



Evelina Duneska Estrada López

Dinâmica molecular da adsorção de prednisolona em um modelo de surfactante pulmonar.

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. André Silva Pimentel

Rio de Janeiro
Março de 2017



Evelina Duneska Estrada López

Dinâmica molecular da adsorção de prednisolona em um modelo de surfactante pulmonar.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. André Silva Pimentel

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Ernesto Raúl Caffarena

FIOCRUZ

Prof. Welles Antonio Martinez Morgado

Departamento de Física - PUC-Rio

Prof. Márcio da Silveira Carvalho

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 30 de março de 2017

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Evelina Duneska Estrada López

Graduou-se em Engenharia Química Industrial na Universidade Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) em 2010 com o reconhecimento de "Cum Laude". Trabalhou como coordenador de qualidade em Embotelladora La Reyna S.A. na área de controle de qualidade do 2011-2013.

Ficha Catalográfica

Estrada López, Evelina Duneska

Dinâmica molecular da adsorção de prednisolona em um modelo de surfactante pulmonar / Evelina Duneska Estrada López ; orientador: André Silva Pimentel. – 2017.

113 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2017.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Surfactante pulmonar. 3. Prednisolona. 4. Monocamada fosfolipídica. 5. Dinâmica molecular. 6. Modelo coarse grained. I. Pimentel, André Silva. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

A minha mãe Evangelina, minha irmã Eva Lizeth e meu noivo David por todo seu amor e apoio incondicional.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as bênçãos dadas ao longo da minha vida e permitir-me ascender mais uma escada na minha vida profissional.

A minha família por seu amor e constante motivação dada durante estes dois anos.

Ao meu orientador o Prof. André Silva Pimentel pela confiança depositada em mim para realizar este trabalho e pelos conhecimentos ensinados.

A FAPERJ, ao CNPq, e a PUC-Rio pela ajuda financeira recebida para desenvolver este trabalho.

A meu amigo Oliver Espino por ter-me falado do programa de Química da PUC-Rio e pela hospitalidade na minha chegada ao Brasil.

Aos professores Ricardo Aucélio, Aurora Pérez Gramatges, Omar Pandoli, Nicolás Rey e José Marcus Godoy do programa de Química da PUC-Rio pelos conhecimentos acadêmicos ensinados.

A Stephanie Ortiz Collazos pelo intercâmbio de conhecimentos entre a dinâmica molecular e o experimento e por sua boa amizade.

A Verônica Diniz e Joseany Almeida por me fazer sentir em casa no Brasil desde o primeiro dia que as conheci e por sua amizade durante estes dois anos.

A meus amigos do departamento de química por todos os momentos compartilhados durante estes dois anos.

A Fátima Almeida por sua gentileza para me guiar em cada processo administrativo.

A meus colegas de laboratório: Alline Pedreira, Erika Murce, Matheus Franca, Guilherme Espinosa, Lucas Pereira e Júlia Barroso pela troca de conhecimento.

Aos Prof. Marta Mendoza, Marta Trochez, David Pineda, e Andres Cruz da UNAH por suas recomendações para poder ingressar no programa de pós-graduação de química da PUC-Rio.

Resumo

Estrada López, Evelina Duneska; Silva Pimentel, André (Orientador). **Dinâmica molecular da adsorção de prednisolona em um modelo de surfactante pulmonar.** Rio de Janeiro, 2017. 113p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A simulação da adsorção da prednisolona em um modelo de surfactante pulmonar foi realizada com sucesso usando dinâmica molecular *coarse grained* a uma temperatura de 310 K. O modelo *coarse grained* da prednisolona foi parametrizado usando o modelo do colesterol e validado utilizando cálculos de coeficientes de partição octanol-água e coeficientes de difusão lateral. O coeficiente de partição octanol-água calculado para prednisolona a 298 K é $3,9 \pm 1,6$ que possui um acordo razoável com o valor experimental. O coeficiente de difusão lateral da prednisolona na monocamada mista de DPPC/POPC é estimado ser $(6 \pm 4) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 20 mN m^{-1} , o que está de acordo com o encontrado para o colesterol. A monocamada mista de DPPC/POPC foi utilizada como modelo de surfactante pulmonar onde moléculas de prednisolona foram adsorvidas formando nanoagregados. Os nanoagregados de prednisolona foram transferidos dentro da monocamada mista DPPC/POPC sendo espalhados na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . A 0 e 10 mN m^{-1} os nanoagregados de prednisolona induzem o colapso da monocamada mista DPPC/POPC formando bicamadas. A implicação deste trabalho é que a prednisolona pode apenas ser administrada com surfactante pulmonar utilizando baixas frações em massa de prednisolona por lipídio (<10%). Com frações elevadas, o colapso inativa as propriedades do surfactante pulmonar pela formação de uma bicamada. Os resultados desta pesquisa podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos tratamentos clínicos de doenças como a síndrome da angústia respiratória do recém-nascido, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica.

Palavras-chave

Surfactante pulmonar; prednisolona; monocamada fosfolipídica; dinâmica molecular; modelo *coarse grained*; colapso; espalhamento.

Abstract

Estrada López, Evelina Duneska; Silva Pimentel, André (Advisor). **Molecular dynamics of prednisolone adsorption on a lung surfactant model.** Rio de Janeiro, 2017. 113p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The simulation of prednisolone adsorption on a lung surfactant model was successfully performed using coarse grained molecular dynamics at 310 K (dynamics first performed). The coarse grained model for prednisolone was parameterized using a well-established cholesterol model and validated by using calculations of octanol–water partition coefficients and lateral diffusion coefficients. The calculated octanol–water partition coefficient of prednisolone at 298 K is 3.9 ± 1.6 , which is in reasonable agreement with experiment. The lateral diffusion coefficient of prednisolone in the DPPC/POPC mixed monolayer is estimated to be $(6 \pm 4) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ at 20 mN m^{-1} , which is in agreement with that found for cholesterol. The DPPC/POPC mixed monolayer was used as lung surfactant model where prednisolone molecules were adsorbed forming nanoaggregates. The nanoaggregates of prednisolone were transferred into the DPPC/POPC mixed monolayer being spread at the surface tension of 20 mN m^{-1} . At 0 and 10 mN m^{-1} , the prednisolone nanoaggregates induce the collapse of the DPPC/POPC mixed monolayer forming a bilayer. The implications of this work are that prednisolone may only be administered with lung surfactant by using low mass fractions of prednisolone per lipid ($<10\%$). And, with high fractions, the collapse inactivates the properties of the lung surfactant by forming a bilayer. The results of this research can be used to develop new clinical treatments for diseases such as respiratory distress syndrome of the newborn, asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

Keywords

Lung surfactant; prednisolone; phospholipid monolayer; molecular dynamics; coarse grained model; collapse; spreading.

Sumário

1	Introdução	23
2	Objetivos	26
2.1.	Objetivo geral	26
2.2.	Objetivos específicos	26
3	Fundamentação teórica	27
3.1.	Corticosteroides	27
3.2.	Tensoativos	28
3.3.	Surfactante pulmonar	28
3.3.1.	Composição	29
3.3.2.	Mecanismo	30
3.3.3.	Coexistência de fases	32
3.3.4.	Temperaturas de transições de fases	33
3.4.	Surfactantes exógenos	33
3.5.	Mistura de fármacos com surfactantes pulmonares exógenos	35
3.6.	Surfactantes pulmonares exógenos e glicocorticoides	35
3.7.	Dinâmica molecular	38
3.8.	Dinâmica molecular clássica	39
3.9.	Cálculo do potencial	40
3.9.1.	Interações entre átomos ligados	40
3.9.2.	Interações entre átomos não ligados	42
3.10.	Campo de força MARTINI	43
3.10.1.	Cálculo do potencial para MARTINI	44
3.10.2.	MARTINI limitações	45
3.10.3.	MARTINI e dinâmicas de surfactante pulmonar	47
3.11.	Algoritmos na dinâmica molecular.	48

3.11.1. Algoritmo de minimização de energia	48
3.11.2. Algoritmo de Verlet	49
3.11.3. Algoritmo <i>Leap-Frog</i>	50
3.11.4. Algoritmo <i>Leap-frog</i> para dinâmica estocástica	50
3.12. Condições periódicas de contorno	51
3.13. Ensembles	51
3.14. Termostatos	52
3.14.1. Termostato Berendsen	52
3.14.2. Termostato de reescalamento da velocidade	53
3.15. Barostatos	53
3.15.1. Barostato de Berendsen	53
3.15.2. Barostato de Parrinello-Rahman	54
3.15.3. Acoplamento de tensão superficial	55
3.16. Cálculo de energia livre	56
3.16.1. Método de integração termodinâmica	56
3.16.2. <i>Umbrella sampling</i>	57
3.17. GROMACS	58
4 Metodologia	60
4.1. Resumo da metodologia	60
4.2. Condições gerais	61
4.3. Parametrização	61
4.4. Cálculos de energia livre	65
4.4.1. Integração termodinâmica	65
4.4.2. <i>Umbrella sampling</i>	67
4.5. Modelo de surfactante pulmonar e prednisolona	68
5 Resultados e discussão	70
5.1. Resumo	70
5.2. Cálculo de energia livre	70
5.2.1. Método de integração termodinâmica	71

5.2.2. Método de umbrella sampling	74
5.3. Modelo de surfactante pulmonar e prednisolona	77
5.3.1. Área por lipídio	77
5.3.2. Difusão lateral	80
5.3.3. Parâmetro de ordem	84
5.3.4. Localização da prednisolona	88
5.3.5. Formação de agregados	90
5.3.6. Análise de fases	99
5.3.7. Função de distribuição radial	100
6 Conclusões	102
7 Perspectivas	104
8 Referência bibliográfica	105

Lista de figuras

- Figura 1 - Perfil acumulativo de energia livre em kJ mol^{-1} de hidratação (vermelho) e de solvatação (preto) da prednisolona a 298 K. 72
- Figura 2 - Perfil acumulativo de energia livre em kJ mol^{-1} de hidratação (vermelho) e de solvatação (preto) do colesterol a 298 K. 73
- Figura 3 - Perfil do potencial de força média da prednisolona em kJ mol^{-1} ao longo do caminho de reação ψ em nm a 298 K. 75
- Figura 4 – Histogramas de todas as janelas (a) e de janelas selecionadas (b) da prednisolona ao longo de um eixo de reação ψ em nm a 298 K. 76
- Figura 5 - Área por lipídio em Å^2 do modelo de surfactante pulmonar em diferentes tensões superficiais, 0 (vermelho), 10 (preto) e 20 (azul) mN m^{-1} durante 2 μs de simulação a 310 K. 78
- Figura 6 - Área por lipídio em Å^2 com uma fração em massa de 1% de prednisolona nas tensões de 0 (vermelho), 10 (preto) e 20 (azul) mN m^{-1} e na fração massa de 10% de prednisolona na tensão superficial 20 (verde) mN m^{-1} ao longo de 2 μs de simulação a 310 K. 79
- Figura 7 - Quadrado do deslocamento médio do DPPC (preto) e do POPC (azul) em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} (linha contínua) e 20 mN m^{-1} (linha tracejada) a 310 K. 83

Figura 8 - Quadrado do deslocamento médio do DPPC (preto), do POPC (azul) e da prednisolona (vermelho) em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} e 310 K. 83

Figura 9 - Parâmetro de ordem da cadeia *sn1* do DPPC (a), da cadeia *sn2* do POPC (b) nas tensões superficiais 0 (preto), 10 (azul) e 20 (vermelho) mN m^{-1} sem prednisolona. Parâmetro de ordem da cadeia *sn1* do DPPC (c), e da cadeia *sn2* do POPC (d) nas frações mássicas de 0% (preto), 1% (azul) e 10% (vermelho) na tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K. 87

Figura 10 - Perfil de densidade mássica (kg m^{-3}) ao longo do eixo z da água (celeste), DPPC (preto), POPC (azul) e prednisolona (vermelha), com 10% de prednisolona e tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K. 89

Figura 11 - Perfil de densidade mássica (kg m^{-3}) ao longo do eixo z dos sítios: NC3 (azul), PO4 (amarelo), GL2 (vermelho), ROH2 (verde), RO3 (roxo) e ROH1 (cinza) a 310 K. A água (linha celeste tracejada) foi utilizada como referência. 89

Figura 12 - Distribuição radial no plano xy do DPPC (preto), do POPC (azul) e da prednisolona (vermelho) com respeito ao DPPC na tensão superficial de 20 mN m^{-1} depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação a 310 K. 101

Lista de tabelas

Tabela 1 - Comparação da energia livre de transferência da prednisolona da água para o octanol (ΔG_{trans}) e do logaritmo do coeficiente de partição ($\log P_{o/a}$) da prednisolona pelo método de integração termodinâmico, o <i>umbrella sampling</i> e experimental de $\log P_{o/a}$ medidos a uma temperatura de 298 K.	75
Tabela 2 - Resumo da área por lipídio (em \AA^2) nas três diferentes tensões superficiais (0; 10 e 20 mN m^{-1}) e nas três diferentes frações em massa (0,1; 1 e 10%) a 310 K.	79
Tabela 3 - Resumo dos coeficientes de difusão lateral do DPPC e do POPC em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ sem prednisolona nas tensões superficiais de 0, 10 e 20 mN m^{-1} a 310 K.	82
Tabela 4 - Coeficientes de difusão lateral do DPPC, do POPC e da prednisolona em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K.	82
Tabela 5 - Parâmetro de ordem das duas caudas do DPPC nas três tensões superficiais 0, 10 e 20 mN m^{-1} e nas três frações mássicas de 0,1%; 1% e 10% de prednisolona a 310 K.	85
Tabela 6 - Parâmetro de ordem das duas caudas do POPC nas três tensões superficiais 0, 10 e 20 mN m^{-1} e nas três frações mássicas de 0,1%; 1% e 10% de prednisolona a 310 K.	86

Lista de ilustrações

Ilustração 1 – Mecanismo de segregação do surfactante pulmonar. Ilustração traduzida ao Português e utilizada com permissão dos autores (Perez-Gil e Weaver, 2010).	30
Ilustração 2 – Fases da monocamada de surfactante pulmonar. Ilustração traduzida ao Português e utilizada com permissão do autor (Perez-Gil, 2008)	31
Ilustração 3 - Modelo <i>coarse grained</i> da prednisolona (roxo) solvatada com água (cinza) em uma caixa de 5,1 nm x 5,1 nm x 5,1 nm.	65
Ilustração 4 - Modelo <i>coarse grained</i> da prednisolona (roxo) solvatada com uma mistura de octanol-água em uma caixa de 5,1 nm x 5,1 nm x 5,1 nm. O octanol está representado por as bolas verdes e azuis e a água está representada em cinza.	66
Ilustração 5 – Prednisolona na fase água de um sistema bifásico água/octanol em uma caixa de 5 x 5 x 24 nm.	67
Ilustração 6 - Prednisolona na fase octanol de um sistema bifásico água/octanol em uma caixa de 5 x 5 x 24 nm.	67
Ilustração 7 - Monocamada de DPPC (verde) e POPC (amarelo) na interface ar-água (água representada em cinza) com 1% de prednisolona (roxo).	69
Ilustração 8 - Ciclo termodinâmico da prednisolona no vácuo, na água e no octanol.	72
Ilustração 9 - Monocamada fosfolipídica de DPPC/POPC com 10%	

prednisolona em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K. Prednisolona está representado em marrom, o sítio ROH2 em azul, o DPPC/POPC com esferas verdes/amarelas menores e água com esferas em cinza. 90

Ilustração 10 - Modelo de surfactante pulmonar com 1% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c). 92

Ilustração 11 - Modelo de surfactante pulmonar com 1% de prednisolona em uma tensão superficial de 10 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c). 93

Ilustração 12 - Modelo de surfactante pulmonar com 1% de prednisolona em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c). 94

Ilustração 13 - Modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de 260 ns de simulação (c). 95

Ilustração 14 - Modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 10 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois

de 776 ns de simulação (c). 96

Ilustração 15 - Modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c). 97

Ilustração 16 - Vista do plano xy do modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} depois de 10 ns de simulação (a), vista de um colapso induzido do plano xz do modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} (b) e vista do espalhamento no plano xy com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} depois de 500 ns de simulação (c). 98

Ilustração 17 - Vista do plano xy da monocamada mista de DPPC/POPC em $0 \mu\text{s}$ (a), $4 \mu\text{s}$ tensão superficial de 10 mN m^{-1} (b) e $4 \mu\text{s}$ tensão superficial de 0 mN m^{-1} (c) a 310 K. 99

Ilustração 18 - Vista xy da mistura fosfolipídica do DPPC/POPC (verde/amarelo) com 10 % de prednisolona (roxo) e tensão superficial de 20 mN m^{-1} depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação a 310 K. 101

Lista de quadros

Quadro 1 - Representação dos sítios que formam as estruturas <i>coarse grained</i> do DPPC, POPC, octanol e água.	62
Quadro 2 - Representação dos sítios que formam as estruturas <i>coarse grained</i> do colesterol e da prednisolona.	62
Quadro 3 - Estruturas químicas e representações <i>coarse grained</i> do DPPC, POPC, octanol, água, prednisolona e colesterol.	64
Quadro 4 – Resumo da estabilidade e formação de agregados nas três frações em massa 0,1%; 1% e 10% de prednisolona e nas três tensões superficiais 0, 10 e 20 mN m ⁻¹ do modelo de surfactante pulmonar a 310 K.	91

Lista de símbolos e abreviaturas

A_L	Área por molécula de lipídio.
C_v	Capacidade calorífica.
N_{df}	Número de graus de liberdade.
P_Z	Parâmetro de ordem <i>coarse grained</i> .
S_{CD}	Parâmetro de ordem atomístico.
V_L	Potencial das interações ligadas
V_{LJ}	Potencial de van der Waals.
V_{NL}	Potencial das interações não ligadas.
V_a	Potencial do ângulo de ligação.
V_c	Potencial eletrostático.
V_d	Potencial de torção de ligação.
V_{di}	Potencial de diedro impróprio.
V_l	Potencial do comprimento de ligação.
k_a	Constante de deformação angular.
k_d	Constante de ângulo diedro.
k_{di}	Constante de ângulo diedro impróprio.
k_l	Constante de força de ligação.
$\log P_{o/a}$	Logaritmo do coeficiente de partição.
r_{ij}	Módulo da distância entre a partícula i e j .
\mathbf{F}_i	Força de uma partícula.
\mathbf{r}_{ij}	Vetor da distância entre a partícula i e j .
γ_0	Tensão superficial da interface ar-água.
ϵ_0	Constante dielétrica no vácuo.
ϵ_r	Constante dielétrica relativa.
θ_{ijk}	Deformação angular entre as partículas i , j e k .
ξ_{ijkl}	Ângulo diedro impróprio entre as partículas i , j , k e l .
σ_{ij}	Distância onde o potencial e Lennard-Jones vai a zero.

τ_T	Constante de tempo do termostato.
τ_p	Constante de tempo do barostato.
ω_i	Constante de fricção dinâmica molecular estocástica.
ϵ_{ij}	Profundidade do poço no potencial de van der Waals.
ϕ_{ijkl}	Ângulo diedro entre os planos ijk e jkl .
\mathcal{H}	Hamiltoniano clássico.
L_C	Fase de líquido condensado.
L_E	Fase de líquido expandido.
L_O	Fase de líquido organizado.
Π	Pressão de superfície.
D	Coeficiente de difusão lateral.
K	Energia cinética.
L	Comprimento de uma caixa.
N	Número de partículas
V	Energia potencial.
k	Constante de Boltzmann.
q	Carga de uma partícula.
t	Tempo.
v	Velocidade de uma partícula.
vol	Volume de uma caixa.
W	Potencial de tendência.
\mathbf{p}	Posição de uma partícula.
\mathbf{q}	Momento de uma partícula.
R	Constante dos gases ideais.
ΔG_{trans}	Variação de energia livre de Gibbs.
α	Parâmetro do pseudopotencial.
β	Compressibilidade isotérmica.
γ	Tensão de superfície.
η	Fator de ruído da equação de dinâmica molecular estocástica.
λ	Parâmetro de acoplamento.

μ	Coeficiente de escalonamento.
σ	Raio das interações no pseudopotencial.
ψ	Coordenada de reação.

Vuela siempre hacia arriba, hacia la cúspide del monte coronado de águilas, hacia la gloria de la luz. No lles en tu garra de hierro las piltrafas de las carnes de tu enemigo: ni en tu ojo rutilante el fuego del odio que sientas por él, ni en tu pico, hecho para partir las viscosas víboras, el rastro de la sangre de su corazón. Vuela a lo alto, limpio el plumaje del limo de la ciénaga de la vida. No causes tormentos, no sordas iras, ni envidias bajas, ni rivalidades ruines. Sé generoso. Sé noble. Sé leal. Anida en los cóncavos de las montañas bíblicas; busca la compañía de los espíritus excelsos; juntamente a la cuadriga de las almas superiores.

Juan Ramón Molina, *Excelsior*

1 Introdução

A inflamação é um mecanismo de defesa de todo organismo vivo a uma infecção ou lesão dos tecidos. Os corticosteroides são amplamente utilizados em um grande número de tratamentos clínicos por suas propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras. Uma dessas aplicações é no tratamento de doenças do sistema respiratório como: asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (bronquites, enfisemas, etc.) e alergias respiratórias (Chung *et al.*, 2009). Não obstante, o uso sistêmico dos corticosteroides para o tratamento de doenças respiratórias tem sido descontinuado por seus efeitos adversos (Schacke *et al.*, 2002b). Atualmente, novos métodos de administração como inalação por aerossóis e instilação intratraqueal têm sido testados clinicamente com sucesso (Barnes, 1995). Outra doença respiratória associada com problemas inflamatórios é a síndrome da angústia respiratória do recém-nascido.

A síndrome da angústia respiratória do recém-nascido é uma doença que afeta principalmente bebês prematuros causada pela deficiência ou inibição do surfactante pulmonar (Polin *et al.*, 2014). O surfactante pulmonar é um filme interfacial composto de lipídios e proteínas, gerado entre as semanas 24 e 34 de gestação. Encontra-se na região alveolar do pulmão e permite executar corretamente o mecanismo respiratório (Suwabe *et al.*, 1992). Um bebê prematuro é aquele que nasce antes das 37 semanas de gestação. Um estudo feito em 2010 com estatísticas de 184 países do mundo, mostra que, o nascimento de bebês prematuros é a causa número um de morte de bebês recém-nascidos. Nesse mesmo estudo foram relatados 15 milhões de nascimentos prematuros, dos quais, 1,1 milhões morreram por complicações médicas (por exemplo infecções). Uma faixa de 5 a 18% de nascimentos prematuros foi registrada entre os 184 países avaliados. Para o Brasil, a porcentagem foi de 9,2% ou seja, 9 de cada 100 bebês que nascem são prematuros (Blencowe *et al.*, 2013). Atualmente, a substituição de surfactante pulmonar por fontes exógenas de origem animal é uma terapia bem estabelecida nos procedimentos clínicos, que gera uma redução considerável na mortalidade dos bebês prematuros sem complicações médicas (Blanco e Perez-Gil, 2007).

Substituição de surfactante pulmonar em recém-nascidos com a síndrome da aspiração de mecônio (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2011) e indivíduos adultos com enfermidades respiratórias crônicas (Lewis e Veldhuizen, 2006) foram realizados. No entanto, os resultados obtidos não foram igualmente eficientes ao tratamento em pacientes com complicações médicas. Por isso, a aplicação clínica de uma mistura de surfactante pulmonar com corticosteroides para o tratamento das doenças descritas anteriormente seria um grande avanço na área médica. A aplicação, além de reduzir consideravelmente os efeitos colaterais negativos dos corticosteroides por sua administração, também melhoraria a eficiência da administração do surfactante pulmonar nos casos onde quadros de inflamação também são diagnosticados. Experimentos de instilação intratraqueal de mistura de budesonida, um tipo de corticosteroide, com surfactante pulmonar exógeno foram realizados com resultados positivos (Kuo *et al.*, 2010). Entretanto, as interações moleculares não são claras e estudos da estabilidade e das propriedades mecânicas do surfactante pulmonar são necessários para demonstrar a viabilidade dessa mistura.

A dinâmica molecular clássica mostra ser uma ferramenta poderosa para simulações de propriedades de sistemas biológicos complexos que ainda não podem ser elucidadas por métodos experimentais. As duas metodologias de dinâmica molecular clássica mais utilizadas são baseadas na resolução de sua estrutura química: representando explicitamente os átomos da molécula (simulação atômica) ou agrupando um conjunto de átomos (simulação *coarse grained*). Existem muitos estudos de dinâmicas moleculares de bicamadas e monocamadas lipídicas com essas duas metodologias na literatura (Baoukina e Tieleman, 2016). Na dinâmica molecular clássica, as interações entre moléculas são definidas pelo campo de força. O MARTINI é um campo de força que utiliza a metodologia *coarse grained* (Marrink *et al.*, 2007). Esse campo de força tem sido utilizado para o estudo de certos fenômenos que acontecem no surfactante pulmonar durante o processo respiratório, como é o caso de colapso do filme (Baoukina *et al.*, 2008), coexistência de fases (Duncan *et al.*, 2011) e interações com outras partículas (Barnoud *et al.*, 2015). Esses fenômenos acontecem em tempos longos e escalas espaciais maiores, portanto, a redução do tempo computacional torna-se uma prioridade. Ainda que a simulação *coarse grained* por sua simplicidade não considere certas características químicas das moléculas, ela consegue simular tempos maiores necessários para apresentar esses fenômenos. Assim, um equilíbrio entre eficiência e realidade deve ser gerenciado com esta metodologia.

Nesta dissertação, cálculos de energia livre da transferência do corticosteroide prednisolona da fase água para a fase octanol foram realizados para determinar o coeficiente de partição octanol/água da prednisolona. Os resultados foram comparados com valores experimentais para validar o campo de força adaptado para a prednisolona. Desta forma, as interações entre a prednisolona e um modelo de surfactante pulmonar foram analisadas em três diferentes tensões superficiais do mecanismo respiratório 0, 10 e 20 mN m⁻¹. Três distintas frações mássicas de prednisolona (0,1%; 1,0%; e 10 %) foram escolhidas. O modelo de surfactante pulmonar é composto por dois fosfolipídios: o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que é o fosfolipídio saturado mais abundante do surfactante pulmonar, e o palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), que é um fosfolipídio insaturado. A formação de nanoagregados de prednisolona, o colapso da monocamada e o espalhamento da prednisolona foram investigados com esta metodologia. Além disso, informações dinâmicas, como a difusão lateral, e estruturais, como a organização da monocamada, localização da prednisolona e separação de fases da monocamada foram analisadas.

2 Objetivos

2.1. Objetivo geral

Simular pela primeira vez a adsorção de prednisolona em um modelo de surfactante pulmonar a 310 K com diferentes frações em massa de prednisolona (0,1%; 1% e 10%) e diferentes tensões superficiais do mecanismo respiratório (0, 10 e 20 mN m⁻¹) utilizando dinâmica molecular *coarse grained* em escala de microssegundos.

2.2. Objetivos específicos

Este trabalho tem como objetivos específicos realizar cálculos de energia livre da transferência da prednisolona da fase água para a fase octanol através do método de integração termodinâmica e do método do *umbrella sampling*. Resultados que serão utilizados para o cálculo do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água da prednisolona e comparados com resultados experimentais. Uma análise de ambos métodos será realizada para avaliar qual apresenta melhores resultados e validar o campo de força da prednisolona em *coarse grained*. Propriedades dinâmicas do modelo de surfactante pulmonar (DPPC/POPC) com e sem a prednisolona serão computadas pela difusão lateral quantificando as mudanças que gera a inserção do fármaco. Propriedades estruturais do modelo de surfactante pulmonar na ausência e na presença da prednisolona tais como área por lipídio e parâmetro de ordem serão calculadas. A localização e a orientação das moléculas de prednisolona no modelo de surfactante pulmonar serão elucidadas com ajuda da distribuição de densidade mássica. A formação de agregados em cada fração em massa e em cada tensão superficial será prevista. Estabilidade e colapso do modelo de surfactante pulmonar em cada fração em massa e em cada tensão superficial será avaliada qualitativamente. A habilidade de espalhamento de nanoagregados de prednisolona será simulada. A separação de fases do modelo de surfactante pulmonar com e sem prednisolona será descrita pela função de distribuição radial.

3 Fundamentação teórica

3.1. Corticosteroides

Os corticosteroides pertencem à família de hormônios esteroides de 21 carbonos, liberado pelo córtex adrenal que inclui glicocorticoides e mineralocorticoides. O termo corticosteroide é, entretanto, usado para referir-se aos glicocorticoides (Ito *et al.*, 2006). Os glicocorticoides regulam diversas funções celulares como crescimento, homeostases, metabolização, cognição e inflamação (Rhen e Cidlowski, 2005). Por sua ampla utilização nos mecanismos imunorreguladores, os glicocorticoides são um dos fármacos mais amplamente prescritas no mundo todo para tratar numerosas doenças inflamatórias e autoimunes como asma, alergia, artrites e esclerose múltipla. Contudo, os benefícios terapêuticos dos glicocorticoides são limitados por seus efeitos adversos associados as suas altas doses e longos tempos de uso. Entre os efeitos adversos estão: osteoporoses, atrofia da pele, diabetes, obesidade abdominal, glaucoma, cataratas, infecção e necroses vascular, crescimento retardado e hipertensão (Schacke *et al.*, 2002a)

Os glicocorticoides têm sido utilizados com sucesso no tratamento da asma desde a década de 1970 por sua ação anti-inflamatória (Chung *et al.*, 2009; Klaustermeier e Choi, 2016). Ainda que eles têm sido tema de críticas pelos efeitos colaterais anteriormente citados, seguem tendo um lugar privilegiado nos tratamentos clínicos da asma (McDonough *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). O mecanismo de administração também tem sido tema de pesquisa, comprovando que a administração pelas vias respiratórias (inalação) tem a mesma efetividade que a administração oral e com um menor número de efeitos colaterais (Barnes, 1995). Por este fato, o glicocorticoide prednisolona, o metabolito ativo da prednisona, tem dosagens baixas, e só em casos extremos, é aplicado em dosagens maiores (Fleishaker *et al.*, 2016).

3.2. Tensoativos

Um material tensoativo é uma substância que influencia através da tensão superficial a superfície de contato entre duas fases não miscíveis. Os tensoativos também são chamados de surfactantes, termo derivado da expressão inglesa “**surface active agent**”. Uma molécula tensoativa apresenta uma parte com característica apolar ligada a outra com característica polar. A parte apolar de um tensoativo normalmente tem origem em uma cadeia carbônica, normalmente é conhecida como cauda. A parte polar pode ser formada por átomos que apresentem concentração de carga com formação de um polo negativo ou positivo, conhecida como cabeça. Os tensoativos são classificados em 4 categorias. Os tensoativos catiônicos apresentam uma carga positiva na região polar da molécula. Os tensoativos aniônicos apresentam uma carga negativa na região polar. Os tensoativos não-iônicos não apresentam cargas verdadeiras. E os tensoativos zwitteriônicos possuem tanto uma carga positiva como negativa na sua cabeça pelo que podem se comportar como tensoativos aniônicos ou catiônicos (Daltin, D. 2012).

3.3. Surfactante pulmonar

O surfactante pulmonar é um componente vital no sistema respiratório. Ele foi descoberto em 1929 quando Kurt von Neergaard sugeriu a existência de um material com propriedades tensoativas no pulmão. Este fato pulmonar foi comprovado 25 anos depois por Richard Pattle na Inglaterra, John Clements nos Estados Unidos e Chris Macklin no Canadá por suas pesquisas sobre os efeitos de agentes nervosos sobre o pulmão onde puderam ter um maior entendimento sobre a fisiologia deste novo tensoativo. Desde então, um grande número de pesquisas teóricas e experimentais tem sido desenvolvidas para conhecer um pouco mais sobre sua composição e seu mecanismo no processo de respiração (Halliday, 2008).

3.3.1. Composição

O surfactante pulmonar é uma mistura complexa de lipídios e proteínas que é sintetizada pelas células alveolares epiteliais tipo II no espaço alveolar (Suwabe *et al.*, 1992). Em termos gerais o surfactante pulmonar dos mamíferos é composto de uma fração em massa de aproximadamente 90 % de lipídios, e de 10 % de proteínas. Entre os lipídios, as espécies majoritárias são os fosfolipídios zwitteriônicos tais como as fosfatidilcolinas (PC) com uma fração em massa de aproximadamente 60 a 70 %. Os lipídios aniônicos tais como os fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidilinositol (PI) possuem uma fração em massa de 10 a 15 % e os lipídios neutros, principalmente o colesterol, contribuem com 10 %. Entre 30 a 60 % dos PC é dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) que é uma espécie que contém as duas cadeias hidrocarbônicas saturadas. Este fosfolipídio possui uma grande capacidade de empacotamento e é o principal responsável pela redução da tensão superficial necessária para estabilizar o pulmão no momento da expiração no processo respiratório. A maior parte dos fosfolipídios restantes são insaturados tais como o palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) que contém uma insaturação em uma das suas cadeias hidrocarbônicas. As proteínas do surfactante pulmonar podem ser classificadas em duas classes: hidrofóbicas (SP-B e SP-C) e hidrofílicas (SP-A e SP-D). As hidrofílicas são as mais abundantes e estão relacionadas com o mecanismo inato de defesa no alvéolo e as hidrofóbicas possuem um papel fundamental nas funções biofísicas do surfactante pulmonar (Shelley *et al.*, 1982; Parra e Perez-Gil, 2015). Todos esses componentes do surfactante pulmonar são organizados e armazenados em estruturas chamadas de corpos lamelares (CL) (Ilustração 1). Estas estruturas têm um formato esférico que contém múltiplas membranas concêntricas. Quando os corpos lamelares são segregados dentro da subfase alveolar, diferentes estruturas são geradas por causa das mudanças de pH, hidratação e concentração de cálcio. Uma reorganização de especial interesse é a chamada bainha de mielina (BM), formada diretamente dos corpos lamelares e contendo numerosos arranjos de membranas (bicamadas) de tipo cúbico. Esta formação é permitida pelo auxílio da proteína SP-A que, junto com a proteína SP-D, é segregada separadamente dos corpos lamelares. Uma das teorias mais aceitas supõe que a bainha de mielina é a responsável direta da formação do surfactante pulmonar na interface ar-água. (Perez-Gil, 2008; Perez-Gil e Weaver, 2010).

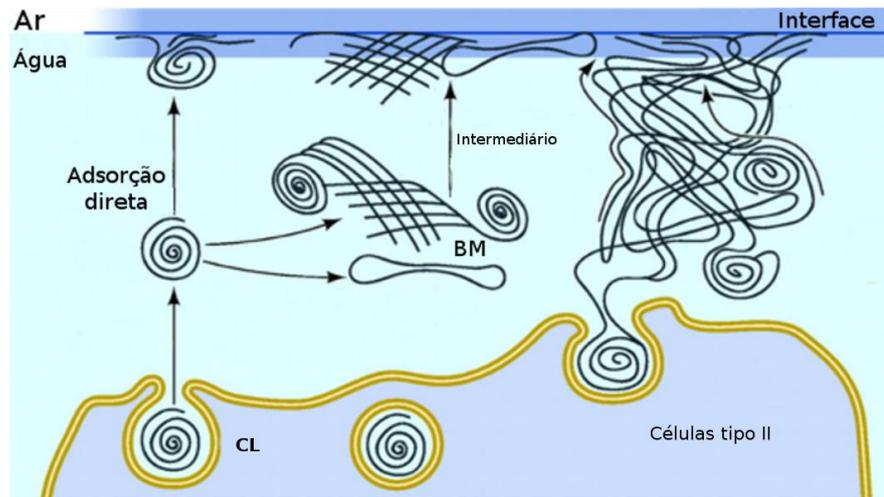


Ilustração 1 – Mecanismo de segregação do surfactante pulmonar. Ilustração traduzida ao Português e utilizada com permissão dos autores (Perez-Gil e Weaver, 2010).

3.3.2. Mecanismo

Os bronquíolos são ramificações que fazem parte do sistema respiratório humano. No final destas ramificações, existem cavidades pequenas chamadas de alvéolos. Os alvéolos são os responsáveis pela troca gasosa: entrada de oxigênio e saída de dióxido de carbono no corpo humano. Estas pequenas cavidades de raio de aproximadamente de 0,1 mm são expandidas para obter oxigênio durante a inalação e contraídas durante a exalação. A expansão desta grande superfície requer uma quantidade significativa de trabalho. De acordo com a equação de Young-Laplace:

$$P = 2\gamma/R \quad (1).$$

O pequeno raio da cavidade gera uma pressão muito alta dentro dos alvéolos. Na eq. (1), P é a pressão na região alveolar, γ é a tensão da superfície alveolar e R é o raio dos alvéolos. A superfície alveolar coberta apenas por água mantém uma tensão superficial aproximada de 70 mN m^{-1} a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. No entanto, o surfactante pulmonar consegue baixar essa tensão a níveis perto de 0 mN m^{-1} no final da exalação que é o estágio mais crítico da respiração, evitando o colapso do pulmão. (Goerke, 1998)

É bem conhecido que o surfactante pulmonar deve possuir pelo menos três propriedades mecânicas em um processo respiratório normal: (I) uma rápida adsorção na interface ar-água, (II) uma tensão superficial muito baixa no momento da compressão e (III) um eficiente espalhamento durante os sucessivos ciclos de compressão e expansão. (Lopez-Rodriguez e Perez-Gil, 2014).

Os fosfolípidios do surfactante pulmonar são pouco solúveis em água e são adsorvidos em forma de agregados na interface ar-água (Ilustração 2). Esses agregados são liberados pela bainha de mielina através da formação de grandes estruturas curvadas com grandes barreiras de energia. SP-B e SP-C promovem a estabilização destes grandes intermediários, permitindo uma adsorção muito eficiente e quase instantânea (Walters *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2002). Devido ao seu caráter anfifílico, os fosfolípidios são orientados na interface ar-água na forma de monocamadas de surfactante.

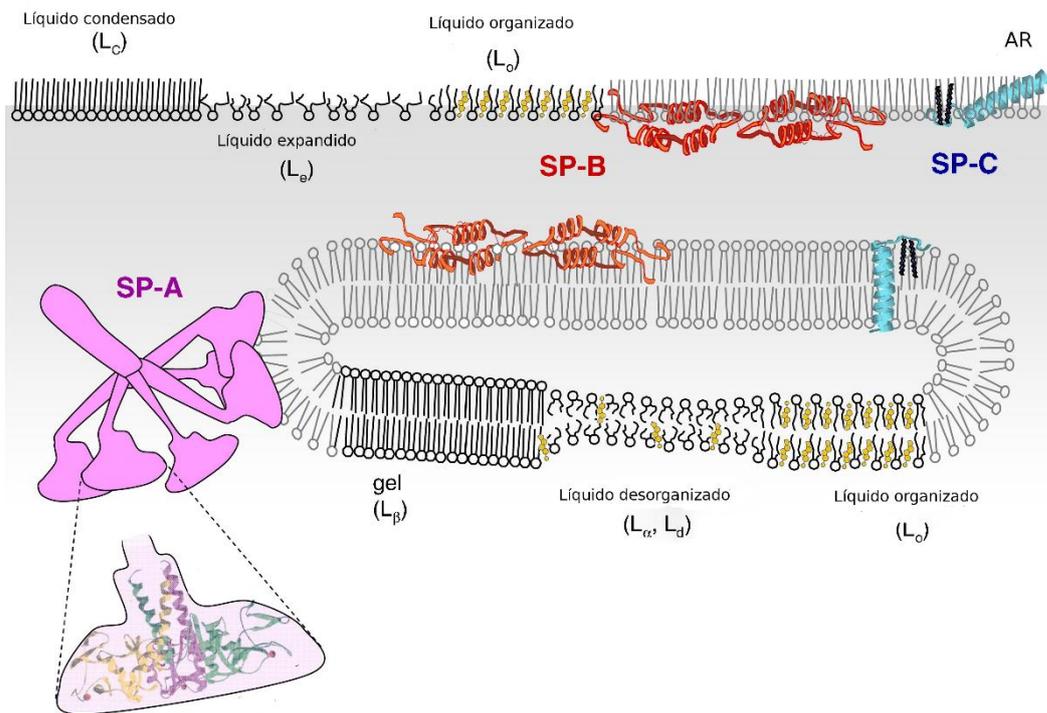


Ilustração 2 – Fases da monocamada de surfactante pulmonar. Ilustração traduzida ao Português e utilizada com permissão do autor (Perez-Gil, 2008)

A tensão superficial na nova interface pode ser calculada pela seguinte equação:

$$\gamma(A_L) = \gamma_0 - \Pi(A_L) \quad (2),$$

onde γ_0 é a tensão superficial da interface ar-água pura, A_L é área por molécula de lipídio, e $\Pi(A_L)$ é a pressão de superfície gerada pela interação das moléculas (Adamson, A.W. 1997). O colapso da monocamada na sua tensão de equilíbrio forma reservatórios de bicamadas de fosfolípidios. Também, a adsorção de material em excesso na subfase pode formar reservatórios (Schurch *et al.*, 1995).

A tensão superficial na interface depende da densidade superficial (o inverso da área por lipídeo). Quanto maior a densidade superficial, menor será a tensão superficial. Um aumento da densidade superficial pode ser atingido pela adsorção do surfactante da subfase ou pela compressão da interface. A quantidade de surfactante que pode ser adsorvida na interface permite atingir uma tensão de equilíbrio de 20 a 27 mN m⁻¹, o que permite um equilíbrio entre agregados 2D (monocamadas) e agregados 3D na subfase. Através da compressão da região alveolar na exalação a densidade superficial é aumentada e a tensão superficial baixa a um valor mínimo de tensão (aproximadamente 0 mN m⁻¹). Quando o processo de inalação acontece, a tensão da superfície sobe novamente para um valor próximo da tensão de equilíbrio. Nesta situação, a monocamada do surfactante pulmonar encontra-se num estado metaestável entre a tensão de equilíbrio e o colapso (Zuo, Yi Y. *et al.*, 2008).

3.3.3. Coexistência de fases

A hipótese clássica *squeezed out* (Watkins, 1968; Clements, 1977) sugere que a monocamada do surfactante pulmonar é exprimida no processo de compressão depois de sua tensão abaixar para valores abaixo do valor de equilíbrio. Os lipídios insaturados são removidos enriquecendo a monocamada com lipídios saturados, basicamente DPPC. Entretanto, esta teoria tem sido questionada por recentes pesquisas que comprovam a existência de quantidades consideráveis de lipídios insaturados no final da exalação (Piknova *et al.*, 2001; Yu e Possmayer, 2003). Além disso, também já foi provado que monocamadas em fase líquido expandida podem atingir tensões muito baixas através de uma supercompressão (Crane e Hall, 2001), não obstante ainda não é conhecido se este fenômeno possa acontecer no mecanismo respiratório pulmonar. Portanto, novas hipóteses são necessárias para responder a estes fatos intrigantes. Um número considerável de estudos tem demonstrado a coexistência de fases tanto em monocamadas de surfactante pulmonar como em bicamadas lipídicas (Discher *et al.*, 1996; Nag *et al.*, 1998; Zuo, Y. Y. *et al.*, 2008; De La Serna *et al.*, 2013). Os cientistas agora se perguntam se esta coexistência de fases pode contribuir para a estabilidade do filme e afetar a formação dos reservatórios (Possmayer *et al.*, 2010).

3.3.4. Temperaturas de transições de fases

Da mesma forma que a composição possui um papel fundamental na redução da tensão superficial da região alveolar, a temperatura define as diferentes fases nas quais o surfactante pulmonar pode permanecer. Cada fosfolípido possui uma temperatura de transição T_m (da sigla em inglês, *melting temperature*) que define uma fase fluida ou condensada. Por exemplo, o DPPC tem uma T_m de 41 °C (Yan *et al.*, 2007) que é um pouco acima da temperatura fisiológica do corpo humano, 37 °C. Desta forma, um filme puro de DPPC não pode ser completamente fluido no corpo humano. Os fosfolípidos insaturados como o POPC possuem T_m muito mais baixas, -3 °C (Davis *et al.*, 1981). Esta mistura de fosfolípidos com diferentes temperaturas de transição é o que permite o surfactante pulmonar ser uma mistura fluida, o qual é fundamental para ele ser adsorvido rapidamente na interface.

Na temperatura fisiológica do corpo humano e níveis baixos de compressão ou baixas densidades de empacotamento, as caudas dos fosfolípidos têm uma grande liberdade de movimento constituindo a fase líquido expandido (L_E). Pelo contrário, em níveis altos de compressão e altas densidades de empacotamento, a fase é conhecida como líquido condensado (L_C) (Nag *et al.*, 1991). Além da temperatura e a composição da mistura fosfolípida, o colesterol possui um papel importante nas fases do surfactante pulmonar. Numerosos estudos mostram que o colesterol influencia diretamente na estrutura do surfactante pulmonar, diminuindo o grau de empacotamento e dando mobilidade aos fosfolípidos (De La Serna *et al.*, 2004). Esta fase conhecida como líquido organizado (L_O) é considerada como uma fase intermediária entre a fase L_E e a L_C (Ilustração 2) (Worthman *et al.*, 1997; De La Serna *et al.*, 2004).

3.4. Surfactantes exógenos

Como já foi descrito, o surfactante pulmonar é fundamental para a vida pois sua falta ou seu mal funcionamento pode trazer consequências fatais (Goerke, 1998). A população mais sensível a ter um mal funcionamento do surfactante pulmonar são os bebês prematuros, que possuem uma doença conhecida como a síndrome da angústia respiratória do recém-nascido. Estas condições patológicas podem ser causadas por desordem genética (Wert *et al.*, 2009), inativação do surfactante (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2011), parto prematuro (Polin

et al., 2014) ou qualquer outra patologia que danifique o epitélio alveolar e as propriedades biofísicas do surfactante pulmonar.

A síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (ou a doença da membrana de hialina como era conhecida) foi descoberta por Mary Ellen Avery e Jere Mead em 1959. Essas cientistas concordaram que a doença acontecia devido à deficiência de surfactante pulmonar (Halliday, 2008). Isto fez seguir a ideia da terapia de substituição de surfactante (Hallman, 1991; Segerer *et al.*, 1991; Banerjee e Puniyani, 2000).

Na década de 80, vários ensaios com a terapia de substituição de surfactante foram feitos em humanos com sucesso e rapidamente tornou-se a terapia padrão para o tratamento da síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (Fujiwara *et al.*, 1980; Halliday, 1995). Atualmente, tem-se desenvolvido numerosos surfactantes clínicos extraídos do pulmão de diferentes animais, principalmente de boi e porco como é o caso de Curosurf®, Survanta®, Surfacen®, Infasurf®, Alveofact® e BLES®. Pela origem, esses surfactantes são conhecidos como surfactantes pulmonares naturais. Todos eles se diferenciam um do outro na composição e, portanto, em sua função. No entanto, todos eles têm demonstrado serem efetivos no tratamento da síndrome da angústia respiratória do recém-nascido. Os surfactantes pulmonares naturais são caros e também apresentam diferenças consideráveis entre cada lote, no entanto, muitos esforços têm sido feitos para desenvolver um surfactante pulmonar padronizado mais barato. Infelizmente, devido à complexidade do mesmo, isto ainda parece ser uma tarefa sem solução (Blanco e Perez-Gil, 2007). O único surfactante pulmonar artificial que hoje pode ser encontrado no mercado é o Surfaxin® (Cochrane *et al.*, 1996). Outros surfactantes pulmonares artificiais estão em estágio de desenvolvimento (Spragg *et al.*, 2003; Seehase *et al.*, 2012).

3.5.

Mistura de fármacos com surfactantes pulmonares exógenos

Apesar de ser bem conhecida a habilidade do surfactante pulmonar de se espalhar rapidamente na interface ar-água da cavidade alveolar, a pesquisa de surfactante pulmonar como um possível carregador de fármacos começou há pouco tempo (Perez-Gil e Keough, 1998). Na década de 90, van 't Veen *et al.* realizaram a experiência de misturar surfactante pulmonar exógeno com fármacos e concluiu que os ratos que tinham recebido o fármaco misturada com surfactante sobreviveram mais do que aqueles que apenas foram tratados com o fármaco (Vantveen *et al.*, 1996). Três anos mais tarde, esse mesmo pesquisador publicou que esta nova técnica diminuía os efeitos colaterais ocasionados pela fármaco além de diminuir a mortalidade dos ratos (Van't Veen *et al.*, 1999). Posteriormente, também foram testados outros agentes terapêuticos tais como: anticorpos (Herting *et al.*, 1999), corticosteroides (Liu *et al.*, 1996), recombinação de vetores adenovírus (Katkin *et al.*, 1997) e enzimas antioxidantes (Walther *et al.*, 1995).

Porém, qualquer molécula que seja transportada pelo surfactante pulmonar pode modificar suas propriedades e funcionalidade devido às interações entre ambos componentes. O estudo destas interações é fundamental para tirar conclusões sobre a aplicabilidade de qualquer mistura fármaco/surfactante pulmonar.

3.6.

Surfactantes pulmonares exógenos e glicocorticoides

Como a inflamação é uma característica primária de muitas doenças, os glicocorticoides têm sido tema de muitas pesquisas. Na parte experimental, Davies *et al.* relataram um aumento na hidrofobicidade de uma monocamada de Survanta® quando ela foi misturada com budesonida. Eles acreditam que este aumento da hidrofobicidade é devido a um aumento das interações com a budesonida hidrofóbica (Davies *et al.*, 2009). Por outro lado, Kuo *et al.* têm relatado estudos sobre instilação intratraqueal de budesonida usando um surfactante pulmonar exógeno como veículo de administração. Ele mostrou uma significativa diminuição das mortes de recém-nascidos prematuros com a síndrome de angústia respiratória do recém-nascido e diminuição dos efeitos adversos a longo prazo (Kuo *et al.*, 2010). Mikolka *et al.* mostraram uma melhoria nas funções mecânicas do pulmão. Quando coelhos induzidos com a síndrome de aspiração de mecônio foram administrados com uma mistura de budesonida e

Curosurf®, também ocorreu a diminuição da inflamação quando comparado com o tratamento com apenas o corticosteroide e o surfactante pulmonar exógeno (Mikolka *et al.*, 2013).

Fazendo uma analogia entre os corticosteroides e o colesterol por suas semelhanças na sua estrutura e pelo importante papel do colesterol no surfactante pulmonar, pesquisas das interações entre estes dois tipos de esteroides têm sido desenvolvidas. Zhang *et al.* e colaboradores compararam os efeitos do colesterol e budesonida no filme de um surfactante pulmonar exógeno livre de colesterol (Curosurf®). Em baixas frações em massa ($\ll 10\%$), ambos esteroides apresentam o mesmo comportamento de fluidificação do filme. Quando a fração em massa aumenta para 10%, o filme com colesterol apresenta uma única fase que anula as propriedades interfaciais do filme. Não obstante, o filme com budesonida apenas é fluidificado mostrando pouco efeito na atividade superficial. Estes mesmos autores sugerem que os surfactantes exógenos livres de colesterol podem ser melhores carreadores de fármacos que aqueles que contêm colesterol. A explicação é que uma maior fração em massa do fármaco poderia ser distribuída sem comprometer as propriedades mecânicas do filme (Zhang *et al.*, 2012).

Por outro lado, na literatura também são encontrados relatos contraditórios com respeito à influência dos corticosteroides no surfactante pulmonar. Palmer *et al.* relatam mudanças na tensão superficial de dois surfactantes pulmonares exógenos (BLES® e Survanta®) quando eles são misturados com dois fármacos muito utilizados no tratamento de doenças respiratórias, budesonida e salbutamol. A mistura do surfactante pulmonar com o salbutamol não teve efeito nenhum na tensão superficial. A adição da budesonida aumentou a tensão superficial mínima do BLES® em frações em massa elevadas (10%). Entretanto, budesonida parece não afetar o filme em frações em massa menores. Por outro lado, o Survanta® parece ser afetado tanto com frações em massa baixas como altas. Esta diferença de estabilidade entre BLES® e Survanta® é atribuída pelo autor à maior fração em massa da proteína SP-B que possui o BLES® quando comparado com o Survanta® (Palmer *et al.*, 2000).

Wang *et al.* também relatam resultados similares de budesonida com outro surfactante pulmonar exógeno (Infasurf®). Em frações baixas de massa (0,1%) o filme não mostra mudanças nas interações do surfactante com o fármaco. No entanto, nas frações mais elevadas (1% e 10%), a tensão superficial mínima aumenta em aproximadamente 5 mN m^{-1} o que indica uma mudança nas propriedades biofísicas do surfactante pulmonar e provoca o colapso do filme pela fluidificação do surfactante. Por outro lado, o dipropionato de beclometasona (um

corticosteroide com uma estrutura química muito parecida a budesonida) não teve mudanças significativas na tensão superficial em tensões mínimas em nenhuma das frações estudadas. As diferenças são identificadas em tensões superficiais maiores (valores perto de 32 mN m^{-1}). O autor sugere que a budesonida mantém uma maior afinidade com o surfactante em níveis muito baixos de tensão e o dipropionato de beclometasona é expulso do filme muito antes de atingir estes níveis. As razões da divergência entre estas duas moléculas com estruturas químicas semelhantes são atribuídas as suas diferenças farmacocinéticas e fisicoquímicas, embora seu mecanismo de interação não está claro para a comunidade científica. (Wang *et al.*, 2012).

Pelas pesquisas desenvolvidas nos últimos anos podemos concluir que as interações de cada corticosteroide devem ser avaliadas individualmente porque ainda que eles compartilhem estruturas similares podem apresentar diferentes comportamentos quando misturados com os diferentes surfactantes pulmonares. Outro componente que tem que ser avaliado no momento da escolha do surfactante pulmonar é sua quantidade do colesterol, pelo seu papel fundamental na formação de fases necessárias para a estabilidade do filme em tensões baixas.

3.7. Dinâmica molecular

Atualmente existem muitas técnicas para o estudo das interações dos átomos e moléculas. A dinâmica molecular é uma ferramenta baseada em cálculos computacionais dessas interações. A dinâmica molecular *ab initio* descreve as interações moleculares de forma muito acurada através da equação de Schrodinger, no entanto é bem conhecido que este tipo de cálculos possui um grande custo computacional. A dinâmica molecular clássica é realizada pela solução da equação de Newton para descrever as interações dos átomos. Esse tipo de abordagem é menos acurado mas tem a grande vantagem que demanda um menor custo computacional quando comparada com a dinâmica molecular *ab initio*. A dinâmica molecular clássica pode ser classificada em relação à resolução ou agrupamento das partículas existentes no sistema: atomística e a *coarse grained*. A dinâmica molecular clássica atomística possui a representação de átomos ou grupos de dois ou três átomos (*United atoms*). Na dinâmica molecular clássica *coarse grained*, o agrupamento de quatro ou mais átomos pesados é realizado e tem sido utilizada com muita frequência nos últimos anos principalmente para sistemas complexos, onde escalas maiores de dimensão e tempo são requeridas. Também são utilizados métodos híbridos (também conhecidos como QM/MM, da sigla em inglês de *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*) onde o centro de interesse é tratado com métodos *ab initio* e o resto do sistema com mecânica molecular clássica. Agora, o desafio dos cientistas é definir como serão tratadas as interações da fronteira dos dois métodos.

3.8. Dinâmica molecular clássica

Um estado microscópico pode ser descrito pela posição e o momento de seus átomos e moléculas. Com a aproximação de Born-Oppenheimer é possível expressar um termo Hamiltoniano clássico do sistema como função da posição e velocidade dos núcleos, deixando de lado os rápidos movimentos dos elétrons. O Hamiltoniano pode ser escrito como a soma das funções das energias cinética e potencial de um conjunto de coordenadas \mathbf{q}_i e momentos \mathbf{p}_i para N partículas:

$$\mathcal{H}(\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i) = \sum_{i=1}^N K(\mathbf{p}_i) + \sum_{i=1}^N V(\mathbf{q}_i) \quad (3).$$

Por convenção as coordenadas \mathbf{q} podem ser representadas pelos eixos de coordenadas cartesianas \mathbf{r} . A energia cinética é expressa em termos do momento de cada partícula:

$$K = \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} \quad (4).$$

A dinâmica molecular clássica utiliza a mecânica clássica de Newton para resolver numericamente a equação de movimento de um conjunto de N partículas:

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}, \quad i = 1 \dots N. \quad (5),$$

onde uma partícula de massa m_i e aceleração $\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}$ gera uma força \mathbf{F}_i .

A força também pode ser expressa através da energia potencial de cada partícula:

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (6).$$

As eq. (5) e eq. (6) são resolvidas em espaços de tempo na escala de femtossegundos. A coordenada \mathbf{r}_i em função do tempo, representa a trajetória da partícula i durante um período de tempo estabelecido. Na dinâmica molecular clássica, o potencial pode ser calculado com a ajuda de campos de força conhecidos.

3.9. Cálculo do potencial

Na dinâmica molecular clássica, o potencial pode ser calculado pela soma das contribuições das interações ligadas (V_L) e das interações não-ligadas (V_{NL}) de um conjunto N de partículas:

$$V_{total} = \sum_{i=1}^N (V_L + V_{NL})_i \quad (7)$$

Entre as interações ligadas, o primeiro termo da equação, temos as seguintes contribuições covalentes que mantêm os átomos juntos:

- I. Potencial do comprimento de ligação.
- II. Potencial do ângulo de ligação.
- III. Potencial da torção de ligação.

O último termo corresponde às interações não-ligadas:

- I. De van der Waals.
- II. Electrostáticas.

3.9.1. Interações entre átomos ligados

As interações entre átomos ligados são definidas pelas interações covalentes que permitem manter os átomos juntos. Neste tipo de ligações, os campos de força fazem diferença no comprimento da ligação com respeito às ligações serem simples, duplas ou triplas. Existem os seguintes tipos de interações entre átomos ligados: estiramento da ligação entre dois corpos, ângulo de ligação entre três corpos e o ângulo diedro entre quatro corpos. Existe também um tipo especial de interação diedro que é usada para forçar os átomos a ficarem em uma posição plana ou tetraédrica. O potencial diedro é usado em compostos cíclicos ou para manter a quiralidade de grupos com carbonos assimétricos no caso de átomos unidos.

3.9.1.1. Comprimento de ligação

A interação entre dois átomos é a descrição mais fácil de compreender conceitualmente. Também, é a energia que domina o potencial total por sua

grandeza (≈ 150 a $1.000 \text{ kJ mol}^{-1}$). No campo de força, a energia de ligação entre dois átomos i e j ligados covalentemente é função do comprimento da ligação e é descrita por um potencial harmônico:

$$V_l(r_{ij}) = \frac{1}{2}k_l(r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad (8),$$

onde r_{ij}^0 é o comprimento padrão de ligação entre os átomos i e j , e K_l é a constante de força de ligação específica para esse par de átomos. Esta aproximação gera um potencial aproximado ao redor de r_{ij}^0 , a qual funciona muito bem para valores próximos do comprimento padrão. Assim, é uma boa aproximação para tratar macromoléculas com pequenas flutuações.

3.9.1.2. Ângulo de ligação

O potencial gerado pela deformação de duas ligações formadas por três átomos i , j e k também pode ser calculado pela aproximação do potencial harmônico. A deformação do ângulo pode ser descrita como a aproximação ou o afastamento de dois átomos:

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_a(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (9),$$

onde θ_{ijk}^0 é a deformação angular harmônica padrão e k_a é a constante de deformação angular dos três átomos envolvidos.

Para o campo de força do MARTINI o potencial angular é calculado pela aproximação do cosseno:

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_a(\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_{ijk}^0))^2 \quad (10),$$

onde $\cos(\theta_{ijk}) = \frac{\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{r}_{kj}}{r_{ij}r_{kj}}$ e k_a é também a constante de deformação angular dos três átomos envolvidos.

3.9.1.3. Torção de ligação

O ângulo diedro ϕ_{ijkl} é definido como o ângulo formado entre os planos; ijk e jkl . O potencial de torção, definido utilizando o ângulo diedro formado por quatro átomos i , j , k e l é:

$$V_d(\phi_{ijkl}) = k_d(1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^0)) \quad (11),$$

onde ϕ_{ijkl}^0 é o ângulo diedro de referência, n é a multiplicidade da função e k_d é a constante de ângulo diedro.

Os ângulos diedros impróprios são utilizados para manter estruturas planas como anéis aromáticos. O potencial de diedro impróprio mais simples é o potencial harmônico.

$$V_{di}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{di} (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2 \quad (12),$$

onde ξ_{ijkl}^0 é o ângulo diedro impróprio de referência e k_{di} é a constante de ângulo diedro impróprio.

3.9.2. Interações entre átomos não ligados

As interações não ligadas são aquelas que não estão diretamente envolvidas nas ligações covalentes. Geralmente, duas interações são consideradas nos campos de força: as interações de van der Waals e as interações eletrostáticas. A energia potencial gerada a partir destas interações é dependente da distância, e no caso das interações eletrostáticas, elas são dependentes da constante dielétrica relativa.

3.9.2.1. Potencial de van de Waals

Geralmente, o potencial de van der Waals é calculado com a aproximação de Lennard-Jones:

$$V_{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad (13),$$

onde ϵ_{ij} é a profundidade do poço, σ_{ij} é a distância na qual o potencial de Lennard-Jones vai a zero e r_{ij} distância entre as partículas i e j . O termo r_{ij}^{-12} descreve a repulsão e o termo r_{ij}^{-6} descreve as atrações entre as partículas.

3.9.2.2. Potencial Eletrostático

O tratamento do potencial eletrostático entre duas partículas carregadas q_i e q_j é feito pela lei de Coulomb:

$$V_c(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (14),$$

onde ϵ_0 é a constante dielétrica no vácuo, ϵ_r é a constante dielétrica relativa do meio e r_{ij} corresponde à distância entre as partículas i e j .

3.10. Campo de força MARTINI

Os campos de força contêm um grande número de parâmetros para descrever a energia potencial das moléculas. Eles podem ser obtidos de valores experimentais ou de cálculos *ab initio*. A maioria deles são desenvolvidos para conjuntos específicos de partículas como proteínas, lipídios, açúcares, etc.

O campo de força MARTINI segue a filosofia *coarse grained*. O MARTINI faz um mapeamento 4 por 1, onde 4 átomos pesados e seus hidrogênios associados são representados por uma simples interação. Para estruturas com anéis, o mapeamento pode ter outra distribuição que será explicada em breve. O campo de força considera apenas 4 sítios principais de interação: polar (P), não-polar (N), apolar (C) e carregada (Q). Cada sítio é dividido em subtipos para representar a natureza química das estruturas atômicas de uma maneira mais acurada no mapeamento. Dois subtipos podem ser identificados claramente. Os sítios que mostram uma capacidade de ligação de hidrogênio são nomeados como doador=d, acceptor=a, doador-acceptor=da, e nenhuma=0. A outra categoria está representada por valores numéricos que vão de 1 até 5 indicando um grau de polaridade baixa a alta, respectivamente. Todas as combinações geram um total de 18 diferentes sítios de interação. (Marrink *et al.*, 2007).

3.10.1. Cálculo do potencial para MARTINI

As interações de ligação entre sítios conectados são descritas pela aproximação harmônica descrita na eq. (8). Neste campo de força, o comprimento padrão r_{ij}^0 utilizado normalmente é 0,47 nm e uma constante de ligação k_l de 1250 kJ mol⁻¹ nm⁻², mas esses valores não são fixos e podem mudar a fim de ter uma estrutura química mais acurada. Para representar os ângulos de ligação entre três sítios ativos a aproximação de cossenos descrita na eq. (10) é utilizada. A constante de deformação angular k_a é definida em 25 kJ mol⁻¹ para cadeias alifáticas e um ângulo de equilíbrio θ_{ijk}^0 de 180°. Para ligações insaturadas com uma conformação *cis*, uma constante mais elevada é utilizada, 45 kJ mol⁻¹, e o ângulo de equilíbrio agora é 120°. No caso das conformações *trans*, a constante de força fica igual, mas o ângulo volta a 180°.

Nas interações não ligadas somente são tratados os dois tipos mais comuns de interações: van der Waals e eletrostáticas. As interações de van der Waals são tratadas com a aproximação de Lennard-Jones, eq. (13), σ_{ij} é selecionado como 0,47 nm. Este valor não é aplicado para os casos especiais como partículas com anéis. Também não é aplicado para interações de moléculas de tipo carregadas (Q) e para tipos de moléculas mais apolares (C1 e C2). Nesses casos, a repulsão é estendida até 0,62 nm. O valor da constante ϵ_{ij} varia desde 2,0 kJ mol⁻¹ para interações entre sítios polares e apolares imitando o efeito hidrofóbico até 5,6 kJ mol⁻¹ para interações entre sítios carregados. As interações eletrostáticas são descritas pela lei de Coulomb, eq. (14), onde a constante dielétrica relativa é fixada em 15.

As estruturas com anéis que precisam manter uma geometria específica não podem ser descritas com mapeamento 4 por 1. A estratégia utilizada é incluir todos os sítios necessários para manter a geometria da molécula. Devido à alta densidade gerada pelos sítios, as estruturas com anéis precisam de um tratamento especial. No campo de força do MARTINI, esses sítios são etiquetados com a letra "S". O valor da distância σ_{ij} de Lennard-Jones é reduzido a 0,43 nm e os valores de ϵ_{ij} são ajustados a 75% de seu valor original. Isto permite um melhor empacotamento das moléculas evitando que elas congelem, o que permite reproduzir corretamente a densidade de pequenas estruturas com formatos de anéis, não afetando seu coeficiente de partição. Para manter a rigidez dos anéis e evitar oscilações muito rápidas, ligações e ângulos são colocados como

restritos. O potencial de ângulo diedro impróprio pode ser aplicado utilizando a aproximação descrita na eq. (12).

As constantes das interações não ligadas são baseadas na reprodução de energias livres de partição entre fases polares e apolares de um grande número de compostos químicos. As constantes das interações ligadas são derivadas de dinâmicas moleculares atomísticas.

3.10.2. MARTINI limitações

O MARTINI, assim como outros modelos, tem suas limitações. Uma grande parte dessas limitações são herdadas do modelo *coarse grained*, enquanto outras são derivadas da sua parametrização. Tais limitações podem ser melhoradas futuramente tanto mantendo a escala de *coarse grained* quanto aceitando um maior detalhamento na descrição da molécula de estudo. As maiores limitações do campo de força MARTINI são:

Resolução do modelo *coarse grained*: Essas limitações de resolução química e espacial são claramente observadas pela resolução do modelo do MARTINI (mapeamento 4 a 1). Por exemplo, o mapeamento feito para um lipídio específico pode não ser exclusivo dessa estrutura química. Isso também acontece em estruturas biológicas cíclicas, como os esteróis, onde pequenas mudanças na estrutura do anel ou da cadeia podem ter um grande efeito na termodinâmica de filmes ou membranas. Outras moléculas como carboidratos e proteínas, onde a estereoquímica e pequenas diferenças estruturais são importantes no seu mecanismo, são difíceis de representá-las no modelo *coarse grained*. Ainda assim, o MARTINI tem sido usado amplamente com boas aproximações de resultados experimentais e atomísticos, mostrando que o MARTINI é suficientemente acurado para certo tipo de aplicações.

Efeito na escala de tempo: O *coarse grained* envolve a mudança do perfil de energia que faz ele mais suave quando comparado com o perfil real pela redução dos graus de liberdade. Como consequência, ocorre um aumento da energia cinética do sistema. Embora o aumento da velocidade das partículas seja uma das grandes vantagens do modelo *coarse grained*, esse aumento não é facilmente previsível e pode não ser a mesma para todos os graus de liberdade. Atualmente, o MARTINI possui um fator de 4 como a melhor estimativa para cálculos do coeficiente de difusão lateral. Esse valor conhecido como “semi-

universal” é obtido de cálculos do coeficiente de difusão lateral em simulações atomísticas (Marrink *et al.*, 2007). No entanto, o uso deste fator tem que ser utilizado com muito cuidado, já que pode mudar segundo o grupo em estudo (Fritz *et al.*, 2011). Por outro lado, também tem que ser considerado que esse fator é baseado na difusão de moléculas individuais e seu comportamento pode mudar quando as moléculas estão em um coletivo. Por exemplo, a viscosidade do modelo de água padrão do MARTINI tem sido determinada em um acordo muito próximo ao valor experimental (Den Otter e Shkulipa, 2007; Fuhrmans *et al.*, 2010). Para bicamadas lipídicas, a viscosidade de cisalhamento na superfície tem concordado também com os valores experimentais (Baoukina, Marrink, *et al.*, 2012).

Energia livre, entalpia e entropia: O MARTINI é parametrizado para reproduzir a variação da energia livre com uma diminuição considerável dos graus de liberdade quando comparada com cálculos atomísticos. No entanto, a redução dos graus de liberdade afeta a entropia do sistema em estudo. Essa redução é compensada com uma diminuição do termo da entalpia no modelo. Contudo, isso mostra que uma separação acurada entre entalpia e entropia não pode ser feita eficazmente.

Cálculo das interações não ligadas: Outra limitação importante do MARTINI é o cálculo do potencial das interações não ligadas. De maneira estrita, o uso do potencial de Lennard-Jones não é a melhor escolha. A repulsão abrupta leva à superestruturação de fluidos em comparação com modelos atomísticos, como evidenciado, por exemplo, nas funções de distribuição radial de alcanos simples (Baron *et al.*, 2006). É por isso que o modelo básico da água do MARTINI congela à temperatura ambiente (ponto de fusão do modelo padrão de água do MARTINI: 290 ± 5 K) (Marrink *et al.*, 2007). Para solucionar isso, o MARTINI faz uso do modelo da água anticongelante que possui um raio maior das interações não ligadas (Marrink *et al.*, 2007).

Outra propriedade que está relacionada com o cálculo das interações não ligadas é a tensão superficial na interface ar-água. O valor da tensão superficial calculado é de 32 mN m^{-1} , 56% menor do que o valor experimental, pelo que gera resultados irreais. Dessa forma, os lipídios não são espalhados homoganeamente na interface. Em tensões superficiais altas, formam-se poros com lipídios fortemente empacotados (Baoukina, Monticelli, Marrink, *et al.*, 2007).

3.10.3. MARTINI e dinâmicas de surfactante pulmonar

A dinâmica molecular com o campo de força MARTINI tem sido muito utilizada para realizar simulações de surfactante pulmonar. Por exemplo Duncan e Larzon têm comparado isotermas de pressão-área de dinâmicas moleculares feitas com *coarse grained* e atomístico com resultados experimentais mostrando uma grande concordância entre ambas (Duncan e Larson, 2008). Resultados similares são obtidos por Baoukina *et al* quando um sistema de 8192 moléculas de DPPC é utilizado. A isoterma representa bem as fases de L_E e L_C (Baoukina, Monticelli, Marrink, *et al.*, 2007). O fenômeno do colapso também tem sido simulado com muito sucesso. Baoukina *et al* mostram a conexão entre a monocamada e uma bicamada na subfase, que é necessária para o processo de espalhamento do surfactante pulmonar (Baoukina, Monticelli, Amrein, *et al.*, 2007). Em uma mistura de apenas DPPC e POPG com uma compressão constante, Baoukina *et al* mostram o colapso do filme depois de 4 μ s de simulação (Baoukina *et al.*, 2008). Em um sistema mais complexo, este mesmo grupo de pesquisa realiza uma das simulações mais longas (25 μ s) e de maior dimensão (80x80 nm²) feitas para surfactante pulmonar com uma mistura de três fosfolipídios (DPPC, POPG e DOPC) com colesterol. Eles concluem que o domínio da fase de L_O ajuda à monocamada a se desdobrar espontaneamente induzido pelo colesterol, permitindo a conexão entre a monocamada e uma bicamada rica em fosfolipídios insaturados (Baoukina *et al.*, 2014). Outro fenômeno também estudado com *coarse grained* é a coexistência de fases. Com esse tipo de dinâmica molecular é possível simular com sistemas maiores e escalas maiores de tempo que não são possíveis atingir com dinâmicas atomísticas (Duncan *et al.*, 2011; Baoukina, Mendez-Villuendas, *et al.*, 2012).

Barnoud *et al* simularam o colapso de um filme de DPPC e DOPC na presença de nanopartículas de carbono (Barnoud *et al.*, 2015), Nisoh *et al* simularam um sistema semelhante, apenas mudando para um filme de DPPC puro mas obteve resultados similares (Nisoh *et al.*, 2015). Chiu *et al* também fez simulações de nanopartículas de carbono em uma monocamada de DPPC puro. Ele fez cálculos da variação da energia livre em bicamadas e concluiu que as nanopartículas tem uma menor variação da energia livre na bicamada do que na monocamada (Chiu *et al.*, 2012). Além das simulações da adsorção de fulerenos e de grafeno em monocamadas, simulações destas foram realizadas para testá-las como um possível carreador de fármacos e avaliar sua toxicidade no pulmão,

concluindo que sua hidrofobicidade e sua orientação podem ser determinantes para atravessar a barreira pulmonar (Yue *et al.*, 2015). Por outro lado, Lin *et al.* simularam nanopartículas esféricas de diferentes diâmetros e hidrofobicidade, mostrando que as nano partículas hidrofílicas de diâmetro menor poderiam ser uma boa escolha para transportar fármacos (Lin *et al.*, 2014).

3.11. Algoritmos na dinâmica molecular.

Para conhecer a trajetória de um conjunto de moléculas pela dinâmica molecular, a eq. (5) deve ser resolvida. A resolução analítica desta equação leva a complicações e por isso que ela é resolvida por métodos numéricos. A grande maioria dos algoritmos utilizam integradores numéricos derivados da série de Taylor. Os métodos numéricos utilizados são descritos resumidamente a seguir:

3.11.1. Algoritmo de minimização de energia

A minimização de energia é uma etapa obrigatória para trabalhar com dinâmica molecular. A principal tarefa deste algoritmo é encontrar a conformação mais próxima do sistema inicial com a energia local mais baixa, e desta maneira, evitar que o sistema colapse em etapas posteriores de simulação. Existem vários algoritmos que ajudam a realizar esta tarefa e a escolha vai depender da convergência. Algoritmos como *steepest descent*, gradiente conjugado e L-BFGS são os mais utilizados. (Leach, A. R. 2001). Nesta dissertação o algoritmo *steepest descent* será descrito pois foi o único utilizado.

Algoritmo *steepest descent*: este algoritmo não é dos mais acurados, mas é o mais simples e robusto de utilizar. O vetor \mathbf{r} é definido como o vetor das $3N$ coordenadas:

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \frac{\mathbf{F}_n}{\max(|\mathbf{F}_n|)} h_n \quad (15),$$

onde h_n é o deslocamento máximo e \mathbf{F}_n é a força. A notação $\max(|\mathbf{F}_n|)$ é o máximo valor da força.

O algoritmo é interrompido quando é alcançado um número específico de avaliações ou quando é atingido um valor de energia especificado.

3.11.2. Algoritmo de Verlet

O algoritmo de Verlet (Verlet, 1967) é considerado um dos mais simples e robustos algoritmos para resolver numericamente a equação de movimento. Esse algoritmo utiliza a posição e aceleração em um tempo t e a posição em um tempo $t-\Delta t$ para calcular a posição em um tempo $t+\Delta t$:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \frac{\mathbf{F}}{m}\Delta t^2 \quad (16).$$

Como pode-se observar na eq. (16), o algoritmo precisa de dois tempos anteriores para poder calcular o seguinte passo. Isso no começo pode ser um problema pelas condições iniciais. Se as interações são iniciadas no passo $n=1$, o tempo t seria igual a t_1 que por sua vez seria igual a Δt . Por isso, a posição r_1 não pode ser determinada pelo algoritmo de Verlet. Então, utiliza-se a série de Taylor:

$$\mathbf{r}_1 = \mathbf{r}_0 + \mathbf{v}_0\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}_0\Delta t^2 + \dots \quad (17).$$

Este cálculo é aproximado, no entanto é considerado como uma boa aproximação e seu erro é desprezível quando comparado com o erro total de muitos passos. A partir de aqui, o cálculo da posição com $n=2$ é feito pelo algoritmo de Verlet.

A velocidade é calculada pela diferença de posições entre os tempos $t-\Delta t$ e $t+\Delta t$ dividido pelo intervalo de tempo transcorrido, $2\Delta t$:

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (18).$$

Esses valores são menos acurados, mas são necessários para calcular energia cinética e, portanto, temperatura e pressão.

A grande vantagem deste algoritmo é sua rapidez pela omissão de vários termos da série de Taylor. A grande desvantagem é o cálculo implícito da velocidade, pois produz cálculos aproximados da energia cinética do sistema.

3.11.3. Algoritmo *Leap-Frog*

O algoritmo de *leap-frog* (Hockney *et al.*, 1974) utiliza a posição \mathbf{r} num tempo t e uma velocidade \mathbf{v} num tempo $t-(1/2)\Delta t$. Neste algoritmo, a velocidade é calculada primeiro em um tempo $t+(1/2)\Delta t$, valor utilizado para o cálculo da posição de $t+\Delta t$. Pode-se considerar que a velocidade e a posição estão se alternando simulando o salto de uma rã (por isso o nome do algoritmo):

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F}(t) \quad (19),$$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \quad (20).$$

De forma similar ao algoritmo de Verlet, o cálculo da velocidade em um tempo inicial não pode ser calculado diretamente do algoritmo e novamente tem que ser usado o polinômio de Taylor para o cálculo da velocidade.

A principal vantagem desse algoritmo é o cálculo explícito da velocidade. Entretanto, o fato da velocidade e a posição não serem calculadas no mesmo tempo é uma desvantagem. Ainda assim, o algoritmo *leap-frog* tem demonstrado ser o mais adequado para dinâmica molecular clássica por ser simples, eficiente e ter um erro razoável.

3.11.4. Algoritmo *Leap-frog* para dinâmica estocástica

Este tipo de dinâmica acrescenta um termo de fricção e de ruído à equação de Newton, o que permite descrever o movimento browniano das partículas:

$$m_i \frac{d^2\mathbf{r}_i}{dt^2} = -m_i\omega_i \frac{d\mathbf{r}_i}{dt} + \mathbf{F}_i(\mathbf{r}) + \boldsymbol{\eta}(t) \quad (21),$$

onde ω_i é uma constante de fricção e $\boldsymbol{\eta}(t)$ é o fator de ruído. Quando $1/\omega_i$ é grande comparado com a escala de tempo no sistema a dinâmica estocástica pode ser considerada como uma dinâmica molecular com um acoplamento de temperatura estocástico. Quando a dinâmica estocástica é utilizada como um termostato acoplado um valor apropriado da constante de fricção é de $0,5 \text{ ps}^{-1}$, já que ele gera uma fricção mais baixa que a fricção interna da água. Este algoritmo tem uma precisão equivalente ao algoritmo *leap-frog* de dinâmica molecular.

3.12. Condições periódicas de contorno

A maneira mais prática que se tem encontrado para minimizar o efeito de borda para sistemas de dimensões finitas é aplicar condições periódicas de contorno. Um sistema é rodeado por réplicas idênticas. Este artifício ajuda a eliminar os problemas de bordas que podem gerar conclusões erradas dos sistemas.

3.13. Ensembles

Denomina-se ensemble estatístico um conjunto hipotético de sistemas que apresentam características similares permitindo realizar análises estatísticas deste conjunto de sistemas como um todo. Um ensemble termodinâmico é um tipo específico de ensemble estatístico, que é utilizado para derivar propriedades termodinâmicas de um sistema através das leis da mecânica quântica ou clássica. A temperatura utilizada para derivar propriedades termodinâmicas é a temperatura absoluta na escala kelvin. Em seguida, os diferentes ensembles termodinâmicos são descritos:

Ensemble NVT: Este ensemble é conhecido comumente como ensemble canônico onde o número de partículas N , o volume V e a temperatura T são mantidos constantes.

Ensemble NVE: Este ensemble é conhecido como ensemble microcanônico onde o número de partículas N , o volume V e a energia E são mantidos constantes.

Ensemble NPT: Este ensemble é conhecido como ensemble isotérmico-isobárico onde o número de partículas N , a pressão P e a temperatura T são mantidos constantes.

Ensemble $N\gamma T$: Neste ensemble o número de partículas N , a tensão superficial γ e a temperatura T são mantidos constantes.

A escolha do tipo de ensemble vai depender das perguntas que se querem responder. Nesta dissertação três tipos de ensembles foram utilizados: NVT, NPT e $N\gamma T$.

3.14. Termostatos

Para manter controlada a temperatura dos diferentes tipos de ensembles, com a exceção do NVE, a dinâmica molecular faz uso de termostatos. Atualmente, tem-se disponíveis vários tipos de acoplamentos fracos de temperatura como Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984), Andersen (Andersen, 1980), Nosé-Hoover (Nosé, 1984; Hoover, 1985) e reescalonamento da velocidade (do inglês *velocity-rescaling*) (Bussi *et al.*, 2007). Cada um deles tem suas vantagens e desvantagens, que são descritas a seguir.

3.14.1. Termostato Berendsen

O termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) imita um banho de calor externo com uma temperatura de referência T_0 com acoplamento fraco de temperatura e uma cinética de primer ordem. Este algoritmo corrige o desvio da temperatura do sistema de T_0 de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau} \quad (22),$$

onde a mudança da temperatura em relação ao tempo é diretamente proporcional ao desvio da temperatura de referência T_0 e uma temperatura em um tempo $T(t)$, e inversamente proporcional a uma constante de tempo τ que faz com que o desvio da temperatura diminua exponencialmente com a constante de tempo τ . A constante de tempo τ é dada por:

$$\tau = \frac{2C_v\tau_T}{N_{df}k} \quad (23),$$

onde C_v é a capacidade calorífica total do sistema, τ_T é a constante de tempo da temperatura, k é a constante de Boltzmann, N_{df} é o número de graus de liberdade.

Uma das vantagens desta abordagem é que a força do acoplamento pode ser variada e adaptada às necessidades do usuário. A velocidade da correção da temperatura neste termostato é baixa e isso pode ser considerado uma desvantagem. Também, este termostato suprime as flutuações da energia cinética pelo que não pode ser utilizado para gerar um ensemble canônico adequado.

3.14.2. Termostato de reescalonamento da velocidade

O termostato de reescalonamento da velocidade (Bussi *et al.*, 2007) é essencialmente um termostato de Berendsen com um termo estocástico adicional que assegura a correta distribuição da energia cinética:

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_T} + \left(\frac{KK_0}{N_{df}} \right)^{1/2} \frac{dW}{(\tau_T)^{1/2}} \quad (24),$$

onde K é a energia cinética, N_{df} corresponde ao número de graus de liberdade e dW é o processo de Wiener. Este termostato reproduz corretamente o ensemble canônico. Além disso, conserva a vantagem do termostato de Berendsen de ter uma diminuição de primeira ordem do desvio da temperatura e não tem oscilações.

3.15. Barostatos

A pressão precisa também ser controlada para mantê-la constante ao longo da simulação. No entanto, a pressão apresenta maiores flutuações para um ensemble NPT. Os barostatos mais conhecidos são Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) e Parrinello-Rahman (Parrinello e Rahman, 1981). A pressão é calculada do tensor de pressão. O tensor de pressão é computado da diferença entre a energia cinética e o tensor virial

3.15.1. Barostato de Berendsen

O barostato do Berendsen faz um reescalonamento das coordenadas e dos vetores de uma caixa a cada n passos com um coeficiente de escalonamento μ . Este barostato tem o mesmo efeito da relaxação de primeira ordem da energia cinética:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P(t)}{\tau_p} \quad (25),$$

onde P_0 representa a pressão de referência, $P(t)$ é a pressão num tempo t e τ_p é a constante de tempo do barostato.

O coeficiente de escalonamento é dado por:

$$\mu_{ij} = 1 - \frac{n_{pc}\Delta t}{3\tau_p} \beta \{P_0 - P(t)\} \quad (26),$$

onde β corresponde a compressibilidade isotérmica para a água a pressão de 1 atm e temperatura de 300 K; $4,6 \times 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ ou $4,6 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. Muitos outros líquidos têm valores similares. n_{pc} é o número de graus de liberdade, o resto das constantes são as mesmas descritas na eq. (25).

3.15.2. Barostato de Parrinello-Rahman

Nos casos onde as flutuações em pressão e volume são importantes (Ex.: sistemas pequenos), um barostato como o Berendsen não descreve bem o ensemble isotérmico-isobárico, então um barostato mais rigoroso como Parrinello-Rahman pode ser necessário. O barostato de Parrinello-Rahman é descrito pela equação:

$$\frac{d^2 b}{dt^2} = Vol W^{-1} b^{-1} (\mathbf{P} - \mathbf{P}_{ref}) \quad (27),$$

onde Vol é o volume da caixa, os vetores da caixa são representados pela matriz b , as matrizes \mathbf{P} e \mathbf{P}_{ref} são as pressões em um dado tempo t e em um tempo de referência, respectivamente. W^{-1} é a matriz inversa dos parâmetros de massa que determina a força do acoplamento e a deformação de uma caixa a qual pode ser definida como:

$$(W^{-1})_{ij} = \frac{4\pi^2 \beta_{ij}}{3\tau_p^2 L} \quad (28),$$

novamente, β_{ij} representa a compressibilidade isotérmica (i e j são coordenadas), τ_p é a constante de tempo do barostato e L é o maior comprimento da caixa.

A constante de tempo do barostato de Parrinello-Rahman não é a mesma que do Berendsen. Na maioria dos casos, é necessária uma constante de tempo de 4 a 5 vezes maior do que no barostato do Berendsen. Se a pressão do sistema estiver muito longe do equilíbrio, este barostato pode produzir oscilações muito grandes e fazer o sistema colapsar. Para resolver este problema, pode-se aumentar a constante de tempo do barostato ou utilizar um barostato de acoplamento menos rigoroso para equilibrar a pressão em etapas prévias da simulação.

3.15.3. Acoplamento de tensão superficial

Este tipo de acoplamento é muito útil para sistemas com interfaces onde a tensão superficial e a componente de pressão podem ser acopladas a um banho de pressão.

A tensão superficial média pode ser calculada da diferença entre as pressões normal e lateral do sistema. Considerando uma interface paralela ao plano xy e a componente de pressão ao longo do eixo z , a tensão superficial é definida como:

$$\gamma(t) = \frac{L_z}{n} \left\{ P_{zz}(t) - \frac{P_{xx}(t) + P_{yy}(t)}{2} \right\} \quad (29),$$

onde L_z é a altura da caixa e n é o número de superfícies. A pressão no eixo z é corrigida pelo escalonamento da altura da caixa com o parâmetro μ_{zz} definido como:

$$\mu_{zz} = 1 + \beta_{zz} \Delta P_{zz} \quad (30),$$

$$\Delta P_{zz} = \frac{\Delta t}{\tau_p} \{ P_{0zz} - P_{zz}(t) \} \quad (31),$$

Este fator de correção de reescalonamento é similar ao do barostato de pressão de Berendsen, eq. (24), exceto pelo fator de $1/3$. O fator é utilizado para obter a correta convergência da tensão superficial quando comparada com o valor de referência γ_0 . O valor de compressibilidade β_{zz} tem um peso maior neste acoplamento quando comparado com um barostato simples já que ele está diretamente relacionado com a convergência da tensão superficial. Quando β_{zz} é fixado a zero (caso de uma altura constante da caixa), ΔP_{zz} também fica fixo em zero o qual é necessário para obter a correta tensão superficial.

3.16. Cálculo de energia livre

Existem vários métodos para o cálculo da diferença de energia livre. Neste trabalho, dois deles serão discutidos: o método de integração termodinâmica e o método de *umbrella sampling*.

3.16.1. Método de integração termodinâmica

O método calcula a diferença de energia livre entre dois estados A e B que são acoplados a um parâmetro λ . Para compreender melhor, o Hamiltoniano clássico é definido em função deste parâmetro de acoplamento que conecta os dois estados $H(\lambda_A) = H_A$ e $H(\lambda_B) = H_B$. Como o Hamiltoniano é definido em termos de λ , a energia livre é também função de λ . Portanto, a energia livre entre A e B pode ser calculada pela seguinte integração:

$$\Delta G_{BA} = G(\lambda_B) - G(\lambda_A) = \int_{\lambda_A}^{\lambda_B} \frac{\partial G(\lambda)}{\partial \lambda} d\lambda = \int_{\lambda_A}^{\lambda_B} \left\langle \frac{\partial H(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (32).$$

Para valores discretos de λ , esta integral é substituída por um somatório (Mezei, 1987):

$$\Delta G = \sum_{\lambda=0}^1 \left\langle \frac{\partial H(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} \quad (33).$$

O termo entre colchetes angulares representa a média do ensemble da derivada do Hamiltoniano com respeito ao parâmetro de acoplamento tomado a um valor λ . Os valores de $\lambda=0$ para o estado inicial e $\lambda=1$ para o estado final são escolhidos por pura simplicidade, e qualquer outra parametrização tem igual validade dado que a diferença de energia livre é uma função de estado.

No cálculo da diferença de energia livre do método da integração termodinâmica partículas estão aparecendo e desaparecendo do nada, pelo que a aproximação descrita para o potencial de van der Waals e Coulomb pode ter uma pobre convergência. Quando partículas estão perto de desaparecer ou aparecer (valores de λ de 0 e 1 respectivamente) as energias de interação chegam a ser suficientemente fracas para permitir que as partículas fiquem perto umas das outras. Um grão flutuação nas medidas do potencial não ligando com respeito à constante de acoplamento é produzido.

O pseudopotencial é usado para evitar flutuações no potencial quando as interações não ligadas entre o soluto e o solvente são levadas a zero. O pseudopotencial (Beutler *et al.*, 1994) é expresso pela seguinte equação:

$$V_{sc}(r_{ij}) = (1 - \lambda)V_{ij}^A(r_{ij}^A) + \lambda V_{ij}^B(r_{ij}^B) \quad (34),$$

onde $V_{ij}^A(r_{ij}^A)$ e $V_{ij}^B(r_{ij}^B)$ são os potenciais normais descritos para as interações não ligadas, van der Waals e eletrostática, no estado $A(\lambda=0)$ e no estado $B(\lambda=1)$, respectivamente. A distância r_{ij} é dada pelas seguintes equações:

$$r_{ij}^A = (\alpha(\sigma_{ij}^A)^6 \lambda + r_{ij}^6)^{1/6} \quad (35),$$

$$r_{ij}^B = (\alpha(\sigma_{ij}^B)^6 (1 - \lambda) + r_{ij}^6)^{1/6} \quad (36),$$

onde α é o parâmetro do pseudopotencial o qual essencialmente controla a altura do potencial, e σ é o raio das interações das partículas.

3.16.2.

Umbrella sampling

A energia livre também pode ser obtida através do cálculo do potencial de força média pelo método de *umbrella sampling*. Esse potencial é obtido pela integração da força média da configuração de um ensemble ao longo de uma coordenada de reação ψ . O cálculo do potencial de força média obtido diretamente de uma dinâmica molecular pode ser impreciso devido à presença de grandes barreiras de energia ao longo da coordenada de reação ψ . Para obter um valor acurado de energia livre, o potencial de força média do sistema precisa passar por um processo adequado de amostragem em todas as posições ao longo da coordenada de reação ψ , garantindo que as posições menos favoráveis (de alta energia) e as posições mais favoráveis (de menor energias) sejam adequadamente amostradas (Roux, 1995). Uma abordagem muito utilizada para evitar estas dificuldades é o método de *umbrella sampling* (Torrie e Valleau, 1974).

Nessa metodologia, o sistema microscópico de interesse é simulado na presença de uma janela de potencial de tendência artificial para melhorar a amostragem na vizinhança escolhida. Para conseguir isto, utiliza-se um potencial de tendência para limitar as variações na coordenada de reação ψ em pequenos intervalos ao redor de um valor pré-estabelecido. Uma forma simples de produzir um ensemble de tendência é através de uma função harmônica centrada em sucessivos valores de ψ_i :

$$W(\psi) = k_w(\psi - \psi_i)^2 \quad (37).$$

Então, o potencial de tendência pode ser representado da seguinte maneira:

$$V_b(r_{ij}) = V(r_{ij}) + W(r_{ij}) \quad (38).$$

Para obter o potencial de força média de uma coordenada de reação de interesse, é necessário realizar um determinado número de janelas de simulações de tendência já que uma simulação pode estimar o potencial de força média com suficiente precisão apenas numa pequena região. Finalmente, os resultados de várias janelas são recombinados para obter um valor final estimado de potencial. A recombinação das janelas pode ser feita pelo método de análise do histograma ponderado (do inglês *Weighted Histogram Analysis Method*, WHAM) (Kumar *et al.*, 1992).

O método de análise do histograma ponderado é uma extensão do histograma múltiplo do Ferrenberg e Swendsen que foi aplicado pela primeira vez em biomoléculas (Ferrenberg e Swendsen, 1988). Como já foi descrito anteriormente, esse método é utilizado como uma extensão do método de *umbrella sampling* para o cálculo do potencial de força média.

Esse método analisa eficientemente a tendência das funções de distribuição de probabilidade, tirando a maior quantidade de informação possível. Proporciona uma estimativa dos erros estatísticos em cada janela amostrada, gerando a localização exata de onde mais amostragem pode ser necessária. O objetivo é obter a melhor estimativa da função de distribuição do sistema considerando todas as simulações e minimizando o erro estatístico.

3.17. GROMACS

O software GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations) do Departamento de Biofísica e Química da universidade de Groningen na Holanda é um pacote computacional desenvolvido para realizar dinâmica molecular de um conjunto de partículas. Originalmente, este pacote foi desenvolvido para sistemas biológicos principalmente para moléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Atualmente, também está sendo utilizado por outros campos de pesquisa devido à viabilidade e rapidez de seu código.

Desde sua primeira versão de 1991, o grupo de desenvolvimento do GROMACS tem desenvolvido uma série de versões para torná-lo cada vez mais adequado às exigências da pesquisa e dos avanços da ciência da computação. Até o dia de hoje o GROMACS continua sendo um programa não pago distribuído e modificado sob licença GNU-LGPL, mantido por uma comunidade de centros de pesquisa ao redor do mundo. Sua última versão estável é a 5.1.4 publicada o 8 de setembro de 2016. Nesta dissertação, todas as dinâmicas moleculares e minimizações de energias foram realizadas utilizando a versão 5.0.6.

O GROMACS suporta a maioria dos algoritmos matemáticos atualmente utilizados na área de dinâmica molecular e pode ser rodado tanto em uma unidade de processamento central como em uma unidade de processamento gráfico. Ainda que o GROMACS não tem um campo de força próprio ele é compatível com os campos de força mais populares em dinâmica molecular como: MARTINI (Marrink *et al.*, 2007), AMBER (Cornell *et al.*, 1996), GROMOS (Oostenbrink *et al.*, 2004) e OPLS (Jorgensen *et al.*, 1996).

4 Metodologia

4.1. Resumo da metodologia

Neste trabalho o modelo *coarse grained* com o campo de força MARTINI (Marrink *et al.*, 2007) foi utilizado para simular as interações das moléculas de prednisolona com um modelo de surfactante pulmonar. O pacote computacional GROMACS versão 5.0.6 (Abraham *et al.*, 2015) foi utilizado. O modelo de surfactante pulmonar foi construído com moléculas de DPPC e POPC em uma razão DPPC/POPC de 7:3. Três tensões do mecanismo respiratório foram simuladas: 0, 10 e 20 mN m⁻¹ e cada uma delas com três diferentes frações em massa: 0,1; 1 e 10 %. Primeiramente, com o intuito de calcular o coeficiente de partição octanol/água, foram realizados cálculos de energia livre de transferência da prednisolona da água para octanol utilizando o método de integração termodinâmica e o método de *umbrella sampling*. Finalmente, foram realizadas várias simulações de dinâmica molecular para investigar a área por lipídio, a organização da monocamada, a localização e orientação das moléculas de prednisolona na monocamada, a formação de fases, a formação de aglomerados de prednisolona e o espalhamento da prednisolona. O programa gráfico VMD foi utilizado para visualizar todas as imagens (Humphrey *et al.*, 1996).

4.2. Condições gerais

Todas as energias dos sistemas foram minimizadas até 100 kJ mol^{-1} utilizando o método de *steepest descent* para eliminar qualquer sobreposição de moléculas que possa ter ocorrido durante a preparação dos sistemas. O passo temporal de todas as simulações foi de 20 fs.

Um raio de corte de 1,2 nm foi aplicado para todas as interações não ligadas de van der Waals e eletrostáticas. O potencial de Lennard-Jones foi deslocado suavemente a zero de 0,9 a 1,2 nm para reduzir o ruído do raio de corte. O potencial de Coulomb foi deslocado suavemente a zero de 0 a 1,2 nm. A constante dielétrica foi 15. Esses valores são os valores padrões para o campo de força MARTINI. A lista de vizinhança para as interações não ligadas foi atualizada a cada 10 passos com um raio de 1,2 nm (Marrink *et al.*, 2007).

4.3. Parametrização

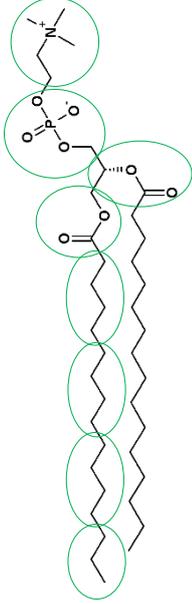
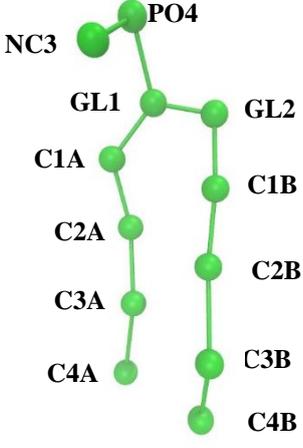
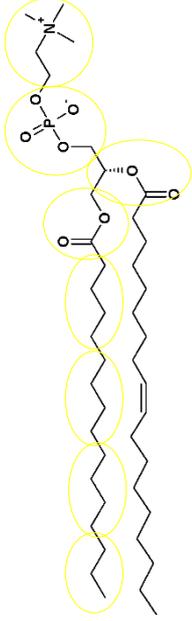
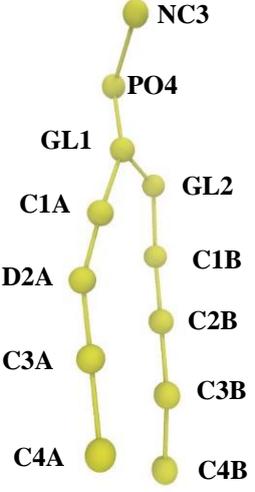
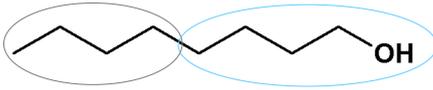
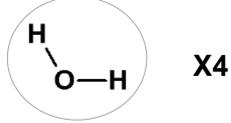
Os modelos de DPPC, POPC, água e octanol para *coarse grained* foram obtidos do sítio web do MARTINI (<http://md.chem.rug.nl/index.php/force-field-parameters>). Os parâmetros são padrões para este campo de força. Os sítios de cada molécula são apresentados no quadro 1. No entanto, o modelo da prednisolona foi gerado a partir do modelo do colesterol (Marrink *et al.*, 2008), mudando os sítios especificados no quadro 2. Os valores do comprimento de ligação, deslocamento angular e ângulo diedro próprio e impróprio foram mantidos iguais ao do colesterol. Uma relação entre as estruturas atomísticas e *coarse grained* de todas as estruturas utilizadas nesta dissertação é mostrada no quadro 3.

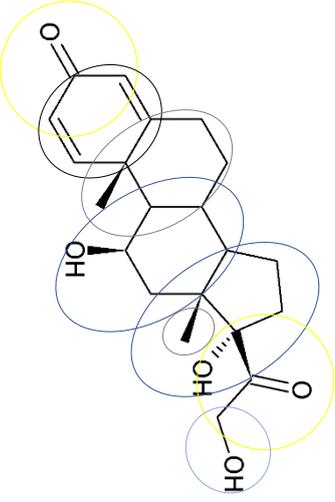
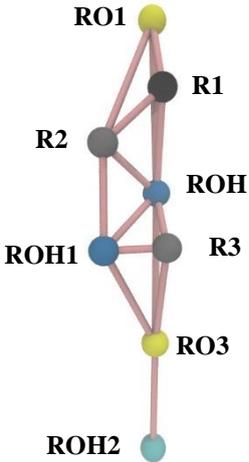
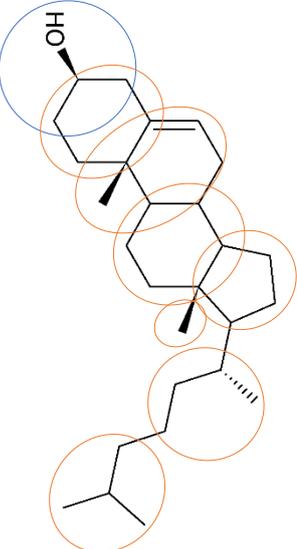
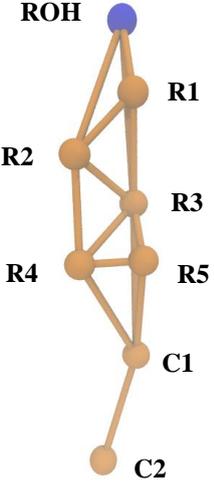
Grupo	DPPC		POPC		Octanol		Água	
	Sítio	ID	Sítio	ID	Sítio	ID	Sítio	ID
1	Q0	NC3	Q0	NC3	P1	PC	P4	W
2	Qa	PO4	Qa	PO4	C1	C		
3	Na	GL1	Na	GL1				
4	Na	GL2	Na	GL2				
5	C1	C1A	C1	C1A				
6	C1	C2A	C3	D2A				
7	C1	C3A	C1	C3A				
8	C1	C4A	C1	C4A				
9	C1	C1B	C1	C1B				
10	C1	C2B	C1	C2B				
11	C1	C3B	C1	C3B				
12	C1	C4B	C1	C4B				

Quadro 1 - Representação dos sítios que formam as estruturas *coarse grained* do DPPC, POPC, octanol e água.

Grupo	Colesterol	Grupo representado	ID	Prednisolona	Grupo representado	ID
1	SP1	Álcool cíclico	ROH	SNa	Cetona cíclica	RO1
2	SC1	Cicloalcano	R1	SC4	Ciclodieno	R1
3	SC3	Cicloalqueno	R2	SC1	Cicloalcano	R2
4	SC1	Cicloalcano	R3	SNda	Álcool cíclico	ROH
5	SC1	Cicloalcano	R4	SNda	Álcool cíclico	ROH1
6	SC1	Cicloalcano	R5	SC1	Cicloalcano	R3
7	SC1	Cicloalcano	C1	SNa	Cetona cíclica	RO3
8	C1	Alcano	C2	P2	Álcool alifático	ROH2

Quadro 2 - Representação dos sítios que formam as estruturas *coarse grained* do colesterol e da prednisolona.

Nome	Estrutura química	Representação <i>coarse grained</i>
DPPC		
POPC		
Octanol		
Água		

<p>Prednisolona</p>		
<p>Colesterol</p>		

Quadro 3 - Estruturas químicas e representações *coarse grained* do DPPC, POPC, octanol, água, prednisolona e colesterol.

4.4. Cálculos de energia livre

4.4.1. Integração termodinâmica

Com ajuda dos programas `gmx solvate` e `gmx insert-molecules` e utilizando um raio de 0.21 nm para as moléculas da água (valor recomendado para *coarse grained*), dois sistemas foram preparados em uma caixa cúbica de 5,1 nm em condições periódicas de contorno para evitar o efeito de borda:

- a) 1 molécula de prednisolona com 918 moléculas de água (ilustração 3).
- b) 1 molécula de prednisolona com 600 moléculas de octanol e 153 moléculas de água para ter uma fração molar de água de 0,255 recomendada pela literatura (Debolt e Kollman, 1995; Maccallum e Tieleman, 2002; Sassi *et al.*, 2004) (ilustração 4).

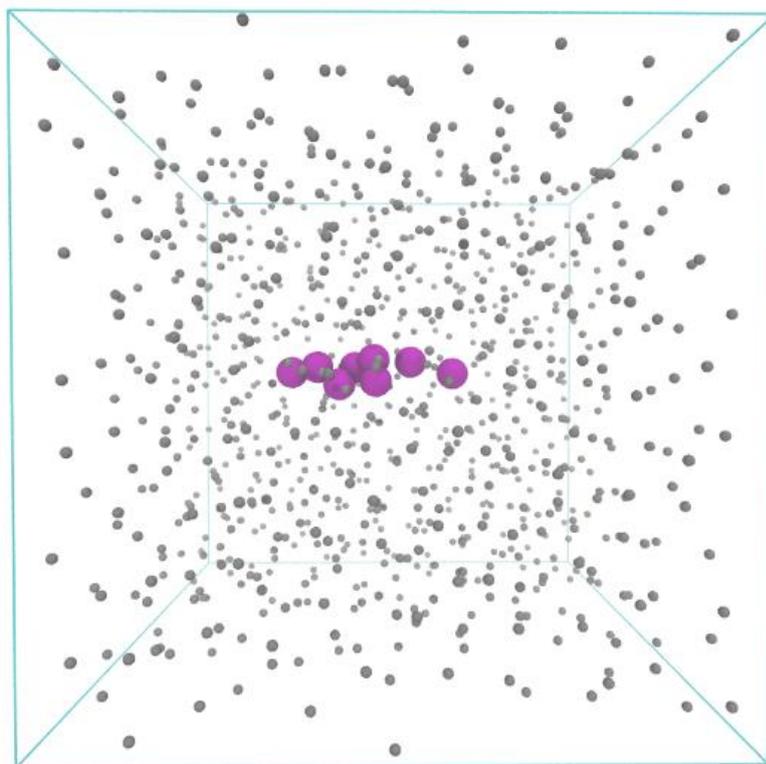


Ilustração 3 - Modelo *coarse grained* da prednisolona (roxo) solvatada com água (cinza) em uma caixa de 5,1 nm x 5,1 nm x 5,1 nm.

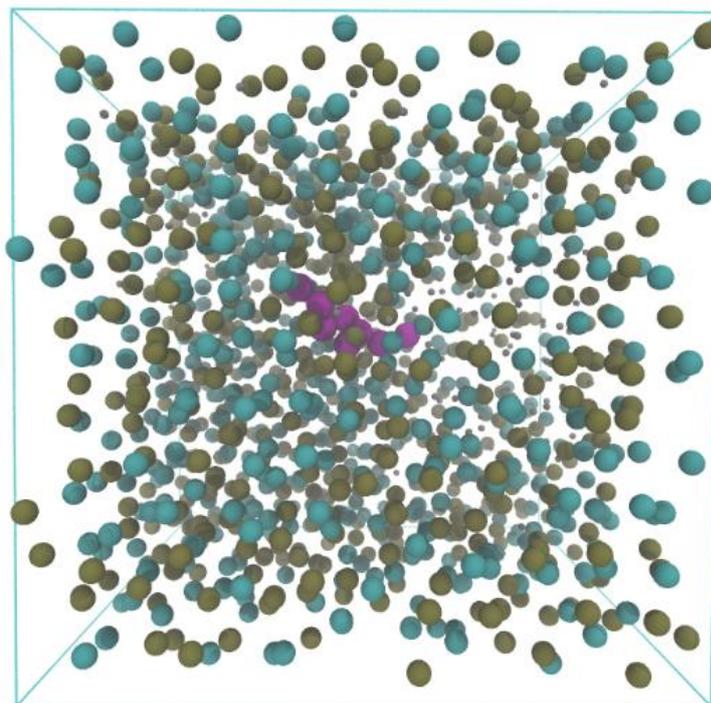


Ilustração 4 - Modelo *coarse grained* da prednisolona (roxo) solvatada com uma mistura de octanol-água em uma caixa de 5,1 nm x 5,1 nm x 5,1 nm. O octanol está representado por as bolas verdes e azuis e a água está representada em cinza.

Ambos sistemas foram equilibrados primeiro com um ensemble NVT durante 5 ns. A temperatura foi controlada pelo algoritmo de integração dinâmica estocástica (Van Gunsteren e Berendsen, 1988) a 298 K e uma constante de tempo de 1 ps. Também foi realizada uma equilibração de 10 ns com ensemble NPT utilizando o barostato Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com um acoplamento fraco de pressão a 1 bar com uma constante de tempo de 3 ps.

A equação de movimento de Newton foi resolvida pelo algoritmo de integração dinâmica estocástica *leap-frog* (Van Gunsteren e Berendsen, 1988). Este algoritmo controla a temperatura a 298 K com 1 ps de tempo de acoplamento. A pressão foi acoplada com o barostato do Parrinello-Rahman (Parrinello e Rahman, 1981) com um tempo de acoplamento de 12 ps.

A energia livre da transferência da prednisolona da fase água para a fase octanol foi calculada utilizando a metodologia da integração termodinâmica na qual uma molécula de prednisolona é desacoplada gradualmente de uma caixa de solvente (água ou octanol). O tempo de desacoplamento foi de 100 ns. Para ambos sistemas, a prednisolona foi desacoplada tanto das interações de van der Waals como das interações eletrostáticas. 20 simulações entre 0 e 1 (cada $\lambda=0,05$) para cada solvente foram realizadas, dando um tempo total de 2 μ s para cada solvente.

4.4.2. ***Umbrella sampling***

A prednisolona foi colocada na fase aquosa em um sistema de duas fases, água-octanol, com 2938 moléculas de água e 765 moléculas de octanol em uma caixa de 5 nm x 5 nm x 24 nm em condições periódicas de contorno (ilustração 5).

Todos os cálculos de energia com o método de *umbrella sampling* foram realizados utilizando o algoritmo *leap-frog* para resolver a equação de movimento de Newton. Uma etapa de equilíbrio de 10 ns em um ensemble NPT a 298 K utilizando o termostato de escalonamento da velocidade (Bussi *et al.*, 2007), com uma constante de tempo de 1 ps e o barostato de pressão de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) a 1 bar com uma constante de acoplamento de 3 ps. Nessa etapa de equilíbrio foi utilizada a restrição de posição para permitir a solvatação da prednisolona no centro da fase água.

A prednisolona foi induzida passar espontaneamente do solvente polar (água) ao solvente apolar (octanol) durante 100 ns de simulação, utilizando o mesmo acoplamento de temperatura da equilíbrio. Nesse caso, o barostato utilizado foi o Parrinello-Rahman (Parrinello e Rahman, 1981) a 1 bar com um tempo de acoplamento de 12 ps. A molécula foi deslocada por 9 nm ao longo da dimensão mais longa da caixa (ilustração 6).

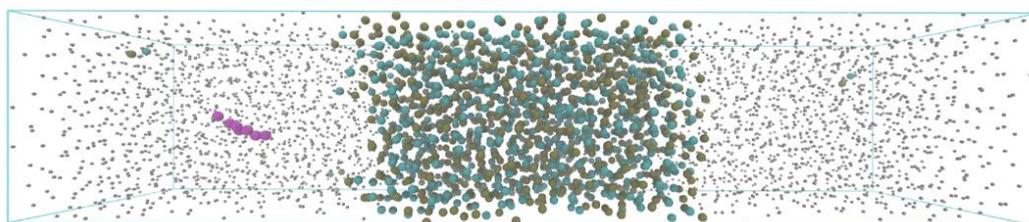


Ilustração 5 – Prednisolona na fase água de um sistema bifásico água/octanol em uma caixa de 5 x 5 x 24 nm.

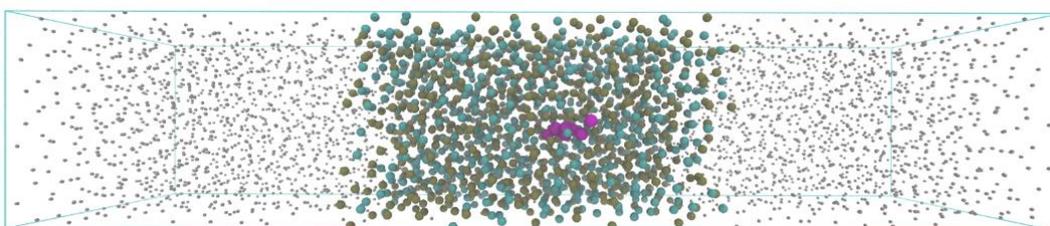


Ilustração 6 - Prednisolona na fase octanol de um sistema bifásico água/octanol em uma caixa de 5 x 5 x 24 nm.

Foram selecionadas diferentes janelas a cada 0.2 nm, aproximadamente, ao longo da dimensão mais longa da caixa como função do centro de massa da

prednisolona e do octanol. As janelas selecionadas foram colocadas para rodar uma etapa de equilíbrio, e em seguida, uma dinâmica molecular de 100 ns. A constante de força foi variada entre 100 e 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻². Esta etapa de equilíbrio foi feita com os mesmos parâmetros da primeira equilíbrio. As simulações de amostragem foram realizadas em um ensemble NPT. Os solventes e a prednisolona foram acoplados separadamente com um termostato de escalonamento da velocidade (Bussi *et al.*, 2007) a 298 K com constante de tempo de 1 ps. A pressão foi mantida com o barostato de Parrinello-Rahman (Parrinello e Rahman, 1981) a 1 bar com uma constante de tempo de 12 ps. Foram realizadas 28 simulações com um tempo de 100 ns e um deslocamento aproximado de 0.2 nm para cada uma delas. Gerando um total de 2,8 μs de simulação. As dinâmicas foram analisadas utilizando o método de análise dos histogramas ponderados (WHAM) (Kumar *et al.*, 1992).

4.5.

Modelo de surfactante pulmonar e prednisolona

O sistema consiste em uma caixa de água colocada no vácuo com 6 nm de comprimento no eixo z com aproximadamente 14000 moléculas de água do modelo *coarse grained*. Duas monocamadas de lipídios simétricas paralelas ao plano xy nas interfaces água-vácuo foram colocadas dentro de uma caixa de tamanho 17,3 nm x 17,3 nm x 50,0 nm. A monocamada simétrica consiste de 358 moléculas do DPPC e 154 moléculas de POPC colocadas aleatoriamente, perfazendo um total de 512 moléculas de lipídios em cada monocamada. As monocamadas de fosfolipídios foram criadas com ajuda do script INSANE (Wassenaar *et al.*, 2015), disponível no sítio web do Martini e rearranjadas com ajuda do programa `gmx editconf`.

Depois da minimização de energia ser feita, foi realizada uma etapa de equilíbrio com o termostato de escalonamento de velocidade (Bussi *et al.*, 2007) a 310 K com uma constante de tempo de 1 ps. O algoritmo *leap-frog* foi utilizado para resolver a equação de movimento de Newton. Dinâmicas moleculares de 2 μs foram realizadas com um ensemble de tensão superficial constante utilizando a pressão de 1 bar. As tensões superficiais de 0, 10 e 20 mN m⁻¹ com uma compressibilidade de 4.5x10⁻⁵ bar⁻¹ foram simuladas com o barostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) e um tempo de acoplamento de 3 ps.

O modelo de surfactante pulmonar foi utilizado para rodar mais 2 μs de dinâmica molecular com três frações em massa de prednisolona: 0,1, 1 e 10%,

com as três diferentes tensões superficiais. As moléculas de prednisolona foram colocadas no vácuo de cada sistema para simular a adsorção da prednisolona na monocamada fosfolipídica (ilustração 7). Os parâmetros da dinâmica molecular foram os mesmos utilizados na dinâmica do filme sem o fármaco.

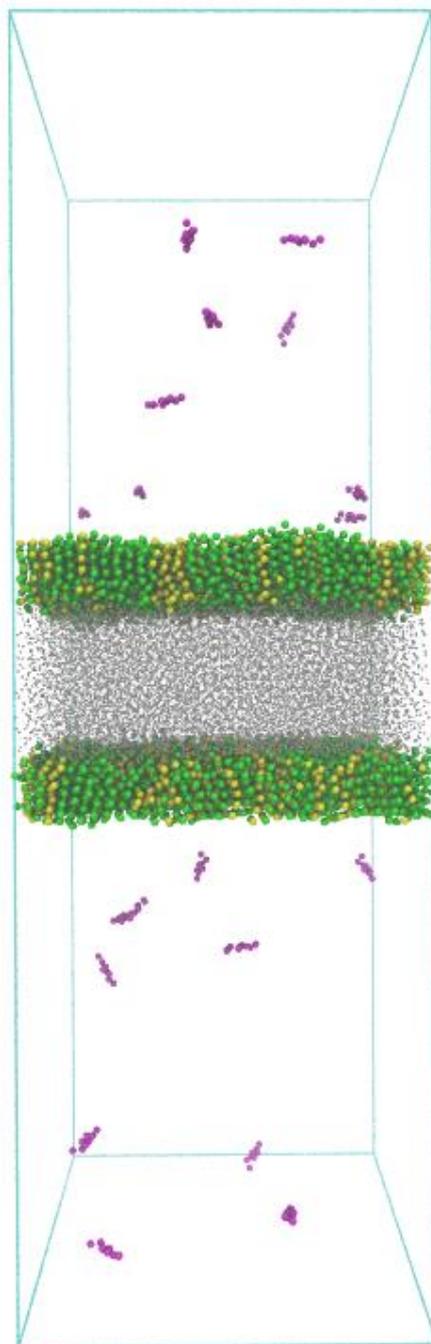


Ilustração 7 - Monocamada de DPPC (verde) e POPC (amarelo) na interface ar-água (água representada em cinza) com 1% de prednisolona (roxo).

5 Resultados e discussão

5.1. Resumo

Os resultados do trabalho estão divididos em duas partes. Primeiro, a validação do modelo *coarse grained* da prednisolona pelo cálculo de energia livre de transferência da prednisolona da água para o octanol através dos métodos de integração termodinâmica e *umbrella sampling*. Segundo, cálculo da área por lipídio, do coeficiente da difusão lateral, do parâmetro de ordem, da localização e orientação da prednisolona na monocamada fosfolipídica da separação de fases, da formação de agregados de prednisolona e do espalhamento da prednisolona na monocamada do modelo de surfactante pulmonar.

5.2. Cálculo de energia livre

O logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, $\log P_{o/a}$, é definido como a razão entre a concentração de um soluto em dois diferentes solventes imiscíveis como são o octanol e a água. Para a molécula de prednisolona, o cálculo do logaritmo do coeficiente de partição pode ser obtido de acordo com a seguinte equação (Leach, A. R. 2001).

$$\log P_{o/a} = -\frac{\Delta G_{trans}}{2,303RT} \quad (39),$$

onde R é o valor da constante dos gases em $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ e T é a temperatura absoluta em K. ΔG_{trans} é a variação da energia livre de Gibbs necessária para transferir a prednisolona da fase água para a fase octanol. A primeira energia livre será chamada de energia livre de hidratação e a segunda, de energia livre de solvatação.

Para obter maior confiabilidade nos resultados do coeficiente de partição, foram acrescentados 10% aos desvios padrões de cada cálculo de energia livre já que a reprodutibilidade deste cálculo encontra-se dentro desta faixa de 10%.

5.2.1. Método de integração termodinâmica

Como foi descrito no capítulo da fundamentação teórica, o método de integração termodinâmica descreve a transferência de energia livre entre dois estados diferentes. Para o cálculo do ΔG_{trans} , o ciclo termodinâmico da ilustração 8 será utilizado. O ciclo termodinâmico faz uso de uma molécula fictícia de prednisolona que basicamente é uma molécula de prednisolona caracterizada por não ter interações não ligadas com o solvente do meio. O seja, o potencial de Lennard-Jones e coulomb é considerado zero.

Segundo o ciclo termodinâmico a energia livre de hidratação e solvatação pode ser calculada como:

$$\Delta G_{hidratação} = \Delta G_2 + \Delta G_4 - \Delta G_1,$$

$$\Delta G_{solvatação} = \Delta G_2 + \Delta G_4 - \Delta G_3,$$

onde:

ΔG_2 : é a energia livre associada para converter uma molécula de prednisolona no vácuo em uma molécula de prednisolona fictícia no vácuo.

ΔG_4 : é a energia livre associada para converter uma molécula fictícia de prednisolona no vácuo em uma molécula fictícia de prednisolona em água (ou em octanol). Este valor de fato é zero em ambos casos, já que a molécula fictícia de prednisolona não está interagindo com nenhum solvente.

ΔG_1 : é a energia livre associada para converter uma molécula de prednisolona em uma molécula fictícia de prednisolona na fase água.

ΔG_3 : é a energia livre associada para converter uma molécula de prednisolona no octanol em uma molécula fictícia de prednisolona na fase octanol.

Assim, o ΔG_{trans} é:

$$\Delta G_{trans} = \Delta G_{solvatação} - \Delta G_{hidratação} = (\Delta G_2 - \Delta G_1) - (\Delta G_2 - \Delta G_3) = \Delta G_3 - \Delta G_1$$

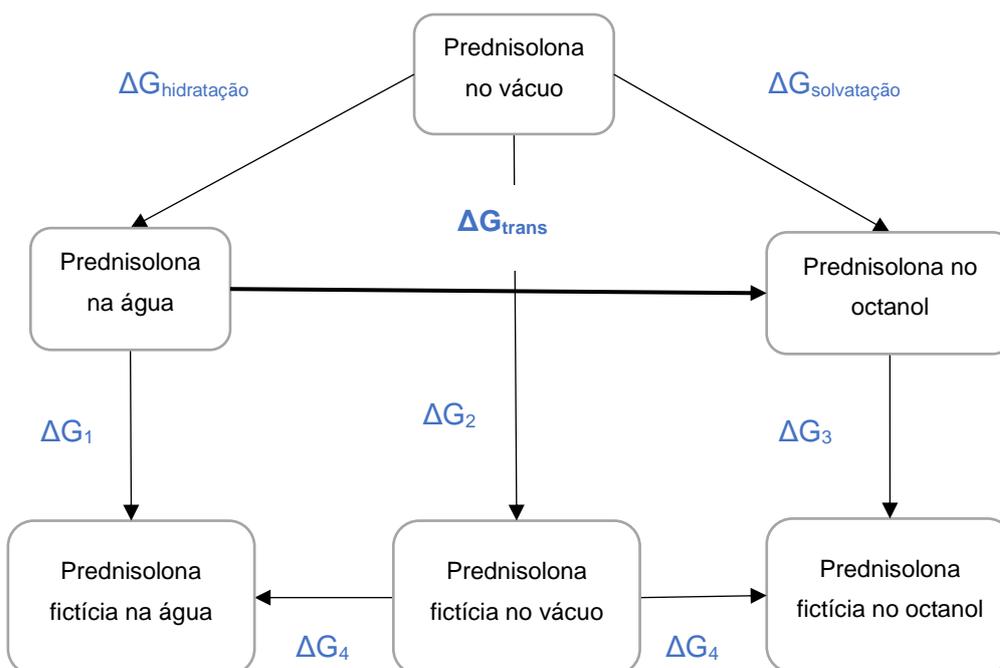


Ilustração 8 - Ciclo termodinâmico da prednisolona no vácuo, na água e no octanol.

O perfil acumulativo de energia livre dos dois solventes utilizados é mostrado na figura 1. Os resultados da energia livre de hidratação e solvatação correspondem a -101 ± 1 e -130 ± 2 kJ mol^{-1} , respectivamente. Portanto, a energia livre de transferência será de -29 ± 3 kJ mol^{-1} . Substituindo esse valor na eq. (40) temos que o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água é estimado ser $5,1 \pm 0,5$. O valor experimental do logaritmo do coeficiente de partição é 1,62 (Hansch e Leo, 1995). Portanto, o valor calculado é superestimado em aproximadamente 3 vezes ao valor experimental.

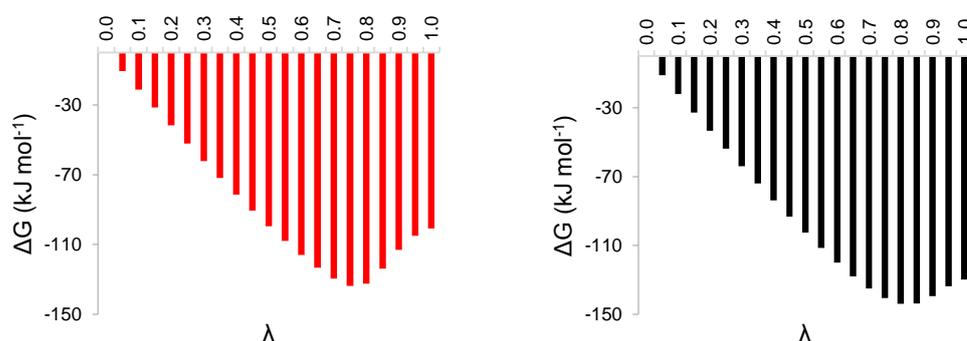


Figura 1 - Perfil acumulativo de energia livre em kJ mol^{-1} de hidratação (vermelho) e de solvatação (preto) da prednisolona a 298 K.

O mesmo cálculo foi realizado com o colesterol (figura 2), que é uma molécula que possui um campo de força MARTINI bem estabelecido. Foram obtidos os seguintes resultados. A energia livre de hidratação corresponde a -27 ± 1 kJ mol⁻¹. A energia livre de solvatação foi estimada em -115 ± 1 kJ mol⁻¹. Portanto, a energia livre de transferência foi calculada em -88 ± 2 kJ mol⁻¹. Esse valor está de acordo com o calculado por outros pesquisadores ($87,7 \pm 0,3$ kJ mol⁻¹) (Melo *et al.*, 2015). Quando este valor é substituído na eq. (40), o logaritmo do coeficiente de partição calculado é $15,6 \pm 0,3$. Um valor previsível para o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água do colesterol é de 7,02 (Tetko e Bruneau, 2004), o que mostra que o valor calculado com o campo de força MARTINI superestima o resultado experimental em aproximadamente 2.

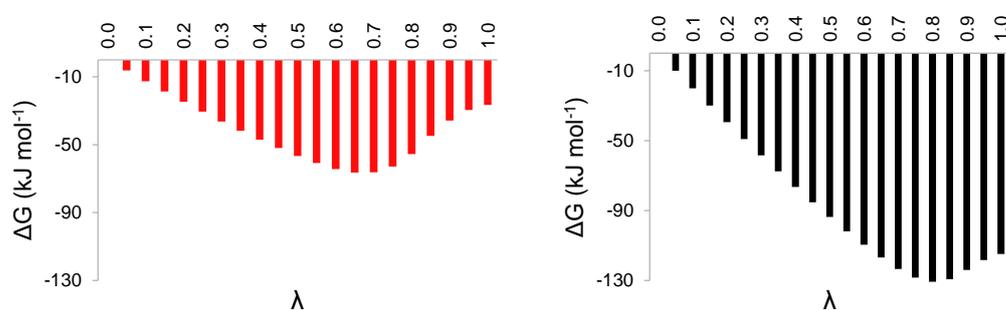


Figura 2 - Perfil acumulativo de energia livre em kJ mol⁻¹ de hidratação (vermelho) e de solvatação (preto) do colesterol a 298 K.

Mesmo os resultados calculados sendo superestimados em relação aos experimentais e previsíveis, esses modelos são considerados boas aproximações devido às dificuldades envolvidas no cálculo da entropia. Ao contrário da energia interna que é medida da energia potencial de cada configuração do sistema, a entropia depende do coeficiente de partição que não é calculado por métodos dinâmicos (Meirovitch *et al.*, 2009).

5.2.2. Método de umbrella sampling

O método do *umbrella sampling* é utilizado para o cálculo do potencial de força média da prednisolona ao passar da fase água para a fase octanol. O perfil do potencial de força média da prednisolona ao longo de um caminho de reação ψ a 298 K é mostrado na figura 3. O histograma calculado pelo método de análise do histograma ponderado é mostrado na figura 4.

A constante de força de $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ foi escolhida já que mostrava a melhor sobreposição das janelas na fase aquosa. Na fase octanol, não foram observadas diferenças significativas entre diferentes constantes de força. Os histogramas gerados para uma constante de força de $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ e uma temperatura de 298 K são mostrados nas figuras 4a e 4b. O histograma 4a mostra todas as 28 janelas simuladas ao longo do caminho de reação. Três regiões são claramente distintas: a região da fase octanol (de 0 a 4 nm), a da interface octanol-água (de 4 a 6 nm) e a da fase água (de 6 a 9 nm). A exceção da interface octanol-água, onde a amostragem é pobre, o histograma exibe a sobreposição de janelas. As janelas sobrepostas foram removidas da análise para testar a influência dessa sobreposição de janelas no cálculo do perfil de força média. Então, o perfil de força média e o histograma foram calculados novamente. O perfil de energia gerado foi exatamente igual ao gerado com todas as janelas. Na figura 4b, o histograma é mostrado após ser aplicado o método de análise do histograma ponderado com a janelas selecionadas. Novamente, as três regiões descritas anteriormente são mostradas no histograma (figura 4b). Porém, podemos concluir que um espaçamento maior de 0,2 nm pode ser escolhido para o cálculo de perfil de força média para moléculas derivadas dos esteróis, como é o caso do colesterol e a prednisolona.

A diferença de energia livre é calculada pela diferença entre os dois patamares da curva do potencial de força média. Considerando uma média no primeiro patamar (aproximadamente de 0 a 3,5 nm), o valor da energia livre é de $-2 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$, e no segundo patamar (aproximadamente de 5 a 8 nm), é de $-24 \pm 7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Com isso, a diferença de energia livre é calculada em $-22 \pm 9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Substituindo esse valor na eq. (40) temos que o coeficiente de partição octanol/água é estimado ser $3,9 \pm 1,6$. Fazendo uma relação com o valor experimental o valor calculado é superestimado em aproximadamente 2. O valor calculado pelo método de *umbrella sampling* está mais próximo ao valor experimental do que o valor calculado pelo método de integração termodinâmico.

Pelas inconsistências (pobre amostragem e sobreposição de janelas) obtidas no histograma, pode-se dizer que a metodologia de *umbrella sampling* tem duas fraquezas no estudo de sistemas bifásicos. Primeiro, a diferença entre as forças de interação entre soluto-solvente não permite ter uma boa amostragem na interface, mostrando um buraco nas figuras 4a e 4b. Segundo, a dificuldade de ajustar uma mesma constante de força para um soluto na água e no octanol, evidenciado pela diferente homogeneidade das janelas em os dois solventes (figura 4a). Os valores do ΔG_{trans} e do $\log P_{o/a}$ são mostrados na tabela 1. Considerando a grã redução dos graus de liberdade dos modelos *coarse grained* e os resultados do logaritmo do coeficiente de partição da prednisolona concluímos que o modelo proposto para a prednisolona é uma boa aproximação para ser utilizado em dinâmica molecular com modelos de surfactante pulmonar.

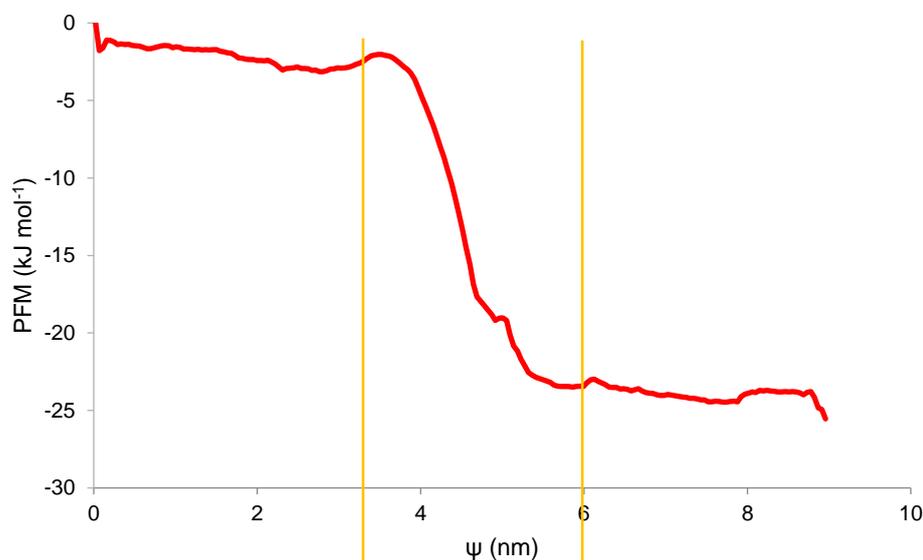


Figura 3 - Perfil do potencial de força média da prednisolona em kJ mol^{-1} ao longo do caminho de reação ψ em nm a 298 K.

Tabela 1 - Comparação da energia livre de transferência da prednisolona da água para o octanol (ΔG_{trans}) e do logaritmo do coeficiente de partição ($\log P_{o/a}$) da prednisolona pelo método de integração termodinâmica, o *umbrella sampling* e experimental de $\log P_{o/a}$ medidos a uma temperatura de 298 K.

Método	ΔG_{trans} (kJ mol^{-1})	$\log P_{o/a}$
Integração Termodinâmica	-29 ± 3	$5,1 \pm 0,5$
<i>Umbrella Sampling</i>	-22 ± 9	$3,9 \pm 1,6$
Experimental	-	1,62

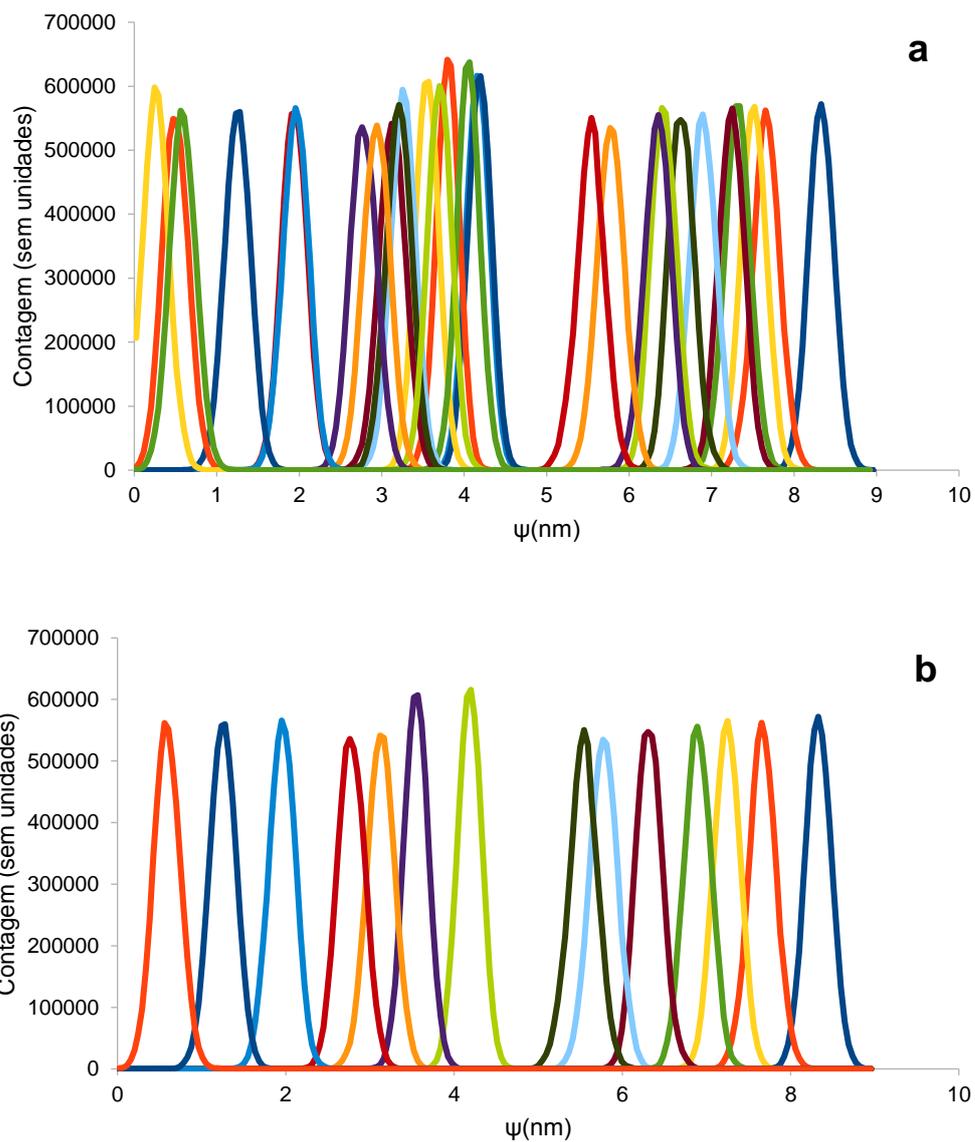


Figura 4 – Histogramas de todas as janelas (a) e de janelas selecionadas (b) da prednisolona ao longo de um eixo de reação ψ em nm a 298 K.

5.3.

Modelo de surfactante pulmonar e prednisolona

5.3.1.

Área por lipídio

A área por molécula de lipídio em um filme corresponde a área total média de uma monocamada dividida pelo número total de moléculas de lipídios nessa monocamada. A área por lipídio é um bom indicativo da estabilidade do filme. Além disso, a área por lipídio explica propriedades dinâmicas como transições de fases e estruturais como organização dos modelos de surfactante pulmonar.

Para o cálculo da área média, os valores dos vectores dos eixos x e y ao longo do tempo são calculados através do programa `gmx energy`. Logo, o produto desses valores é dividido pelo número total de lipídios em cada camada. O desvio padrão foi utilizado para medir a quantidade de dispersão do conjunto de valores da área por lipídio ao longo do tempo. Para o cálculo da área média por lipídio foi considerado apenas o último microssegundo das dinâmicas.

A área por lipídio da mistura fosfolipídica sem prednisolona é mostrada na figura 5. A área nas três tensões superficiais é praticamente estável ao longo dos dois microssegundos. No modelo do surfactante pulmonar sem o fármaco, a área por lipídio diminui um 3% ao passar da tensão superficial 20 para 10 mN m^{-1} . Entretanto, a área por lipídio sofre uma redução considerável, aproximadamente um 16% quando a tensão superficial foi reduzida para 0 mN m^{-1} . A mesma tendência foi obtida para as frações mássicas de 0,1 e 1 % (figura 6). Os resultados da fração em massa de 0,1% nas tensões superficiais 0 e 10 mN m^{-1} não são mostrados na figura 6 já que apresentam resultados similares para o filme sem o fármaco (tabela 2). A dinâmica de 0,1% para a tensão superficial de 20 mN m^{-1} não foi realizada.

A área por lipídio na fração de 10% com tensão superficial de 20 mN m^{-1} aumenta em um 9% com respeito ao valor da área do filme sem prednisolona na mesma tensão de superfície. Em uma isoterma de pressão-área, considerando uma área constante, implicaria um aumento da pressão e, portanto, uma diminuição da tensão superficial que estabilizaria o filme com a prednisolona.

Baoukina, *et al.* identificam três fases para um filme de 8192 moléculas de DPPC puro simulado a 300 K. A fase de líquido condensando (L_C) com uma faixa de área por lipídio de (46-48) Å^2 , a coexistência de fases de líquido expandido e líquido condensado (L_C-L_E) com uma faixa de área por lipídio de (48-56) Å^2 e uma fase de líquido expandido (L_E) com uma faixa de área por lipídio de (56-63) Å^2

(Baoukina, Monticelli, Marrink, *et al.*, 2007). Comparando com as médias das áreas por lipídios calculadas no modelo de estudo com e sem o fármaco (tabela 2) também são identificadas as mesmas três fases. Na tensão superficial 0 mN m^{-1} com uma área de $47,7 \pm 0,1 \text{ \AA}^2 \text{ lipídio}^{-1}$, a monocamada encontra-se na fase de L_C . Na tensão superficial de 10 mN m^{-1} com uma área média de $55,1 \pm 0,3 \text{ \AA}^2 \text{ lipídio}^{-1}$ o modelo de surfactante pulmonar encontra-se na faixa de coexistência de fases de L_C - L_E . Na tensão superficial de 20 mN m^{-1} o modelo de surfactante pulmonar com e sem o fármaco e uma faixa de $(57-62) \text{ \AA}^2 \text{ lipídio}^{-1}$ encontra-se na fase de L_E . Esses valores são concordantes como resultados experimentais relatados por vários pesquisadores onde uma faixa de $(44-48) \text{ \AA}^2 \text{ lipídio}^{-1}$ é considerada para a fase de L_C e $(57-81) \text{ \AA}^2 \text{ lipídio}^{-1}$ para a fase de L_E (Duncan e Larson, 2008).

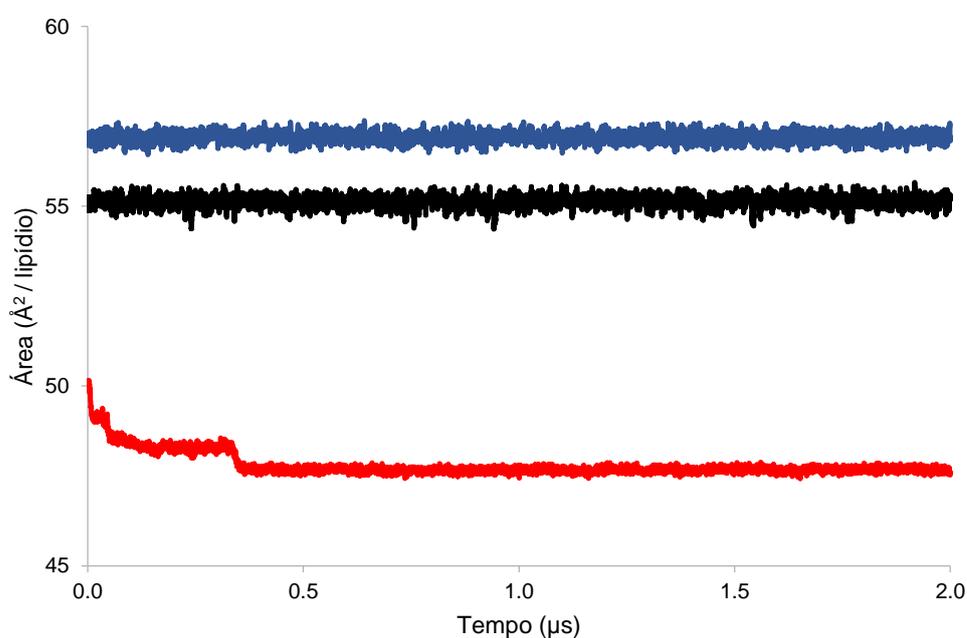


Figura 5 - Área por lipídio em \AA^2 do modelo de surfactante pulmonar em diferentes tensões superficiais, 0 (vermelho), 10 (preto) e 20 (azul) mN m^{-1} durante 2 μs de simulação a 310 K.

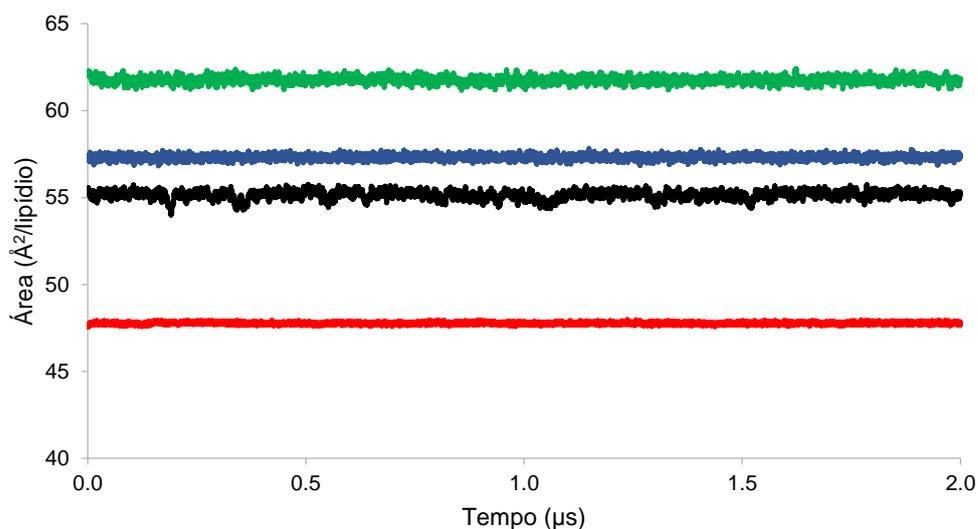


Figura 6 - Área por lipídio em Å² com uma fração em massa de 1% de prednisolona nas tensões de 0 (vermelho), 10 (preto) e 20 (azul) mN m⁻¹ e na fração massa de 10% de prednisolona na tensão superficial 20 (verde) mN m⁻¹ ao longo de 2 µs de simulação a 310 K.

Tabela 2 - Resumo da área por lipídio (em Å²) nas três diferentes tensões superficiais (0; 10 e 20 mN m⁻¹) e nas três diferentes frações em massa (0,1; 1 e 10%) a 310 K.

% m/m	Tensão superficial (mN m ⁻¹)	Área por lipídio (Å ² /lipídio)
0	0	47.7±0.1
	10	55.1±0.3
	20	56.9±0.3
0,1	0	47.7±0.2
	10	55.2±0.2
	20	Não feito
1	0	47.8±0.1
	10	55.2±0.4
	20	57.3±0.1
10	0	Colapsou
	10	Colapsou
	20	61.8±0.2

5.3.2. Difusão lateral

A difusão lateral é uma propriedade dinâmica muito importante que mede a capacidade dos lipídios de se movimentarem ao longo da monocamada. O coeficiente de difusão é computado usando a relação de Einstein através do cálculo do deslocamento quadrático médio de um conjunto de átomos em uma posição específica. O deslocamento quadrático médio é uma medida do desvio entre a posição de uma partícula e uma posição de referência. O coeficiente de difusão é calculado pelo método de mínimos quadrados que ajusta um conjunto de pontos a uma reta:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle \|r(t) - r(t=0)\|^2 \rangle = 2Dt \quad (40),$$

onde $r(t)$ é a posição do centro de massa da molécula no plano xy em um tempo t e $r(t=0)$ é a posição do centro de massa em um tempo 0. D é o coeficiente de difusão lateral.

O erro é calculado como a diferença dos coeficientes de difusão obtidos a partir de ajustes sobre as duas metades do intervalo total. Todos os cálculos apresentados foram ajustados descartando 10% do tempo no começo e no final das análises.

Para comparar com valores experimentais ou simulações atomísticas, um fator de conversão de 4 deve ser aplicado ao coeficiente de difusão obtido a partir de uma simulação feita com modelos *coarse grained*. A origem deste fator é para compensar a difusão mais rápida nos modelos *coarse grained* (Marrink *et al.*, 2004).

A difusão lateral é calculada ao longo do plano xy , utilizando os centros de massa do DPPC, do POPC e da prednisolona. Na tabela 3, os coeficientes de difusão lateral e seus erros do DPPC e POPC a 310 K são mostrados no modelo de surfactante pulmonar com as tensões superficiais de 0, 10 e 20 mN m^{-1} utilizando 2 μs de simulação. Os resultados estão em acordo com valores experimentais encontrados em bicamadas e vesículas onde as grandezas vão de 10^{-7} e 10^{-8} $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, respectivamente (Fahey e Webb, 1978). Resultados similares também foram encontrados em simulações *coarse grained* para misturas fosfolipídicas similares. Laing *et al* encontrou um valor para difusão do DPPC em uma mistura com POPG e colesterol de $(3,4 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ e $(4,2 \pm 0,2) \times 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ nas tensões de 0 e 20 mN m^{-1} respectivamente (Laing *et al.*, 2009). A difusão lateral do DPPC e POPC na tensão superficial 0 mN m^{-1} é quase duas vezes

menor do que na tensão de 10 mN m^{-1} . No entanto, não existe diferença alguma entre as tensões superficiais 10 e 20 mN m^{-1} de ambos fosfolipídios na monocamada. O quadrado do deslocamento médio do DPPC e POPC na tensão superficial de 0 e 20 mN m^{-1} é mostrado na figura 7. Na tensão superficial de 0 mN m^{-1} não tem diferença no coeficiente de difusão entre o DPPC e POPC. Entretanto, o POPC mostra uma difusão levemente maior que o DPPC na tensão superficial 20 mN m^{-1} . A explicação tem origem na dupla ligação de uma de suas caudas que permite ficar mais livre para difundir na tensão de 20 mN m^{-1} .

A difusão lateral da prednisolona apenas foi medida na tensão superficial de 20 mN m^{-1} já que foi a única tensão que a simulação foi completada em um tempo longo ($2 \mu\text{s}$) para uma fração em massa de 10% . O quadrado do deslocamento médio do DPPC, do POPC e da prednisolona na tensão superficial de 20 mN m^{-1} é mostrado na figura 8. O coeficiente de difusão lateral da prednisolona na monocamada fosfolipídica foi de $(6\pm 4) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 310 K . Resultados experimentais do colesterol foram encontrados: $2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 310 K (Scheidt *et al.*, 2005) e $5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 310 K (Gliss *et al.*, 1999) em bicamadas de DPPC. Laing *et al.* (Laing *et al.*, 2009) também encontrou valores de $(6,5\pm 0,4) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 310 K para uma mistura de DPPC/POPG na tensão superficial de 20 mN m^{-1} utilizando simulações do modelo *coarse grained* do colesterol. Considerando que os valores de difusão de lipídios em bicamadas são uma ordem de grandeza menores do que em monocamadas e pelas similaridades da prednisolona com o colesterol (Adalsteinsson e Yu, 2000), os resultados obtidos estão em bom acordo.

No filme de DPPC/POPC com prednisolona (tabela 4), os valores dos coeficientes de difusão lateral do DPPC e POPC diminuíram com respeito aos valores do filme sem o fármaco (tabela 3), o que dá uma ideia que a prednisolona organiza a monocamada fosfolipídica, comportamento similar observado no colesterol.

Tabela 3 - Resumo dos coeficientes de difusão lateral do DPPC e do POPC em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ sem prednisolona nas tensões superficiais de 0, 10 e 20 mN m^{-1} a 310 K.

Molécula	Tensão	
	Superficial (mN m^{-1})	D ($10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
DPPC	0	4±3
	10	7±3
	20	7±2
POPC	0	4±3
	10	8±3
	20	8±1

Tabela 4 - Coeficientes de difusão lateral do DPPC, do POPC e da prednisolona em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K.

Tensão		D ($10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
Superficial (mN m^{-1})	Molécula	
20	DPPC	5±4
	POPC	6±4
	Prednisolona	6±4

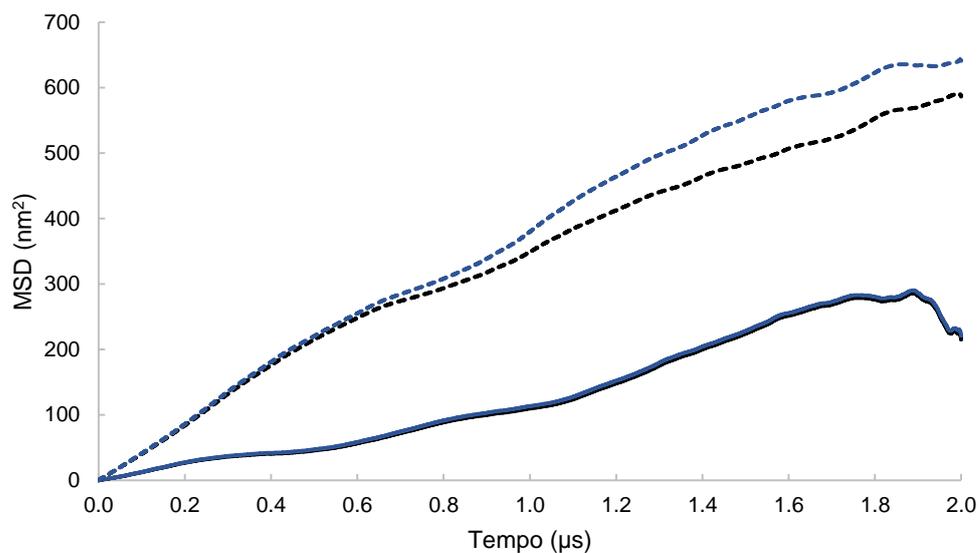


Figura 7 - Quadrado do deslocamento médio do DPPC (preto) e do POPC (azul) em uma tensão superficial de 0 mN m⁻¹ (linha contínua) e 20 mN m⁻¹ (linha tracejada) a 310 K.

PUC-Rio - Certificação Digital N° 1513091/CA

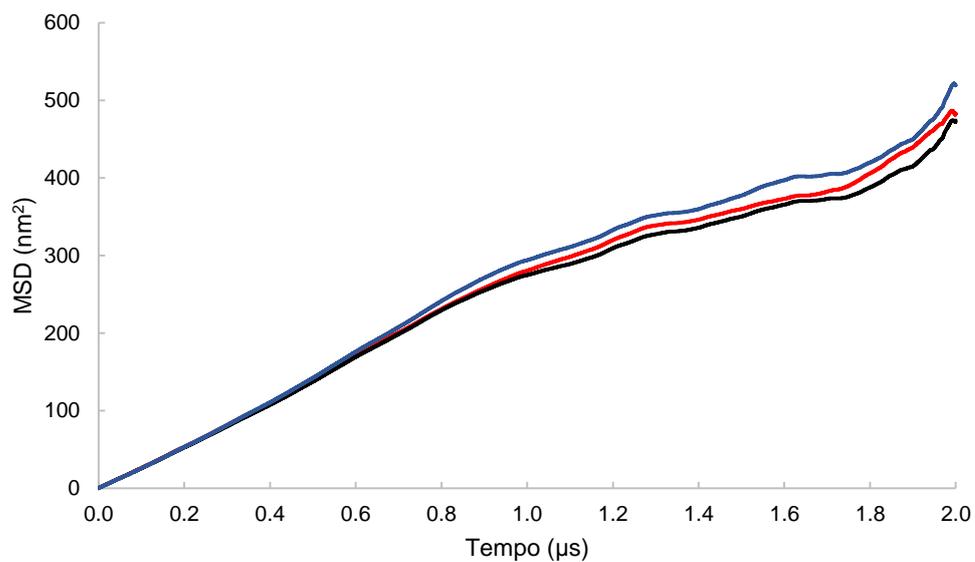


Figura 8 - Quadrado do deslocamento médio do DPPC (preto), do POPC (azul) e da prednisolona (vermelho) em uma tensão superficial de 20 mN m⁻¹ e 310 K.

5.3.3. Parâmetro de ordem

O parâmetro de ordem é calculado na dinâmica molecular para comparar diretamente com resultados obtidos de experimentos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). O parâmetro de ordem indica uma ideia da ordem de um conjunto de átomos (por exemplo, as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios). No modelo *coarse grained*, o parâmetro de ordem é calculado com ajuda de um script (`do-order-multi.py`) pela seguinte equação:

$$P_z = \frac{1}{2}((3\cos^2\theta) - 1) \quad (41),$$

onde θ é o ângulo entre o vetor conectando os sítios $n-1$ e $n+1$ da cauda dos lipídios e a normal z da monocamada. $P_z=1$ significa um perfeito alinhamento com a normal, $P_z=-0,5$ um alinhamento perpendicular com a normal e $P_z=0$ uma orientação aleatória.

Para comparar os resultados obtidos com modelos *coarse grained* com resultados experimentais ou atomísticos, o parâmetro de ordem (S_{CD}) pode ser escrito como: $S_{CD} = P_z/4$. O P_z é dividido por 4 para compensar o mapeamento 4 a 1 dos modelos *coarse grained*.

O valor médio do parâmetro de ordem ($S_{CD} = 0,21$) das cadeias $sn1$ e $sn2$ do DPPC sem prednisolona na tensão superficial de 0 mN m^{-1} e 310 K está em acordo com valores experimentais encontrados para a fase fluida em membranas (Egberts *et al.*, 1994). Também foram comparados com valores de S_{CD} calculados com *coarse grained* mostrando a mesma tendência (Nisoh *et al.*, 2015). Os parâmetros de ordem S_{CD} obtidos também estão em acordo com as fases descritas na seção de área por lipídio. Baoukina *et al* relatam uma média aproximada de $S_{CD} = 0,20$ para a fase de L_C e de $S_{CD} = 0,15$ para a coexistência de L_C e L_E , valores muito próximos aos obtidos para o sistema de DPPC/POPC sem prednisolona (Baoukina, Monticelli, Marrink, *et al.*, 2007)

Nas figuras 9a e 9b observa-se que o parâmetro de ordem é dependente da tensão superficial da monocamada fosfolipídica. A organização diminui muito da tensão superficial 0 para 10 mN m^{-1} quando comparada com a diminuição da organização ao passar da tensão superficial 10 para 20 mN m^{-1} . Esta mesma tendência foi observada no cálculo da área por lipídio da monocamada sem prednisolona. Quando as frações de massa de $0,1$ e 1% foram simuladas em diferentes tensões superficiais, o parâmetro de ordem não muda. A única diferença percebida foi com a adição de 10% de prednisolona que foi medida

apenas na tensão superficial de 20 mN m⁻¹. Nas tensões superficiais de 0 e 10 mN m⁻¹, a monocamada fosfolipídica com 10% de prednisolona colapsa. Na tensão superficial de 20 mN m⁻¹ e com 10% de prednisolona, os fosfolipídios mostram dois comportamentos: mais organizado nos dois primeiros grupos próximos da cabeça polar e mais desorganizado nos últimos dois grupos da cadeia hidrocarbônica. Isto pode ser um indício de que a prednisolona prefere ficar mais próxima da cabeça polar dos lipídios do que das caudas. Os grupos próximos da cabeça ficam mais rígidos e os das caudas ficam mais móveis para se desorganizar.

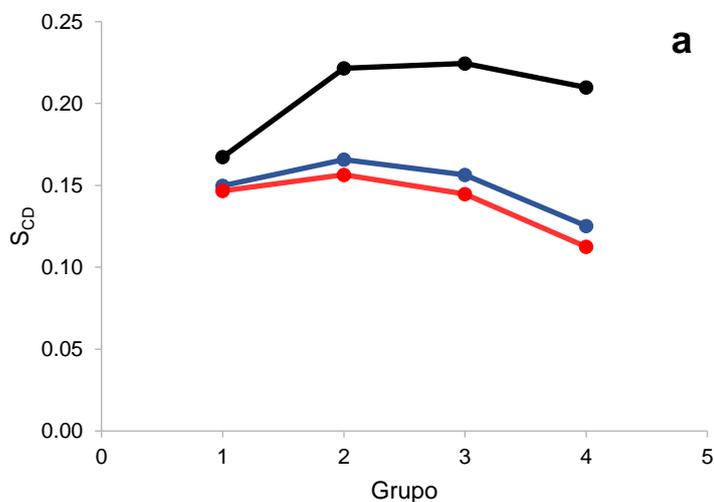
Nas tabelas 5 e 6 é mostrado o valor do S_{CD} de todos os sistemas simulados para cada uma das caudas do DPPC e do POPC.

Tabela 5 - Parâmetro de ordem das duas caudas do DPPC nas três tensões superficiais 0, 10 e 20 mN m⁻¹ e nas três frações mássicas de 0,1%; 1% e 10% de prednisolona a 310 K.

		DPPC									
Tensão superficial (mN m ⁻¹)	Grupo	<i>sn2</i>					<i>sn1</i>				
		0%	0,1%	1%	10%		Grupo	0%	0,1%	1%	
0	GL1-C1A	0.17	0.16	0.17	Colapsou	GL2-C1B	0.19	0.18	0.19	Colapsou	
	C1A-C2A	0.22	0.22	0.22		C1B-C2B	0.22	0.22	0.23		
	C2A-C3A	0.22	0.23	0.23		C2B-C3B	0.22	0.23	0.23		
	C3A-C4A	0.21	0.21	0.21		C3B-C4B	0.20	0.20	0.20		
10	GL1-C1A	0.15	0.15	0.15	Colapsou	GL2-C1B	0.15	0.15	0.15	Colapsou	
	C1A-C2A	0.17	0.17	0.17		C1B-C2B	0.16	0.16	0.17		
	C2A-C3A	0.16	0.16	0.16		C2B-C3B	0.15	0.15	0.16		
	C3A-C4A	0.13	0.13	0.13		C3B-C4B	0.12	0.12	0.12		
20	GL1-C1A	0.15		0.15	Não feito	GL2-C1B	0.14		0.14	0.16	
	C1A-C2A	0.16		0.16		0.16	C1B-C2B	0.15		0.15	0.16
	C2A-C3A	0.14		0.14		0.14	C2B-C3B	0.14		0.14	0.13
	C3A-C4A	0.11		0.11		0.10	C3B-C4B	0.10		0.10	0.09

Tabela 6 - Parâmetro de ordem das duas caudas do POPC nas três tensões superficiais 0, 10 e 20 mN m⁻¹ e nas três frações mássicas de 0,1%; 1% e 10% de prednisolona a 310 K.

POPC										
Tensão superficial (mN m ⁻¹)	sn2					sn1				
	Grupo	0%	0,1%	1%	10%	Grupo	0%	0,1%	1%	10%
0	GL1-C1A	0.16	0.16	0.17	Colapso	GL2-C1B	0.18	0.18	0.19	Colapso
	C1A-D2A	0.20	0.19	0.20		C1B-C2B	0.22	0.21	0.22	
	D2A-C3A	0.20	0.19	0.20		C2B-C3B	0.22	0.21	0.22	
	C3A-C4A	0.20	0.19	0.20		C3B-C4B	0.19	0.18	0.19	
10	GL1-C1A	0.15	0.15	0.15	Colapso	GL2-C1B	0.14	0.14	0.15	Colapso
	C1A-D2A	0.13	0.13	0.14		C1B-C2B	0.16	0.16	0.16	
	D2A-C3A	0.11	0.11	0.11		C2B-C3B	0.15	0.15	0.15	
	C3A-C4A	0.11	0.11	0.11		C3B-C4B	0.11	0.11	0.11	
20	GL1-C1A	0.14	Não feito	0.15	0.16	GL2-C1B	0.14	Não feito	0.14	0.15
	C1A-D2A	0.13		0.13	0.14	C1B-C2B	0.15		0.15	0.15
	D2A-C3A	0.10		0.10	0.09	C2B-C3B	0.14		0.14	0.13
	C3A-C4A	0.10		0.09	0.08	C3B-C4B	0.10		0.10	0.08



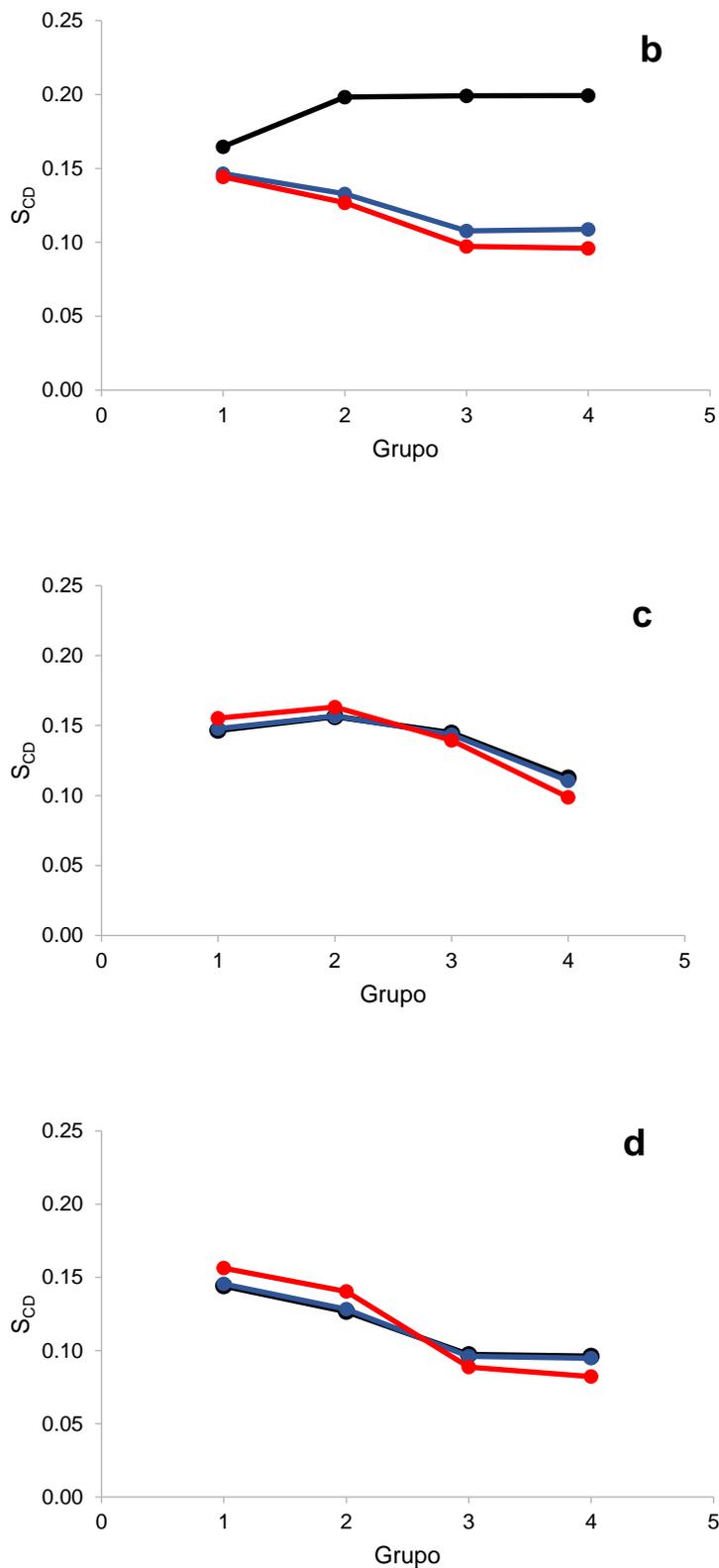


Figura 9 - Parâmetro de ordem da cadeia $sn1$ do DPPC (a), da cadeia $sn2$ do POPC (b) nas tensões superficiais 0 (preto), 10 (azul) e 20 (vermelho) mN m⁻¹ sem prednisolona. Parâmetro de ordem da cadeia $sn1$ do DPPC (c), e da cadeia $sn2$ do POPC (d) nas frações mássicas de 0% (preto), 1% (azul) e 10% (vermelho) na tensão superficial de 20 mN m⁻¹ a 310 K.

5.3.4. Localização da prednisolona

5.3.4.1. Distribuição de densidade de massa

O perfil de densidade de uma monocamada é a distribuição temporal média de alguma propriedade extensiva do sistema ao longo de um eixo perpendicular ao plano da monocamada. Neste trabalho, o perfil de densidade mássica será apresentado para elucidar a posição de alguns sítios da mistura fosfolipídica e da prednisolona. No GROMACS, este perfil é calculado com o programa `gmx density`. A distribuição da densidade de cada sítio/molécula é calculada ao longo do eixo z do sistema.

Na figura 10 é mostrado o perfil de densidade mássica da monocamada fosfolipídica de DPPC e POPC com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} . Os sítios mais polares da prednisolona e as cabeças polares do DPPC e do POPC ficam solvatadas pelas moléculas da camada de água.

Para conferir o nível de hidratação e a posição dos sítios da molécula de prednisolona e da mistura fosfolipídica, uma análise mais aprofundada de diferentes sítios foi feita (figura 11). Os sítios NC3 e PO4 do DPPC e do POPC mostraram-se completamente imersos na água, já o sítio GL2 fica mais do lado da fase fosfolipídica. Os sítios ROH2 e RO3 ficam também imersos na água e praticamente no mesmo nível que os sítios das cabeças polares (NC3 e PO4) do DPPC e do POPC. O sítio ROH1 fica no mesmo nível que o sítio GL2 das moléculas de DPPC e POPC.

O perfil de densidade também fica evidenciado na ilustração 9 com o espalhamento da prednisolona a 10% e uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} . As moléculas de prednisolona ficam orientadas com seu sítio mais polar na fase aquosa. Os mesmos resultados foram observados para frações em massa menores (0,1% e 1%) e filmes mais comprimidos (0 e 10 mN m^{-1})

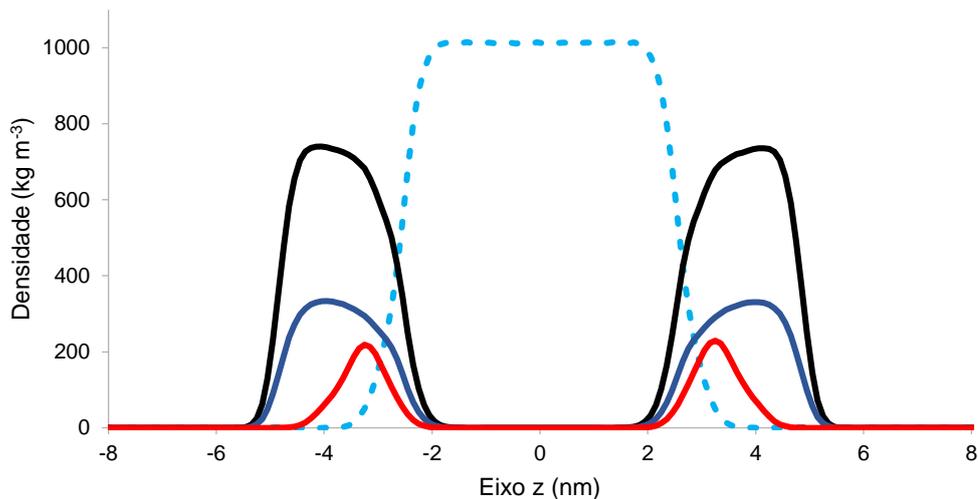


Figura 10 - Perfil de densidade mássica (kg m⁻³) ao longo do eixo z da água (celeste), DPPC (preto), POPC (azul) e prednisolona (vermelha), com 10% de prednisolona e tensão superficial de 20 mN m⁻¹ a 310 K.

PUC-Rio - Certificação Digital N° 1513091/CA

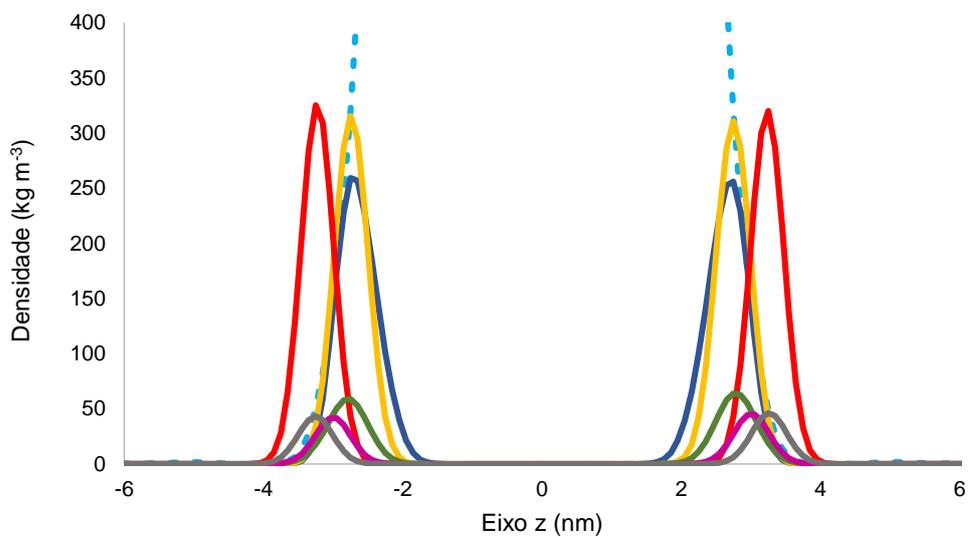


Figura 11 - Perfil de densidade mássica (kg m⁻³) ao longo do eixo z dos sítios: NC3 (azul), PO4 (amarelo), GL2 (vermelho), ROH2 (verde), RO3 (roxo) e ROH1 (cinza) a 310 K. A água (linha celeste tracejada) foi utilizada como referência.

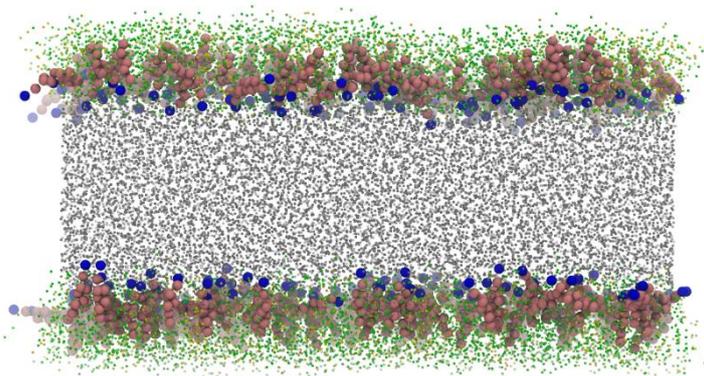


Ilustração 9 - Monocamada fosfolipídica de DPPC/POPC com 10% prednisolona em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K. Prednisolona está representado em marrom, o sítio ROH2 em azul, o DPPC/POPC com esferas verdes/amarelas menores e água com esferas em cinza.

5.3.5. Formação de agregados

Um agregado é um conjunto de moléculas unidas por forças não ligadas como as forças de van der Waals conformando um aglomerado como um todo. Os agregados podem ser classificados por vários critérios, nesta dissertação o critério do tamanho será utilizado. Um agregado será chamado de nanoagregado quando seu tamanho (diâmetro) se encontra entre 1 e 100 nm.

A formação de agregados é um fenômeno que pode impedir o funcionamento normal da mecânica do surfactante pulmonar. Para entender a influência da quantidade de prednisolona e da tensão superficial do filme, várias imagens foram tiradas em diferentes momentos de todas as dinâmicas moleculares. O diâmetro dos agregados de prednisolona foi estimado fazendo uma proporção entre o comprimento de um do eixo x utilizado como referência e o agregado.

Na ilustração 10a é mostrada a vista do plano xy da monocamada fosfolipídica com 1% de prednisolona na tensão superficial de 0 mN m^{-1} com dois agregados depois de 10 ns de simulação. A ilustração 10b mostra uma pequena curva do filme no plano xz causado pelos agregados. O valor aproximado do diâmetro dos agregados foi de 3 nm. Na ilustração 10c observa-se o espalhamento dos agregados na monocamada, ainda que eles ficam segregados em um extremo do filme por causa da tensão superficial ser a mínima (0 mN m^{-1}).

Nas ilustrações 11 e 12 mostram-se as mesmas três imagens que na ilustração 10, mas aqui as tensões superficiais foram de 10 e 20 mN m^{-1} , respectivamente. Não são encontrados agregados como os encontrados na

tensão superficial de 0 mN m^{-1} e o espalhamento melhora consideravelmente depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação.

Na ilustração 13a mostra-se o plano xy da monocamada fosfolipídica com 10% de prednisolona na tensão superficial de 0 mN m^{-1} . Cinco agregados com um diâmetro aproximado de 5 nm foram observados. Tanto o número de agregados como seu tamanho aumentaram consideravelmente devido ao aumento do número de moléculas. Depois de 260 ns de simulação os agregados rompem o filme e conduzem ao colapso da monocamada (ilustração 13c). Quando a tensão superficial do filme aumenta para 10 mN m^{-1} , o tamanho diminui de 5 nm para 3 nm e forma-se apenas 2 agregados (ilustração 14a e 14b). Entretanto, o filme colapsa depois de 776 ns (ilustração 14c).

Quando a tensão superficial é aumentada para 20 mN m^{-1} , praticamente não tem agregados na interface, apenas dois agregados de aproximadamente de 1,5 nm são observados (ilustração 15a e 15b) e as moléculas de prednisolona são adsorvidas e espalhadas completamente no filme depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (ilustração 15c).

Para comprovar se o filme tem a capacidade de espalhar agregados de aproximadamente 5 nm, agregados formados com 10% de prednisolona e tensão superficial 0 mN m^{-1} , foi escolhido um quadro em 10 ns de dinâmica (ilustração 16a) e simulada em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} . A prednisolona foi adsorvida e espalhada ao longo da monocamada depois de 500 ns (ilustração 16c). Isto é uma evidência importante de que agregados depositados na interface ar-lipídios podem ser espalhados em tensões superficiais maiores que 20 mN m^{-1} . Pelo contrário, o filme colapsa se a tensão superficial é mantida em 0 mN m^{-1} (ilustração 16b).

Um resumo é mostrado no quadro 4 para comparar todos os sistemas simulados.

Fração em massa da prednisolona em p/p %	Tensão superficial em mN m^{-1}					
	0		10		20	
	Estável	Agregados	Estável	Agregados	Estável	Agregados
0,1	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
1	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
10	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim

Quadro 4 – Resumo da estabilidade e formação de agregados nas três frações em massa 0,1%; 1% e 10% de prednisolona e nas três tensões superficiais 0, 10 e 20 mN m^{-1} do modelo de surfactante pulmonar a 310 K.

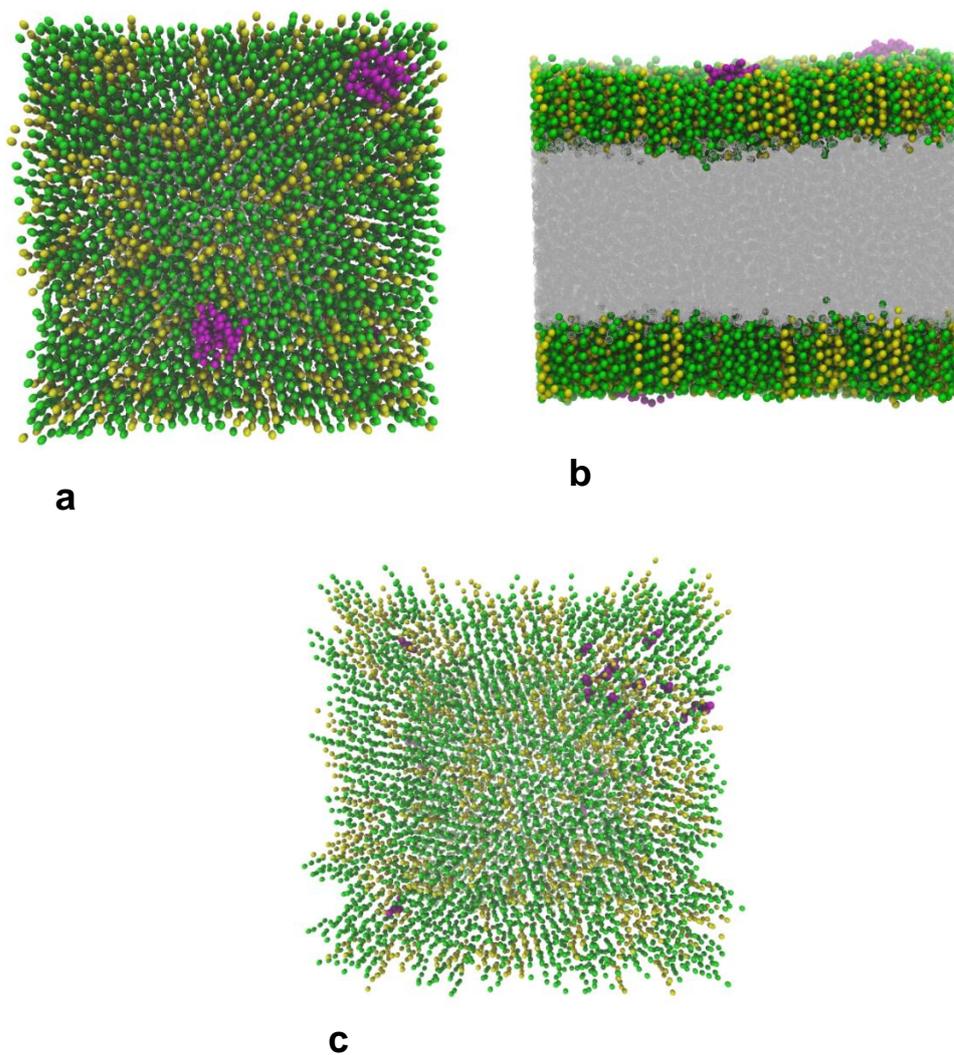


Ilustração 10 - Modelo de surfactante pulmonar com 1% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c).

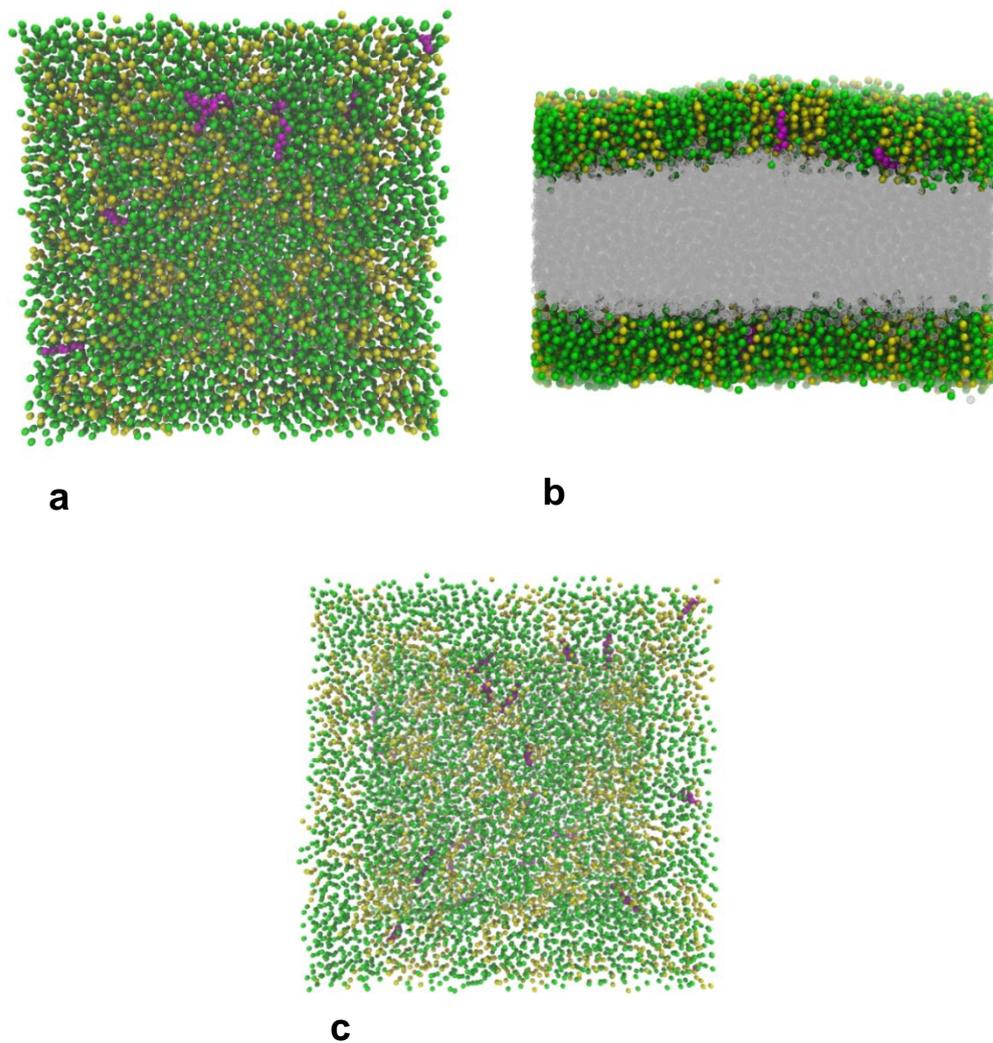


Ilustração 11 - Modelo de surfactante pulmonar com 1% de prednisolona em uma tensão superficial de 10 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c).

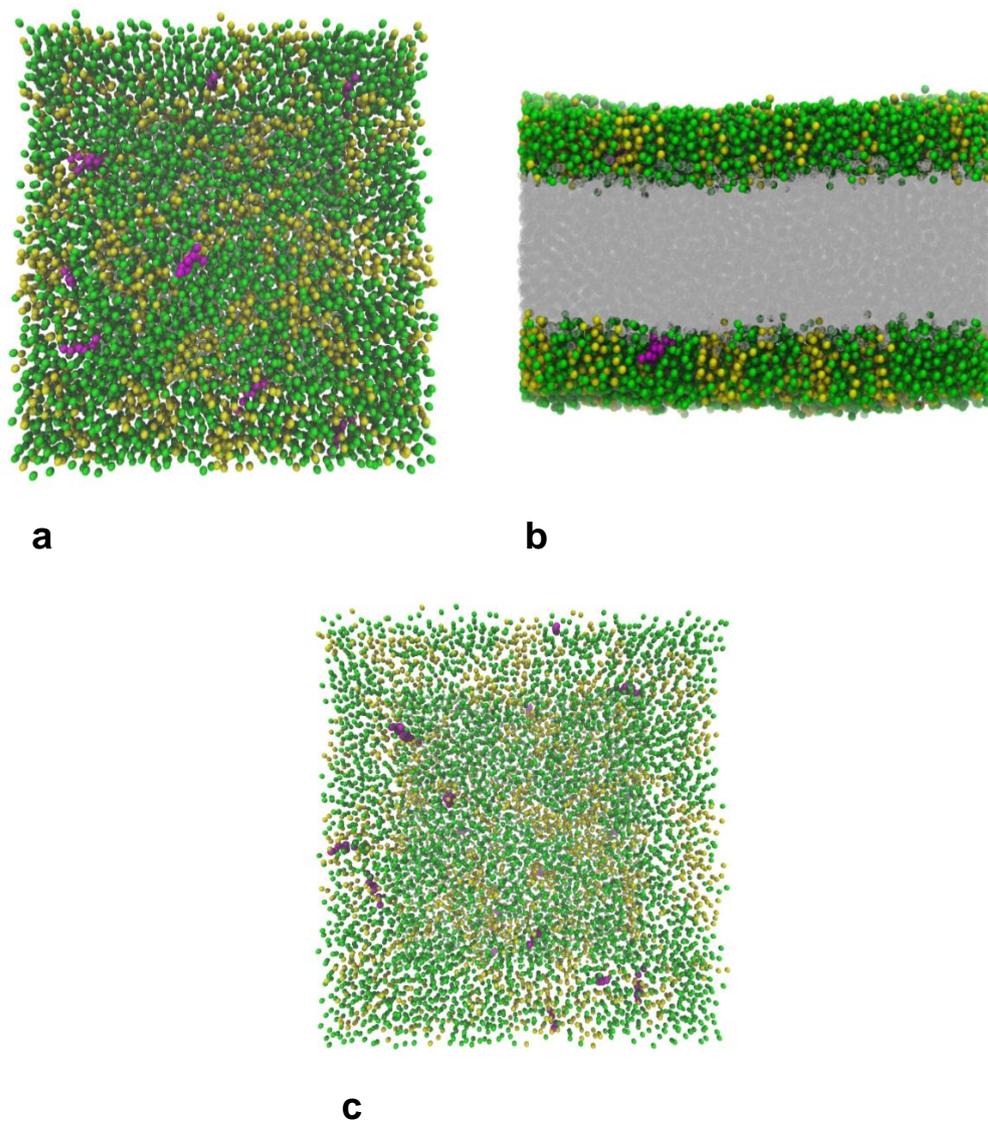


Ilustração 12 - Modelo de surfactante pulmonar com 1% de prednisolona em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K . Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c).

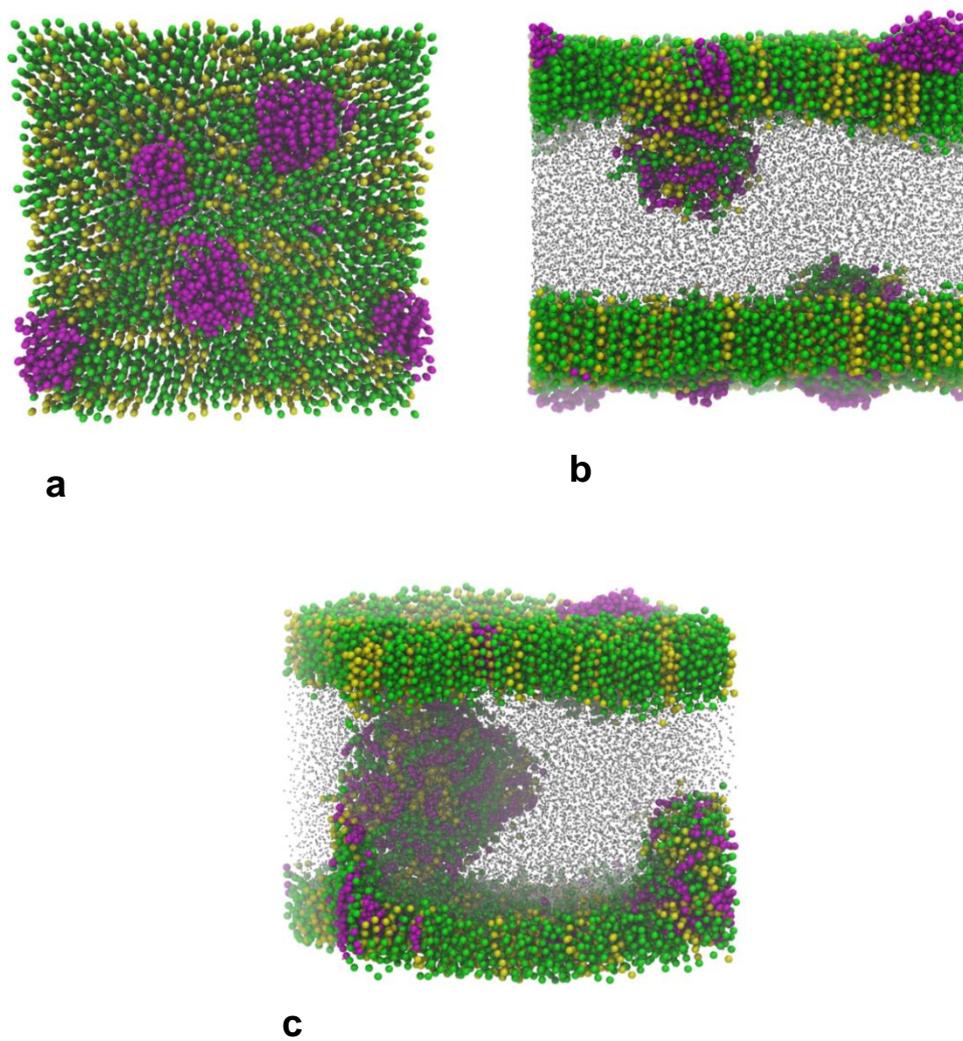


Ilustração 13 - Modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de 260 ns de simulação (c).

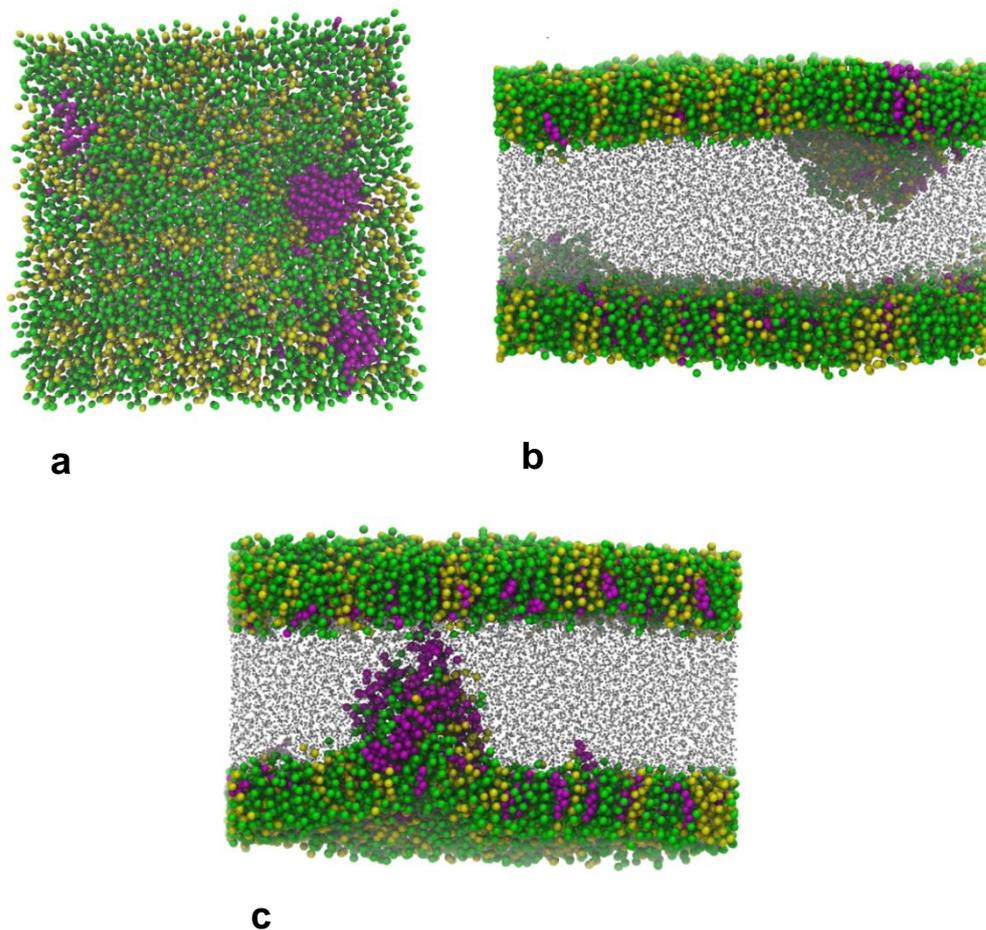


Ilustração 14 - Modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 10 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de 776 ns de simulação (c).

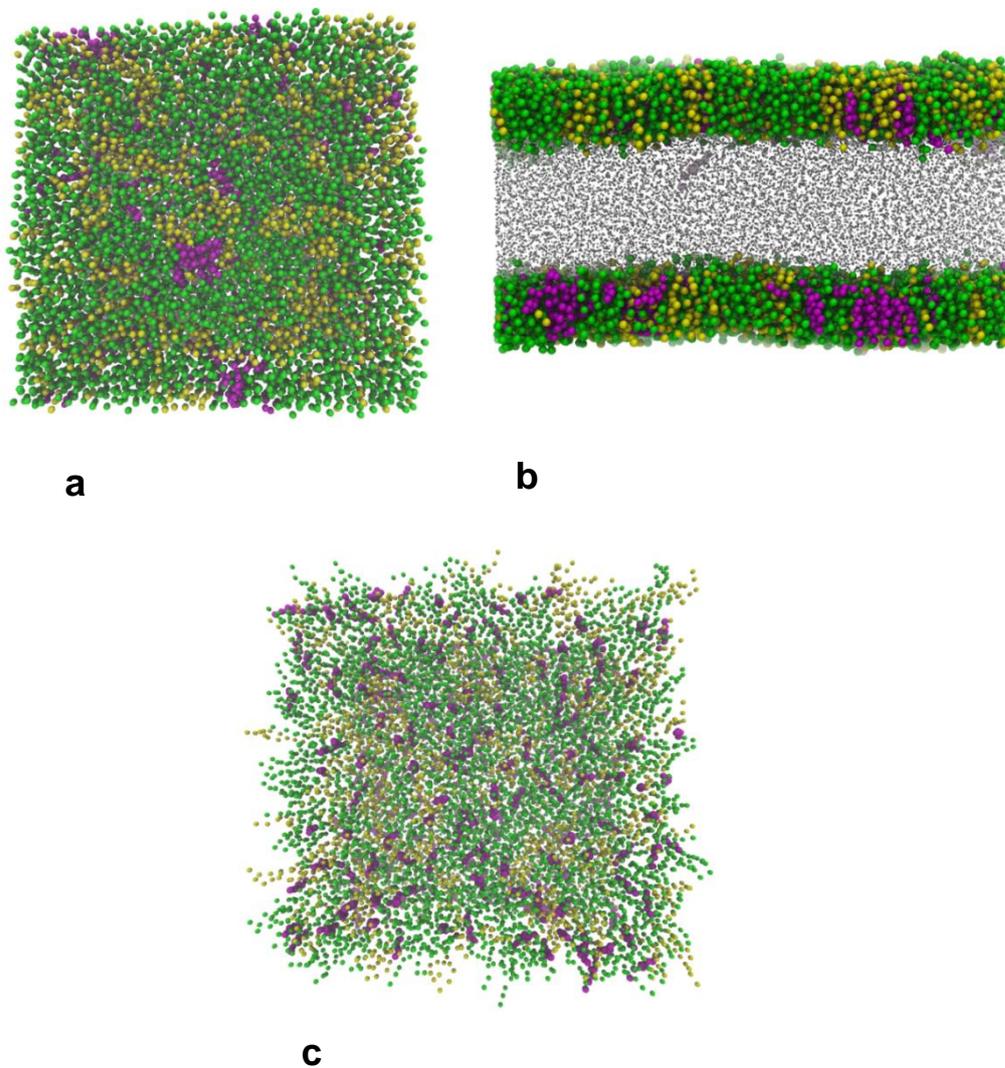


Ilustração 15 - Modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 20 mN m^{-1} a 310 K. Vista do plano xy depois de 10 ns de simulação (a), vista do plano xz depois de 10 ns de simulação (b) e vista do plano xy depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação (c).

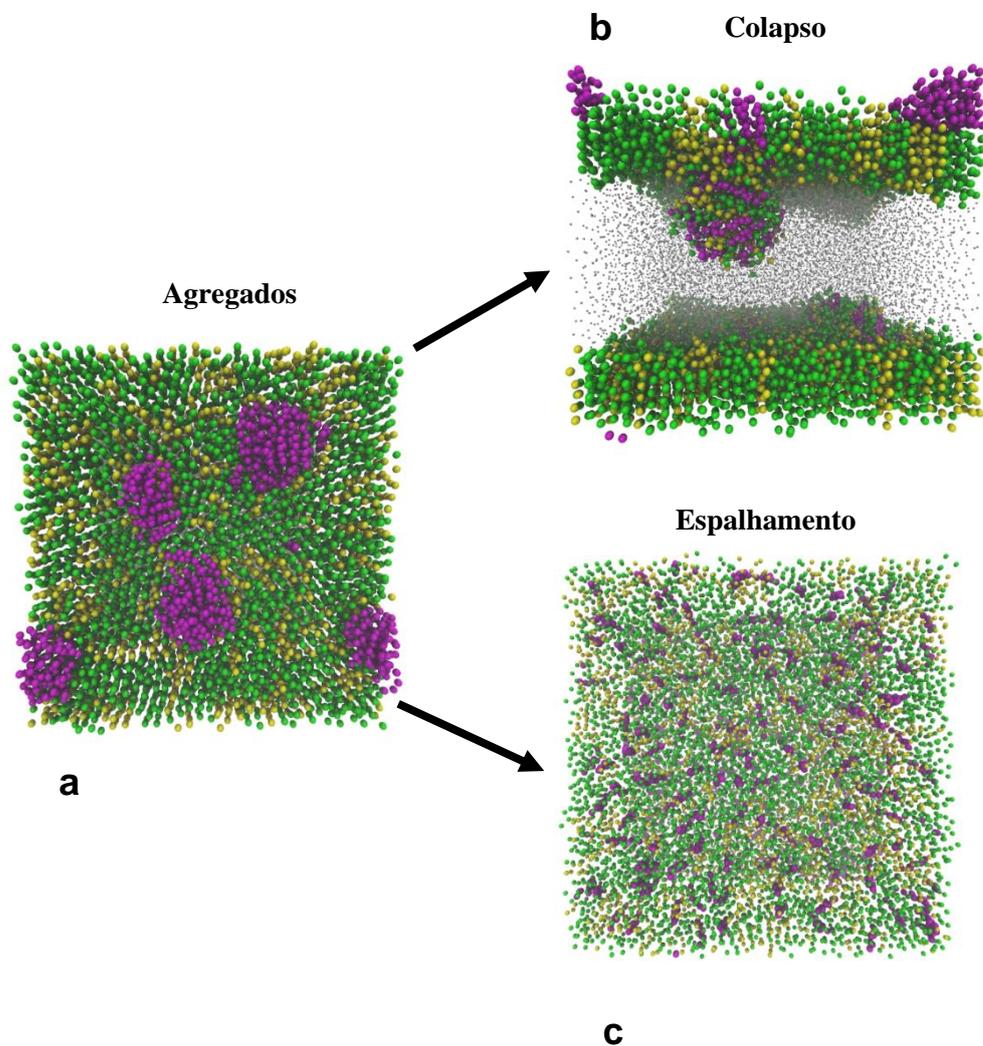


Ilustração 16 - Vista do plano xy do modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} depois de 10 ns de simulação (a), vista de um colapso induzido do plano xz do modelo de surfactante pulmonar com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} (b) e vista do espalhamento no plano xy com 10% de prednisolona em uma tensão superficial de 0 mN m^{-1} depois de 500 ns de simulação (c).

5.3.6. Análise de fases

Como já foi descrito no capítulo da fundamentação teórica, a coexistência de fases é um fenômeno que acontece na mecânica do surfactante pulmonar. Na ilustração 17 é mostrado o modelo de surfactante pulmonar com 0,1% de prednisolona. A prednisolona (1 molécula) foi tirada das imagens porque não influencia no resultado da segregação do DPPC e POPC. A ilustração 17a mostra o filme construído inicialmente depois da minimização de energia. Na tensão superficial de 10 mN m^{-1} e depois de $4 \mu\text{s}$ de dinâmica molecular (ilustração 17b), o filme mostra o início da formação de ilhas de DPPC e POPC. Ao diminuir a tensão superficial para 0 mN m^{-1} (ilustração 17c) as ilhas tornam-se maiores. Como foi relatado na seção da área por lipídio e no parâmetro de ordem o filme na ilustração 17b encontra-se na fase de L_E-L_C e na ilustração 17c na fase de L_C .

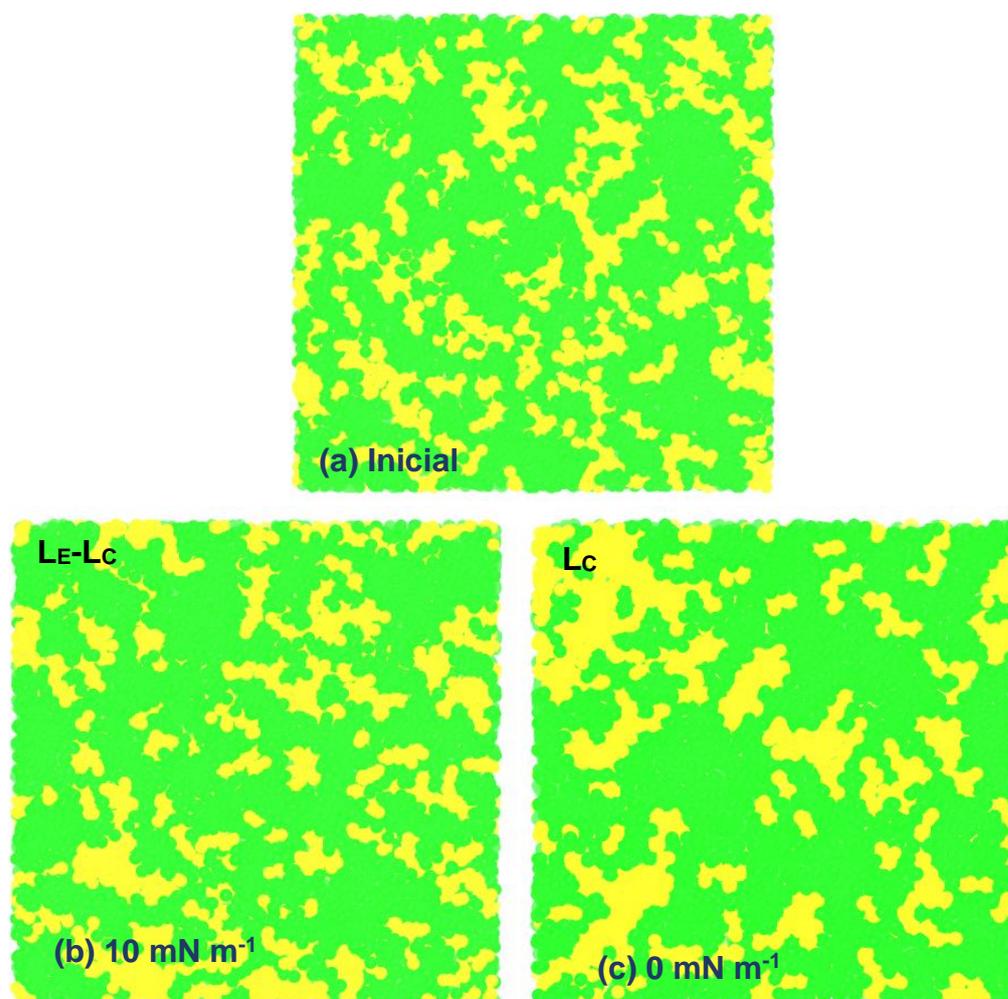


Ilustração 17 - Vista do plano xy da monocamada mista de DPPC/POPC em $0 \mu\text{s}$ (a), $4 \mu\text{s}$ tensão superficial de 10 mN m^{-1} (b) e $4 \mu\text{s}$ tensão superficial de 0 mN m^{-1} (c) a 310 K .

5.3.7. Função de distribuição radial

A função de distribuição radial é o método mais usual para tirar informação da estrutura de fluidos. A função de distribuição radial descreve a probabilidade de encontrar uma partícula B a uma distância r e $r+dr$ de uma partícula A. Para sistemas semi-isotrópicos, como é o caso de mono e bicamadas, a distribuição radial fica limitada a uma dimensão 2D (plano xy):

$$RDF_{xy}(r) = \left\langle \left(\frac{N_B(r)}{A_B(r)} \right) \right\rangle / \left\langle \left(\frac{N_B}{A_B} \right)_{total} \right\rangle \quad (42),$$

onde os colchetes indicam uma média ao longo do tempo, $N_B(r)$ é o número de partículas de B a um raio r e espessura dr ao redor da partícula A. $A_B(r)$ é a área do anel formado pelos raios r e dr . N_B corresponde ao total de partículas B até um raio máximo e A_B corresponde a área formada até esse raio máximo. No GROMACS o raio máximo é a metade do comprimento da caixa.

Na ilustração 18 é mostrada a separação de fases do DPPC, do POPC e de 10% de prednisolona na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . No gráfico de distribuição radial do DPPC, do POPC e da prednisolona com respeito ao DPPC como grupo de referência (figura 12), mostra-se que a prednisolona prefere ficar mais perto do DPPC do que do POPC. Resultados similares foram relatados por Baoukina para uma mistura de DPPC/DOPC/colesterol, onde o colesterol prefere ficar na mesma fase de fosfolípidios saturados como DPPC e segregar o fosfolípido insaturado (Baoukina, Mendez-Villuendas, *et al.*, 2012).

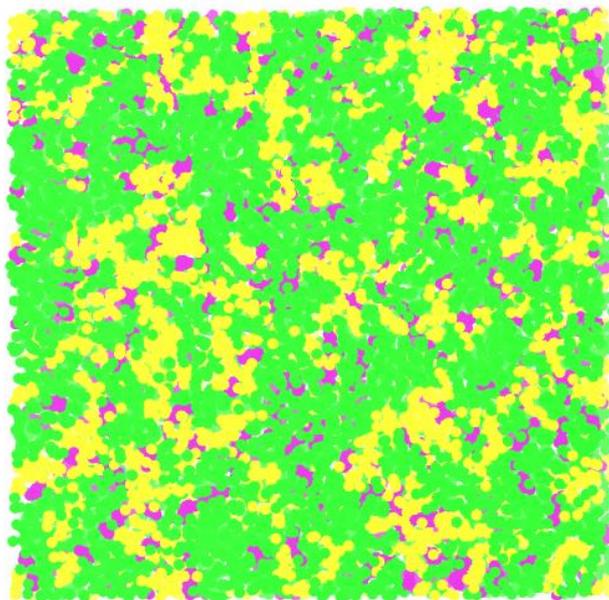


Ilustração 18 - Vista xy da mistura fosfolipídica do DPPC/POPC (verde/amarelo) com 10 % de prednisolona (roxo) e tensão superficial de 20 mN m^{-1} depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação a 310 K.

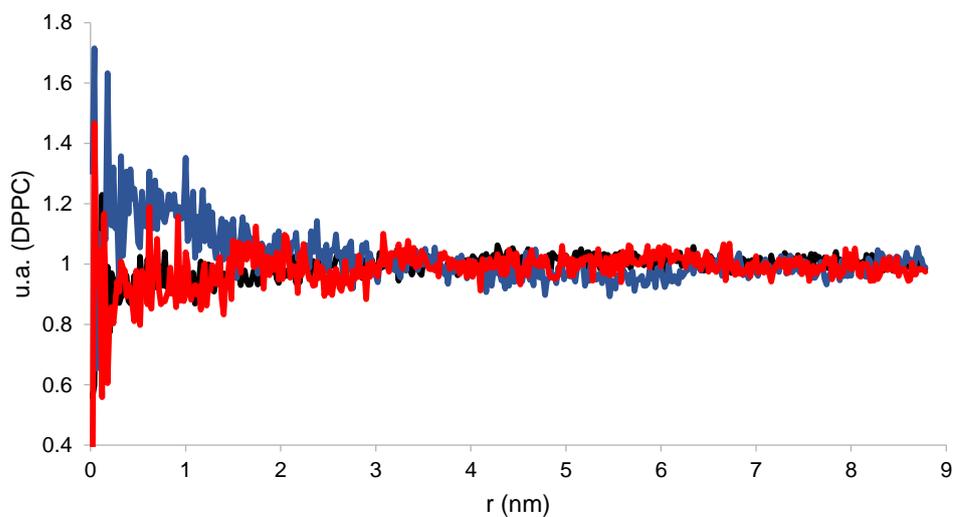


Figura 12 - Distribuição radial no plano xy do DPPC (preto), do POPC (azul) e da prednisolona (vermelho) com respeito ao DPPC na tensão superficial de 20 mN m^{-1} depois de $2 \mu\text{s}$ de simulação a 310 K.

6 Conclusões

A dinâmica molecular com modelos *coarse grained* e campo de força MARTINI do modelo de surfactante pulmonar DPPC/POPC (7:3) em presença de três diferentes frações mássicas (0,1%; 1% e 10%) do glicocorticoide prednisolona e em uma temperatura de 310 K foi realizada com sucesso pela primeira vez. Importantes conclusões da estabilidade, da organização, e da similaridade com outros esteroides foram elucidadas na escala de microssegundos.

Os cálculos do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água foi superestimado em 2 vezes o valor experimental. Considerando as dificuldades para cálculos de energia livre pelo cálculo da entropia e comparando com outros modelos *coarse grained* para estruturas similares, considera-se que o modelo *coarse grained* proposto para prednisolona pode ser utilizado para avaliar sua interação com modelos de surfactante pulmonar. O cálculo da difusão lateral dos fosfolipídios e da prednisolona estão em acordo com resultados experimentais assim como com outras simulações atômicas e *coarse grained*. A prednisolona mostrou uma difusão similar ao colesterol quando comparada com resultados experimentais e modelos *coarse grained*.

Com as evidências encontradas na dinâmica molecular é possível inferir que o uso de surfactante pulmonar como um possível carreador de prednisolona está sujeito à sua concentração e à sua tensão superficial do mecanismo respiratório. Propriedades estruturais que medem a organização mostram que o modelo de surfactante pulmonar aumenta sua organização ao diminuir sua tensão superficial. Em todas as frações em massa e tensões superficiais estudadas mostra-se que a parte mais polar da prednisolona fica perto das cabeças polares dos fosfolipídios do que nas suas caudas hidrocarbônicas. A adição de frações elevadas de prednisolona ($\approx 10\%$) também aumenta a organização da monocamada fosfolipídica. No entanto, frações mássicas menores ($\leq 10\%$) não apresentam mudança nas propriedades estruturais e dinâmicas do modelo de surfactante pulmonar. Esta pouca mudança das propriedades estruturais e dinâmicas do modelo de surfactante pulmonar é um indicio que frações mássicas $\leq 10\%$ de prednisolona podem ser carreadas com o surfactante pulmonar sem mudar suas propriedades estruturais.

A formação de agregados em uma escala manométrica foi observada na fração mássica de 10% de prednisolona nas três tensões superficiais medidas (0, 10 e 20 mN m⁻¹) e na fração mássica de 1% na tensão superficial de 0 mN m⁻¹. Entretanto, o filme colapsa em bicamadas apenas na fração em massa de 10% e nas tensões mais baixas (0 e 10 mN m⁻¹). Em tensões superficiais maiores (20 mN m⁻¹) o filme é capaz de espalhar os nanoagregados de prednisolona mostrando um aumento da área por lipídio para tensões superficiais iguais. Isto apresentaria um aumento de pressão e, portanto, uma diminuição de tensão superficial. O que permite manter o filme estável em um tempo de escala de microssegundos.

A separação de fases de L_C e L_E também foi demonstrada satisfatoriamente para o modelo de surfactante pulmonar. Além disso, pode-se dizer que uma fração em massa de 10% de prednisolona pode induzir uma fase de líquido organizado (L_o) tendo como força motriz a preferência do fármaco de ficar perto do lipídio saturado e segregando o lipídio insaturado. Porém, pode-se concluir que a influência de esteróis com estrutura similares como o colesterol produz interações parecidas que são refletidas em propriedades como difusão lateral e preferência de fases.

As implicações deste trabalho estão orientadas para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos tratamentos para gerenciar doenças como a síndrome de angústia respiratória do recém-nascido, asma e doenças pulmonares obstrutivas crônicas.

Os resultados desta dissertação foram publicados recentemente no jornal *RSC Advances* (Estrada-Lopez *et al.*, 2017) e apresentados em formato pôster na 5ª Reunião sobre Estruturas de Auto-Organização em Soluções e Interfaces - AutoOrg 2016, Florianópolis, Brasil.

7 Perspectivas

Este trabalho possui várias perspectivas futuras. Pretende-se continuar dentro do grupo com as seguintes pesquisas sob a minha colaboração:

- 1) Pretende-se realizar a dinâmica molecular atomística dos antibióticos levofloxacina e claritromicina sendo adsorvidos em modelos de surfactante pulmonar. O trabalho referente a levofloxacina está sendo realizado pela aluna de iniciação científica Alline Pedreira. Além disso, o trabalho da claritromicina está sendo realizado por dois alunos de iniciação científica, Alline Pedreira e Matheus Franca.
- 2) Os resultados das simulações realizadas nesta dissertação serão diretamente comparáveis com os resultados experimentais que estão sendo realizados pela aluna de doutorado, Stephanie Ortiz Collazos, dentro de nosso grupo.
- 3) Pretende-se realizar no futuro a dinâmica molecular *coarse grained* de um modelo de surfactante pulmonar mais complexo com uma mistura mais completa de fosfolípidios com proteína SP-B. Este trabalho está sendo realizado pelos alunos Júlia Barroso, Lucas Pereira e Guilherme Espinosa para interagir com peptídeos antimicrobianos.
- 4) É importante melhorar os cálculos da metodologia de *umbrella sampling* para sistemas bifásicos. Este trabalho pode ser realizado no futuro por um aluno de doutorado.
- 5) Pretende-se desenvolver modelos *coarse grained* para a levofloxacina e para a claritromicina com o objetivo de simular tempos na escala de microssegundos. Este trabalho pode ser realizado no futuro por um aluno de doutorado.
- 6) É importante desenvolver um modelo polarizável de filme de Langmuir adsorvido em água para melhorar o cálculo da isoterma de Langmuir e das propriedades do filme.

8

Referências bibliográficas

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19-25, 9// 2015.
- ADALSTEINSSON, T.; YU, H. Lipid lateral diffusion in multi-bilayers, and in monolayers at the air/water and heptane/water interfaces. **Langmuir**, v. 16, n. 24, p. 9410-9413, Nov 2000.
- ADAMSON, A. W. **Physical Chemistry of Surfaces**, 6th ed. Wiley & Sons, New York, 1997.
- ANDERSEN, H. C. Molecular-dynamics simulations at constant pressure and-or temperature. **Journal of Chemical Physics**, v. 72, n. 4, p. 2384-2393, 1980.
- BANERJEE, R.; PUNIYANI, R. R. Exogenous surfactant therapy and mucus rheology in chronic obstructive airway diseases. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 14, n. 3, p. 243-272, Jan 2000.
- BAOUKINA, S.; MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P. Molecular Structure of Membrane Tethers. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 8, p. 1866-1871, Apr 2012.
- BAOUKINA, S.; MENDEZ-VILLUENDAS, E.; TIELEMAN, D. P. Molecular View of Phase Coexistence in Lipid Monolayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 42, p. 17543-17553, Oct 2012.
- BAOUKINA, S. et al. The molecular mechanism of monolayer-bilayer transformations of lung surfactant from molecular dynamics simulations. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 11, p. 3775-3782, Dec 2007.
- BAOUKINA, S.; MONTICELLI, L.; MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P. Pressure-area isotherm of a lipid monolayer from molecular dynamics simulations. **Langmuir**, v. 23, n. 25, p. 12617-12623, Dec 2007.
- BAOUKINA, S.; MONTICELLI, L.; RISSELADA, H. J.; MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P. The molecular mechanism of lipid monolayer collapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 10803-10808, Aug 2008.
- BAOUKINA, S.; ROZMANOV, D.; MENDEZ-VILLUENDAS, E.; TIELEMAN, D. P. The Mechanism of Collapse of Heterogeneous Lipid Monolayers. **Biophysical Journal**, v. 107, n. 5, p. 1136-1145, Sep 2014.
- BAOUKINA, S.; TIELEMAN, D. P. Computer simulations of lung surfactant. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2431-2440, 10// 2016.
- BARNES, P. J. Drug-therapy - inhaled glucocorticoids for asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 13, p. 868-875, Mar 1995.
- BARNOUD, J.; URBINI, L.; MONTICELLI, L. C-60 fullerene promotes lung monolayer collapse. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 12, n. 104, p. 6, Mar 2015.

BARON, R. et al. Comparison of atomic-level and coarse-grained models for liquid hydrocarbons from molecular dynamics configurational entropy estimates. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 16, p. 8464-8473, Apr 2006.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984 1984.

BEUTLER, T. C. et al. Avoiding singularities and numerical instabilities in free-energy calculations based on molecular simulations. **Chemical Physics Letters**, v. 222, n. 6, p. 529-539, Jun 1994.

BLANCO, O.; PEREZ-GIL, J. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: Role of the different components in an efficient pulmonary surfactant. **European Journal of Pharmacology**, v. 568, n. 1-3, p. 1-15, Jul 2007.

BLENCOWE, H. et al. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. **Reproductive Health**, v. 10, Nov 2013.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, Jan 2007.

CHIU, C. C. et al. Effects of spherical fullerene nanoparticles on a dipalmitoyl phosphatidylcholine lipid monolayer: a coarse grain molecular dynamics approach. **Soft Matter**, v. 8, n. 37, p. 9610-9616, 2012.

CHUNG, K. F.; CARAMORI, G.; ADCOCK, I. M. Inhaled corticosteroids as combination therapy with beta-adrenergic agonists in airways disease: present and future. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 9, p. 853-871, Sep 2009.

CLEMENTS, J. A. functions of alveolar lining. **American Review of Respiratory Disease**, v. 115, n. 6, p. 67-71, 1977.

COCHRANE, C. G. et al. The efficacy and safety of KL(4)-surfactant in infants with respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 153, n. 1, p. 404-410, Jan 1996.

CORNELL, W. D. et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules (vol 117, pg 5179, 1995). **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 9, p. 2309-2309, Mar 1996.

CRANE, J. M.; HALL, S. B. Rapid compression transforms interfacial monolayers of pulmonary surfactant. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 4, p. 1863-1872, Apr 2001.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. Edgard Blucher Ltda, 2012.

DAVIES, M. J. et al. A quantitative assessment of inhaled drug particle-pulmonary surfactant interaction by atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 73, n. 1, p. 97-102, Oct 2009.

DAVIS, P. J. et al. Gel to liquid-crystalline transition-temperatures of water dispersions of 2 pairs of positional isomers of unsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. **Biochemistry**, v. 20, n. 12, p. 3633-3636, 1981.

DE LA SERNA, J. B. et al. Compositional and structural characterization of monolayers and bilayers composed of native pulmonary surfactant from wild

- type mice. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2450-2459, Nov 2013.
- DE LA SERNA, J. B.; PEREZ-GIL, J.; SIMONSEN, A. C.; BAGATOLLI, L. A. Cholesterol rules - Direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40715-40722, Sep 2004.
- DEBOLT, S. E.; KOLLMAN, P. A. investigation of structure, dynamics, and solvation in 1-octanol and its water-saturated solution - molecular-dynamics and free-energy perturbation studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 19, p. 5316-5340, May 1995.
- DEN OTTER, W. K.; SHKULIPA, S. A. Intermonolayer friction and surface shear viscosity of lipid bilayer membranes. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 2, p. 423-433, Jul 2007.
- DISCHER, B. M. et al. Lateral phase separation in interfacial films of pulmonary surfactant. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 5, p. 2583-2590, Nov 1996.
- DUNCAN, S. L.; DALAL, I. S.; LARSON, R. G. Molecular dynamics simulation of phase transitions in model lung surfactant monolayers. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1808, n. 10, p. 2450-2465, Oct 2011.
- DUNCAN, S. L.; LARSON, R. G. Comparing experimental and simulated pressure-area isotherms for DPPC. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 8, p. 2965-2986, Apr 2008.
- EGBERTS, E.; MARRINK, S. J.; BERENDSEN, H. J. C. Molecular-dynamics simulation of a phospholipid membrane. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 22, n. 6, p. 423-436, Feb 1994.
- ESTRADA-LOPEZ, E. D. et al. Prednisolone adsorption on lung surfactant models: insights on the formation of nanoaggregates, monolayer collapse and prednisolone spreading. **Rsc Advances**, v. 7, n. 9, p. 5272-5281, 2017.
- FAHEY, P. F.; WEBB, W. W. Lateral diffusion in phospholipid bilayer membranes and multilamellar liquid-crystals. **Biochemistry**, v. 17, n. 15, p. 3046-3053, 1978.
- FERRENBURG, A. M.; SWENDSEN, R. H. New monte-carlo technique for studying phase-transitions. **Physical Review Letters**, v. 61, n. 23, p. 2635-2638, Dec 1988.
- FLEISHAKER, D. L. et al. Safety and pharmacodynamic dose response of short-term prednisone in healthy adult subjects: a dose ranging, randomized, placebo-controlled, crossover study. **Bmc Musculoskeletal Disorders**, v. 17, Jul 2016.
- FRITZ, D. et al. Multiscale modeling of soft matter: scaling of dynamics. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 22, p. 10412-10420, 2011.
- FUHRMANS, M. et al. Effects of bundling on the properties of the SPC water model. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 125, n. 3-6, p. 335-344, Mar 2010.
- FUJIWARA, T. et al. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. **Lancet**, v. 1, n. 8159, p. 55-59, 1980.

- GLISS, C. et al. Anisotropic motion of cholesterol in oriented DPPC bilayers studied by quasielastic neutron scattering: The liquid-ordered phase. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 1, p. 331-340, Jul 1999.
- GOERKE, J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1408, n. 2-3, p. 79-89, Nov 1998.
- GROMACS USER MANUAL, version 5.0.6** Development teams at the Royal Institute of Technology and Uppsala University, Sweden.
- HALLIDAY, H. L. Overview of clinical-trials comparing natural and synthetic surfactants. **Biology of the Neonate**, v. 67, p. 32-47, 1995.
- HALLIDAY, H. L. Surfactants: past, present and future. **Journal of Perinatology**, v. 28, p. S47-S56, May 2008.
- HALLMAN, M. Lung surfactant in respiratory-distress syndrome. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 35, p. 15-21, 1991.
- HANSCH, C.; LEO, A. **Exploring QSAR**. Washington: American Chemical Society, 1995
- HERTING, E. et al. Combined treatment with surfactant and specific immunoglobulin reduces bacterial proliferation in experimental neonatal group B streptococcal pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 6, p. 1862-1867, Jun 1999
- HOCKNEY, R. W.; GOEL, S. P.; EASTWOOD, J. W. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, v. 14, n. 2, p. 148-158, 1974 1974..
- HOOVER, W. G. Canonical dynamics - equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695-1697, 1985.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 14, n. 1, p. 33-38, Feb 1996.
- ITO, K.; CHUNG, K. F.; ADCOCK, I. M. Update on glucocorticoid action and resistance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 3, p. 522-543, Mar 2006.
- JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADORIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225-11236, Nov 1996.
- KATKIN, J. P. et al. Exogenous surfactant enhances the delivery of recombinant adenoviral vectors to the lung. **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 2, p. 171-176, Jan 1997.
- KLAUSTERMEYER, W. B.; CHOI, S. H. A perspective on systemic corticosteroid therapy in severe bronchial asthma in adults. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 37, n. 3, p. 192-198, May-Jun 2016.
- KUMAR, S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules .1. the method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1011-1021, Oct 1992.
- KUO, H. T. et al. A Follow-up Study of Preterm Infants Given Budesonide Using Surfactant as a Vehicle to Prevent Chronic Lung Disease in Preterm Infants. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 4, p. 537-541, Apr 2010.
- LAING, C.; BAOUKINA, S.; TIELEMAN, D. P. Molecular dynamics study of the effect of cholesterol on the properties of lipid monolayers at low surface

tensions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 12, p. 1916-1922, 2009.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications** 2nd ed. Pearse Education Limited, 2001.

LEWIS, J. F.; VELDHUIZEN, R. A. W. The future of surfactant therapy during ALI/ARDS. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 27, n. 4, p. 377-388, Aug 2006.

LIN, X. B. et al. Promote potential applications of nanoparticles as respiratory drug carrier: insights from molecular dynamics simulations. **Nanoscale**, v. 6, n. 5, p. 2759-2767, 2014.

LIU, D. R. et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy Asthma and Clinical Immunology**, v. 9, Aug 2013.

LIU, M. et al. Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea-pigs. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 26, n. 3, p. 270-275, Mar 1996. ISSN 0954-7894.

LOPEZ-RODRIGUEZ, E. et al. Meconium Impairs Pulmonary Surfactant by a Combined Action of Cholesterol and Bile Acids. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 3, p. 646-655, Feb 2011

LOPEZ-RODRIGUEZ, E.; PEREZ-GIL, J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1838, n. 6, p. 1568-1585, Jun 2014.

MACCALLUM, J. L.; TIELEMAN, D. P. Structures of neat and hydrated 1-octanol from computer simulations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 50, p. 15085-15093, Dec 2002.

MARRINK, S. J. et al. Cholesterol shows preference for the interior of polyunsaturated lipid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 1, p. 10+, Jan 2008.

MARRINK, S. J.; DE VRIES, A. H.; MARK, A. E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 2, p. 750-760, Jan 2004.

MARRINK, S. J. et al. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 27, p. 7812-7824, Jul 12 2007.

MCDONOUGH, A. K.; CURTIS, J. R.; SAAG, K. G. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 20, n. 2, p. 131-137, Mar 2008.

MEIROVITCH, H.; CHELUVARAJA, S.; WHITE, R. P. Methods for Calculating the Entropy and Free Energy and their Application to Problems Involving Protein Flexibility and Ligand Binding. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 3, p. 229-243, Jun 2009.

MELO, M. N.; INGOLFSSON, H. I.; MARRINK, S. J. Parameters for Martini sterols and hopanoids based on a virtual-site description. **Journal of Chemical Physics**, v. 143, n. 24, Dec 2015.

MEZEI, M. The finite-difference thermodynamic integration, tested on calculating the hydration free-energy difference between acetone and dimethylamine in water. **Journal of Chemical Physics**, v. 86, n. 12, p. 7084-7088, Jun 1987.

MIKOLKA, P. et al. Budesonide Added to Modified Porcine Surfactant Curosurf May Additionally Improve the Lung Functions in Meconium Aspiration Syndrome. **Physiological Research**, v. 62, p. S191-S200, 2013.

NAG, K. et al. Epifluorescence microscopic observation of monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine - dependence of domain size on compression rates. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1068, n. 2, p. 157-160, Sep 1991.

NAG, K.; PEREZ-GIL, J.; RUANO, M. L. F.; WORTHMAN, L. A. D.; STEWART, J.; CASALS, C.; KEOUGH, K. M. W. Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 6, p. 2983-2995, Jun 1998.

NISOH, N. et al. Lipid monolayer disruption caused by aggregated carbon nanoparticles. **Rsc Advances**, v. 5, n. 15, p. 11676-11685, 2015.

NOSE, S. A molecular-dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 52, n. 2, p. 255-268, 1984.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656-1676, Oct 2004.

PALMER, D.; SCHURCH, S.; BELIK, J. Effect of budesonide and salbutamol on surfactant properties. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 3, p. 884-890, Sep 2000.

PARRA, E.; PEREZ-GIL, J. Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 185, p. 153-175, Jan 2015.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single-crystals - a new molecular-dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182-7190, 1981.

PEREZ-GIL, J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid-protein interactions. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1778, n. 7-8, p. 1676-1695, Jul-Aug 2008.

PEREZ-GIL, J.; KEOUGH, K. M. W. Interfacial properties of surfactant proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1408, n. 2-3, p. 203-217, Nov 1998.

PEREZ-GIL, J.; WEAVER, T. E. Pulmonary Surfactant Pathophysiology: Current Models and Open Questions. **Physiology**, v. 25, n. 3, p. 132-141, Jun 2010.

PIKNOVA, B. et al. Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 4, p. 2172-2180, Oct 2001.

POLIN, R. A.; CARLO, W. A.; COMM FETUS, N. Surfactant Replacement Therapy for Preterm and Term Neonates With Respiratory Distress. **Pediatrics**, v. 133, n. 1, p. 156-163, Jan 2014.

POSSMAYER, F. et al. Recent advances in alveolar biology: Some new looks at the alveolar interface. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, p. S55-S64, Aug 2010.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, Oct 2005.

ROSS, M. et al. Kinetics of phospholipid insertion into monolayers containing the lung surfactant proteins SP-B or SP-C. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 31, n. 1, p. 52-61, Mar 2002.

ROUX, B. The calculation of the potential of mean force using computer-simulations. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1-3, p. 275-282, Sep 1995.

SASSI, P. et al. Water/alcohol mixtures: A spectroscopic study of the water-saturated 1-octanol solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 50, p. 19557-19565, Dec 2004.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23-43, Oct 2002a.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23-43, Oct 2002b.

SCHEIDT, H. A.; HUSTER, D.; GAWRISCH, K. Diffusion of cholesterol and its precursors in lipid membranes studied by H-1 pulsed field gradient magic angle spinning NMR. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 4, p. 2504-2512, Oct 2005.

SCHURCH, S. et al. The surface-associated surfactant reservoir in the alveolar lining. **Biology of the Neonate**, v. 67, p. 61-76, 1995.

SEEHASE, M. et al. New Surfactant with SP-B and C Analogs Gives Survival Benefit after Inactivation in Preterm Lambs. **Plos One**, v. 7, n. 10, Oct 2012.

SEGERER, H. et al. Surfactant substitution in ventilated very-low-birth-weight infants - factors related to response types. **Pediatric Research**, v. 30, n. 6, p. 591-596, Dec 1991.

SHELLEY, S. A. et al. Biochemical-composition of adult human-lung surfactant. **Lung**, v. 160, n. 4, p. 195-206, 1982.

SPRAGG, R. G. et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 11, p. 1562-1566, Jun 2003.

SUWABE, A. et al. Pulmonary surfactant secretion is regulated by the physical state of extracellular phosphatidylcholine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 28, p. 19884-19890, Oct 1992.

TETKO, I. V.; BRUNEAU, P. Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 12, p. 3103-3110, Dec 2004.

TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Monte-carlo free-energy estimates using non-boltzmann sampling - application to subcritical lennard-jones fluid. **Chemical Physics Letters**, v. 28, n. 4, p. 578-581, 1974.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. A Leap-frog algorithm for stochastic dynamics. **Molecular Simulation**, v. 1, n. 3, p. 173-185, 1988.

- VAN'T VEEN, A. et al. Lung clearance of intratracheally instilled Tc-99m-tobramycin using pulmonary surfactant as vehicle. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 5, p. 1091-1096, Mar 1999.
- VANTVEEN, A. et al. Pulmonary surfactant as vehicle for intratracheally instilled tobramycin in mice infected with *Klebsiella pneumoniae*. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 6, p. 1145-1148, Nov 1996.
- VERLET, L. Computer experiments on classical fluids .i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98-+, 1967.
- WALTERS, R. W.; JENQ, R. R.; HALL, S. B. Distinct steps in the adsorption of pulmonary surfactant to an air-liquid interface. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 1, p. 257-266, Jan 2000.
- WALTHER, F. J.; DAVIDCU, R.; LOPEZ, S. L. Antioxidant surfactant liposomes mitigate hyperoxic lung injury in premature rabbits. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 269, n. 5, p. L613-L617, Nov 1995.
- WANG, Y. E. et al. Biophysical interaction between corticosteroids and natural surfactant preparation: implications for pulmonary drug delivery using surfactant as a carrier. **Soft Matter**, v. 8, n. 2, p. 504-511, 2012.
- WASSENAAR, T. A. et al. Computational Lipidomics with insane: A Versatile Tool for Generating Custom Membranes for Molecular Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 5, p. 2144-2155, May 2015.
- WATKINS, J. C. The surface properties of pure phospholipids in relation to those of lung extracts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 152, n. 2, p. 293-306, 1968/03/04 1968.
- WERT, S. E.; WHITSETT, J. A.; NOGEE, L. M. Genetic Disorders of Surfactant Dysfunction. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 12, n. 4, p. 253-274, Jul-Aug 2009.
- WORTHMAN, L. A. D. et al. Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy. **Biophysical Journal**, v. 72, n. 6, p. 2569-2580, Jun 1997.
- YAN, W. F. et al. The melting of pulmonary surfactant monolayers. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 5, p. 1739-1745, May 2007.
- YU, S. H.; POSSMAYER, F. Lipid compositional analysis of pulmonary surfactant monolayers and monolayer-associated reservoirs. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 3, p. 621-629, Mar 2003.
- YUE, T. T. et al. Molecular modeling of interaction between lipid monolayer and graphene nanosheets: implications for pulmonary nanotoxicity and pulmonary drug delivery. **Rsc Advances**, v. 5, n. 38, p. 30092-30106, 2015.
- ZHANG, H. et al. Differential effects of cholesterol and budesonide on biophysical properties of clinical surfactant. **Pediatric Research**, v. 71, n. 4, p. 316-323, Apr 2012.
- ZUO, Y. Y. et al. Atomic force microscopy studies of functional and dysfunctional pulmonary surfactant films. I. Micro- and nanostructures of functional pulmonary surfactant films and the effect of SP-A. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 9, p. 3549-3564, May 2008.

ZUO, Y. Y. et al. Current perspectives in pulmonary surfactant - Inhibition, enhancement and evaluation. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 1947-1977, Oct 2008.