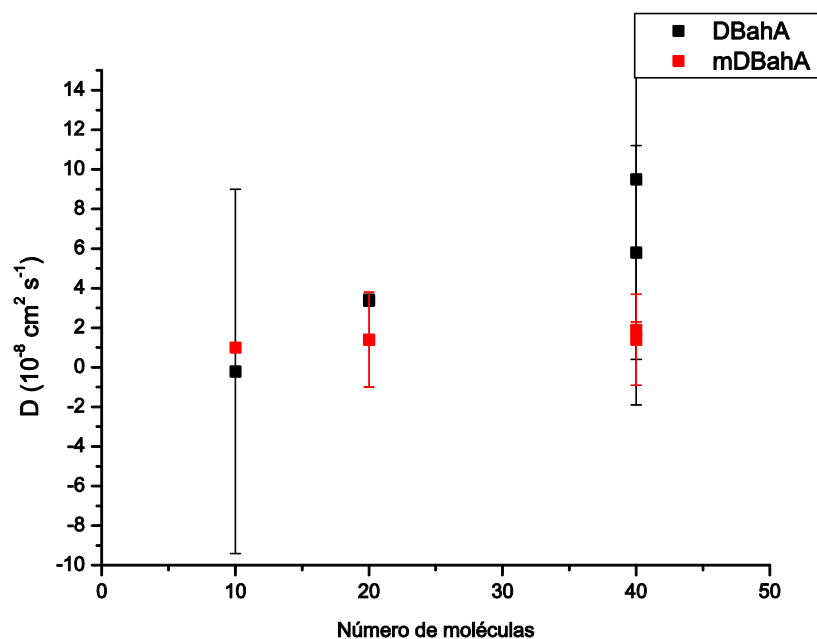


**Figura 6-23** Quadrado do deslocamento médio de 40 moléculas de DBahA (em preto) e de seu metabólito (em vermelho) no eixo z da bicamada fosfolipídica de DPPC/DPPG/Colesterol nos últimos 40 ns de simulação.

Foi novamente observado o mesmo comportamento do dibenzo[a,h]antraceno em relação a seu metabólito para a bicamada de fosfolipídico DPPC/DPPG/Colesterol como mostra a Figura 6-21. Os coeficientes de difusão na normal (eixo z) do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito são maiores na bicamada de fosfolípidios DPPC/DPPG/Colesterol do que na modelo de DPPC. Este resultado está novamente de acordo com a maior fluidez da bicamada DPPC/DPPG/Colesterol em relação ao modelo de DPPC.

Difusão em Z (10 <sup>8</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	DPPC		DPPC/DPPG/Colesterol	
	DBahA	mDBahA	DBahA	mDBahA
	5,8±5,4	19 ± 4	204 ± 3	33 ± 3

**Tabela 6-9** Coeficientes de difusão no eixo z para dibenzo[a,h]antraceno e seu metabólito nas bicamadas fosfolipídicas de DPPC e de DPPC/DPPG/Colesterol.

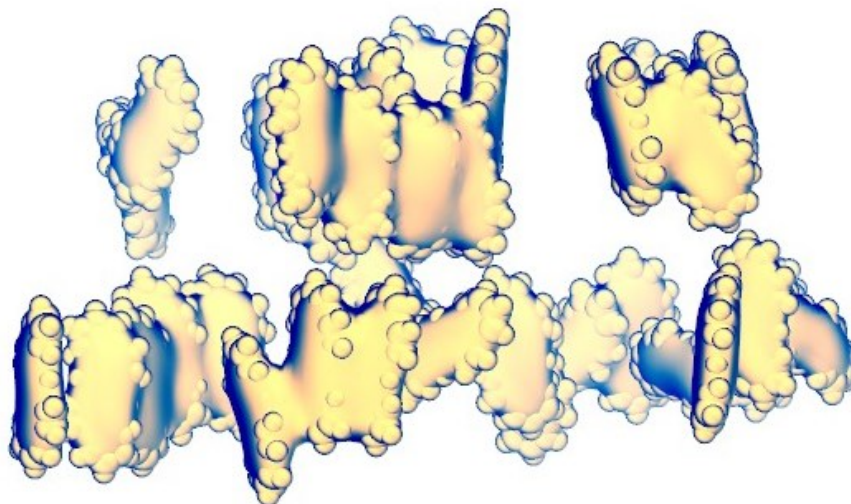


**Figura 6-24** Coeficientes de difusão no eixo z para 10, 20 e 40 moléculas de DBahA (em preto) e seu metabólito (em vermelho) nas bicamadas fosfolipídicas de DPPC e de DPPC/DPPG/Colesterol, incluindo o erro associado.

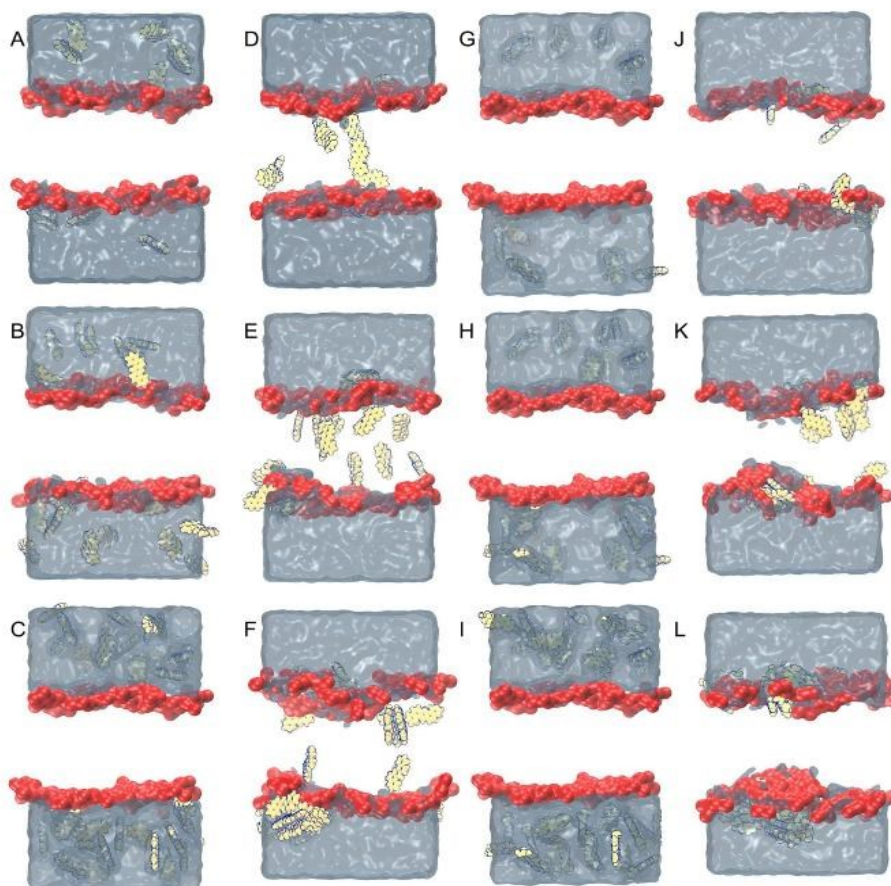
Comparando os coeficientes de difusão do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito, é notado que a difusão aumenta com a concentração. Este aumento é maior no dibenzo[a,h]antraceno em relação a seu metabólito. As espessuras das bicamadas pode indicar que este aumento da difusão é resultado do maior espaço existente entre as camadas fosfolipídicas podendo ser ocupado pelo dibenzo[a,h]antraceno.

### 6.2.9. Formação de agregados

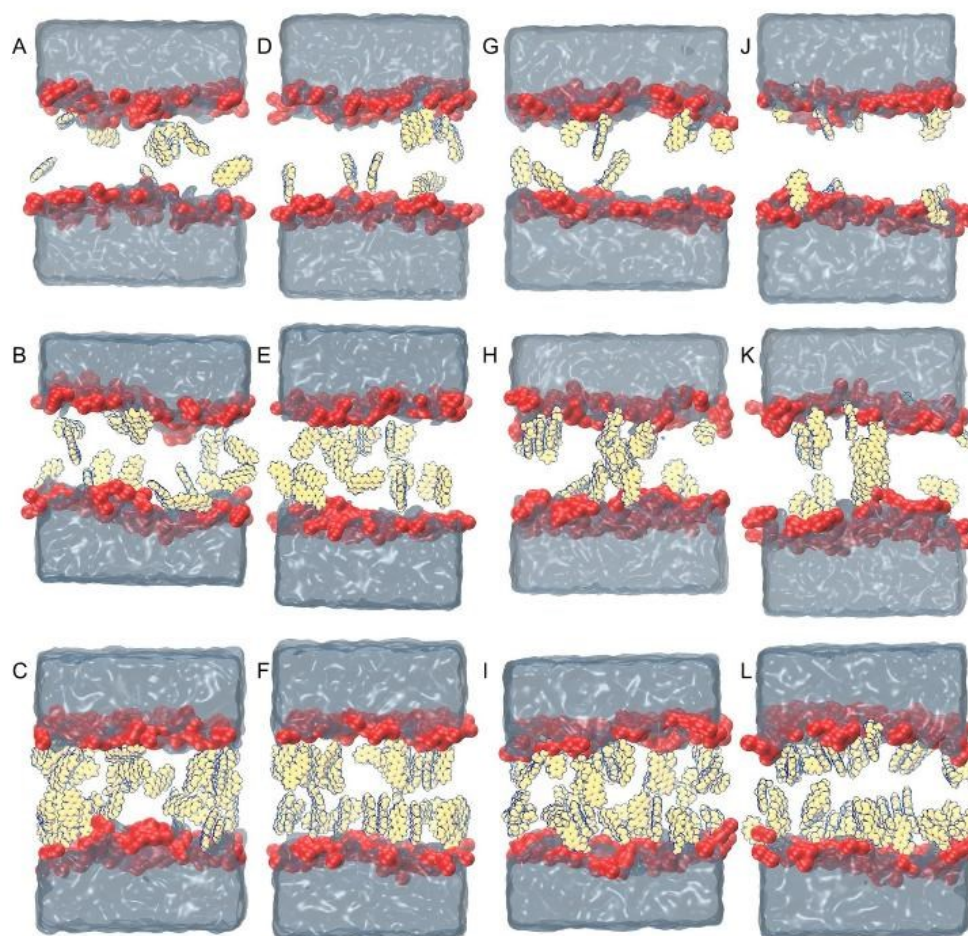
Foi observado tanto formação de agregados em todos os grupos de simulações. Existe formação de agregados tanto na fase aquosa como na fase fosfolipídica dos modelos de membrana celular e de surfactante pulmonar.



**Ilustração 5** Foto instantânea que mostra exemplos dos agregados formados na simulação com 40 moléculas de DBahA na bicamada fosfolipídica de DPPC. São mostradas apenas as moléculas de DBahA, onde é aplicada sobre elas uma representação com o raio de van der Waals e a superfície acessível ao solvente.



**Figura 6-25** Fotos instantâneas em 0 e 200 ns dos sistemas com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase aquosa. (A), (B) e (C) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de DBahA na posição inicial, e (D), (E), e (F) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas do DBahA em 200 ns. (G), (H), e (I) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas do metabólito na posição inicial, e (J), (K), e (L) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas do metabólito em 200 ns. para maior clareza a região azul é a fase aquosa, as bolas vermelhas os átomos de N e P, e os átomos do DBahA e seu metabólito estão como bolas amarelas. as moléculas de DPPC foram omitidas para maior clareza.



**Figura 6-26** Fotos instantâneas em 0 e 50 ns dos sistemas com o DBaHA e seu metabólito inicialmente na fase lipídica. (A), (B) e (C) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas de DBaHA na posição inicial, e (D), (E), e (F) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas do DBaHA em 50 ns. (G), (H) e (I) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas do metabólito na posição inicial, e (J), (K), e (L) são respectivamente as fotos instantâneas dos sistemas com 10, 20 e 40 moléculas do metabólito em 50 ns. para maior clareza a região azul é a fase aquosa, as bolas vermelhas os átomos de N e P, e os átomos do DBaHA e seu metabólito estão como bolas amarelas. as moléculas de DPPC foram omitidas para maior clareza.

Devido à pouca solubilidade, o dibenzo[a,h]antraceno e o seu metabólito formam majoritariamente agregados quando estão na fase aquosa. O dibenzo[a,h]antraceno deve também formar agregados no material particulado que normalmente é introduzido no sistema respiratório, resultando na

transferência dos agregados de dibenzo[a,h]antraceno do material particulado para o surfactante pulmonar. Pela característica totalmente hidrofóbica e rigidez do dibenzo[a,h]antraceno e do seu metabólito devem também formar aglomerados dentro da membrana celular. A formação de agregados do dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito na fase aquosa está em concordância com a baixa hidroflicidade dos mesmos, aumentando a ocorrência nos sistemas com maior número de dibenzo[a,h]antraceno e de seu metabólito.

A formação de agregados e a sua dinâmica dificultam as análises em relação a concentração dos compostos. Isto deve-se ao fato dos agregados comportarem-se como se fosse um composto volumoso e de baixa difusão. Portanto, existem duas situações:

- 1) Calcular separadamente a difusão de cada uma das moléculas com movimento aleatório na fase aquosa, na fase do modelo de bicamada de fosfolipídios ou nas interfaces, e posteriormente, calcular a média entre cada uma destas difusões separadamente;
- 2) Calcular a difusão do agregado de moléculas com movimento aleatório na fase aquosa, na fase do modelo de bicamada de fosfolipídios ou nas interfaces;

Portanto acaba-se medindo a difusão dos compostos na interface do agregado, no interior do agregado e dos compostos que não formam parte de nenhum agregado. Posteriormente, é calculada a média destas difusões sem poder discriminar entre as distintas fases em que se encontram os compostos. A discriminação dos compostos em distintas fases é dificultada porque as moléculas mudam de fases no decorrer da simulação.

Deve ser notado que o campo de força usado não descreve as interações  $\pi - \pi$ , e a formação de agregados na simulação é liderada pela energia de interação entre os HPAs e a água que é pouco favorável. Em uma situação mais realista, incluindo as interações  $\pi - \pi$ , deve-se formar mais aglomerados do que foi encontrado nas simulações desta dissertação.

Também observa-se que a formação de agregados diminui a entrada e a difusão dos HPAs nos modelos. No caso da formação de agregados na fase aquosa foi visto que o tamanho dos agregados influi grandemente no seu transporte para a bicamada fosfolipídica. O transporte é dificultado porque o agregado é muito grande para se difundir nos modelos. Além disso, os compostos pertencentes a um agregado devem escapar do aglomerado para a fase dos modelos, o que acontece, de fato.

Quando os HPAs encontram-se dentro da fase dos modelos, formam-se aglomerados devido a flexibilidade das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolípidios. Ou seja, existe uma preferência para o empacotamento. Também é observada uma preferência por formação de aglomerados na interface interna entre monocamadas dos modelos, onde existe maior liberdade. Este fenômeno da existência de formação de aglomerados no interior da membrana celular não deve ocorrer no surfactante pulmonar e na membrana celular biológicos reais. Provavelmente, isto é um artefato das simulações de modelos simplificados.

### 6.3. Resumo de Resultados

As análises de densidade, área superficial, espessura da membrana, difusão, parâmetro de ordem e função de distribuição radial foram feitas utilizando os últimos 30 ns dos dados da simulação com as coordenadas e energias salvas em intervalos de 2 ps.

Bicamada		DPPC			DPPC/DPPG/Colesterol				
HPA		DBahA			mDBahA		DBahA		mDBahA
Número de Moléculas	10	20	40	10	20	40	40	40	40
Difusão lateral HPA ( $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	11±12	15±5	5±8	2,3±0,2	1,3±4,7	1,4±0,4	20,6±7,2	1,7±2,0	
Difusão lateral DPPC/DPPG ( $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	6±3	3±3	1±2	4±1	3±6	2±1	12,3±2,3	1,7±1,8	
Difusão na normal HPA ( $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	-0,2±9,2	3,4±0,3	5,8±5,4	1,0±0,2	1,4±2,4	1,9±0,4	9,5±11,4	1,4 ±2,3	
Espessura da Membrana (nm)	4,0±0,2	4,1± 0,2	4,4±0,1	3,9± 0,1	4,0±0,2	4,1±0,1	4,2±0,2	4,0±0,04	
Área do sistema (nm <sup>2</sup> )	39,6±0,9	39,7±0, 7	38,9± 0,4	41,1± 0,5	40,8± 0,6	41,0± 0,4	38,4±2,6	39,6±0,4	
Área por molécula de DPPC/DPPG (nm <sup>2</sup> )	0,62±0,01	0,62± 0,01	0,61± 0,01	0,64± 0,01	0,64±0,01	0,64± 0,01	0,60±0,04	0,62±0,01	
Área por molécula da monocamada (nm <sup>2</sup> )	0,47±0,01	0,46± 0,01	0,46± 0,01	0,49±0,01	0,49±0,01	0,49±0,01	0,19±0,01	0,20±0,01	

**Tabela 6-10** Resumo de resultados das simulações com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase lipídica.