



Francesca Fornasier

**Nanopartículas de ouro revestidas com
polímeros e nanopartículas poliméricas como
nanocarreadoras do peptídeo antimicrobiano
BP-100 através de 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 do Departamento de Química da
PUC-Rio.

Orientador: Prof. André Silva Pimentel

Coorientador: Dr. Felipe Rodrigues de Souza

Rio de Janeiro
Março de 2020



Francesca Fornasier

**Nanopartículas de ouro revestidas com
polímeros e nanopartículas poliméricas como
nanocarreadoras do peptídeo antimicrobiano
BP-100 através de um modelo de surfactante
pulmonar**

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

Prof. André Silva Pimentel

Orientador

Departamento de Química – PUC-Rio

Dr. Felipe Rodrigues de Souza

Coorientador

Departamento de Química – IME

Prof. Welles Antonio Martinez Morgado

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Luciano Tavares da Costa

Departamento de Físico – Química – UFF

Prof. Alexandre Braga da Rocha

Departamento de Físico – Química – UFRJ

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

Francesca Fornasier

Graduou-se em Química pela Universidade de Santa Cruz do Sul – Rio Grande do Sul em 2017. Atua na área de Físico Química, interação de fármacos em sistemas biológicos.

Ficha Catalográfica

Fornasier, Francesca

Nanopartículas de ouro revestidas com polímeros e nanopartículas poliméricas como nanocarreadora do peptídeo antimicrobiano BP-100 através de um modelo de surfactante pulmonar / Francesca Fornasier ; orientador: André Silva Pimentel ; coorientador: Felipe Rodrigues de Souza. – 2020.

128 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2020.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Nanopartículas. 3. Pulmão. 4. Entrega de Fármacos. 5. Pneumonia. I. Pimentel, André Silva. II. Souza, Felipe Rodrigues de. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Dedico esta dissertação à minha mãe, uma pessoa guerreira que é minha fonte de
inspiração diária para lidar com essa caixinha de surpresas que é a vida.
Ao meu pai, que nunca mediu esforços para me ajudar.
À minha irmã, meu orgulho.
A todos os mestres que já passaram pela minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e aos Orixás por toda força, por todas as conquistas, por todo crescimento pessoal e profissional.

À minha família por todo amor incondicional, por todo apoio e por entenderem minhas ausências neste período de grande crescimento. Amo vocês!

Ao meu orientador professor André Silva Pimentel por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho, por todos os ensinamentos e por todas as oportunidades que tive nestes 2 anos de mestrado.

Ao meu coorientador Felipe Rodrigues de Souza por todo ensinamento, pela paciência, pelos “cocões”, pelos conselhos, por me ajudar a controlar a minha ansiedade e principalmente por todo apoio nesses 2 anos.

Ao meu colega de laboratório Lucas Miguel Pereira de Souza por todo apoio, ajuda e troca de conhecimento.

À PUC – Rio por ter me acolhido e por todas as oportunidades que pude vivenciar nessa universidade tão querida por todos.

Ao Departamento de Química da PUC – Rio, a todos os professores e funcionários, em especial à Fátima e à Marlene por todo o apoio e pela amizade.

Ao CNPq, FAPERJ, INCT-FCx e PUC-Rio pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Fluidos Complexos da PUC – Rio, em especial às minhas colegas Beatriz, Mariana e Adriana por toda ajuda nas simulações.

Aos meus tios Nilce e Edgard por terem disponibilizado a sua residência para que fosse a minha também nesses 2 anos.

Às minhas primas Bruna e Lívia pela parceria e apoio enquanto estava me dedicando neste trabalho.

Aos meus amigos e amigas do programa de Pós Graduação em Química da PUC – Rio, vocês foram essenciais para a minha formação, muito obrigada por entrarem na minha vida e tornarem esse período mais leve e mais divertido. Agradeço também à Bianca pela amizade e ao Vinicius pelos conselhos e por ter me ajudado a enxergar o quão merecedora disso tudo eu sou.

Às gurias que me acolheram tão bem na PUC, Luana, Jesana e Carol, muito obrigada por todo apoio de sempre. Agradeço mais uma vez à Luana por ter me apresentado à PUC – Rio.

Aos meus amigos e amigas do Rotaract Club Corcovado, vocês são incríveis! Muito obrigada por me apresentarem o Sabeduca, por me permitirem estar com vocês e realizar tanto projeto voluntário lindo.

Aos meus amigos e amigas que conquistei nesse período, muito obrigada por todo apoio.

A essa cidade maravilhosa que tem o meu coração e que me acolheu tão bem. O Rio de Janeiro sempre foi e continua lindo!

Aos meus amigos do Sul, em especial à Bruna, que sempre me apoiaram e entenderam a minha ausência, tu mora no meu coração amiga.

À minha segunda família, minha sogra Iranir, Danilo, vó Odalea e em especial ao meu namorado Luiz Fernando por todo apoio, por toda motivação, por toda força, amo vocês!

À minha psicóloga Paula, por me ajudar a encarar os momentos de tensão e ansiedade e, mostrar que não estou sozinha.

À minha orientadora de iniciação científica Rosana de Cássia de Souza Schneider por todos os ensinamentos e pelo apoio que me deu quando decidi realizar o mestrado em outra universidade e estado.

À banca, professores Welles, Luciano e Alexandre, por terem aceitado o convite para contribuir com este trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de certa forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigada de coração!

Resumo

Fornasier, Francesca; Pimentel, André Silva, Souza, Felipe Rodrigues de. **Nanopartículas de ouro revestidas com polímeros e nanopartículas poliméricas como nanocarreadoras do peptídeo antimicrobiano BP-100 através de um modelo de surfactante pulmonar.** Rio de Janeiro, 2020. 128p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A pneumonia é causada por microrganismos que se instalam nos pulmões, podendo chegar aos alvéolos pulmonares e ocasionar insuficiências respiratórias. Tratamentos com antibióticos são os mais utilizados. Porém, o uso dos mesmos pode não ser eficiente por causa de mecanismos de resistência bacteriana. O peptídeo antimicrobiano BP-100 é um promissor candidato a novo antibiótico devido sua baixa suscetibilidade à resistência bacteriana. Ele pode ser mais eficaz quando utilizado com nanopartículas de ouro (AuNPs) e revestimentos de polímeros biodegradáveis para uso tópico. O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio da dinâmica molecular *coarse grained* (DM-CG), utilizando o campo de força MARTINI, o efeito da transposição do peptídeo BP-100, carregado em uma nanopartícula de ouro revestida com três tipos de polímeros, através de um modelo de surfactante pulmonar. Os polímeros selecionados para este trabalho foram o polietilenoglicol (PEG), poliestireno (PS) e o copolímero de polietilenoglicol em bloco com poliestireno (PEG-b-PS). As energias livres de Gibbs das transposições das nanopartículas foram realizadas utilizando simulações direcionadas e amostragem guarda-chuva. Os resultados obtidos demonstraram que o processo foi espontâneo para a nanopartícula de ouro contendo o BP-100 adsorvido em sua superfície e encapsulada com o PEG. No entanto, observou-se que a nanopartícula BP100-PEG se desfaz ao atingir a fase aquosa, e o BP-100 migra para a região das cabeças polares dos fosfolipídios carregados negativamente. Com a realização deste trabalho, foi possível avaliar os efeitos de nanocarreadores no modelo de surfactante pulmonar, bem como avaliar a viabilidade da aplicação de peptídeos antimicrobianos para possíveis tratamentos de doenças pulmonares, como a pneumonia.

Palavras-chave

Nanopartículas; pulmão; entrega de fármacos; pneumonia.

Abstract

Fornasier, Francesca; Pimentel, André Silva, Souza, Felipe Rodrigues de. **Polymer-coated gold nanoparticles and polymeric nanoparticles as nanocarriers of the BP-100 antimicrobial peptide through a lung surfactant model.** Rio de Janeiro, 2020. 128. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Pneumonia is caused by microorganisms that settle in the lungs, which may reach the pulmonary alveoli and cause respiratory failure. Antibiotic treatments are the most used. However, their use may not be efficient due to bacterial resistance. The antimicrobial peptide BP-100 is a promising candidate for a new antibiotic due to its low susceptibility to bacterial resistance. It can be most effective when used with gold nanoparticles (AuNPs) and polymer coatings for topical use. The goal of this work was to evaluate the effect of the transposition of the BP-100 peptide carried on a gold nanoparticle coated with three types of polymers (polyethylene glycol (PEG), polystyrene (PS) and polyethylene glycol-block-polystyrene (PEG-b-PS)) using a pulmonary surfactant model. The Gibbs free energies for nanoparticle transpositions are performed using coarse grained molecular dynamics (CGMD) and umbrella sampling. The results demonstrate that the process is spontaneous for the gold nanoparticle containing BP-100 adsorbed on the AuNPs encapsulated with PEG. However, it is observed that the BP100-PEG nanoparticle breaks up when reaching the aqueous phase. Then, BP-100 migrates to the polar heads region of the negatively charged phospholipids. It is possible to evaluate the effects of nanocarriers on the lung surfactant model. In addition, it is suggested the feasibility of applying antimicrobial peptides carried on PEG capped AuNPs for possible treatments of lung diseases, such as pneumonia.

Keywords

Nanoparticles; lung; drug delivery; pneumonia.

Sumário

1 Introdução	19
2 Objetivos	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 Revisão Bibliográfica	25
3.1 Surfactante Pulmonar	25
3.2 Surfactantes Exógenos	32
3.3 Doenças Pulmonares	33
3.3.1 Pneumonia	34
3.4 Tratamentos	35
3.4.1 Tratamento Convencional	35
3.4.2 Tratamentos Alternativos	36
3.5 Peptídios Antimicrobianos	37
3.5.1 BP-100	38
3.6 Carreamento de Fármacos	40
3.6.1 Nanopartículas	41
3.6.2 Revestimentos	45
3.7 Simulação Molecular	47
3.7.1 Dinâmica Molecular Clássica	48
3.7.2 Ensembles	49
3.7.3 Campos de Força	49
3.7.4 Cálculo do Potencial	51
3.7.4.1 Comprimento de Ligação	52
3.7.4.2 Ângulo de Ligação	52
3.7.4.3 Torção de Ligação	53
3.7.4.4 Potencial de van der Waals	53
3.7.4.5 Potencial Eletrostático ou de Coulomb	54
3.7.5 Algoritmos na dinâmica molecular	54
3.7.5.1 Algoritmo de minimização de energia	54
3.7.5.2 Algoritmo de Verlet	55
3.7.5.3 Algoritmo Leap-Frog	56

3.7.6 Condições Periódicas de Contorno	57
3.7.7 Termostatos	57
3.7.7.1 Termostato Berendsen	57
3.7.7.2 Termostato Nosé-Hoover	58
3.7.7.3 Termostato de reescalonamento da velocidade	58
3.7.8 Barostatos	59
3.7.8.1 Barostato de Berendsen	59
3.7.8.2 Barostato Parrinello–Rahman	60
3.7.9 Acoplamento de Tensão Superficial	60
3.7.10 Soma de Ewald (PME)	61
3.7.11 LINCS	62
3.7.12 Amostragem guarda-chuva	63
3.7.13 Método da análise do histograma ponderado (WHAM)	64
3.7.14 GROMACS	65
4 Metodologia	66
4.1 Modelo coarse grained do BP-100	66
4.2 Preparação da AuNP com o BP-100	67
4.3 Simulação de transposição das nanopartículas no modelo de surfactante pulmonar	69
4.4 Método de amostragem guarda-chuva (Umbrella Sampling)	71
4.5 Análises	72
4.5.1 Área por lipídio	72
4.5.2 Difusão Lateral	73
4.5.3 Parâmetro de Ordem	73
4.5.4 Função de Distribuição Radial	74
4.5.5 Perfil Z	74
5 Resultados e Discussões	75
5.1 Composição dos sistemas	76
5.2 Sistema BP100-PEG	77
5.3 Sistema AuNP-BP100	81
5.4 Sistema AuNP	83
5.5 Sistema AuNP-PEG	84
5.6 Sistema AuNP-BP100-PEG	86
5.7 Perfis energéticos e estabilidade dos filmes dos sistemas AuNP-PEG e AuNP-PEG-BP100	88
5.7.1 Método de amostragem guarda-chuva	88

5.7.1 Área por Lipídio	90
5.7.2 Difusão Lateral	93
5.7.3 Parâmetro de Ordem	96
5.8.1 Sistema Au(C3)NP-BP100-PEG	98
5.8.2 Sistema Au(C1)NP-BP100-PEG	99
5.8.3 Método de amostragem guarda-chuva	101
5.9 Polietilenoglicol com terminação tiol	102
5.9.1 Método de amostragem guarda-chuva	104
5.10 Efeito da hidrofobicidade dos revestimentos	106
5.10.1 Sistema AuNP-BP100-PEG-b-PS	106
5.10.2 Sistema AuNP-BP100-PS	107
6 Conclusões	109
7 Implicações	112
8 Perspectivas para o trabalho	112
9 Referências Bibliográficas	113
10 Apêndices	125
Apêndices A	125
Apêndices B	126
Apêndices C	127
Apêndices D	128

Lista de Figuras

Figura 1. Representação gráfica do surfactante pulmonar na interface ar-água e na fase aquosa, com as respectivas proteínas, adaptado de Guagliardo e colaboradores (2018).	26
Figura 2. Representação de uma isoterma de Langmuir do DPPC, onde as fases da organização do filme de DPPC são apresentadas com o aumento da pressão de superfície, adaptada de González e colaboradores (2015).	31
Figura 3. Isotermas de transições de fases de diferentes tipos de surfactantes pulmonares exógenos e de diferentes composições de lipídios, adaptada de Zhang e colaboradores (2011).	31
Figura 4. Estrutura química do BP-100, adaptada de Carretero e colaboradores (2018).	39
Figura 5. Estrutura alfa-hélice α -BP-100, adaptada de Park e colaboradores (2019).	40
Figura 6. Representação do modelo do BP-100 atomístico do PDB e seu respectivo modelo <i>coarse grained</i> .	67
Figura 7. Representação dos polímeros utilizados como revestimentos: PEG, PEG-b-PS e PS.	68
Figura 8. Representação do modelo de surfactante pulmonar com a proteína SP-B.	76
Figura 9. Representação do sistema BP100-PEG durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF [®] , a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	78
Figura 10. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula BP100-PEG através do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF [®] , durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	79
Figura 11. Gráfico da função de distribuição radial entre o BP-100 e os fosfolipídios que compõem a monocamada do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF, a 310 K e tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	79
Figura 12. Representação do sistema BP100-PEG durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF [®] , a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	80
Figura 13. Representação do sistema AuNP-BP100 durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF [®] , a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	82

Figura 14. Gráfico da função de distribuição radial entre os aminoácidos polares e apolares do BP-100 e as caudas dos fosfolipídios que compõem a monocamada do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF, a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 83

Figura 15. Representação do sistema AuNP durante a simulação de 500 ns da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®, a 310 K e na tensão de 20 mN m^{-1} . 84

Figura 16. Representação do sistema AuNP-PEG durante a simulação de $1 \mu\text{s}$ da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 86

Figura 17. Representação do sistema AuNP-BP100-PEG durante a simulação de $2 \mu\text{s}$ da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 87

Figura 18. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula AuNP-BP100 (A), durante $1 \mu\text{s}$ de simulação, AuNP (B), durante 500 ns de simulação, AuNP-PEG (C), durante $1 \mu\text{s}$ de simulação, e AuNP-BP100-PEG (D), durante $2 \mu\text{s}$ de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 87

Figura 19. A energia livre de Gibbs de transferência da nanopartícula AuNP-PEG (vermelho) e AuNP-BP100-PEG (azul) da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 89

Figura 20. Análise do histograma ponderado da sobreposição de janelas da amostragem guarda-chuva na coordenada da reação ξ para a transferência da nanopartícula AuNP-PEG (A) e AuNP-BP100-PEG (B) através do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF® a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 90

Figura 21. Área por lipídio calculada pelo método GridMAT-MD do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF® da transposição da nanopartícula AuNP-PEG (A) e AuNP-BP100-PEG (B) da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 93

Figura 22. Parâmetros de ordem dos fosfolipídios a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 97

Figura 23. Representação do sistema Au(C3)NP-BP100-PEG durante a simulação de $1 \mu\text{s}$ da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 99

Figura 24. Representação do sistema Au(C1)NP-BP100-PEG durante a simulação de $1 \mu\text{s}$ da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . 100

Figura 25. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula Au(C3)NP-BP100-PEG (A) e Au(C1)NP-BP100-PEG (B), durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	100
Figura 26. A energia livre de Gibbs de transferência da nanopartícula Au(C1, C3 e C5)NP-BP100-PEG da fase gasosa para a fase aquosa, a 310 K e tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	102
Figura 27. Representação do sistema AuNP-BP100-PEG(tiol) durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF [®] , a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	103
Figura 28. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula AuNP-BP100-PEG(tiol), durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	104
Figura 29. Gráfico da energia livre de Gibbs de transferência da nanopartícula AuNP-BP100-PEG (tiol) da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	105
Figura 30. Representação do sistema AuNP-BP100-PEG-b-PS durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF [®] , a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	107
Figura 31. Representação do sistema AuNP-BP100-PS durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF [®] , a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	108
Figura 32. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula AuNP-BP100-PEG-b-PS (A) e AuNP-BP100-PS (B) , durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m ⁻¹ .	108

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição de cada modelo de nanopartícula estudada	68
Tabela 2. Análise visual e a energia livre de Gibbs (ΔG) da transposição da nanopartícula da fase gasosa para a fase aquosa de cada sistema estudado.	75
Tabela 3. Área por lipídio calculada pelos métodos GridMAT-MD e suAVE do modelo de surfactante pulmonar após a nanopartícula ser transferida da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} .	92
Tabela 4. Coeficientes de difusão lateral (D) dos fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar (somente monocamada que foi permeada) a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} .	95
Tabela 5. Representação dos grãos das moléculas do PEG e PEG(tiol) a partir do itp original.	103

Lista de Siglas e Abreviaturas

AA - All-Atom

AuNP – Nanopartícula de Ouro

BP100 – Peptídio antimicrobiano

CG - Coarse Grained

DM - Dinâmica Molecular

DPPC – 1,2-dipalmitoil-rac-glicero-3-fosfocolina

DPPI - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo- (1'-mio-inositol) (sal de amônio)

DPPS - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sódio)

DPSM - N-palmitoil-D-eritro-esfososilfosforilcolina

LC – Líquido Condensado

LE – Líquido Expandido

LO – Líquido Ordenado

LPC – 1-palmitoil-d31-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

MARTINI – Campo de força coarse grained

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina

POPE - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

POPG - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol

SDR - Síndrome do Desconforto Respiratório

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SP-A – Proteína do Surfactante A

SP-B – Proteína do Surfactante B

SP-C – Proteína do Surfactante C

SP-D – Proteína do Surfactante D

UA - United-Atom

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza”
Marie Curie

Introdução

A pneumonia é uma doença pulmonar que atinge cerca de 450 milhões de pessoas em todo o mundo e é a causa de morte de aproximadamente 4 milhões de pacientes (BAER et al., 2019). É causada a partir da infecção de microrganismos (bactérias, vírus ou fungos) na região alveolar, onde ocorrem as trocas gasosas, acarretando acúmulo de líquidos nos pulmões e, conseqüentemente, insuficiências respiratórias (BAER et al., 2019; NAYAK et al., 2019). Na região dos alvéolos pulmonares, se encontra o surfactante pulmonar, uma mistura complexa de fosfolipídios, que tem a função de reduzir a tensão superficial dos mesmos, evitando seu colapso. Contém majoritariamente o fosfolipídio dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), que é produzido e secretado por células do tipo pneumócitos II, durante o desenvolvimento fetal. As propriedades do surfactante pulmonar permitem o rápido espalhamento de fármacos na interface alveolar (GUAGLIARDO et al., 2018).

A identificação do microrganismo causador da pneumonia é complexa. Em decorrência disso, os pacientes são tratados com antibióticos de amplo espectro, via administração oral ou sistêmica em altas doses (BAER et al., 2019; NAYAK et al., 2019). Alguns exemplos de fármacos, que são utilizados no tratamento da pneumonia, são os antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos (e.g. amoxicilina), que atuam inibindo a síntese da parede bacteriana, os macrolídios (e.g. eritromicina), os quais agem impossibilitando a síntese proteica da bactéria, e as quinolonas (e.g. levofloxacina), as quais agem inibindo a replicação do DNA (SILVER, 2011).

Embora os antibióticos contribuam muito para tratar doenças bacterianas e, conseqüentemente, diminuir os índices de mortalidade, as bactérias acabam desenvolvendo resistência na ação destes fármacos

(BAER et al., 2019; MANZINI et al., 2014). Diversos são os mecanismos de resistência bacteriana. Por exemplo, pode-se citar a destruição ou inativação do fármaco, impedindo que o mesmo consiga penetrar na superfície das células bacterianas. Além disso, as bactérias podem possuir rotas bioquímicas alternativas, promovendo o efluxo rápido do fármaco, fazendo com que ele seja ejetado para fora do organismo antes que possa se tornar ativo (SILVER, 2011).

Uma solução para minimizar o desenvolvimento da resistência bacteriana é propor novos antibióticos, como, por exemplo, os que são baseados em peptídios antimicrobianos (TORCATO et al., 2013). Os peptídios fazem parte do nosso sistema imune como antibióticos endógenos e agem inibindo o crescimento de patógenos causadores de infecções (CARRETERO et al., 2018). Além disso, possuem um amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e vírus (MANZINI et al., 2014; TORCATO et al., 2013). Eles agem permeabilizando as células dos microrganismos, cessando o seu crescimento. (TORCATO et al., 2013; WADHWANI et al., 2014).

Peptídios pequenos podem ser liberados no organismo sem que haja uma detecção imunológica, permitindo a liberação eficaz dessas moléculas no alvo de interesse (MAHMOODI; GHAVIDAST; AMIRMAHANI, 2016). Uma forma de carrear os peptídios para a região dos alvéolos pulmonares é a partir de agentes carreadores (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018). As nanopartículas de ouro estão sendo frequentemente exploradas como agentes, justamente pelas suas propriedades físicas e químicas (forma e área superficial) permitirem a aplicação biológica e desenvolvimento de novos tratamentos para inúmeras doenças, dentre elas as respiratórias (MAHMOODI; GHAVIDAST; AMIRMAHANI, 2016; RAMALINGAM, 2019). O tamanho também é uma das propriedades das nanopartículas de ouro que permitem o uso das mesmas como carreadoras. (MALIK; MUKHERJEE, 2018).

Porém, as nanopartículas de ouro são instáveis sem a presença de algo que possa revesti-las, como, por exemplo, moléculas orgânicas

carregadas (íon citrato), surfactantes e polímeros biodegradáveis (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018). Além disso, os peptídios também possuem fortes interações eletrostáticas com os fosfolipídios do surfactante pulmonar e essa interação pode reduzir a atividade do peptídio, por impedir sua ação no alvo, necessitando também de revestimentos que consigam reduzir essas interações (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019; SOUZA et al., 2018).

Com o intuito de aprimorar os efeitos e os mecanismos de ação dos peptídios naturais, peptídios híbridos estão sendo sintetizados. Por exemplo, o peptídio BP-100, que foi inicialmente projetado para o combate à patógenos vegetais (BADOSA et al., 2007). No entanto, o mesmo, apresentou outras atividades como facilitador no transporte intracelular e desenvolvimento da fusão de membranas (MANZINI et al., 2014; MISIEWICZ et al., 2015). A escolha do BP-100 para este estudo ocorreu devido o mesmo possuir essas propriedades essenciais para a atividade em membrana, além da ação antibiótica para possível aplicação em tratamento de doenças pulmonares, como a pneumonia.

Compreender o complexo mecanismo da função do surfactante pulmonar é um desafio. Isso acontece por causa de sua complexa estrutura e de suas rápidas transformações de monocamada para bicamada, que são difíceis de observar e requerem alta resolução temporal e espacial, para que seja possível estudar as propriedades do sistema. Uma forma de se atingir este objetivo é utilizar simulações computacionais que, ao combinar propriedades do sistema como composição e estrutura, podem complementar dados experimentais (BAOUKINA; TIELEMAN, 2016).

A dinâmica molecular (DM) permite obter informações da interação das nanopartículas em sistemas de membranas, fornecendo detalhes da energia das interações, da estrutura e da dinâmica de monocamadas e bicamadas lipídicas (BENNETT; TIELEMAN, 2013; KHONDKER; HUB; RHEINSTÄDTER, 2019). Portanto, a dinâmica molecular é uma ferramenta útil para investigar o comportamento dos sistemas complexos

compostos por misturas lipídicas, proteicas e de outros nanomateriais (ZHANG et al., 2015).

Além das informações supracitadas, os experimentos teóricos computacionais podem complementar e elucidar dados experimentais. As interações moleculares podem ser obtidas através das simulações de dinâmica molecular clássica, que utilizam campos de força que descrevem os componentes do sistema de estudo, como, por exemplo, os campos de força *All-Atom* (AA), *United-Atom* (UA) e *coarse grained* (CG) (BENNETT; TIELEMAN, 2013; LYUBARTSEV; RABINOVICH, 2016; MARRINK et al., 2007; MIGUEL; PERILLO; VILLARREAL, 2016; POURMOUSA; PASTOR, 2018).

Simulações com o campo de força MARTINI, que utilizam a metodologia CG, são capazes de demonstrar fenômenos de interesse no estudo das monocamadas. Por exemplo, o colapso e as transições de fases, uma vez que, com esse campo de força, os átomos pesados (C, O, N, P) são agrupados em forma de grãos. Com isso, é possível obter tempos maiores de simulação, permitindo a observação desses fenômenos (BAOUKINA; TIELEMAN, 2016; DUNCAN; DALAL; LARSON, 2011; MARRINK et al., 2007).

Ao simularmos a transposição de fármacos, peptídios e nanopartículas no modelo de surfactante pulmonar, podemos obter a energia livre de Gibbs através do método de amostragem guarda chuva (do termo em inglês *umbrella sampling*), obtendo janelas de simulações durante a coordenada de reação. Essas janelas podem ser combinadas através do método de análise de histograma ponderado (da tradução da expressão em inglês *Weighted Histogram Analysis Method*-WHAM). Em seguida, pode-se avaliar a espontaneidade do sistema em estudo e a precisão dos dados (KUMAR et al., 1992).

A pneumonia é uma doença que atinge muitas pessoas e acaba levando a óbito muitos pacientes. Este trabalho visa entender o mecanismo de transposição do peptídio BP-100 no modelo de surfactante pulmonar, como possível fármaco para o tratamento da pneumonia.

2 Objetivos

2.1

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi obter informação da variação da energia livre de Gibbs das transposições de nanopartículas de ouro revestidas com o peptídeo antimicrobiano BP-100 e encapsuladas com polímeros, e também do mesmo peptídeo sendo encapsulado por um polímero através de um modelo de surfactante pulmonar na interface ar-água. Desta forma, teve-se também o objetivo de inferir a espontaneidade da transposição destas nanopartículas utilizando a dinâmica molecular *coarse grained* e a amostragem guarda-chuva.

2.2

Objetivos específicos

- ❖ Calcular a variação da energia livre de Gibbs da transposição, através de um modelo de surfactante pulmonar na interface ar-água dos sistemas compostos por:
 - ❖ Nanopartícula de ouro, peptídeo BP-100 e polietilenoglicol (PEG);
 - ❖ Nanopartícula de ouro, peptídeo BP-100 e poliestireno (PS);
 - ❖ Nanopartícula de ouro, peptídeo BP-100 e o copolímero PEG-b-PS;
 - ❖ Peptídeo BP-100 revestido por polietilenoglicol (PEG);

- ❖ Nanopartícula de ouro com diferentes polaridades composta pela peptídio BP-100 revestido por polietilenoglicol (PEG);

- ❖ Peptídio BP-100 revestido por polietilenoglicol tiolado (PEG(tiol));

- ❖ Avaliar a estabilidade do modelo de surfactante pulmonar em cada sistema através das análises de área por lipídio, parâmetro de ordem, difusão lateral e perfil Z.

3

Revisão Bibliográfica

3.1

Surfactante Pulmonar

O surfactante pulmonar (Figura 1) é uma mistura complexa de fosfolipídios (90%) e proteínas (10%). Suas principais funções são revestir a superfície interna dos pulmões e reduzir a tensão superficial entre a água e o ar presente nos alvéolos pulmonares (PÉREZ-GIL, 2008). É produzido e secretado por células do tipo pneumócitos II, durante o desenvolvimento fetal, sendo considerado a primeira barreira contra patógenos no sistema respiratório (CIMATO; FACORRO; MARTÍNEZ SARRASAGUE, 2018; GUAGLIARDO et al., 2018; GUZMÁN; SANTINI, 2019; PÉREZ-GIL, 2008; ROLDAN et al., 2016; SØRLI et al., 2018; SOSNOWSKI, 2018).

O surfactante pulmonar é constituído por uma subfase aquosa e lipoproteica, recoberta por uma monocamada de fosfolipídios (PÉREZ-GIL, 2008). Após ser sintetizado no retículo endoplasmático das células alveolares, ele é armazenado em corpos lamelares, uma forma de armazenamento intracelular (GOERKE, 1998; HIDALGO; CRUZ; PÉREZ-GIL, 2017). Através da exocitose, esses corpos lamelares são secretados, ocorrendo a fusão com a membrana plasmática. Então são reorganizados na mielina tubular, que é ativa na superfície e também nas vesículas multilamelares (AGASSANDIAN; MALLAMPALLI, 2013; GOERKE, 1998; SARRASAGUE et al., 2011).

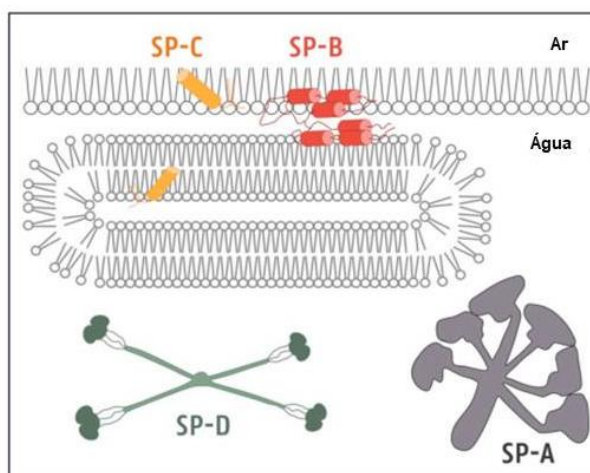


Figura 1. Representação gráfica do surfactante pulmonar na interface ar-água e na fase aquosa, com as respectivas proteínas, adaptado de Guagliardo e colaboradores (2018) (GUAGLIARDO et al., 2018).

O surfactante pulmonar é composto majoritariamente por lipídios saturados como o DPPC, dipalmitoil fosfatidilcolina, cujo nome de acordo com a IUPAC é 1,2-dipalmitoil-rac-glicero-3-fosfocolina, que possui em torno de 70 a 80% de fração em massa. Também faz parte da sua composição lipídios insaturados como o POPG, fosfatidilglicerol, cujo nome de acordo com a IUPAC é 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, com fração em massa entre 10 e 15%. Lipídios neutros (colesterol) correspondem a uma fração em massa de 5 a 10% (BAER et al., 2019; GUAGLIARDO et al., 2018; PÉREZ-GIL, 2008). Também existe um pequeno número de lipoproteínas, que representam menos de 10% da massa do surfactante pulmonar, denominadas SP-A, SP-B, SP-C e SP-D, mas que possuem um papel importante na dinâmica de funcionamento do surfactante (DUNCAN; LARSON, 2010; GUAGLIARDO et al., 2018; GUZMÁN; SANTINI, 2019; PÉREZ-GIL, 2008; ROLDAN et al., 2016).

Os fosfolipídios formam monocamadas orientadas na interface ar-água, devido suas características anfifílicas. Em sua estrutura, possuem dois grupos, o grupo das cabeças polares, que tem afinidade com a água e o grupo das caudas apolares, ficando orientadas para a fase gasosa

(PÉREZ-GIL, 2008). O comportamento interfacial dos fosfolipídios depende das suas estruturas químicas, tanto para as cabeças polares, quanto para as caudas apolares, pois essas características determinam as temperaturas de transições de fases, a fusão do estado ordenado para desordenado e a atividade de superfície (BERNHARD, 2016; BLANCO; PÉREZ-GIL, 2007; PÉREZ-GIL, 2008). Além disso, os fosfolipídios são componentes essenciais para muitas secreções e ainda há relato de que participam da permeabilização das membranas, que são promovidas pelas proteínas (PARRA et al., 2013).

As fosfatidilcolinas (PCs) atuam principalmente reduzindo a tensão superficial da água presente na cavidade alveolar. Nesse processo, a molécula de DPPC desenvolve um papel importante, devido a sua atividade de superfície na interface ar-água (HIDALGO; CRUZ; PÉREZ-GIL, 2015). Além disso, a temperatura de fusão do DPPC, em torno de 41 °C lhe confere rigidez e propriedades de empacotamento (CURSTEDT; HALLIDAY; SPEER, 2015; HIDALGO; CRUZ; PÉREZ-GIL, 2015; PÉREZ-GIL, 2008). Em temperatura fisiológica, o DPPC está em um estado de gel cristalino e, nesse estado, o lipídio consegue reduzir a tensão superficial para quase 0 mN m⁻¹ quando é incorporado na interface (BLANCO; PÉREZ-GIL, 2007; HIDALGO; CRUZ; PÉREZ-GIL, 2015).

Na interface ar-água, existe uma tensão superficial (γ) de aproximadamente 70 mN m⁻¹ (BAOUKINA; TIELEMAN, 2016; LOPEZ-RODRIGUEZ; PÉREZ-GIL, 2014). Portanto, para que ocorra a expansão dessa interface, exige-se a realização de uma quantidade de trabalho muito significativa, uma vez que o raio dos alvéolos é muito pequeno (aproximadamente 0,1 mm) e a pressão interna P é muito alta. Isso pode ser observado segundo a equação de Young-Laplace:

$$\Delta P = 2\gamma/R \quad \text{Eq.1}$$

onde ΔP é a variação de pressão entre superfícies, γ é a tensão da superfície alveolar e R é o raio dos alvéolos. Nessas condições, a região alveolar é muito instável, então o surfactante pulmonar forma um filme fino estável dentro dos alvéolos, permitindo o mecanismo de expansão

pulmonar e promovendo o equilíbrio da tensão superficial em torno de 20–25 mN m⁻¹ (BAOUKINA; TIELEMAN, 2016; LOPEZ-RODRIGUEZ; PÉREZ-GIL, 2014). Quando ocorre a compressão, pode-se chegar a tensões superficiais próximas de 0 mN m⁻¹ (BAER et al., 2019; GUAGLIARDO et al., 2018; GUZMÁN; SANTINI, 2019).

Quando os fosfolípidios são adsorvidos na interface das monocamadas de surfactante, a tensão superficial dos alvéolos pulmonares diminui e a nova tensão superficial da monocamada pode ser descrita de acordo com a Equação 2:

$$\gamma_m(A_L) = \gamma_0 - \Pi(A_L) \quad \text{Eq.2}$$

onde γ_0 é a tensão superficial na interface ar-água pura, aproximadamente 70 mN m⁻¹ a 37 °C, A_L é a área de molécula por lipídio e $\Pi(A_L)$ é a pressão de superfície resultante das interações moleculares (BAOUKINA; TIELEMAN, 2016). O aumento ou diminuição da tensão superficial depende da densidade molecular na superfície, que é inversamente proporcional à área por lipídio. Ou seja, a tensão superficial irá diminuir quando a densidade for maior na superfície, diminuindo a área por lipídio. A densidade pode aumentar quando se tem adsorção de surfactante na subfase ou quando se comprime a interface (BAOUKINA; TIELEMAN, 2016).

No desenvolvimento de sua função, a estrutura e a composição do filme de surfactante pulmonar são fundamentais para determinar as propriedades mecânicas e de transporte sob condições fisiológicas variadas (OLMEDA; MARTÍNEZ-CALLE; PÉREZ-GIL, 2017). O surfactante pulmonar é organizado em dois arranjos moleculares principais. O primeiro arranjo é através da monocamada lipídica, que se adsorve na interface ar-água. No entanto, o segundo arranjo é a organização de uma multicamada espessa, composta por várias bicamadas conectadas como agregados multilamelares (ANDERSSON et al., 2018). Essa organização permite que a adsorção na interface ar-água seja rápida, a tensão superficial diminua nas compressões e o espalhamento do surfactante pulmonar nos alvéolos ocorra de forma

efetiva no processo respiratório (LOPEZ-RODRIGUEZ; PÉREZ-GIL, 2014).

As lipoproteínas, como mencionado anteriormente, também possuem um papel importante na modulação do surfactante pulmonar. Elas são divididas em SP-A e SP-D, com características hidrofílicas, e SP-B e SP-C, com características hidrofóbicas (GUAGLIARDO et al., 2018).

As proteínas SP-B e SP-C se encontram na monocamada, são relativamente pequenas, fundamentais na adsorção interfacial do surfactante e garantem estabilidade do filme durante os ciclos respiratórios (GUAGLIARDO et al., 2018). A proteína SP-B tem maior participação na adsorção lipídica, enquanto que, a proteína SP-C participa efetivamente na formação de reservatórios lipídicos (VELDHUIZEN; HAAGSMAN, 2000). A deficiência da SP-B pode levar a óbito, pois nenhuma outra proteína é capaz de promover a função respiratória (SERNA et al., 2013), tendo o transplante de pulmão como único tratamento disponível. A deficiência da SP-C não é letal, mas pode causar doenças pulmonares crônicas. No entanto, estudos *in vivo* demonstraram que a falta desta proteína não influencia na função do surfactante pulmonar, na composição lipídica ou na oxigenação (DUNCAN; LARSON, 2010; ROLDAN et al., 2016; SCHÜRCH et al., 2010; VELDHUIZEN; HAAGSMAN, 2000).

As proteínas SP-A e SP-D pertencem à família das coletinas e regulam o sistema imune. A SP-A tem uma afinidade particular com o DPPC e essa associação facilita o espalhamento da proteína, protegendo a superfície respiratória da entrada de patógenos (GUAGLIARDO et al., 2018; HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996). A falta dessa proteína causa redução na absorção lipídica, enquanto que elevados níveis colaboram para a homeostase do surfactante (GUAGLIARDO et al., 2018). Similarmente, a SP-D promove a aglutinação e depuração de patógenos que dependem dos íons de cálcio (Ca^{2+}) e regula a homeostase do surfactante. Estudos sugerem que a falta da SP-D está

associada ao acúmulo de surfactante nas vias aéreas (GUAGLIARDO et al., 2018; HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996).

No surfactante pulmonar, é comum ocorrer a coexistência de fases devido aos ciclos respiratórios e às temperaturas de transições de fases dos fosfolípidios, que diferem entre os lipídios saturados (como o DPPC, que é de 41 °C) e os lipídios insaturados (como os PCs que é de aproximadamente -2 °C) (PÉREZ-GIL, 2008). Essa mistura de fosfolípidios com diferentes temperaturas de transições confere ao surfactante uma característica de mistura fluídica, permitindo a rápida adsorção na interface (PARRA; PÉREZ-GIL, 2015; PÉREZ-GIL, 2008).

As fases conhecidas são a líquido condensado (LC) (Figura 2), onde as estruturas dos fosfolípidios estão dispostas como a de um sólido semicristalino, e a fase líquida expandida (LE) (Figura 2), que é uma fase fluida desordenada. Nessa região de coexistência, o filme torna-se resistente e flexível. O colesterol também participa da manutenção das fases, gerando uma nova fase chamada líquida ordenada (LO). Essas transições de fases ocorrem devido às temperaturas de transição dos lipídios, que é próxima à temperatura corporal (37 °C) (CASALS; CAÑADAS, 2012; DUNCAN; LARSON, 2010; PÉREZ-GIL, 2008).

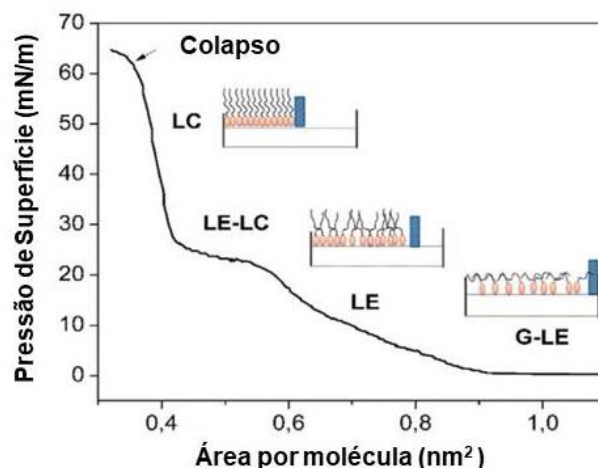


Figura 2. Representação de uma isoterma de Langmuir do DPPC, onde as fases da organização do filme de DPPC são apresentadas com o aumento da pressão de superfície. As moléculas se organizam até chegar ao colapso em aproximadamente 65 mN m^{-1} , adaptada de González e colaboradores (2015) (GONZÁLEZ et al., 2015).

Os surfactantes pulmonares possuem organização similar ao DPPC, visto que a sua composição majoritária é do respectivo fosfolípido. No entanto, algumas diferenças existem, como é mostrado por Zhang e colaboradores (2011) (Figura 3), quando o autor compara outros tipos de surfactantes. Nesse caso, classificados como surfactantes exógenos (ZHANG et al., 2011).

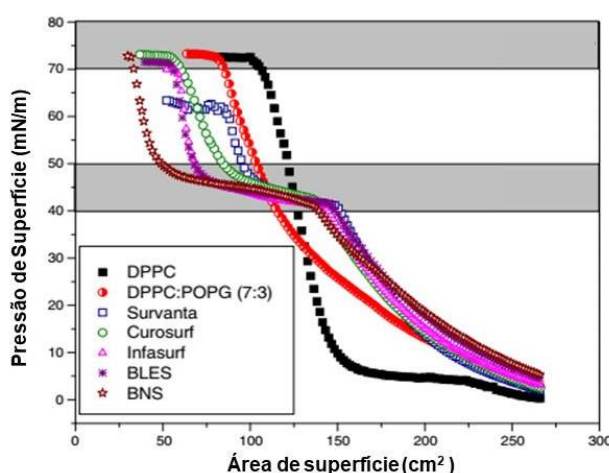


Figura 3. Isotermas de transições de fases de diferentes tipos de surfactantes pulmonares exógenos e de diferentes composições de lipídios, adaptada de Zhang e colaboradores (2011) (ZHANG et al., 2011).

3.2

Surfactantes Exógenos

Na década de 70 e meados da década de 80, uma das principais causas da mortalidade neonatal era a síndrome do desconforto respiratório (SDR), devido à insuficiência do surfactante natural (OWEN et al., 2017). Nessa época, iniciou-se um novo tratamento com uma terapia com surfactantes exógenos oriundos de animais bovinos, suínos e até mesmo de preparações sintéticas isentas de proteínas (OWEN et al., 2017). Na década de 80, Fujiwara e colaboradores (1980), realizaram o primeiro teste, com surfactantes exógenos, com um grupo de pacientes neonatais, e apresentou dados satisfatórios, quando utilizado surfactante exógeno bovino, melhorando a oxigenação alveolar e reduzindo a mortalidade (FUJIWARA et al., 1980).

Os surfactantes de origem bovina são denominados de beractantes e correspondem comercialmente ao Survanta[®], BLES[®] e BNS[®], sendo os dois últimos obtidos através da lavagem broncoalveolar (HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996; ZHANG et al., 2011). Os surfactantes derivados de suínos são da classe poractante alfa, disponível comercialmente com o nome CUROSURF[®] (HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996; ZHANG et al., 2011). Os surfactantes sintéticos podem possuir em sua composição apenas o DPPC ou uma mistura de DPPC e POPG (HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996; ZHANG et al., 2011). Todos os surfactantes citados possuem variação na composição de fosfolipídios e das proteínas SP-B e SP-C (HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996; ZHANG et al., 2011).

Para preservar a integridade dos surfactantes exógenos durante a terapia, são necessárias estratégias para que o mesmo não seja inativado no espaço alveolar. O uso de corticosteroides é uma das estratégias para a terapia efetiva da SDR, bem como o tratamento para asma e displasia broncopulmonar (CIMATO et al., 2016; CIMATO; FACORRO; MARTÍNEZ SARRASAGUE, 2018). Com os resultados satisfatórios da terapia para a SDR, ocorreu a ideia de utilizar a mesma terapia como forma de liberação

de fármacos diretamente no pulmão (KARADAG; OZDEMIR; DEGIRMENCIOGLU, 2016). No entanto, apenas a reposição de surfactante exógeno como tratamento de outras doenças pulmonares não se mostrou efetiva através de testes clínicos, devido às inibições pelos componentes plasmáticos (BAER et al., 2019; DOYLE; CHEONG, 2017; EINICKER-LAMAS et al., 2016).

3.3

Doenças Pulmonares

Sabe-se que o surfactante pulmonar é secretado pelas células do tipo pneumócitos II. Sua produção é realizada durante o período gestacional, entre a 28ª e a 34ª semana (BERNHARD, 2016; BOEL; BANERJEE; CHAKRABORTY, 2018). Bebês que nascem prematuramente acabam não amadurecendo os pulmões e, conseqüentemente, não produzem o surfactante pulmonar, desenvolvendo a SDR, que é considerada uma das maiores causas de mortalidade entre os prematuros, além de doenças pulmonares crônicas ao longo da vida (AGASSANDIAN; MALLAMPALLI, 2013; BAER et al., 2019; BERNHARD, 2016; BOEL; BANERJEE; CHAKRABORTY, 2018; GUAGLIARDO et al., 2018; HERMANS et al., 2015).

Em adultos a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é um tipo de insuficiência respiratória resultante de diversas infecções e inflamações crônicas que causam acúmulo de líquidos nos pulmões e redução dos níveis de oxigênio no sangue (HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996). Infelizmente, a SDRA só é diagnosticada quando a lesão pulmonar está em estado avançado, comprometendo o surfactante pulmonar, e conseqüentemente, a mecânica pulmonar (BAER et al., 2019). A SDRA é considerada mais complexa que a SDR, devido às dificuldades que envolvem o seu tratamento (AGASSANDIAN; MALLAMPALLI, 2013; BAER et al., 2019; HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996). A asma, sepse, pneumonia e a fibrose cística são as doenças pulmonares inflamatórias que mais causam mortes em pacientes

em unidades de tratamento intensivo (UTI) (AGASSANDIAN; MALLAMPALLI, 2013). Apesar de a fibrose cística ser uma alteração genética, a maior causa pela qual os pacientes perecem a esta doença é em função das infecções e inflamações crônicas (AGASSANDIAN; MALLAMPALLI, 2013; OSMAN et al., 2018).

3.3.1

Pneumonia

A pneumonia é a causa da morte de milhares de pacientes entre crianças e adultos no mundo. Ela é desenvolvida a partir da inflamação dos alvéolos pulmonares através de vírus e/ou bactérias (NAYAK et al., 2019). Inicia-se no trato respiratório superior e expande-se para a região alveolar, causando o acúmulo de líquido e dificultando as trocas gasosas pulmonares (HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996; NAYAK et al., 2019). Os sintomas desenvolvidos são tosse, respiração rápida, dificuldade em respirar e febre (HITTINGER et al., 2015; KÄLLANDER; NSUNGWA-SABIITI; PETERSON, 2004; NAYAK et al., 2019). Comumente, a pneumonia é ocasionada devido a infecções por bactérias do tipo *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, o número de espécies de bactérias capazes de promover a infecção pode passar de 12 (BAER et al., 2019; HAMM; KROEGEL; HOHLFELD, 1996; HITTINGER et al., 2015; NAYAK et al., 2019).

Ao atingirem os alvéolos pulmonares, os patógenos inativam o surfactante pulmonar, uma vez que causam a desorganização na estrutura organizacional dos fosfolipídios. Essa desorganização ocorre devido às células dos patógenos terem afinidade e facilidade de se ligar com os componentes do surfactante e agirem causando as inflamações na região pulmonar (WRIGHT et al., 2001).

3.4

Tratamentos

3.4.1

Tratamento Convencional

A partir do século XX, o tratamento para a pneumonia avançou, assim como a sobrevivência dos pacientes, uma vez que se deu início ao uso de antibióticos como forma de tratamento para a doença (CILLONIZ et al., 2016). No entanto, devido às dificuldades em diagnosticar qual é o patógeno responsável pela inflamação, os pacientes são submetidos a tratamentos com antibióticos que atingem tanto bactérias gram-negativas quanto gram-positivas, conhecidos como antibióticos de amplo espectro (CILLONIZ et al., 2016; NAYAK et al., 2019).

Contudo, os patógenos podem desenvolver resistência na ação dos antibióticos utilizados como tratamento, uma vez que os mesmos podem sofrer mutações e seleções nos seus genes, inativando o efeito do medicamento (FAIR; TOR, 2014). O mecanismo para a ocorrência das mutações pode ser de origem endógena ou exógena (SILVER, 2011). Outro fator que contribui para o crescente índice de resistência bacteriana é a indicação excessiva de antibióticos, por parte dos médicos, para tratar sintomas que não são causados por bactérias (FAIR; TOR, 2014; SILVER, 2011; WELTE et al., 2019).

A origem exógena ocorre através da transmissão de microrganismos patogênicos, a partir de organismos ambientais, que podem ser naturalmente produtores de antibióticos, ou até mesmo devido ao comensalismo. O mecanismo de resistência, nesta classe, pode decorrer pelo efeito de efluxo, degradação e modificação celular, atingindo os fármacos dos grupos dos macrolídios, beta-lactâmicos e tetraciclina. Além disso, esses microrganismos podem agir protegendo, modificando ou substituindo seus alvos pelos fármacos dos grupos das vancomicinas e das fluoroquinolonas (SILVER, 2011).

Na origem endógena, o mecanismo de resistência ocorre pela redução da absorção celular (permeabilidade), perda de ativação e regulação positiva do alvo. O grupo de fármacos que são atingidos através desses mecanismos são as fosfomicinas, as vancomicinas, as fluoroquinolonas e as metronidazóis (SILVER, 2011).

A resistência bacteriana é considerada problema de saúde global. Estratégias para o controle do surgimento dos patógenos resistentes precisam ser ampliadas (BAER et al., 2019). Sendo assim, novos tratamentos e abordagens são necessários, como, por exemplo, o desenvolvimento de novos antibióticos que sejam menos suscetíveis à resistência bacteriana (BAER et al., 2019; BANASCHEWSKI et al., 2015; MANZINI et al., 2014).

3.4.2

Tratamentos Alternativos

Muitas alternativas para o combate da resistência bacteriana estão sendo desenvolvidas. Dentre elas, estão potenciais substituintes para os antibióticos convencionais, como os bacteriófagos, probióticos e peptídios antimicrobianos (BANASCHEWSKI et al., 2015; HIEMSTRA et al., 2016). Os peptídios antimicrobianos são uma classe de antibióticos que está ganhando grande atenção com o decorrer dos anos, devido suas características e a capacidade em cessar o crescimento dos microrganismos (BANASCHEWSKI et al., 2015; CARRETERO et al., 2018; REIS et al., 2018; SANTOS et al., 2010; VERLY et al., 2008).

Por fazerem parte do sistema imune, os peptídios antimicrobianos agem como um antibiótico endógeno, destruindo diretamente as células dos patógenos (BANASCHEWSKI et al., 2015). Eles são menos suscetíveis a induzir a resistência bacteriana, levando em conta seu mecanismo de ação (BANASCHEWSKI et al., 2015; TORCATO et al., 2013). Além disso, o interesse em aplicações farmacêuticas se dá devido à pequena sequência genética dos peptídios, o que facilita a síntese dos

mesmos (BANASCHEWSKI et al., 2015; TORCATO et al., 2013; WADHWANI et al., 2014).

3.5

Peptídios Antimicrobianos

Os peptídios antimicrobianos são a primeira linha de defesa dos organismos multicelulares. Possuem ampla ação em bactérias, vírus, fungos e células cancerígenas. A primeira proteína identificada com ação antimicrobiana por Alexandre Fleming em 1922 foi a Lisozima (ZHANG; GALLO, 2016). Porém, o mesmo descobriu a penicilina em 1940, ofuscando o interesse nos peptídios e nas proteínas antimicrobianas. Em 1960, o crescente índice de casos de resistência bacteriana a múltiplos antibióticos motivou resgatar o interesse em pesquisar essas pequenas moléculas que teriam função na defesa do hospedeiro (CORRÊA et al., 2019; ZHANG; GALLO, 2016).

São pequenas moléculas anfifílicas, carregadas positivamente, formadas por aminoácidos e contendo entre 10 e 50 resíduos (TORCATO et al., 2013; ZHANG; GALLO, 2016). Essas características facilitam sua penetração nas camadas lipídicas das células dos microrganismos através da combinação com a membrana e com os componentes citoplasmáticos dos microrganismos (CORRÊA et al., 2019; GUSMÃO et al., 2017; VERLY et al., 2017). Agem promovendo alterações celulares como a formação de poros, extravasamento celular, e então a morte celular (CORRÊA et al., 2019; GOMES et al., 2018; TORRES et al., 2018; VERLY et al., 2009).

A ação dos peptídios no alvo pode ser mediada com ou sem receptores. Os mediados sem receptores são mais diversificados quanto à composição de aminoácidos, por não possuírem receptores específicos e seus alvos serem as membranas celulares (CORRÊA et al., 2019). As células dos microrganismos são compostas por fosfolipídios carregados negativamente; as bactérias gram-positivas possuem ácido teicóico, enquanto que as gram-negativas possuem lipopolissacarídeos, e essas

duas substâncias também possuem carga negativa. Essas características são fundamentais para que ocorra a ação imediata dos peptídeos antimicrobianos nas células dos microrganismos (CORRÊA et al., 2019; MAGALHÃES et al., 2008; VERLY et al., 2017).

No pulmão, os peptídeos contribuem para a defesa do sistema imune, agindo contra os microrganismos causadores de inflamações. As classes dos peptídeos que são frequentes nos tecidos pulmonares são as α - e β -defensinas. Os peptídeos que fazem parte deste grupo são o HBD-1, HBD-2, HBD-3 (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019). Os peptídeos LL-37, CATH-2, SMAP-29 são exemplos da classe das catelicidinas (SOUZA et al., 2018). Esses grupos são considerados os principais e agem no rompimento das membranas celulares (HIEMSTRA et al., 2016; ZHANG; GALLO, 2016).

Devido suas características estruturais, os peptídeos antimicrobianos possuem forte interação com as cabeças polares dos fosfolipídios do surfactante pulmonar. Quando eles penetram a membrana, sofrem redução na atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2018). Para que a liberação dos peptídeos seja efetiva nos alvéolos pulmonares, são necessários agentes carreadores que penetram a membrana sem causar danos estruturais no surfactante pulmonar (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019; SOUZA et al., 2018).

3.5.1

BP-100

O BP-100 é um peptídeo catiônico híbrido, derivado dos peptídeos naturais melittin e cecropin A, e que apresenta carga +6 em pH fisiológico. Possui a sequência de 11 aminoácidos H-KKLFFKKILKYL-NH₂ (H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-NH₂) e tem massa molecular de 1420,88 g mol⁻¹ (CARRETERO et al., 2018; EALES et al., 2018; MANZINI et al., 2014). Ele age como um peptídeo de penetração celular, inibindo o crescimento de microrganismos e possui baixa susceptibilidade de degradação das proteases (MANZINI et al., 2014; TORCATO et al., 2013).

Em membranas, apresenta uma estrutura helicoidal anfifílica, uma vez que sua hélice é muito curta e não abrange com totalidade uma membrana lipídica típica. Seu comprimento é de 16,5 Å, ou seja, 1,5 Å por resíduo em uma α -hélice ideal (MANZINI et al., 2014; PARK et al., 2019; TORCATO et al., 2013; TORRES et al., 2018, 2019; WADHWANI et al., 2014).

O BP-100 (Figura 4) interage com a membrana celular, porém seu mecanismo de ação em nível molecular não é completamente entendido. Ele interage com fosfolipídios carregados negativamente (CARRETERO et al., 2018; TORRES et al., 2018). Nas bactérias gram-negativas, se liga aos lipopolissacarídeos, ao passo que em bactérias gram-positivas, interage com o ácido teicóico (CARRETERO et al., 2018; PARK et al., 2019). Estudos envolvendo microscopia de força atômica revelaram que o mesmo age destruindo progressivamente a estrutura celular da *E. coli*, causando o extravasamento citoplasmático, com concentração inibitória mínima de 3 μ M (ZAMORA-CARRERAS et al., 2016). Torres e colaboradores (2018) observaram que o BP-100 ligado covalentemente em nanopartículas de alumina apresentou eficiência na atividade antibacteriana, maior estabilidade e foi capaz de desorganizar a integridade das bicamadas fosfolipídicas das células das cepas de *E. coli* e *S. typhimurium* (TORRES et al., 2018).

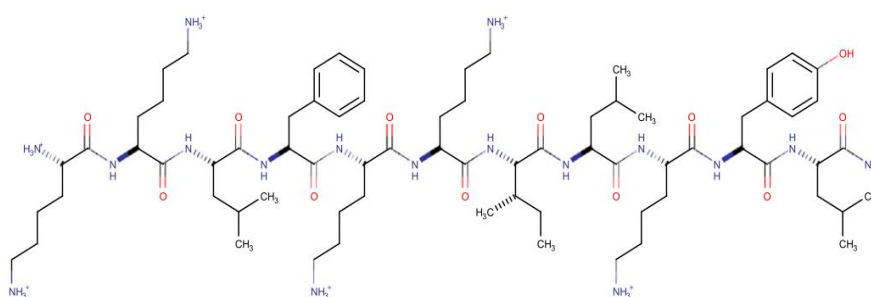


Figura 4. Estrutura química do BP-100, adaptada de Carretero e colaboradores (2018) (CARRETERO et al., 2018).

Sugere-se que o BP-100 (Figura 5) forme um “tapete” na superfície ao interagir com a membrana, inserindo-se dinamicamente no núcleo da bicamada, provocando desordem, aumento da permeabilidade e morte da

célula bacteriana (WADHWANI et al., 2014). É importante citar que não é necessária a organização de um oligômero ou a formação de um poro transmembranar. Esse mecanismo se dá por conta da sua hélice curta e anfifílica (WADHWANI et al., 2014; ZAMORA-CARRERAS et al., 2016).

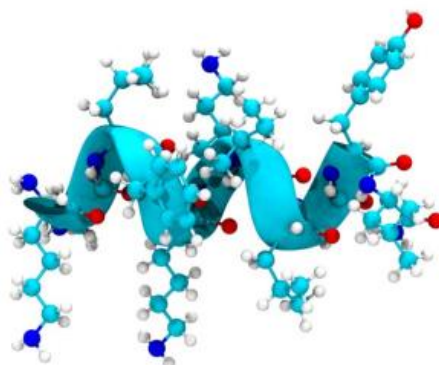


Figura 5. Estrutura alfa-hélice α -BP-100, adaptada de Park e colaboradores (2019) (PARK et al., 2019).

3.6

Carreamento de Fármacos

Em adultos, o pulmão possui uma área superficial absorvente de aproximadamente 140 m^2 , sendo capaz de absorver fármacos de forma sistêmica ou tópica (PATIL; SARASIJA, 2012). Essa característica está gerando grandes interesses na pesquisa de novas formas de administração não invasiva de agentes terapêuticos. Além disso, as características morfológicas dos fármacos, tais como tamanho, geometria, superfície, influenciam diretamente na deposição dos mesmos nos pulmões (PATIL; SARASIJA, 2012).

Direcionar fármacos a alvos específicos, principalmente no pulmão, é um desafio. Dependendo da via de administração, há dificuldades em carrear o fármaco no local desejado por um período de tempo efetivo (KLEBOWSKI et al., 2018). Desta forma, o sistema de carreamento assume papel importante para a efetividade da entrega e ação dos fármacos, além da possibilidade de solucionar problemas de barreiras bioquímicas do organismo (PATIL; SARASIJA, 2012).

Os sistemas de carreamento também podem resolver problemas que envolvem a solubilidade do fármaco, a proteção da fotodegradação e as alterações de pH. Os meios mais comuns de carreamento de fármacos incluem lipossomas, cristais líquidos, dendrímeros, ciclodextrinas, micelas, lipoplexos, polímerossomos, hidrogéis e nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) (HO et al., 2019; KLEBOWSKI et al., 2018).

Com o objetivo de aprimorar a eficiência do carreamento de fármacos, as nanopartículas estão sendo introduzidas como sistemas de entrega de fármacos (do inglês *Drug Delivery*). Nesse contexto, o uso de nanopartículas de ouro, para o desenvolvimento de novos tratamentos, se torna promissor para inúmeras doenças, dentre elas as respiratórias (JELINKOVA et al., 2019; RIZVI; SALEH, 2018).

3.6.1

Nanopartículas

Estruturas em nanoescala estão despertando grande interesse em diversos campos da ciência por apresentarem várias propriedades físicas e químicas que favorecem o seu uso, como, por exemplo, o tamanho, área superficial e facilidade de manipulação (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018). Dentre os nanomateriais estudados, as nanopartículas de ouro estão sendo amplamente investigadas por possuírem, além das características citadas, alto coeficiente de absorção de raios X. Também, é possível controlar as propriedades físico-químicas durante a síntese, possibilitando a aplicação nos mais variados campos científicos (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; MAHMOODI; GHAVIDAST; AMIRMAHANI, 2016; RAMALINGAM, 2019).

As nanopartículas de ouro possuem características dominantes como as propriedades optoeletrônicas, que estão associadas à forma, à biocompatibilidade e à baixa toxicidade ao organismo. Suas propriedades físicas e a ressonância plasmônica de superfície dependem de sua morfologia, estando associada às suas características ópticas

(RAMALINGAM, 2019). Para aplicações biomédicas, sugere-se que as nanopartículas possuam tamanhos inferiores a 200 nm, pois as mesmas podem ativar o sistema linfático e serem removidas do organismo rapidamente. No entanto, nanopartículas de ouro com tamanhos inferiores a 100 nm são capazes de atravessar membranas e também serem adsorvidas nas células endoteliais da pele (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; RIZVI; SALEH, 2018). Sendo assim, nanopartículas são capazes de atravessar barreiras, antes muito difíceis de serem atingidas, fornecendo quantidades de fármacos capazes de tratar doenças que até então eram difíceis de serem tratadas (RAMALINGAM, 2019; RIZVI; SALEH, 2018).

Como mencionado, o tamanho é umas das principais características das nanopartículas, pois afeta como as células do corpo as enxergam, determinando sua distribuição, toxicidade, capacidade de direcionamento e absorção (ou adsorção) celular (RAMALINGAM, 2019; RIZVI; SALEH, 2018). Estudos mostraram que nanopartículas com tamanhos variando entre 12 e 40 nm de diâmetro não apresentaram toxicidade para células do sistema imunológico (BARRETO et al., 2014).

De Jong e colaboradores (2008), ao variar o tamanho das nanopartículas de ouro (10, 50, 100 e 250 nm), observaram que as menores se distribuíram mais nos tecidos após 24 horas de injeção, enquanto que as maiores foram encontradas exclusivamente em órgãos como fígado, baço e também na corrente sanguínea (DE JONG et al., 2008). O mesmo foi observado por Sonavane e colaboradores (2008), demonstrando que, quanto maior o tamanho das nanopartículas, as mesmas tendem a formar agregados nos órgãos, diminuindo sua eficiência e aumentando sua citotoxicidade (GOODMAN et al., 2004; SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008).

Luo e colaboradores (2018) observaram, através da dinâmica molecular, que as nanopartículas com diâmetros menores que 5 nm podem permear monocamadas fosfolipídicas, como, por exemplo, o surfactante pulmonar, sem influenciar na estrutura organizacional dos fosfolipídios. Porém, quando o tamanho das mesmas aumentou, para

aproximadamente 10 nm, a transposição se tornou menos eficiente, promovendo a desorganização estrutural dos fosfolipídios (LUO et al., 2018). Além do tamanho, a forma da nanopartícula, como, por exemplo, esférica, cilíndrica ou em disco, também pode afetar a sua permeação em monocamadas fosfolipídicas, bem como promover a desorganização dos fosfolipídios. Assim, o diâmetro torna-se também um fator importante para a transposição deste tipo de nanopartícula em modelos de surfactante pulmonar (LIN; ZUO; GU, 2015; YUE et al., 2017).

Outro fator é o efeito da densidade de cargas, principalmente em estudos *in vitro* que envolvam análises de toxicologia e administração de fármacos. As cargas da superfície da nanopartícula podem promover a permeação e a adsorção das mesmas na superfície das monocamadas fosfolipídicas. A capacidade de adsorção aumenta na medida em que a densidade de cargas superficiais da nanopartícula aumenta (CHEN et al., 2017; HU et al., 2013).

Lin e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos das interações das nanopartículas de ouro, com caráter hidrofílico e hidrofóbico, em um modelo de surfactante pulmonar contendo DPPC. Os autores observaram que a nanopartícula de ouro com caráter hidrofílico não influenciou na organização dos fosfolipídios ao atravessar a monocamada fosfolipídica. O contrário ocorreu com a nanopartícula com caráter hidrofóbico. Xu e colaboradores (2017) também observaram que nanopartículas hidrofóbicas interagiram com os fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar, enquanto que as nanopartículas hidrofílicas permearam a monocamada sem influenciar na organização dos fosfolipídios (XU et al., 2017).

Utilizar nanopartículas como entrega de fármacos têm permitido grandes avanços em terapias respiratórias. No entanto, faz-se necessário entender os efeitos colaterais das mesmas no surfactante pulmonar, como demonstrado por Lin e colaboradores (LIN et al., 2014). Estudos *in vitro* sugerem que a inalação de nanopartículas de ouro com caráter hidrofóbico faz com que elas permaneçam nos alvéolos pulmonares por

mais tempo. Esse comportamento pode afetar as funções respiratórias, uma vez que as mesmas interagem com os fosfolipídios, promovendo a desorganização estrutural do surfactante pulmonar (ZHANG et al., 2018).

O direcionamento das nanopartículas pode ocorrer de forma passiva ou ativa, atravessando os tecidos inflamados. A forma ativa acontece quando o sistema transportador do fármaco é conjugado a um alvo específico da célula (MENON; RAJESHKUMAR; S, 2017). O direcionamento passivo ocorre quando a nanopartícula atinge o órgão alvo devido aos espaços vazios entre as junções celulares (MENON; RAJESHKUMAR; S, 2017). O direcionamento ativo de antibióticos está relacionado com a ligação prolongada e com a interação do alvo através da sua superfície funcionalizada, alterando a permeabilidade da membrana das bactérias, inibindo a atividade enzimática, a respiração celular e levando à morte da célula (CORRÊA et al., 2019). Esse processo diminui o uso de altas concentrações de antibióticos, diminuindo os efeitos colaterais que os mesmos provocam (CORRÊA et al., 2019). Quando são associados com peptídeos antimicrobianos, a suscetibilidade em ocorrer resistência bacteriana diminui consideravelmente (CORRÊA et al., 2019; MENON; RAJESHKUMAR; S, 2017).

São vários os métodos para a síntese das nanopartículas de ouro que podem ser divididos em duas classes: *top-down* e *bottom-up* (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2017). Na síntese *top-down*, é empregada a abordagem destrutiva e inicia-se com uma molécula grande, que é decomposta em moléculas menores até serem convertidas em nanopartículas com tamanhos adequados (BAHRAMI et al., 2017; ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

Na síntese *bottom-up*, também conhecida como abordagem de construção, as nanopartículas são obtidas a partir de substâncias mais simples (BAHRAMI et al., 2017; ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2017). Podem ser utilizados métodos químicos, físicos e biológicos. Nos métodos físicos, são aplicados a irradiação de

raios gama, micro-ondas, radiação ultravioleta, processos fotoquímicos e termolíticos. Nos métodos químicos, são realizadas reações químicas em meios aquosos por um agente redutor, como, por exemplo, citrato ou boro hidreto de sódio. Nesse método, o procedimento de Turkevich (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951) é muito utilizado devido a vantagens como facilidade na síntese, tamanho controlado e estabilidade das nanopartículas coloidais. A síntese biológica é uma via em que objetiva-se reduzir resíduos perigosos para auxiliar na química verde, sendo empregados compostos e derivados de vegetais, bactérias, fungos e algas (BAHRAMI et al., 2017; ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

3.6.2

Revestimentos

A estabilização coloidal das nanopartículas de ouro se dá através da competição das forças de atração de van der Waals, repulsão de dupla camada e forças de interação estérica. Quando as nanopartículas de ouro puras são colocadas em meio aquoso, a estabilidade coloidal diminui, fazendo com que as forças de atração se sobressaiam às demais e, então, forme agregados coloidais. Para que a estabilidade aumente, é necessário que sejam conjugados polímeros e/ou biomoléculas à superfície das nanopartículas, que são capazes de proteger as mesmas contra a agregação, que é induzida pelos eletrólitos do meio aquoso. Existem relatos na literatura que fármacos adsorvidos na superfície das nanopartículas e revestidos com essas moléculas tiveram a eficiência de liberação aumentada nos alvos de tratamento (MAHMOODI; GHAVIDAST; AMIRMAHANI, 2016; PÉREZ-ORTIZ et al., 2017).

Um dos polímeros relatados na literatura como revestimento de nanopartículas é o polietilenoglicol (PEG). O PEG possui solubilidade em água, apresenta baixa toxicidade, que depende do tamanho da cadeia polimérica, e melhora a permeabilidade nas células (KLEBOWSKI et al., 2018; MAHMOODI; GHAVIDAST; AMIRMAHANI, 2016). O revestimento

de nanopartículas de ouro com PEG faz com que as mesmas permaneçam mais tempo em circulação no organismo e aumente a concentração de fármacos nos tecidos doentes, pois o PEG age como uma espécie de “capa”, fazendo com que as nanopartículas não sejam expelidas do organismo antes que cheguem ao alvo de interesse para o tratamento (LEE et al., 2014; YANG et al., 2019). São utilizadas terminações em tiol (SH) ou amina (NH₂) nas cadeias poliméricas de PEG, a fim de se aprimorar a estabilidade, a biocompatibilidade e a permeabilidade das nanopartículas nas membranas (HO et al., 2019; KLEBOWSKI et al., 2018).

Em um estudo realizado por Bai e colaboradores (2020), os autores observaram que o tamanho da cadeia polimérica também influencia na espontaneidade da transposição de nanopartículas de ouro. Quando as mesmas foram encapsuladas com uma cadeia polimérica de PEG contendo 5 unidades de monômeros, as nanopartículas não permearam a monocamada de fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar. No entanto, quando encapsuladas com uma cadeia polimérica maior, com 10 unidades de monômeros, as nanopartículas apresentaram facilidade em permear a monocamada fosfolipídica (BAI; LI; HU, 2020).

O poliestireno (PS) também é um polímero que pode ser utilizado como revestimentos de nanopartículas. Porém, devido o seu caráter hidrofóbico leva à formação de agregados na interface ar-água (PERCEBOM et al., 2016). A miscibilidade do PS está relacionada com a massa utilizada para recobrir as nanopartículas e com o tamanho das nanopartículas de ouro. Lamarre e colaboradores (2015) observaram que as nanopartículas de ouro com o diâmetro de aproximadamente 2,7 nm e 66000 g mol⁻¹ de poliestireno apresentaram miscibilidade em água quando comparada com diâmetros maiores (~ 6 nm) com a mesma massa de poliestireno (LAMARRE; YOCKELL-LELIÈVRE; RITCEY, 2015).

Na literatura, encontram-se ainda relatos sobre a utilização de copolímeros anfifílicos, como revestimento de nanopartículas. Estes são construídos em blocos a partir de dois ou mais polímeros, que

apresentam características hidrofóbicas e hidrofílicas. São vários os copolímeros que podem ser sintetizados, como, por exemplo, o copolímero em bloco poli (óxido de etileno) -b- poli (óxido de propileno) (PEG-b-PPO), o poli (2-vinilpiridina) -b-poli (óxido de etileno) (P2VP-b-PEG), o poliestireno-b-poli óxido de etileno (PS-b-PEG), entre outros. No entanto, é preciso avaliar a hidrofobicidade dos polímeros e a toxicidade dos mesmos para serem aplicados no direcionamento de fármacos (PERCEBOM; HELENA; COSTA, 2019).

O copolímero em bloco PEG-b-PS tem ganhado atenção pela sua estabilidade, promoção à adesão celular e por aumentar a atividade catalítica na redução de compostos que são utilizados na síntese de analgésicos, como o 4-nitrofenol para 4-aminofenol (GRUNEWALD et al., 2018; MALMSTROM; TRAVAS-SEJDIC, 2013; QUE et al., 2015). Desta forma, ele foi escolhido para este trabalho a fim de se avaliar o seu comportamento na transposição do BP-100 adsorvido na superfície da nanopartícula de ouro.

3.7

Simulação Molecular

Considerada uma ferramenta importante para o estudo de sistemas biológicos, simulações moleculares são utilizadas cada vez mais para compreender mecanismos de sistemas biológicos (BAOUKINA; TIELEMAN, 2016; BERNARDI; MELO; SCHULTEN, 2015; HANSSON; OOSTENBRINK; GUNSTEREN, 2002). As técnicas de simulação podem fornecer imagens detalhadas do sistema, permitindo obter informações fundamentais, que são dificilmente obtidas por métodos experimentais, como, por exemplo, a organização estrutural dos fosfolipídios, a agregação e a transição de fases (LYUBARTSEV; RABINOVICH, 2016). O avanço das ferramentas computacionais é uma das razões para o grande crescimento do interesse nas simulações computacionais (ADCOCK; MCCAMMON, 2006; OLLILA; PABST, 2016).

3.7.1

Dinâmica Molecular Clássica

A dinâmica molecular é uma técnica computacional que calcula as interações de átomos e moléculas. Pode ser aplicada para a investigação de diversas propriedades em diversos campos científicos. Os métodos denominados clássicos, também denominados de métodos de mecânica molecular, permitem obter modelos que podem ser aplicados na investigação de sistemas biomoleculares (ADCOCK; MCCAMMON, 2006). Por exemplo, são usados em pesquisas relacionadas à biologia molecular, bioquímica estrutural, biotecnologia, etc. Através da dinâmica molecular é possível avaliar propriedades termodinâmicas e fenômenos de transporte desses sistemas, a partir da solução da equação clássica da segunda lei de Newton (Equação 3):

$$\vec{F}_i = \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} m_i = \frac{d\vec{v}_i}{dt} m_i = \vec{a}_i m_i \quad \text{Eq. 3}$$

onde F_i é a força aplicada a partícula i na posição r_i , t é o tempo, v_i é a velocidade e a_i é a aceleração da partícula i de massa m_i .

Também é possível expressar a força por meio da energia potencial de cada partícula através da Equação 4:

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} \quad \text{Eq. 4}$$

A força que atua sobre cada partícula é obtida a partir da derivada primeira da energia potencial em relação às posições (Equação 4), gerando a aceleração da partícula. Com isso, ao integrar as equações de movimento, obtém-se as velocidades das partículas que proporcionam os cálculos das posições das mesmas. As energias potencial e cinética do sistema são obtidas a partir das novas posições e velocidades de cada partícula. Ao aplicar várias vezes esses cálculos, obtém-se uma trajetória, que é o conjunto de posições e velocidades de cada partícula ao longo do tempo.

3.7.2

Ensembles

São um conjunto de microestados que permite manter constantes as configurações (da partícula) e propriedades termodinâmicas (pressão, temperatura, energia interna) do sistema durante a integração das equações de Newton. Os ensembles termodinâmicos (NVE, NVT, NPT, $N\gamma T$) podem ser definidos através da mecânica quântica ou clássica (MCQUARRIE, 2004).

O ensemble microcanônico NVE foi um dos primeiros ensembles desenvolvidos. Durante a simulação, o número de partículas (N), volume (V) e energia (E) são mantidos constantes. Para controlar separadamente o volume (V), a temperatura (T) e a pressão (P), e não a energia total (E), ensembles alternativos foram criados. No ensemble canônico NVT, o número de partículas (N), volume (V) e temperatura (T) são mantidos constantes. No ensemble isotérmico-isobárico NPT, o número de partículas (N), pressão (P) e temperatura (T) são mantidos constantes. E no ensemble $N\gamma T$, são mantidos constantes o número de partículas (N), a temperatura (T) e a tensão superficial (γ) (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007).

3.7.3

Campos de Força

O conjunto de parâmetros que descrevem os potenciais das interações ligadas e não-ligadas entre as partículas estão contidos no campo de força. (POURMOUSA; PASTOR, 2018). O desenvolvimento de um campo de força está diretamente relacionado a encontrar valores que melhor descrevem as interações moleculares dos sistemas. Uma das formas de se parametrizar um campo de força é através dos cálculos *ab initio*, que determinam as cargas parciais dos átomos e algumas interações intramoleculares (LYUBARTSEV; RABINOVICH, 2016).

O avanço computacional permitiu o desenvolvimento de campos de força que podem ser utilizados no estudo de interações de átomos e moléculas em sistemas biológicos. Os campos de força não polarizáveis disponíveis atualmente são descritos através dos modelos: *All-Atom* (AA), *United-Atom* (UA) e *coarse grained* (CG) (OLLILA; PABST, 2016; POURMOUSA; PASTOR, 2018; VENABLE; BROWN; PASTOR, 2015).

No campo de força AA, cada átomo, incluindo os átomos de hidrogênio, são tratados separadamente. Esse campo de força permite calcular propriedades a partir de escalas nanométricas e escalas de tempo de nanossegundos, possibilitando obter informações a nível atômico (BENNETT; TIELEMAN, 2013; POURMOUSA; PASTOR, 2018; WANG et al., 2016). Simulações utilizando esse campo de força permitem compreender diversos sistemas biológicos desde moléculas muito pequenas como peptídios, até moléculas muito grandes, como complexos proteicos (BERNARDI; MELO; SCHULTEN, 2015).

No campo de força UA, os hidrogênios e átomos pesados são unidos, formando grupos não polares de hidrocarbonetos (CH, CH₂ e CH₃). Estes grupos são considerados uma única partícula e, por este fato, esses campos de força são até 3 vezes mais rápidos quando comparado com campos de forças AA (LYUBARTSEV; RABINOVICH, 2016). O desenvolvimento desse campo de força permitiu reproduzir propriedades termodinâmicas, possibilitando obter algumas informações em escala atômica de modelos de sistemas biomoleculares. Porém, a viabilidade de simular sistemas em escala espacial de centenas de nanômetros e em escala temporal de centenas de microssegundos ainda é uma limitação (BERNARDI; MELO; SCHULTEN, 2015; LYUBARTSEV; RABINOVICH, 2016).

O campo de força CG permite agrupar um conjunto de átomos pesados (C, O, P, N) e formar grãos. O agrupamento ocorre através de um mapeamento de quatro átomos pesados para um grão, que representa o centro de interação (BENNETT; TIELEMAN, 2013;

MARRINK et al., 2007; MIGUEL; PERILLO; VILLARREAL, 2016; POURMOUSA; PASTOR, 2018; SIANI et al., 2016).

As interações dos grãos são representadas por quatro sítios principais sendo eles polar (P), não-polar (N), apolar (C) e carregado (Q). Esses sítios são subdivididos para representar a natureza química das estruturas atômicas. Quando o sítio tem a capacidade de realizar ligações de hidrogênio, ele se divide em doador (d), aceitor (a), doador-aceptor (da) ou nenhuma (0). Outra divisão dos sítios está relacionada com o nível de polaridade, na qual é representada por números de um a cinco, onde um é a polaridade mais baixa (1) e cinco é a polaridade mais alta (5) (MARRINK et al., 2007; MARRINK; DE VRIES; MARK, 2004; MIGUEL; PERILLO; VILLARREAL, 2016). O campo de força CG é uma alternativa que vem sendo muito empregada em simulações de sistemas biológicos por dinâmica molecular. Neste campo de força, o número de graus de liberdade é reduzido, o tempo de integração aumenta, e então sistemas da ordem de centenas de nanômetros podem ser simulados por períodos de tempo da ordem de microssegundos (MIGUEL; PERILLO; VILLARREAL, 2016; ZHANG et al., 2015).

3.7.4

Cálculo do Potencial

A soma (Equação 5) das contribuições das interações ligadas (V_L) e das interações não ligadas (V_{NL}) de um conjunto de partículas define o potencial dessas interações na dinâmica molecular clássica.

$$V_{total} = \sum_{i=1}^N (V_{L,i} + V_{NL,i}) \quad \text{Eq. 5}$$

No primeiro termo da equação, aparecem as interações ligadas V_L , que são as contribuições covalentes que mantém as partículas unidas: potencial de comprimento de ligação, potencial de ângulo de ligação e potencial de torção de ligação. No segundo termo da equação, são

apresentadas as interações não ligadas: a contribuição das interações de van der Waals e de Coulomb (CRAMER, 2013).

3.7.4.1

Comprimento de Ligação

O potencial harmônico (Equação 6) descreve a energia de ligação de duas partículas i e j , ligados covalentemente, em função do comprimento de ligação no campo de força.

$$V_l(\vec{r}_{ij}) = \frac{1}{2} k_l (r_{ij} - r_{ij}^o)^2 \quad \text{Eq. 6}$$

Nessa equação, $(r_{ij} - r_{ij}^o)$, é a distância entre as partículas i e j de uma referência padrão, r_{ij}^o . A constante de força de ligação específica para esse par de partículas é dada por k_l . Essa aproximação é baseada na lei de Hooke em função dos termos de coordenadas internas moleculares que dão origem ao potencial, sendo válida para tratar moléculas com pequenas flutuações (CRAMER, 2013).

3.7.4.2

Ângulo de Ligação

A aproximação ou afastamento de duas partículas descreve a deformação do ângulo. Sejam as partículas i , j e k , unidas por duas ligações, seu potencial será gerado pela deformação das mesmas e pode ser calculado pela aproximação do potencial harmônico (Equação 7).

$$V_a(\vec{r}_{ijk}) = \frac{1}{2} k_a (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^o)^2 \quad \text{Eq. 7}$$

O termo θ_{ijk} é a variação angular, θ_{ijk}^o é o ângulo de equilíbrio e k_a é a constante de deformação angular das três partículas envolvidas. No campo de força MARTINI, o ângulo é calculado pela aproximação do cosseno (Equação 8).

$$V_a(\vec{r}_{ijk}) = \frac{1}{2} k_a (\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta^{\circ}_{ijk}))^2 \quad \text{Eq. 8}$$

Nesse caso, o termo $(\cos(\theta_{ijk}))$ também descreve a deformação angular das três partículas envolvidas e k_a é a constante de deformação angular (CRAMER, 2013).

3.7.4.3

Torção de Ligação

O potencial de torção é definido pelo ângulo diedro a partir de quatro partículas i , j , k e l , onde ϕ_{ijkl} (Equação 9) é o ângulo formado entre os planos ijk e jkl .

$$V_d(\vec{r}_{ijkl}) = k_d (1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi^{\circ}_{ijkl})) \quad \text{Eq. 9}$$

O ângulo do diedro de referência é definido por ϕ°_{ijkl} , k_d é a constante do diedro e n é a multiplicidade da função. Os ângulos diedros impróprios também são descritos pelo campo de força através do potencial de diedro impróprio (Equação 10).

$$V_{di}(\vec{r}_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{di} (\xi_{ijkl} - \xi^{\circ}_{ijkl})^2 \quad \text{Eq. 10}$$

O ângulo diedro impróprio de referência é descrito por ξ°_{ijkl} e k_{di} é a constante de ângulo diedro impróprio (CRAMER, 2013).

3.7.4.4

Potencial de van der Waals

Sejam os pares de átomos i e j não ligados covalentemente, as interações entre eles são descritas pelos potenciais de van der Waals e de Coulomb. A aproximação de Lennard–Jones (Equação 11) é utilizada para calcular o potencial de van der Waals.

$$V_{LJ}(\vec{r}_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad \text{Eq. 11}$$

A profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva é dada por ϵ_{ij} . O termo σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial de Lennard–Jones é zero. Esses parâmetros são ajustados experimentalmente ou por cálculos teóricos. O termo r_{ij} refere-se à distância entre as partículas i e j . Os termos r_{ij}^{-12} e r_{ij}^{-6} descrevem respectivamente a repulsão e a atração das partículas (CRAMER, 2013).

3.7.4.5

Potencial Eletrostático ou de Coulomb

Quando se tem duas partículas carregadas, q_i e q_j , o potencial eletrostático é dado a partir da lei de Coulomb (Equação 12).

$$V_c(\vec{r}_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad \text{Eq. 12}$$

onde q_i e q_j correspondem a magnitude das cargas pontuais de cada partícula, r_{ij} a distância entre as cargas, ϵ_0 a permissividade do vácuo e ϵ_r a constante dielétrica relativa do meio (CRAMER, 2013).

3.7.5

Algoritmos na dinâmica molecular

A partir da expansão da série de Taylor, é possível aplicar algoritmos que utilizam integradores numéricos para a resolução da equação de movimento de um conjunto de partículas, resultando na trajetória dessas partículas (MORSE; FESHBACH, 1953). Os algoritmos envolvidos na dinâmica molecular e utilizados neste trabalho serão descritos a seguir.

3.7.5.1

Algoritmo de minimização de energia

A necessidade de eliminar as sobreposições de partículas, que ocorrem durante a construção do sistema, implica na aplicação de um

algoritmo de minimização de energia, evitando que nas etapas posteriores o sistema colapse.

A minimização de energia permite obter um conjunto de coordenadas que minimiza a energia potencial do sistema de estudo. Basicamente, ocorre o direcionamento da superfície do potencial para uma energia mínima. Esse processo adapta o sistema, suavizando as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre as ligações e nas interações de van der Waals.

Um dos métodos mais utilizados para realizar a minimização de energia é o método *steepest descent*, devida a sua simplicidade e robustez. Para o algoritmo *steepest descent*, o vetor das 3N coordenadas é definido a partir do vetor \vec{r} (Equação 13):

$$\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n + \frac{\vec{F}_n}{(|\vec{F}_n|)} h_n \quad \text{Eq. 13}$$

O deslocamento máximo é dado por h_n e a força por \vec{F}_n . O máximo valor da força é dado pela notação $(|\vec{F}_n|)$. Quando o mínimo valor de energia especificado é atingido, o algoritmo é interrompido.

3.7.5.2

Algoritmo de Verlet

Para resolver a equação de movimento, um dos algoritmos mais utilizados, por ser considerado simples e robusto, é o algoritmo de Verlet (VERLET, 1967). O algoritmo é baseado no método das diferenças finitas que consiste em integrar pequenos intervalos de tempo, simulando com maior frequência os movimentos do sistema.

O algoritmo de Verlet utiliza a posição e a aceleração de um átomo em um tempo t e a posição em um tempo $t-\Delta t$, para calcular a posição em um tempo $t+\Delta t$ (Equação 14).

$$\vec{r}(t + \Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \frac{\vec{F}}{m}\Delta t^2 \quad \text{Eq. 14}$$

Utiliza-se também a série de Taylor para determinar a posição r_1 , quando as interações estão no passo $n = 1$ com o tempo t_1 (Equação 15).

$$\vec{r}_1 = \vec{r}_0 + \vec{v}_0\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}_0\Delta t^2 + \dots \quad \text{Eq. 15}$$

A vantagem desse algoritmo está na omissão de alguns termos da série de Taylor. Porém, os cálculos de velocidade ficam implícitos e aproximados para a energia cinética do sistema.

Para o cálculo da velocidade, utilizam-se as diferenças de posições nos tempos $t - \Delta t$ e $t + \Delta t$ e divide-se pelo intervalo de tempo percorrido $2\Delta t$ (Equação 16):

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad \text{Eq. 16}$$

3.7.5.3

Algoritmo *Leap-Frog*

No algoritmo Leap-Frog, considera-se que a velocidade e a posição alternam simultaneamente (Equações 17 e 18). Para uma posição r em um tempo t e uma velocidade v em um tempo $t - \left(\frac{1}{2}\right)\Delta t$. A posição $t + \Delta t$ é calculada a partir da velocidade em um tempo $t + \left(\frac{1}{2}\right)\Delta t$ (HOCKNEY; GOEL; EASTWOOD, 1974).

$$\vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \vec{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\vec{F}(t) \quad \text{Eq. 17}$$

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \Delta t\vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \quad \text{Eq. 18}$$

Para um tempo inicial, a velocidade não consegue ser calculada diretamente pelo algoritmo. Portanto, faz-se também o uso da série de Taylor para o cálculo da velocidade (a velocidade inicial é sorteada no

Gromacs). Esse algoritmo é considerado simples e eficiente para o uso na dinâmica molecular. Porém, uma desvantagem é o cálculo da posição e da velocidade em tempos diferentes.

3.7.6

Condições Periódicas de Contorno

As simulações são executadas com condições periódicas de contorno, a fim de evitar artefatos e eliminar efeitos de borda. Consiste em replicar o sistema para todas as direções do espaço e, quando uma partícula move-se, sua imagem periódica se move da mesma maneira. O número total de partículas no sistema é conservado. As condições periódicas de contorno permitem, por exemplo, a simulação de bicamadas de fosfolipídios infinitas, com 72 lipídios, permitindo a observação de propriedades experimentais desses lipídios (POURMOUSA; PASTOR, 2018).

3.7.7

Termostatos

Na dinâmica molecular, para manter a temperatura constante dos ensembles, utilizam-se termostatos que permitem controlar a temperatura do sistema durante o processo de simulação. Existem alguns tipos desses termostatos, tais como: Berendsen (BERENDSEN et al., 1984), Nosé-Hoover (EVANS; HOLIAN, 1985) e reescalonamento da velocidade (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007).

3.7.7.1

Termostato Berendsen

O controle da temperatura pode ser realizado através do termostato de Berendsen, que acopla ao sistema um banho térmico com uma temperatura fixa T_0 e uma cinética de primeira ordem (Equação 19).

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau} \quad \text{Eq. 19}$$

Para ajustar a energia cinética do sistema para a temperatura desejada, as velocidades são re-escaladas a cada passo de integração (BERENDSEN et al., 1984).

3.7.7.2

Termostato Nosé-Hoover

No termostato de Nosé-Hoover, o termo Hamiltoniano (Equação 20) é introduzido com grau de liberdade extra para um banho de calor. Esse termostato não é ergódico para um oscilador harmônico único (EVANS; HOLIAN, 1985).

$$\mathcal{H} = \sum_i \frac{P_i^2}{2m_i s^2} + \phi(Q) + \frac{P_s^2}{2M} + g k_B T \ln(s) \quad \text{Eq. 20}$$

onde $\phi(Q)$ corresponde ao potencial de interação com grau de liberdade extra (s). k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura de equilíbrio do sistema. M corresponde a escala de tempo da flutuação da temperatura. P_i^2 é o momento da partícula em Q e P_s^2 é o momento do grau de liberdade extra em s .

3.7.7.3

Termostato de reescalamento da velocidade

Para ocorrer a distribuição correta da energia cinética durante a simulação, é utilizado o termostato de reescalamento da velocidade (Equação 21).

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_T} + \left(\frac{K K_0^{\frac{1}{2}}}{N_f} \right) \frac{dW}{(\tau_T)^{1/2}} \quad \text{Eq. 21}$$

A energia cinética é dada por K , o número de graus de liberdade por N_f e dW corresponde ao processo de Wiener. τ_T é o parâmetro arbitrário

que tem a dimensão do tempo e determina a escala de tempo do termostato. Esse termostato não tem oscilações e reproduz o ensemble canônico sem erros (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007).

3.7.8

Barostatos

A pressão também pode ser mantida constante durante a simulação utilizando os barostatos de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) e Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981), que são os barostatos mais conhecidos.

3.7.8.1

Barostato de Berendsen

A cada n passos, o barostato de Berendsen faz um reescalamento das coordenadas e dos vetores de uma caixa, com o coeficiente de escalonamento μ (Equações 22 e 23).

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P(t)}{\tau_p} \quad \text{Eq. 22}$$

A pressão de referência é dada por P_0 , $P(t)$ é a pressão num tempo t e a constante de tempo do barostato é dado por τ_p .

Para o coeficiente de escalonamento μ , tem-se que:

$$\mu = 1 - \frac{n_{PC}\Delta t}{3\tau_p}\beta(P_0 - P(t)) \quad \text{Eq. 23}$$

onde β é a compressibilidade isotérmica para a água a pressão de 1 atm a 300 K que equivale a $4,6 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ e n_{PC} é o número de graus de liberdade (BERENDSEN et al., 1984).

3.7.8.2

Barostato Parrinello–Rahman

Para sistemas pequenos, as flutuações em pressão e volume são importantes. Portanto, é necessário um barostato mais forte como o Parrinello-Rahman (Equação 24).

$$\frac{d^2b}{dt^2} = VW^{-1}b^{-1}(P - P_{ref}) \quad \text{Eq. 24}$$

Nessa equação, o volume da caixa é dado por V e os vetores da caixa são representados por b . As pressões em um dado tempo t e a pressão de referência são dadas por P e P_{ref} , respectivamente. A força do acoplamento e a deformação de uma caixa são dadas por W^{-1} , que é a matriz inversa dos parâmetros de massa e pode ser definida pela Equação 25:

$$(W^{-1}) = \frac{4\pi^2\beta_{ij}}{3\tau_p^2L} \quad \text{Eq. 25}$$

onde β é a compressibilidade isotérmica, a constante de tempo do barostato é dada por τ_p e L é o maior comprimento da caixa (PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

A constante de tempo, nesse caso, é de 4 a 5 vezes maior que a constante de tempo para o barostato de Berendsen. Quando a pressão do sistema está muito longe do equilíbrio, podem ocorrer oscilações e o sistema pode colapsar. Uma das soluções é aumentar a constante de tempo do barostato e também utilizar o termostato de reescalonamento de velocidade, para atingir o equilíbrio do sistema com mais precisão.

3.7.9

Acoplamento de Tensão Superficial

Nos sistemas que possuem interfaces, pode-se acoplar a tensão superficial, um parâmetro de entrada, inserido nos acoplamentos de

pressão. Com a diferença entre a pressão normal e a pressão lateral do sistema, obtém-se a tensão superficial média. Quando se tem uma interface paralela ao eixo xy e a componente de pressão ao longo do eixo z, a tensão superficial é descrita conforme a Equação 26:

$$\gamma(t) = \frac{L_z}{n} \left\{ \frac{P_{xx}(t) + P_{yy}(t)}{2} \right\} \quad \text{Eq. 26}$$

Nessa equação, o termo L_z refere-se à altura da caixa e n é o número de partículas na superfície. No eixo z, a pressão é corrigida pelo escalonamento da altura da caixa pelo parâmetro μ_{zz} (Equações 27 e 28).

$$\mu_{zz} = 1 + \beta_{zz} \Delta P_{zz} \quad \text{Eq. 27}$$

$$\Delta P_{zz} = \frac{\Delta t}{\tau_p} \{P_{0zz} - P_{zz}(t)\} \quad \text{Eq. 28}$$

O fator de correção é utilizado para convergir a tensão superficial com o valor de tensão de referência γ_0 . A compressibilidade β_{zz} é mais significativa nesse caso, pois está diretamente relacionado com a convergência da tensão superficial. A tensão superficial corrigida é obtida quando os valores de β_{zz} e ΔP_{zz} são fixados em zero (BERENDSEN et al., 1984).

3.7.10

Soma de Ewald (PME)

A soma de Ewald (ESSMANN et al., 1995) foi desenvolvida para estimar as interações de dipolo nas células unitárias. A energia resultante das imagens periódicas das partículas é calculada a partir da Equação 29:

$$E = \frac{f}{2} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z} \sum_i^N \sum_j^N \frac{q_i q_j}{r_{ij,n}} (n_x, n_y, n_z) = n \neq 0 \quad \text{Eq. 29}$$

onde n corresponde ao número de imagens da célula unitária para cada coordenada.

A Equação 29 é dividida em três partes independentes (Equações 30, 31 e 32) para que a função de Ewald convirja mais rápido.

$$E_{curto} = \frac{f}{2} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z} \sum_i^N \sum_j^N \frac{q_i q_j}{r_{ij,n}} \text{erfc}(\beta r_{ij,n}) \quad \text{Eq. 30}$$

$$E_{longe} = \frac{f}{2\pi V} \sum_{i,j}^N q_i q_j \sum_{m_x} \sum_{m_y} \sum_{m_z} \frac{\exp(-(\frac{\pi m}{\beta})^2 + 2\pi i m (r_i - r_j))}{m^2} \quad \text{Eq. 31}$$

$$E_{próprio} = -\frac{f\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i^N q_i^2 \quad \text{Eq. 32}$$

A Equação 30 é de curto alcance, sendo calculada de forma direta. A Equação 31 de longe alcance, fornece a distribuição gaussiana sobre a energia e utiliza a transformada de Fourier. A Equação 32 é utilizada para manter a neutralidade de carga da célula unitária. β é o parâmetro direto e indireto do sistema. O volume da célula unitária é dado por V , e m é o número de células unitárias e q é a carga da partícula i .

3.7.11

LINCS

O algoritmo de restrição linear LINCS (HESS et al., 1997) foi desenvolvido para solucionar problemas de vibrações de ligações. Quando se tem períodos de vibrações menores do que o tempo utilizado na simulação, a partícula acaba afastando muito do seu comprimento ideal de ligação, ocorrendo a geração de energia que aquece o sistema. Esse processo é comum em partículas pequenas e de pouca massa, uma vez que o momento médio do sistema gera grande movimento das partículas. Para corrigir os comprimentos de ligação, é utilizado o método de LINCS que instaura a cada novo cálculo de posição o comprimento de ligação.

A Equação 33 demonstra o método de LINCS:

$$-m_i \frac{dr_i^2}{dt^2} = \frac{d}{dr} (V(r_i(t)) - k(t)g_k) \quad \text{Eq. 33}$$

O método aplica um potencial $V(r)$ para uma restrição k , um multiplicador Langrange $\lambda_k(t)$ com uma função de restrição $g_k = (r_a - r_b)^2 - d_k^2$. Os parâmetros r_a e r_b são as posições das partículas participantes da restrição e d_k é a distância ideal da ligação. O multiplicador Langrange é utilizado para não variar a energia total do sistema.

3.7.12

Amostragem guarda-chuva

A amostragem guarda-chuva (da tradução da expressão em inglês *Umbrella Sampling*) é uma técnica útil para analisar as interações das moléculas. Após o término da simulação, é gerada uma série de configurações entre as duas espécies que interagem ao longo da coordenada de reação (ξ). Uma dessas espécies é definida como referência, enquanto que a outra é fixada a uma distância do centro de massa da referência. As distâncias entre as duas espécies são chamadas de janelas de amostragem, que são executadas em simulações independentes. Em cada janela, os valores do potencial de força média (PMF) podem ser calculados (TORRIE; VALLEAU, 1977).

Através do cálculo do PMF, é possível obter informações sobre a energia livre do sistema. Durante a dinâmica molecular, o potencial é obtido através da integração da força média ao longo da coordenada de reação (ξ). Para obter dados precisos sobre a energia livre do sistema, é necessário que uma amostragem acurada seja realizada, a fim de garantir que as condições favoráveis e não favoráveis do sistema sejam contabilizadas (ROUX, 1995). Neste cenário, o método de amostragem guarda-chuva é uma abordagem capaz de garantir a precisão da amostragem, uma vez que são capturadas configurações suficientes para obter espaçamentos regulares entre as janelas, diminuindo o erro estatístico. A metodologia aborda a simulação de janelas de potenciais

de tendência. Este potencial limita as variações da coordenada (ξ) em intervalos a partir de um valor pré-estabelecido (TORRIE; VALLEAU, 1977). A Equação 34 apresenta um ensemble de tendência para uma função harmônica através dos valores de ξ_i .

$$W(\xi) = k_w(\xi - \xi_i)^2 \quad \text{Eq. 34}$$

Logo, a Equação 35 apresenta o potencial de tendência:

$$V_b(r_{ij}) = V(r_{ij}) + W(r_{ij}) \quad \text{Eq. 35}$$

A combinação das janelas é realizada através do método da análise do histograma ponderado (da tradução da expressão em inglês *Weighted Histogram Analysis Method* – WHAM) (KUMAR et al., 1992), que estima o erro da energia livre calculada.

3.7.13

Método da análise do histograma ponderado (WHAM)

O método da análise do histograma ponderado (KUMAR et al., 1992) é uma extensão do método descrito anteriormente. Este método fornece uma estimativa dos erros da amostragem, gerando valores de energias livres mais precisos. As distribuições de probabilidade podem ser sobrepostas, e então uma função de energia contínua pode ser derivada posteriormente, gerando melhores avaliações das energias livres e a minimização dos erros estatísticos (Equações 36 e 37).

$$P(\xi) = \frac{\sum_{i=1}^{N_w} g_i^{-1} h_i(\xi)}{\sum_{j=1}^{N_w} n_j g_j^{-1} \exp[-(\beta(w_j(\xi) - f_j))]} \quad \text{Eq. 36}$$

$$\exp(-\beta f_i) = \int d\xi \exp[-\beta(w_j(\xi))] P(\xi) \quad \text{Eq.37}$$

onde β é o inverso da temperatura $1/k_B T$, com a constante de Boltzmann sendo k_B e a temperatura T . n_j é o número total de pontos de dados no histograma. A ineficiência estatística g_i é dada por $g_i = 1 + 2\tau_i$ com o tempo de autocorrelação integrado τ_i da janela de guarda-chuva i (em

unidades do tempo de simulação). g_i pode ser cancelado das Equações 36 e 37 se (e somente se) os tempos de autocorrelação em todas as janelas forem iguais. Por outro lado, se os valores de g_i diferem entre diferentes histogramas, os fatores g_j^{-1} atribuem pesos menores aos histogramas com autocorrelações mais longas. $P(\xi)$ é a distribuição de probabilidade imparcial que está relacionada ao PMF (HUB; GROOT; SPOEL, 2010).

As quantidades constantes de energia livre f_j e a distribuição imparcial $P(\xi)$ são desconhecidas. Portanto, são resolvidas iterativamente. Dependendo do número de histogramas e da altura das barreiras no PMF, as Equações 36 e 37 geralmente convergem entre dezenas de iterações e dezenas de milhares de iterações (HUB; GROOT; SPOEL, 2010).

3.7.14

GROMACS

GROMACS é um acrônimo de GRONingen MACHine for Chemical Simulation. Foi desenvolvido pelos Departamentos de Biofísica e Química da Universidade de Groningen na Holanda, no início de 1990, como um sistema de computador voltado para a simulação molecular. É um programa de licença livre GNU-LGPL, sendo mantido por diversos centros de pesquisa. O software também possui diversas versões devido aos avanços computacionais e pelas necessidades em acompanhar os avanços nas pesquisas. É um programa versátil e eficiente voltado para simulações de moléculas biológicas em meios aquosos e em membranas. Ele funciona com os mais variados campos de força, como, por exemplo, os campos de força MARTINI, OPLS, GROMOS, AMBER e CHARMM. Por ser um programa rápido e robusto para realizar as simulações, tem sido utilizado nos mais variados campos de pesquisa (VAN DER SPOEL et al., 2005).

4

Metodologia

4.1

Modelo *Coarse Grained* do BP-100

A estrutura tridimensional do BP-100 (código pdb = 1D9L) foi inserida dentro de uma caixa com formato cúbico, com as dimensões de $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$, sob as condições periódicas de contorno, sendo a caixa preenchida com 3894 moléculas de água, usando o modelo TIP4P, com todo o sistema restante parametrizado para o campo de força OPLS-AA (HARRACH; DROSSEL, 2014; JORGENSEN et al., 1983; KAMINSKI et al., 2001; MARTINEZ; BORIN; SKAF, 2007). A minimização de energia do sistema foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, foi aplicado o algoritmo *steepest descent* com restrição de posição. Na segunda etapa, foi utilizado novamente o algoritmo *steepest descent*, mas sem a restrição de posição. O critério de convergência foi de $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. Utilizando o ensemble canônico (NVT), foi realizada a etapa de termalização do sistema durante 100 ps. O ensemble isotérmico-isobárico (NPT) foi utilizado para equilibrar a pressão e a temperatura do sistema durante 100 ps (BOSKO; TODD; SADUS, 2005). Com os sistemas minimizados e equilibrados, a dinâmica molecular foi realizada com restrição de posição para o peptídeo, para garantir melhor acomodação da água ao redor dos aminoácidos por um tempo de 500 ps. Por último, uma etapa de produção foi realizada com o tempo de 50 ns a 310 K e 1 bar de pressão, usando um tempo de integração de 2 fs, com as listas de pares sendo atualizadas a cada 5 passos. O *cut-off* para as interações de Lennard-Jones e Coulomb foi de 1,2 nm. Nessa etapa, foi utilizado o algoritmo *leap-frog* com o termostato *Nose-Hoover* (EVANS; HOLIAN, 1985) ($\tau = 0.5 \text{ ps}$) a 310 K e o barostato Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981) ($\tau = 2.0 \text{ ps}$) a 1 bar. Foram conferidas cargas positivas para todos os

resíduos Lys e cargas negativas para os resíduos Glu e Asp. O programa PyCGTOOL foi utilizado para converter o modelo atomístico do BP-100 para o modelo *coarse grained* (Figura 6), parametrizado para o campo de força Martini 2.2 (DE JONG et al., 2013; MARRINK et al., 2007; MONTICELLI et al., 2008).

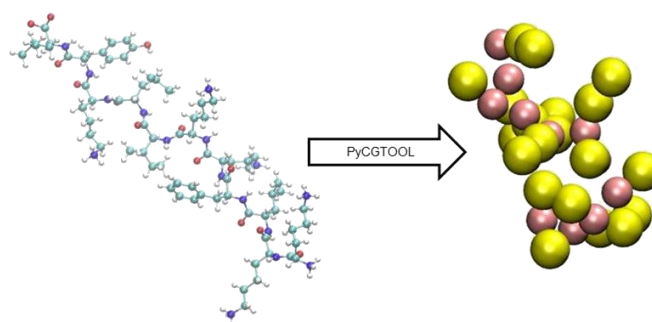


Figura 6. Representação do modelo do BP-100 atomístico do PDB (à esquerda) e seu respectivo modelo *coarse grained* (à direita).

4.2

Preparação da AuNP com o BP-100

Para construir a nanopartícula de ouro (AuNP) esférica, foi utilizado o software OPENMD (<http://openmd.org>) (BHATTARAI et al., 2019), sendo o raio da nanopartícula definido como 1,5 nm. A constante de rede para o ouro foi de 4,08 Å. A estrutura da nanopartícula de ouro possui o tipo de grão C5 com a restrição de ligação Au-Au como ligação rígida (HOSSAIN et al., 2019). Em seguida, 5 nanopartículas foram construídas e denominadas como AuNP/BP100, AuNP/PEG, AuNP/BP100/PEG, AuNP/BP100/PEG-b-PS e AuNP/ BP100/PS. As duas primeiras nanopartículas (AuNP) foram revestidas apenas com BP100 e apenas com polietilenoglicol (PEG), respectivamente. Enquanto que as outras foram colocadas para adsorver 5 moléculas de BP-100 na superfície da AuNP e revestidas com os modelos *coarse grained* de polietilenoglicol (PEG) (GRUNEWALD et al., 2018), poliestireno (PS) (ROSSI et al., 2011) e o copolímero em bloco PEG-b-PS (GRUNEWALD et al., 2018). Para o encapsulamento, os polímeros foram utilizados. As nanopartículas de

ouro foram construídas apenas com o PEG e o BP-100, para verificar o efeito do revestimento e do peptídeo ao atravessar o modelo de surfactante pulmonar. O modelo *coarse grained* do PEG (Figura 7) tem um peso molecular de 1206 g mol^{-1} , ou seja, existem 26 unidades de monômeros em cada modelo. O modelo *coarse grained* do PS (Figura 7) tem o peso molecular de 10400 g mol^{-1} com 100 unidades de monômeros em cada modelo. O modelo do copolímero em bloco PEG-b-PS (Figura 7) tem o peso molecular de 2114 g mol^{-1} , com 10 unidades de monômeros do PS e 23 unidades de monômeros do PEG para cada modelo. Os parâmetros foram retirados do site MARTINI (<http://cgmartini.nl/index.php/force-field-parameters/polymers>). A composição de cada nanopartícula estudada está descrita na Tabela 1 a seguir.

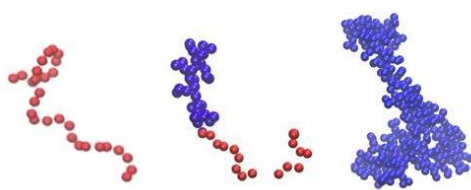


Figura 7. Representação dos polímeros utilizados como revestimentos: PEG (à esquerda), PEG-b-PS (ao centro) e PS (à direita).

Tabela 1. Composição de cada modelo de nanopartícula estudada

Sistemas	Composição				
	AuNP	BP100	PEG	PEG-b-PS	PS
BP100-PEG		5	15		
AuNP-BP100	1	5			
AuNP	1				
AuNP-PEG	1		10		
AuNP-BP100-PEG	1	5	15		
AuNP-BP100-PEG-b-PS	1	5		10	
AuNP-BP100-PS	1	5			3

As nanopartículas que foram construídas com o peptídeo tiveram o padrão de 5 moléculas do mesmo. A variação na quantidade de revestimento na composição de cada nanopartícula ocorreu devido a capacidade do recobrimento e a forma final das mesmas. Nota-se que a

quantidade de PS foi muito menor do que a de PEG, devido ao volume do polímero ser maior. O recobrimento com o copolímero também ocorreu com menos moléculas, devido à estrutura do mesmo. O recobrimento apenas da nanopartícula foi efetivo com as 10 moléculas de PEG. Porém, quando se recobriu apenas o peptídeo, necessitou-se de mais moléculas do polímero para recobrir toda a superfície das 5 moléculas do mesmo. Todas as nanopartículas apresentaram aproximadamente 6 nm de diâmetro.

O modelo de surfactante pulmonar contendo a SP-B, utilizado neste trabalho, foi construído e parametrizado em trabalhos prévios do grupo publicados em periódicos especializados (SOUZA et al., 2020; SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019).

4.3

Simulação de transposição das nanopartículas no modelo de surfactante pulmonar

O modelo da monocamada do surfactante pulmonar CUROSURF[®] com a SP-B foi construído e composto pelos fosfolipídios DPPC, POPC, POPG, POPE, DPPS, DPPI, LPC, DPSM. A composição do filme encontra-se no apêndice A. Os modelos dos lipídios seguiram o padrão do campo de força Martini 2.2 (BAOUKINA et al., 2014a; DE JONG et al., 2013; MARRINK et al., 2007; MONTICELLI et al., 2008; PERIOLE; MARRINK, 2013). As definições dos lipídios e as regras de construção em bloco foram obtidas através do lipidoma MARTINI (MARRINK et al., 2007; MARRINK; DE VRIES; MARK, 2004; MONTICELLI et al., 2008; WASSENAAR et al., 2015). O script INSANE (WASSENAAR et al., 2015) foi usado para construir a bicamada contendo 1021 lipídios em cada monocamada. O programa gmx editconf foi utilizado para concatenar as monocamadas em um sistema simétrico separado por 12 nm. A caixa de água foi construída utilizando o programa gmx solvate, com dimensões de 25 x 25 x 12 nm³ e inserida entre as duas monocamadas. A caixa de água contém em torno de 52356 moléculas de água no padrão do modelo

coarse grained para a densidade da água de 1 kg L^{-1} . O sistema também contém 12 nm de vácuo acima da monocamada superior e abaixo da monocamada inferior. Importante mencionar que a fase gasosa é representada pelo vácuo no modelo do surfactante pulmonar. O plano lipídico foi colocado paralelo ao plano xy do sistema e os lipídios foram orientados com as cabeças polares direcionadas para a fase aquosa. Todo o sistema possui o tamanho de $25 \times 25 \times 40 \text{ nm}^3$, sendo repetido periodicamente em todas as direções (ESTRADA-LÓPEZ et al., 2017). As cargas do sistema foram neutralizadas através do programa gmx genion, substituindo as moléculas do solvente por íons (Na^+ e Cl^-).

O modelo do surfactante pulmonar CUROSURF[®], com a representação da SP-B, foi utilizado para construir 7 diferentes sistemas, cada um contendo 1 nanopartícula de ouro previamente construída (tópico 4.2), incluindo um sistema contendo apenas a AuNP. As nanopartículas foram inseridas no vácuo a 6 nm do topo da monocamada superior do modelo de surfactante. Os sistemas contendo BP-100 tiveram suas cargas neutralizadas devido aos aminoácidos carregados. Todos os sistemas foram submetidos às mesmas etapas descritas a seguir. A etapa de minimização de energia dos sistemas utilizou o algoritmo *steepest descent* com o critério de convergência de $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ ou um número máximo de 200 mil etapas. Os sistemas foram submetidos a uma etapa de equilíbrio de 200 ns usando o ensemble NPT (BOSKO; TODD; SADUS, 2005), restringindo a posição da nanopartícula no vácuo. Cada monocamada, o modelo de SP-B, as moléculas de água e a nanopartícula foram acopladas separadamente. A temperatura foi controlada usando o termostato de reescalonamento de velocidade (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) a 310 K com uma constante de tempo de 1 ps. A pressão foi controlada usando o barostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) com uma tensão superficial γ de 20 mN m^{-1} (pressão superficial de 53 mN m^{-1}) e a pressão de 1 bar no eixo Z com uma constante de tempo de 3 ps. A compressibilidade foi de $4.5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ no plano xy e 0 no eixo Z. Na etapa de produção da dinâmica molecular, as nanopartículas foram liberadas para verificar se eram capazes de

permeiar espontaneamente o modelo de monocamada. As simulações variaram de 1 a 2 μs dependendo do sistema. Esses tempos foram mais que o suficiente para observar se as nanopartículas são transferidas da fase ar para a fase água. O tempo de integração, a atualização da lista de vizinhos, a constante dielétrica relativa, o cut-off para as interações de Coulomb e Lennard-Jones, a temperatura, a tensão superficial e a pressão no eixo Z permaneceram os mesmos da etapa NPT para todos os sistemas. Para os sistemas onde não ocorreu a penetração das nanopartículas através da monocamada, a nanopartícula foi empurrada ao longo do eixo z por 200 ns da fase ar para a fase aquosa. O mesmo protocolo aplicado anteriormente na fase de produção foi aplicado para simulações de arraste, porém, um potencial harmônico com a constante de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ e uma taxa de arraste de $0,08 \text{ nm ns}^{-1}$ foi aplicado sobre as nanopartículas.

4.4

Método de amostragem guarda-chuva (*Umbrella Sampling*)

Para calcular a energia livre de Gibbs da transferência da nanopartícula da fase ar para a água (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019; SOUZA et al., 2018) foi utilizado o método de amostragem guarda-chuva (LAING; BAOUKINA; TIELEMAN, 2009; LEMKUL; BEVAN, 2010; TORRIE; VALLEAU, 1977). A distância do centro de massa entre o grupo das nanopartículas e o grupo dos fosfatos da monocamada foi usada como referência para amostragem. A partir dessas trajetórias, foram tiradas amostras instantâneas para gerar as configurações iniciais das janelas de amostragem ao longo da coordenada da reação ξ . A amostragem começa no ar e termina na distância máxima do centro da fase aquosa, usando uma distribuição de janelas igualmente espaçada de 0,2 nm. Em cada amostragem, uma etapa de equilíbrio de 10 ns e uma simulação de dinâmica molecular de 50 ns foram realizadas usando o mesmo tempo de integração, a atualização da lista de vizinhos, a constante dielétrica relativa, o cut-off para as interações de Coulomb e

Lennard-Jones, a temperatura, a tensão superficial e a pressão no eixo Z da simulação anterior. Além disso, foi utilizado um potencial harmônico com constante de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ e a energia da configuração inicial do sistema foi definida como zero. O cálculo do perfil energético e a análise de erros foram realizados com o método de análise de histograma ponderado (WHAM) (HUB; GROOT; SPOEL, 2010; KUMAR et al., 1992; STELZL et al., 2017) e com o método de reamostragem *bootstrap* (KUMAR et al., 1992). A amostragem de guarda-chuva foi aplicada a todos os sistemas onde não houve colapso da monocamada.

4.5

Análises

4.5.1

Área por lipídio

A área por lipídio foi calculada usando o programa GridMAT-MD, que realiza a avaliação dos vetores x e y da caixa ao longo do tempo de simulação. Em seguida, foi dividida pelos 1021 fosfolipídios contidos na monocamada (ALLEN; LEMKUL; BEVAN, 2009; MARRINK et al., 2007; MARRINK; DE VRIES; MARK, 2004).

Para fins de comparação, a área também foi calculada pelo método suAVE (SANTOS et al., 2019). Esse método particiona a área da monocamada em vários pontos, formando uma rede retangular e, de cada metade triangular dos pontos que formam a rede, é então calculada a área. A área da rede retangular (A_{ij}) é a soma das áreas A_1 e A_2 (Equação 38) e a área total da superfície compreende a soma das áreas de cada partição Equação 39:

$$A_{ij} = A_1 + A_2 \quad \text{Eq. 38}$$

$$A = \sum_{i=1}^{\text{bin}} \sum_{j=1}^{\text{bin}} A(i, j) \quad \text{Eq.39}$$

4.5.2

Difusão Lateral

O coeficiente de difusão lateral (D) dos lipídios da monocamada do modelo de surfactante pulmonar, onde foi permeada a nanopartícula, foi calculado a partir do deslocamento quadrático médio (MSD) ao longo do tempo (Equação 40):

$$D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{4t} \langle \|R(t + t_0) - R(t_0)\|^2 \rangle \quad \text{Eq. 40}$$

onde $R(t)$ é o vetor da posição para o centro de massa de cada lipídio. O deslocamento quadrático médio foi calculado ao longo do tempo para todos os lipídios. D foi estimado usando o ajuste dos dados. A análise de erro foi realizada através da diferença dos Ds calculados a partir de ajustes ao longo de duas metades do intervalo de ajuste.

4.5.3

Parâmetro de Ordem

O parâmetro de ordem lipídica (S_z) está relacionado à orientação espacial dos lipídios em média ao longo do tempo e em todos os grãos, permitindo uma descrição completa da organização molecular da monocamada de surfactante pulmonar e correlacionando-se com o grau de ordem usando a Equação 41 a seguir.

$$S_z = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle \quad \text{Eq. 41}$$

onde θ é o ângulo entre a ligação e a membrana normal, a direção perpendicular emerge do plano xy do modelo de surfactante pulmonar. O parâmetro de ordem $S_z = +1$ significa que as ligações estão totalmente paralelas à normal da membrana, $S_z = -0,5$ significa que as ligações estão totalmente perpendiculares em relação à normal da membrana.

4.5.4

Função de Distribuição Radial

As monocamadas são sistemas semi-isotrópicos. Para avaliar a interação do BP-100 com os fosfolipídios da monocamada, fez-se o estudo da função de distribuição radial. A função de distribuição radial é dada por $g_{AB}(r)$ entre as partículas do tipo A e B conforme a (Equação 42).

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad \text{Eq. 42}$$

onde $\langle \rho_B(r) \rangle$ representa a densidade da partícula B à uma distância r ao redor das partículas A, $\langle \rho_B \rangle_{local}$ representa a média da densidade da partícula B sobre todas as esferas em torno da partícula A com raio máximo. O raio máximo normalmente é a metade do comprimento da caixa. No GROMACS, o programa `gmx_rdf` divide o sistema em fatias esféricas de r para $r + dr$, fornecendo um histograma no lugar da função δ .

4.5.5

Perfil Z

A localização do BP-100 durante o tempo de simulação foi avaliada pelo perfil Z, através do programa `gmx_traj`. Esse comando plota a coordenada Z do centro de massa do peptídeo em relação ao centro de massa do grupo fosfato dos fosfolipídios.

Resultados e Discussões

Após as simulações, análises visuais dos sistemas foram realizadas através do programa VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). Foram observados que dois sistemas estudados (AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG) não apresentaram colapso, sendo então avaliada a energia livre de Gibbs da transposição da nanopartícula da fase gasosa para a fase aquosa através do método de amostragem guarda-chuva. Para os demais sistemas, que serão discutidos em suas respectivas seções, não foi possível calcular a energia livre de Gibbs da transposição da nanopartícula, devido ao colapso do filme no momento em que ocorreu a transposição da nanopartícula. A Tabela 2 mostra os dados da análise visual e também os valores dos perfis energéticos dos sistemas estudados.

A nanopartícula de ouro também foi avaliada quanto à polaridade dos grãos e quanto à influência na energia livre de Gibbs. Originalmente, a nanopartícula de ouro possui grãos C5, que é aquele grão com maior polaridade dos grãos C. Posteriormente, este grão foi alterado para C1 e C3. O grupo terminal hidroxila (-OH) do PEG foi modificado para o grupo tiol (-SH) em uma extremidade da cadeia polimérica, a fim de se também avaliar a influência na energia livre de Gibbs.

Tabela 2. Análise visual e a energia livre de Gibbs (ΔG) da transposição da nanopartícula da fase gasosa para a fase aquosa de cada sistema estudado.

Sistema	Análise Visual (VMD)	ΔG (kcal mol ⁻¹)
BP100-PEG	Colapsou	>100
AuNP-BP100	Colapsou	>100
AuNP	Colapsou	>100
AuNP-PEG	Permeou	-214
AuNP-BP100-PEG	Permeou	-223
AuNP-BP100-PEG-b-PS	Colapsou	>100
AuNP-BP100-PS	Colapsou	>100

5.1

Composição dos sistemas

O modelo de surfactante pulmonar (SOUZA et al., 2020; SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019), está apresentado na Figura 8. A imagem mostra as monocamadas com a proteína SP-B do surfactante pulmonar com uma padronização de cores.

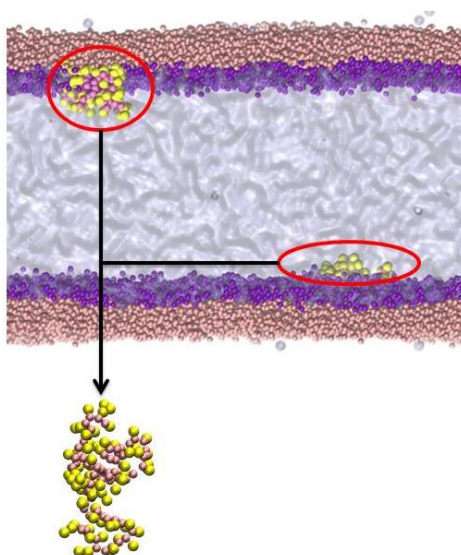


Figura 8. Representação do modelo de surfactante pulmonar com a proteína SP-B (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019). As esferas rosas (forte) representam as caudas apolares e as roxas representam as cabeças polares dos fosfolípidios. A fase aquosa é representada pela região roxa transparente. A proteína SP-B está circundada em vermelho em uma conformação deitada na interface água-monocamada. A seta indica outra conformação da SP-B, para melhor visualização. A SP-B é representada por esferas amarelas (corresponde aos aminoácidos Val, Thr, Tyr, Ser, Pro, Met, Leu, Ile, Trp, Cys, Gln, Ala) e rosas claras (corresponde aos aminoácidos Lys, Arg, Glu, Asp)

5.2

Sistema BP100-PEG

O BP-100 apresenta afinidade por fosfolipídios carregados negativamente, devido às cargas positivas (+6) em sua estrutura (CARRETERO et al., 2018; PARK et al., 2019; ZAMORA-CARRERAS et al., 2016), podendo interagir com o modelo de surfactante pulmonar. É importante mencionar que existem 73 fosfolipídios carregados negativamente na composição do modelo do surfactante pulmonar (CUROSURF[®]), distribuídos entre os fosfolipídios POPG, DPPI e DPPS (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019).

Para realizar o estudo da transposição do BP-100, o carreador polimérico PEG foi inicialmente utilizado, a fim de avaliar a estabilidade do sistema e a espontaneidade do processo. No estudo, observou-se que a nanopartícula BP100-PEG, ao permear a membrana lipídica (Figuras 9 A e B) e atingir a fase aquosa, se decompõe liberando as moléculas do PEG e BP-100 (Figura 9 C). Consequentemente, o BP-100 passou a interagir com os fosfolipídios da monocamada.

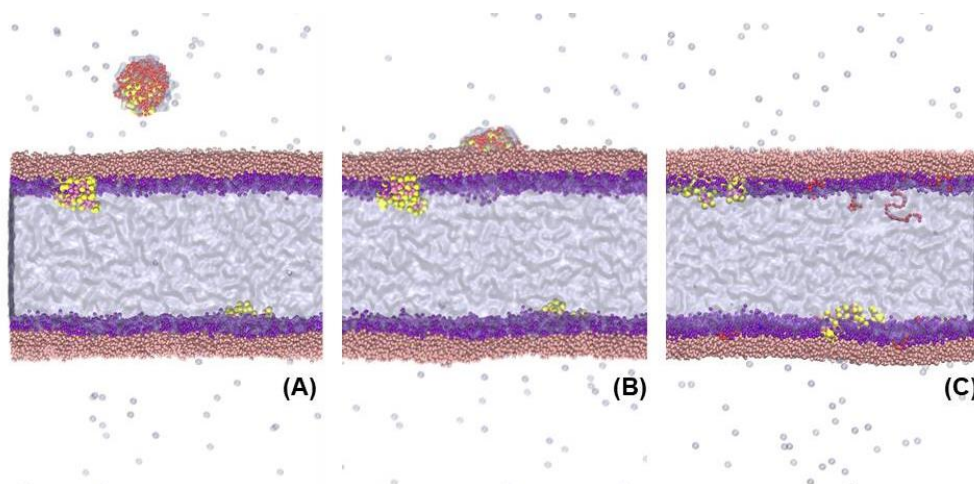


Figura 9. Representação do sistema BP100-PEG durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹, no vácuo (A), na monocamada (B) e na fase aquosa (C). As esferas em vermelho representam o PEG.

O gráfico de perfil Z (Figura 10) mostra o comportamento da nanopartícula ao longo da coordenada Z do sistema. Ele apresenta o momento em que a nanopartícula atingiu a monocamada e realizou a transposição através da monocamada inferior. Observa-se também que as moléculas de PEG permearam a monocamada e atingiram a fase aquosa permanecendo nela até o final da simulação de 1 μ s (1000 ns). No entanto, as moléculas do BP-100 permeiam a monocamada e interagem com as cabeças polares dos fosfolipídios durante todo o tempo de simulação. Ao avaliar o gráfico de função de distribuição radial (Figura 11) entre o BP-100 e os fosfolipídios, observou-se um pico acentuado seguido de um pico menor em relação aos fosfolipídios carregados negativamente (POPG, DPPI e DPPS). O primeiro pico são os primeiros vizinhos, enquanto que o segundo pico são os segundos vizinhos de fosfolipídios que interagem com o BP-100. Essa interação ocorre devido à atração das cargas negativas dos fosfolipídios com as cargas positivas do BP-100. Para os demais fosfolipídios que compõem o filme (DPPC, POPC, POPE, DPSM e LPC), não se observou a mesma organização.

Portanto, o resultado comprova a afinidade do peptídio pelos fosfolipídios que contém cargas negativas em sua estrutura.

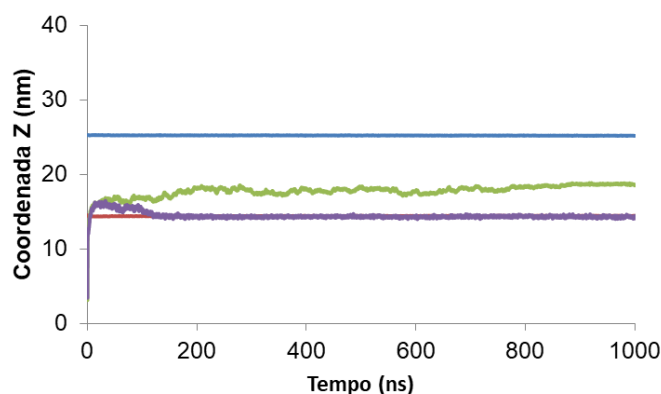


Figura 10. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula BP100-PEG através do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . Monocamada inferior (vermelho), monocamada superior (azul), PEG (verde) e BP-100 (roxa).

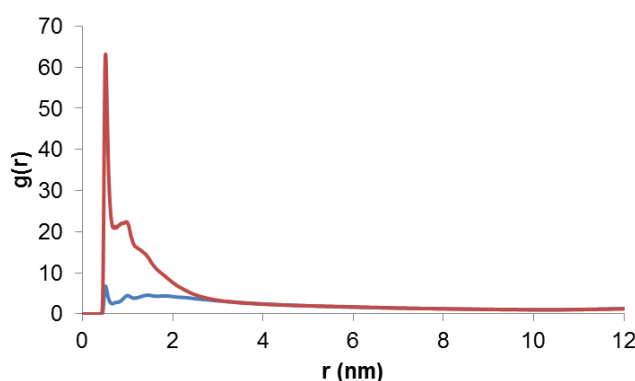


Figura 11. Gráfico da função de distribuição radial entre o BP-100 e os fosfolipídios que compõem a monocamada do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF, a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} .

Fosfolipídios carregados negativamente: POPG, DPPI e DPPS (vermelho), demais fosfolipídios DPPC, POPC, POPE, LPC, DPSM (azul).

Para avaliar a energia livre de Gibbs da transposição do BP100-PEG da fase gasosa para a fase aquosa, foi realizada a simulação direcionada, com o tempo de 200 ns, aplicando uma constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ sobre a nanopartícula, o valor da constante de força está relacionado com a maior capacidade de se abranger o espaço amostral. Porém, ao passar da fase intermediária (Figura 12 B) para a fase aquosa (Figura 12 C), observou-se que, a nanopartícula se desfez, liberando as moléculas de BP-100, que migraram para as monocamadas e arrastaram os fosfolipídios para a fase aquosa, acarretando o colapso do filme (Figura 12 C).

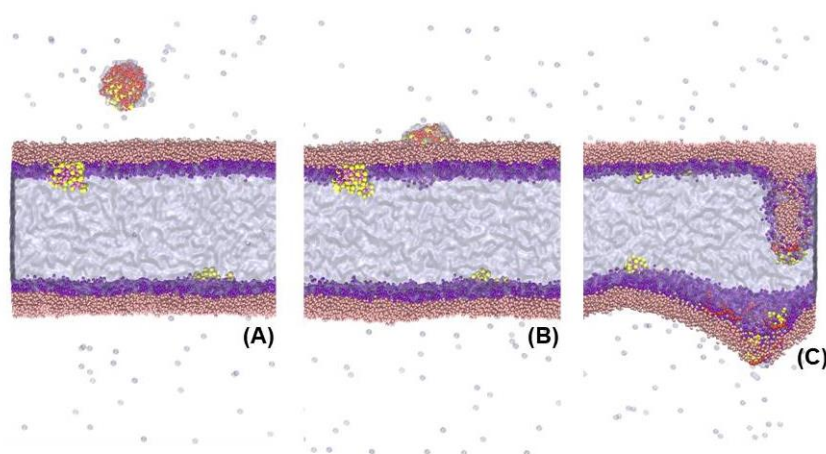


Figura 12. Representação do sistema BP100-PEG durante a simulação de $1 \mu\text{s}$ da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} , no vácuo (A), na monocamada (B) e após a simulação de 200 ns com a constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ quando ocorre o colapso (C).

As cargas que compõem o peptídeo BP-100 propiciam as interações eletrostáticas com as cabeças polares dos fosfolipídios, induzindo o colapso do filme. O mesmo foi observado por Souza e colaboradores (2018), ao realizarem um estudo com os modelos de peptídios

antimicrobianos LL-37, CATH-2 e SMAP-29 para a transposição dos mesmos em um modelo de surfactante pulmonar contendo DPPC, POPC, POPG, POPE e colesterol. Esses peptídios também possuem cargas positivas em suas estruturas e a transposição dos mesmos, através do modelo de surfactante pulmonar, mostrou que ocorreram fortes interações entre os peptídios e as caudas apolares dos fosfolipídios, e os mesmos não chegaram à fase aquosa do sistema. No entanto, quando os peptídios foram encapsulados com colato de sódio, que é outra estratégia para a administração de fármacos nos alvéolos pulmonares, as interações reduziram e a transposição ocorreu de forma efetiva (SOUZA et al., 2018).

Em outro estudo realizado, com o modelo de peptídio beta-defensina 3 humana (HBD-3), Souza e colaboradores (2019) observaram que esse peptídio também apresentou interações eletrostáticas com os fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®, devido às cargas positivas que o peptídio apresenta. Porém, essas interações, não afetaram a espontaneidade da transposição. Quando o peptídio foi encapsulado com PEG, as interações reduziram e a permeação ocorreu com mais facilidade (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019).

No estudo dos peptídios LL-37, CATH-2 e SMAP-29, as cargas influenciaram no processo da transposição, assim como no caso do BP-100. No entanto, o peptídio HBD-3 não apresentou o mesmo comportamento. Esses resultados indicam que fatores como tamanho, estrutura e forças intermoleculares também podem influenciar na permeação e espontaneidade do processo (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019; SOUZA et al., 2018).

5.3

Sistema AuNP-BP100

Outra possibilidade de carrear o BP-100 no modelo de surfactante pulmonar é através das nanopartículas de ouro. Portanto, um sistema contendo 5 moléculas do BP-100 adsorvidos na superfície de uma nanopartícula de ouro foi construído (Figura 13 A). Através do gráfico do

perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 18 A), pôde-se notar a interação da nanopartícula com as caudas apolares dos fosfolipídios durante todo o tempo de simulação de 1 μs (1000 ns). Ou seja, a nanopartícula atingiu a monocamada (Figura 13 B) e não chegou à fase aquosa. O gráfico de função de distribuição radial entre os aminoácidos (polares e apolares) e as caudas dos fosfolipídios (Figura 14) mostra que ocorre uma maior interação entre os aminoácidos apolares com as caudas dos fosfolipídios, enquanto que, neste caso, os aminoácidos polares interagem com a nanopartícula de ouro.

A simulação direcionada (tempo de 200 ns e constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$) para avaliar a espontaneidade do sistema, mostrou que a nanopartícula arrastou os fosfolipídios para a fase aquosa, ocorrendo o colapso do filme de surfactante pulmonar (Figura 13 C). Nesse sistema, o colapso ocorreu devido às interações entre o BP-100 com as caudas apolares dos fosfolipídios e a contribuição das interações da nanopartícula de ouro, que também possui características hidrofóbicas, conforme a polaridade do seu grão (C5).

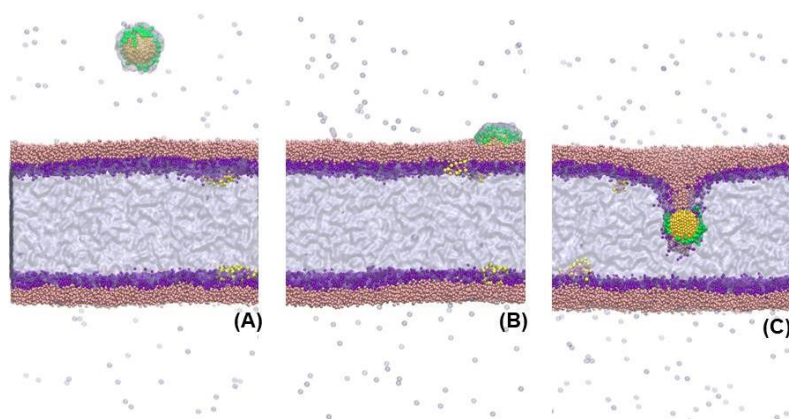


Figura 13 Representação do sistema AuNP-BP100 durante a simulação de 1 μs da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} , no vácuo (A), na monocamada (B) e após a simulação de 200 ns com a constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ quando ocorre o colapso (C).

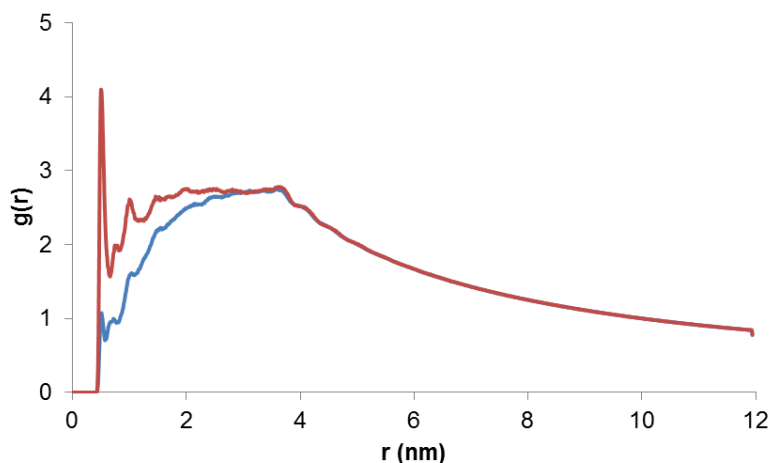


Figura 14. Gráfico da função de distribuição radial entre os aminoácidos polares (azul) e apolares (vermelho) do BP-100 e as caudas dos fosfolipídios que compõem a monocamada do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF, a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} .

5.4

Sistema AuNP

Para esse sistema, somente a transposição da nanopartícula de ouro foi realizada (Figura 15 A), para avaliar o efeito da mesma no modelo de surfactante pulmonar. A região de preferência da nanopartícula pôde ser observada no gráfico do perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 18 B). Por apresentar característica hidrofóbica, a mesma interagiu com as caudas apolares dos fosfolipídios da monocamada. Estudos realizados por Lin e colaboradores (2014) e Xu e colaboradores (2017) também mostraram que nanopartículas de ouro com caráter hidrofóbico interagiram com as caudas dos fosfolipídios da monocamada do modelo de surfactante pulmonar (LIN et al., 2014; XU et al., 2017).

No sistema AuNP, também ocorreram interações com a região das cabeças polares dos fosfolipídios. Essas interações se devem ao fato do grão C5 possuir menor repulsão pela água. Importante mencionar que a nanopartícula não atingiu a fase aquosa do sistema durante os 500 ns de simulação (Figura 15 A e B). A simulação direcionada (tempo de 200 ns e constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$) realizada, demonstrou que a

nanopartícula arrastou os fosfolipídios para a fase aquosa, ocorrendo o colapso do filme de surfactante pulmonar (Figura 15 C).

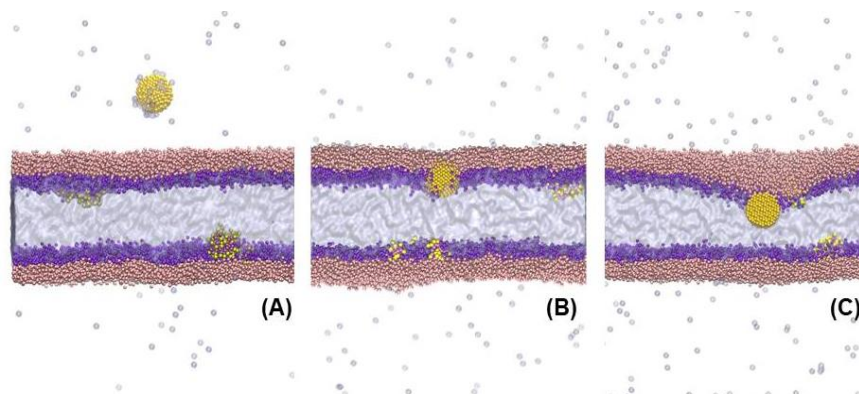


Figura 15. Representação do sistema AuNP durante a simulação de 500 ns da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão de 20 mN m^{-1} , no vácuo (A), na monocamada (B) e após a simulação de 200 ns com a constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ quando ocorre o colapso (C).

5.5

Sistema AuNP-PEG

As interações entre a nanopartícula de ouro e os fosfolipídios da membrana do modelo de surfactante pulmonar, não permitiram a transposição da mesma até a fase aquosa do sistema. A utilização de algum revestimento se mostrou necessário, para possibilitar sua transposição no modelo de surfactante pulmonar. Como o peptídeo permeia a membrana quando encapsulado com o PEG, optou-se então por avaliar o comportamento da nanopartícula de ouro, também encapsulada pelo PEG (Figura 16 A).

Ao ser avaliado o gráfico do perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 18 C), observou-se que a nanopartícula permeia o filme de surfactante pulmonar através da monocamada inferior. Esta permeação ocorreu em menos de 100 ns de simulação. Quando a nanopartícula chegou à fase aquosa, a mesma permaneceu nessa região durante todo o tempo de $1 \mu\text{s}$ de simulação (1000 ns), não se aproximando das

monocamadas. Portanto, a permeação ocorreu de forma espontânea (Figuras 16 B e C); logo, não houve necessidade de realizar a simulação direcionada. O comportamento desta nanopartícula está relacionado com a facilidade do PEG em reduzir as interações entre a nanopartícula e os fosfolípidios, permitindo a permeação da mesma na monocamada. Desta forma, a transposição desta nanopartícula não colapsou o modelo de surfactante pulmonar como visto nos sistemas discutidos anteriormente.

Estudos demonstraram que, o tamanho da cadeia polimérica do PEG também influencia na transposição das nanopartículas. Quanto maior a cadeia polimérica (a partir de 10 unidades de monômeros), a nanopartícula de ouro apresenta mais facilidade em permear a membrana (BAI; LI; HU, 2020). O modelo de PEG utilizado neste estudo possui 26 unidades de monômeros.

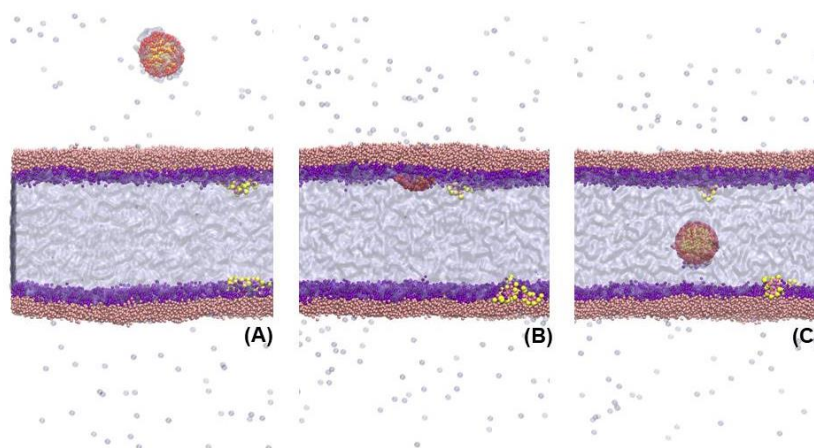


Figura 16. Representação do sistema AuNP-PEG durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹, no vácuo (A), na monocamada (B) e na fase aquosa (C).

5.6

Sistema AuNP-BP100-PEG

Como foi possível permear a nanopartícula de ouro com o PEG, uma nova nanopartícula foi construída, contendo a nanopartícula de ouro, o BP-100 e o PEG. Nesse sistema, o BP-100 foi adsorvido na superfície da nanopartícula e então encapsulado com o PEG (Figura 17 A).

O gráfico do perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 18 D), mostrou que a nanopartícula permeia o filme de surfactante pulmonar através da monocamada inferior. Esta permeação ocorreu em menos de 100 ns de simulação, e a nanopartícula permaneceu próxima dos fosfolipídios durante todo o tempo de 2 μ s de simulação (2000 ns). Acredita-se que essa aproximação possa ter ocorrido devido as interações do PEG e os aminoácidos polares do BP-100 com as cabeças polares dos fosfolipídios. A simulação deste sistema ocorreu em um tempo maior, para ser avaliada a estabilidade do filme e da nanopartícula. Neste sistema, a permeação ocorreu de forma espontânea (Figuras 17 B e C), portanto não foi necessário realizar a simulação direcionada. Esse resultado demonstra que o PEG é capaz de reduzir as interações da nanopartícula e do BP-

100, permitindo a permeação da mesma na monocamada, sem provocar o colapso do filme.

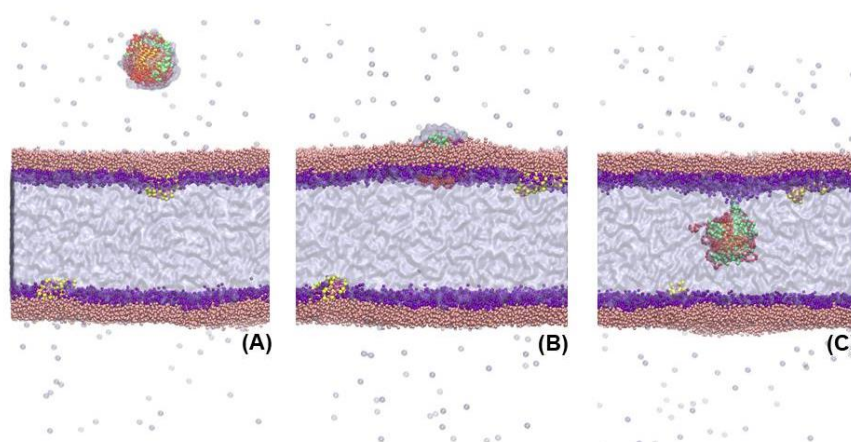


Figura 17. Representação do sistema AuNP-BP100-PEG durante a simulação de 2 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} no vácuo (A), na monocamada (B) e na fase aquosa (C).

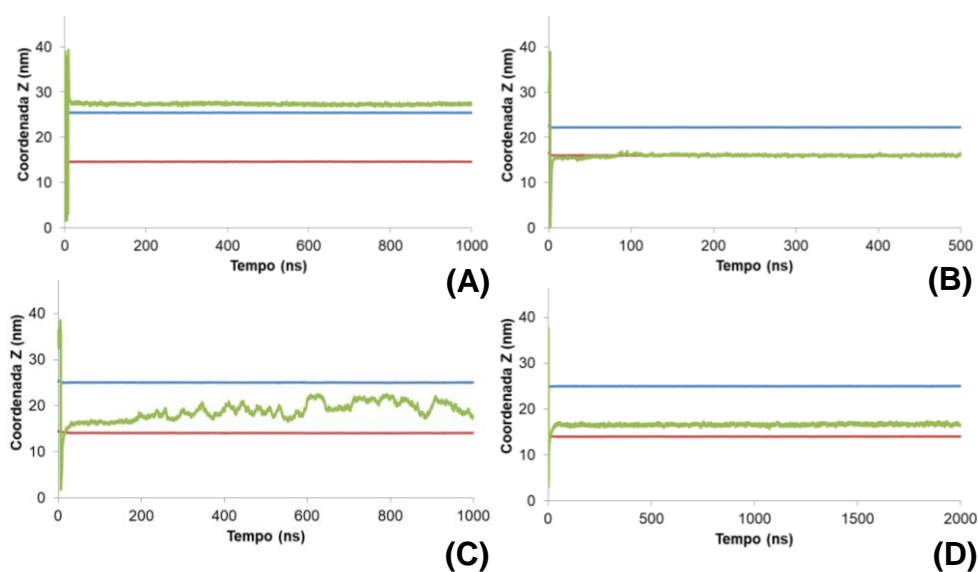


Figura 18. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula AuNP-BP100 (A), durante 1 μ s de simulação, AuNP (B), durante 500 ns de simulação, AuNP-PEG (C), durante 1 μ s de simulação, e AuNP-BP100-PEG (D), durante 2 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . Monocamada inferior (vermelho), monocamada superior (azul) e a nanopartícula com o BP-100 adsorvido (verde).

5.7

Perfis energéticos e estabilidade dos filmes dos sistemas AuNP-PEG e AuNP-PEG-BP100

5.7.1

Método de amostragem guarda-chuva

Nos dois sistemas que apresentaram espontaneidade na transposição da nanopartícula, a simulação direcionada (tempo de 200 ns e constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$) foi realizada para avaliar o comportamento energético da transposição das nanopartículas. O perfil de energia (Figura 19) apresenta o valor de aproximadamente $-214,20 \pm 0,72 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a transposição da nanopartícula AuNP-PEG e aproximadamente $-223,37 \pm 1,28 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a nanopartícula AuNP-BP100-PEG, através do modelo de surfactante pulmonar. A nanopartícula AuNP-PEG atravessa uma barreira energética de aproximadamente $25,18 \pm 0,67 \text{ kcal mol}^{-1}$ para transpor as interações com os fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar. A interação da nanopartícula AuNP-BP100-PEG com os fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar, gerou uma barreira energética de aproximadamente $21,13 \pm 0,13 \text{ kcal mol}^{-1}$. Observa-se que no sistema composto pela AuNP-PEG, a barreira energética foi maior, esse comportamento pode estar relacionado com as características hidrofóbicas da nanopartícula e, as interações com os fosfolipídios, que ocorreram no momento da permeação. Quando ocorreu a transposição do sistema composto pela AuNP-BP100-PEG, a diminuição da barreira energética pode estar relacionada com as interações do BP-100 com a nanopartícula de ouro, conferindo carga à mesma, além do PEG reduzir as interações do peptídeo com os fosfolipídios e, o mesmo ter afinidade com a água.

Por outro lado, Souza e colaboradores (2018) observaram que o peptídeo CATH-2, quando encapsulado com o colato de sódio, apresentou uma barreira energética menor, próxima a 17 kcal mol^{-1} , sob a tensão superficial de 30 mN m^{-1} , no modelo de surfactante pulmonar contendo

DPPC, POPC, POPG, POPE e colesterol (SOUZA et al., 2018). O peptídeo HBD-3 (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019), quando encapsulado com o PEG, não apresentou barreira energética ao transpor o modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], sob a tensão superficial de 20 mN m^{-1} . A barreira energética pode ser influenciada pelo modelo do surfactante pulmonar, pela tensão superficial utilizada, pelo tamanho e pelas características dos aminoácidos que compõem o peptídeo, como observado nos peptídios CATH-2 e HBD-3, porém, no caso do peptídeo BP-100, a transposição só foi efetiva quando o mesmo esteve adsorvido na superfície da nanopartícula de ouro e encapsulado pelo PEG. Esses resultados demonstram que os encapsulamentos são capazes de minimizar as interações eletrostáticas entre os fosfolipídios e os peptídios, promovendo uma transposição mais suave dos peptídios no modelo de surfactante pulmonar.

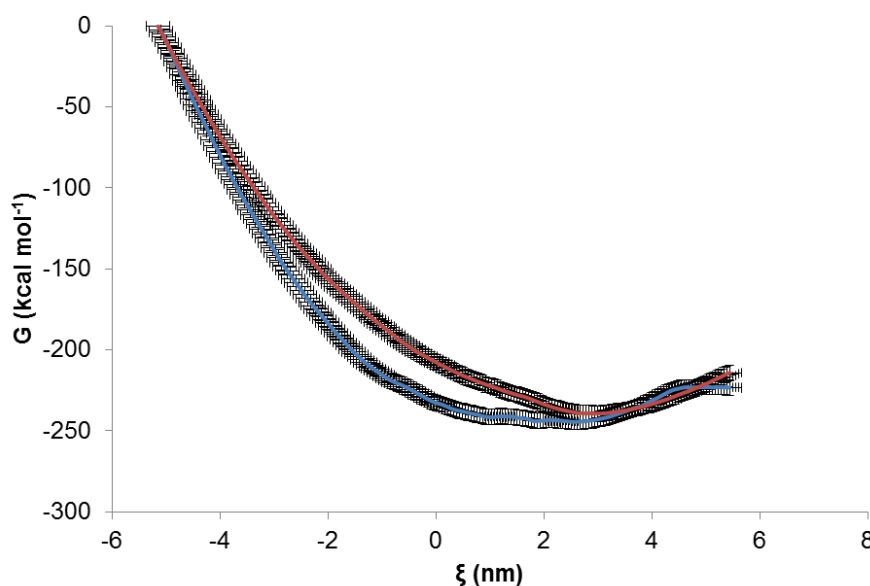


Figura 19. A energia livre de Gibbs de transferência da nanopartícula AuNP-PEG (vermelho) e AuNP-BP100-PEG (azul) da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . As energias são calculadas ao longo da coordenada da reação ξ usando amostragem guarda-chuva. As barras de erro ($\pm \sigma$, $N = 50$) são calculadas usando o método de reamostragem *bootstrap* (KUMAR et al., 1992).

A análise pelo histograma ponderado visa minimizar os erros através da estimativa da função de distribuição. Quanto mais as janelas estiverem sobrepostas, menor será o erro estatístico. Consequentemente, o resultado é mais confiável. O histograma apresentado na Figura 20 apresenta janelas sobrepostas em toda a coordenada de reação ξ , conferindo confiabilidade nos valores energéticos apresentados.

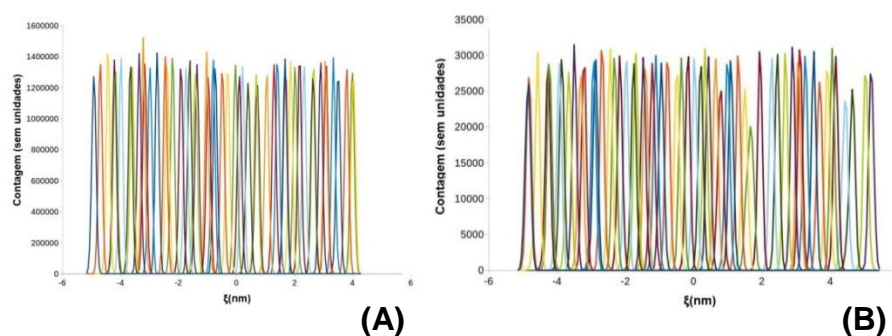


Figura 20. Análise do histograma ponderado da sobreposição de janelas da amostragem guarda-chuva na coordenada da reação ξ para a transferência da nanopartícula AuNP-PEG (A) e AuNP-BP100-PEG (B) através do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®] a 310 K e tensão superficial de 20 mN m⁻¹.

5.7.1

Área por Lipídio

A área por lipídio é obtida através do cálculo da divisão da área total da monocamada pelo número de lipídios que ela contém. A área é um parâmetro importante para observar a estabilidade organizacional do filme e as transições de fases da monocamada. A área por lipídio está relacionada com a tensão superficial fixada no sistema. Ela aumenta e diminui conforme a expansão e compressão dos alvéolos pulmonares (HOSSAIN et al., 2019).

O estudo de Baoukina e colaboradores (2007) sugere que a monocamada encontra-se na fase líquido expandido (LE), quando a área por lipídio está na faixa de 56 a 63 Å² lipídio⁻¹. Na faixa de 46 a 48 Å² lipídio⁻¹, a monocamada encontra-se na fase líquido condensado (LC). A coexistência das fases LE e LC ocorre na faixa de valores para área por

lipídio de 48 a 56 Å² lipídio⁻¹, quando se varia a tensão superficial entre 20 e 30 mN m⁻¹ (BAOUKINA et al., 2007a).

No estudo do peptídeo HBD-3, Souza e colaboradores (2019) (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019), obtiveram o valor de $61 \pm 0,2$ Å² lipídio⁻¹ para a área por lipídio do modelo de surfactante pulmonar, sob uma tensão superficial de 20 mN m⁻¹. No estudo realizado por Estrada-López e colaboradores (2017) (ESTRADA-LÓPEZ et al., 2017), com um modelo de DPPC/POPC, o valor obtido para a área por lipídio para uma tensão superficial de 20 mN m⁻¹ foi de $57 \pm 0,1$ Å² lipídio⁻¹. Estrada-López e colaboradores (2017), ainda mencionam a existência da fase LE do surfactante pulmonar, com uma tensão superficial variando entre 20 a 25 mN m⁻¹, em um organismo saudável durante a expansão pulmonar.

Os valores obtidos para as áreas dos sistemas onde ocorreram a transposição das nanopartículas, AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG, foram de $57,20 \pm 0,14$ e $57,25 \pm 0,13$, respectivamente, e estão próximos aos valores encontrados no estudo de Baoukina e colaboradores (2007) (BAOUKINA et al., 2007b), Estrada-López e colaboradores (2017) (ESTRADA-LÓPEZ et al., 2017) e Souza e colaboradores (2019) (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019), citados anteriormente, sugerindo que a permeação das nanopartículas (AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG), faz com que o modelo de surfactante pulmonar se organize na fase LE, indicando que o sistema permaneceu estável mesmo após a permeação das nanopartículas.

Para fins de comparação, também foi utilizado o programa suAVE para o cálculo da área por lipídio. A Tabela 3 apresenta os valores obtidos da área por lipídio para os dois sistemas. Observa-se que os valores das áreas de ambos os sistemas não variaram consideravelmente entre os métodos. Isto está de acordo com os resultados encontrados na literatura (FORNASIER et al., 2020).

Tabela 3. Área por lipídio calculada pelos métodos GridMAT-MD e suAVE do modelo de surfactante pulmonar após a nanopartícula ser transferida da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m⁻¹.

Método	Sistema	
	AuNP-PEG	AuNP-BP100-PEG
	Área por Lipídio (Å ² lipídio ⁻¹)	Área por Lipídio (Å ² lipídio ⁻¹)
GridMAT-MD	57,20 ± 0,14	57,25 ± 0,13
suAVE	58,01 ± 0,31	57,81 ± 0,19

Importante notar dois aspectos: 1) os modelos *coarse grained* estimam valores mais altos de área por lipídio em uma tensão superficial que deveria gerar uma fase LC; e 2) o funcionamento de um pulmão doente ocorre com uma tensão superficial maior do que 20 mN m⁻¹ e, conseqüentemente, o modelo de surfactante pulmonar trabalha com uma área por lipídio maior (BAOUKINA et al., 2007a).

A área por lipídio também está representada pelos gráficos (Figuras 21 A e B) para os sistemas AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG respectivamente, em relação ao tempo de simulação, avaliada pelo método GridMAT-MD. É possível observar que no início da simulação (antes dos primeiros 100 ns) ocorreu uma variação mais acentuada na área por lipídio. Nesse momento da simulação, a variação da área de ambos os sistemas está relacionada com o momento em que a nanopartícula permeia a monocamada, como visualizado nos gráficos de perfil na coordenada Z (Figuras 18 C e D) dos respectivos sistemas (AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG). Percebe-se que, após a permeação das nanopartículas, a área permaneceu constante ao longo de todo o tempo de simulação, indicando que a fase LE, como esperado para o modelo de surfactante pulmonar, não provoca desestabilização na organização dos fosfolipídios.

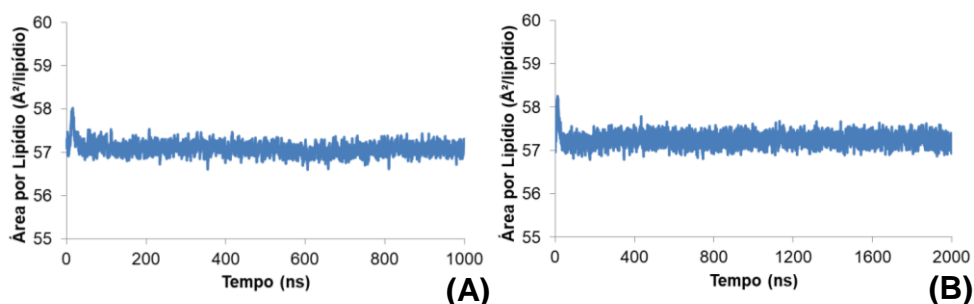


Figura 21. Área por lipídio calculada pelo método GridMAT-MD do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF® da transposição da nanopartícula AuNP-PEG (A) e AuNP-BP100-PEG (B) da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . As barras de erro são calculadas usando $\pm\sigma$ e $N = 50000$.

5.7.2

Difusão Lateral

A difusão lateral é uma propriedade que indica a mobilidade dos lipídios e a rigidez da monocamada. A Tabela 4 apresenta os valores obtidos para a difusão lateral da monocamada que foi permeada pelos sistemas AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG durante os últimos 500 ns de simulação. Para o modelo de CUROSURF® puro, os valores de difusão lateral apresentados fazem parte do estudo de Souza e colaboradores (2019) (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019).

Os resultados obtidos para o sistema AuNP-PEG (Tabela 4) estão na faixa de $1,94$ a $2,40 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Para o sistema AuNP-BP100-PEG (Tabela 4), os valores obtidos estão na faixa de $1,81$ a $2,93 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Esses valores se aproximam dos valores encontrados no estudo de Souza e colaboradores (2019) (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019) com o peptídeo HBD-3 encapsulado com o PEG, que foram na faixa de $0,83$ a $4,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, indicando que as características do BP-100 (cargas e hidrofobicidade) e da AuNP (hidrofobicidade), foram reduzidas quando as nanopartículas foram encapsuladas pelo PEG.

Ao comparar os valores de difusão do filme puro de CUROSURF®, com o sistema AuNP-PEG, os valores de difusão de todos os fosfolipídios sofreram pequenas diminuições. Esse resultado pode estar relacionado

com as interações entre a AuNP e os fosfolipídios no momento da passagem na monocamada, e na interação do PEG com as moléculas de água da fase aquosa do sistema. O mesmo ocorreu com os fosfolipídios do sistema AuNP-BP100-PEG. Essas variações também podem estar relacionadas com as interações entre o BP-100 e os fosfolipídios, no momento da passagem na monocamada, e também na interação dos aminoácidos polares do BP-100 com o PEG e a fase aquosa do sistema.

Em ambos os casos, os fosfolipídios tendem a se reorganizar na monocamada após a permeação da nanopartícula, indicando uma baixa influência da nanopartícula na mobilidade e na rigidez da monocamada. Uma explicação para este fato são os valores de difusão lateral dos fosfolipídios, que não são afetados significativamente, uma vez que mudanças significativas só ocorreriam se a nanopartícula provocasse mudanças de fases no filme, como, por exemplo, passando da fase LE para LC. Nesse caso, a difusão lateral diminuiria duas ordens de grandezas (BAOUKINA et al., 2007a).

Os gráficos de MSD (Figura B.1) dos fosfolipídios dos sistemas AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG encontram-se no Apêndice B.

Tabela 4. Coeficientes de difusão lateral (D) dos fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar (somente monocamada que foi permeada) a 310 K e tensão superficial de 20 mN m⁻¹.

	D (10 ⁻⁷ cm ² s ⁻¹)		
	Sistema AuNP-PEG	Sistema AuNP-BP100-PEG	CUROSURF ^{®*}
DPPC	2,34 ± 0,01	2,32 ± 0,08	3.52 ± 1.17
POPC	2,20 ± 0,01	2,39 ± 0,23	3.40 ± 1.40
POPG	2,28 ± 0,34	2,28 ± 0,39	3.15 ± 0.19
POPE	2,25 ± 0,02	2,15 ± 0,21	2.57 ± 0.50
DPPI	1,94 ± 0,89	2,73 ± 0,78	3.82 ± 0.54
DPPS	2,02 ± 0,25	1,81 ± 0,18	2.93 ± 0.84
LPC	2,40 ± 0,60	2,93 ± 0,26	3.90 ± 1.24
DPSM	2,09 ± 0,15	2,38 ± 0,04	3.91 ± 0.75

*Resultados adaptados do estudo de: (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019).

5.7.3

Parâmetro de Ordem

O parâmetro de ordem é uma propriedade que indica a ordem, a fase e a estabilidade da monocamada em relação à cadeia hidrocarbônica dos fosfolípidios. Para calcular o parâmetro de ordem (S_z) dos modelos, as cadeias carbônicas dos lipídios são agrupadas em dois grupos, denominadas SN1 e SN2. Os grãos que correspondem o grupo SN1 são GL1-C1A, C1A-C2A, C2A- C3A, C3A-C4A e os grãos correspondentes para o grupo SN2 são GL2-C1B, C1B-C2B, C2B-C3B, C3B-C4B. Os grãos GL1-C1A e GL2-C1B, para os respectivos grupos SN1 e SN2, representam o grupo onde ocorrem as ligações das cabeças polares dos fosfolípidios com as cadeias hidrocarbônicas (MARRINK; DE VRIES; MARK, 2004).

De acordo com o estudo de Baoukina e colaboradores (2007) (BAOUKINA et al., 2007a), os valores do parâmetro de ordem (S_z) para um filme contendo o fosfolípido DPPC variando entre 0,6 e 0,4 indicam que a organização dos fosfolípidios está na fase LE. Entre 0,8 e 0,9, a fase encontrada é LC. Valores entre 0,7 e 0,6 indicam a coexistência das fases LC e LE.

A partir dos gráficos dos fosfolípidios (Figura 22), observa-se que os valores dos parâmetros S_z variam de 0,6 a 0,4, indicando que a organização do filme está na fase LE, corroborando com os resultados encontrados por Baoukina e colaboradores (2007) (BAOUKINA et al., 2007a). Logo, a organização do filme se manteve estável e não sofreu alterações com a permeação das nanopartículas. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos para a área por lipídio (seção 5.7.1).

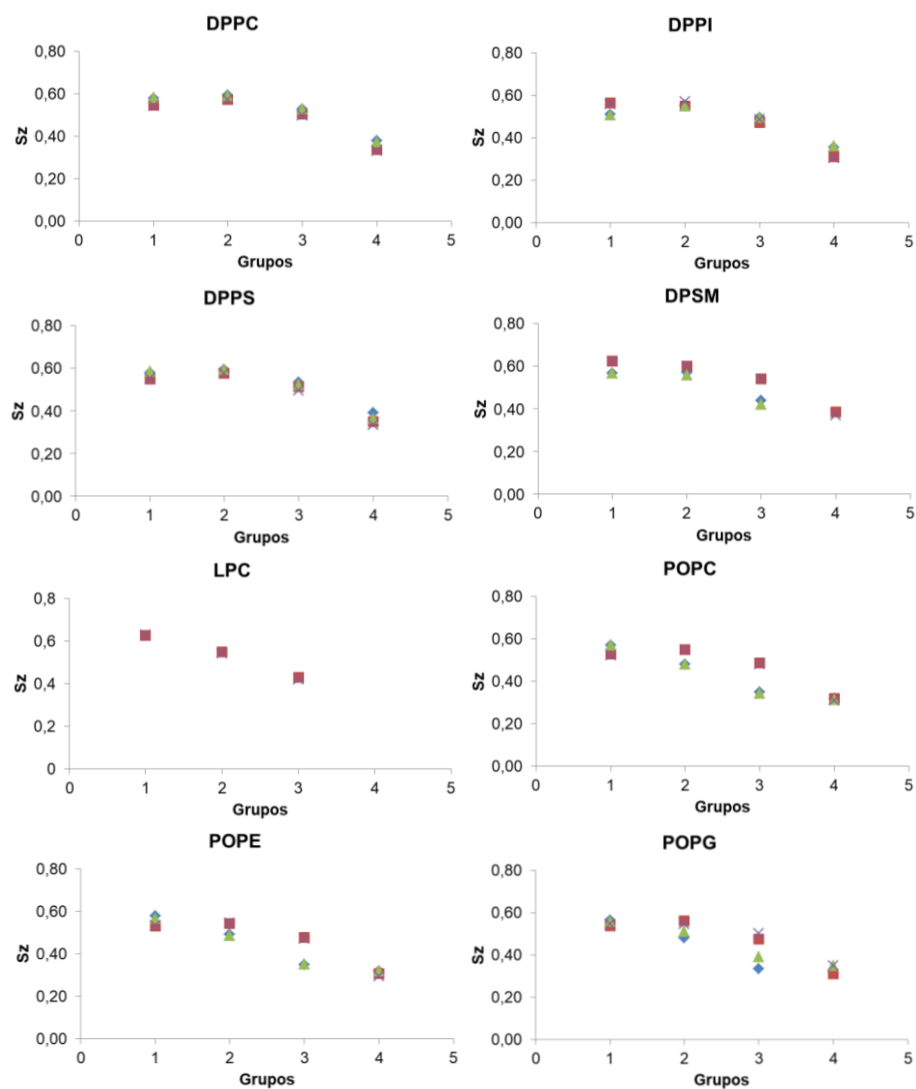


Figura 22. Parâmetros de ordem dos fosfolípidios a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . Grupo SN1 AuNP-PEG (azul) e AuNP-BP100-PEG (vermelho). Grupo SN2 AuNP-PEG (verde) e AuNP-BP100-PEG (lilás). O parâmetro de ordem foi obtido usando o script do-order-multi.py do campo de força Martini.

5.8

Polaridade dos grãos da nanopartícula

No campo de força coarse *grained*, o grão C é diferenciado pela polaridade, variando de 1 (menor polaridade) a 5 (maior polaridade). Sendo assim, foi realizada uma avaliação sobre a polaridade do modelo da nanopartícula de ouro, observando o efeito na energia livre da transposição da mesma, no modelo de surfactante pulmonar. Nessa análise, o sistema AuNP-BP100-PEG foi avaliado através da alteração dos grãos da nanopartícula de ouro, sendo estes modificados do grão original C5 para C3 e C1.

5.8.1

Sistema Au(C3)NP-BP100-PEG

No sistema Au(C3)NP-BP100-PEG (Figura 23 A), a nanopartícula possui grão C3, o que representa uma polaridade intermediária quando comparado com o grão C5 e C1. O gráfico do perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 25 A), apresenta a trajetória da transposição da nanopartícula no filme de surfactante pulmonar. Observou-se que a mesma permeou o modelo de surfactante pulmonar através da monocamada inferior. Esta permeação ocorreu em menos de 100 ns de simulação. Quando a mesma chegou à fase aquosa, ela permaneceu nessa região durante todo o tempo de 1 μ s de simulação (1000 ns), mantendo-se próxima da cabeça polar dos fosfolipídios. A transposição da nanopartícula ocorreu de forma espontânea (Figuras 23 B e C), sem colapsar o modelo de surfactante pulmonar. Esse mesmo comportamento foi observado no sistema com o grão C5.

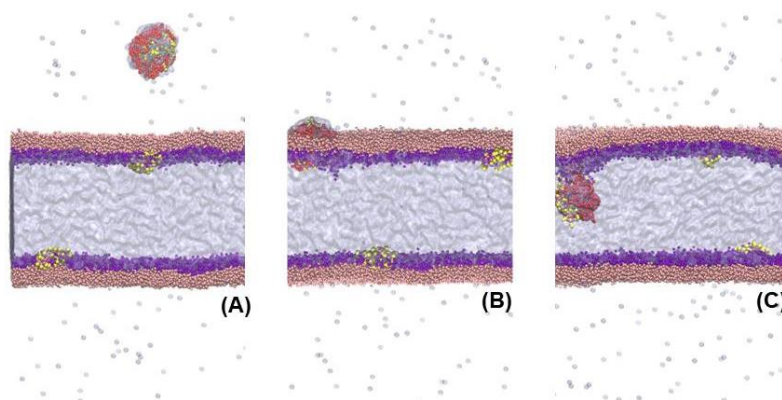


Figura 23. Representação do sistema Au(C3)NP-BP100-PEG durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹, no vácuo (A), na monocamada (B) e na fase aquosa (C).

5.8..2

Sistema Au(C1)NP-BP100-PEG

No sistema Au(C1)NP-BP100-PEG (Figura 24 A), a nanopartícula é construída com o grão C1, que possui uma polaridade menor quando comparado com o grão C5 e C3. O gráfico do perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 25 B), apresenta a trajetória da nanopartícula. A permeação também ocorreu em menos de 100 ns de simulação. Quando a nanopartícula chegou à fase aquosa, a mesma permaneceu nessa região durante todo o tempo de 1 μ s de simulação (1000 ns). No entanto, pequenas flutuações de posição ao longo do eixo z na simulação ocorreram, apresentando uma ligeira aproximação da nanopartícula com os fosfolípidios da monocamada (Figura 24 C). Essa aproximação ocorre devido à influência da polaridade do grão da nanopartícula com o conjunto do sistema. No entanto, a transposição da nanopartícula também ocorreu de forma espontânea (Figuras 24 B e C).

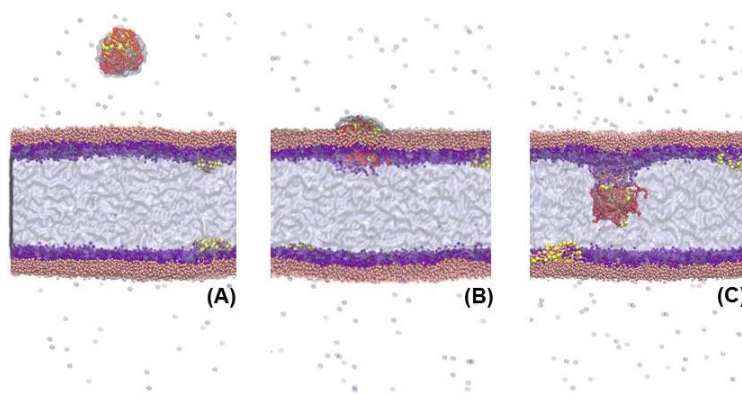


Figura 24. Representação do sistema Au(C1)NP-BP100-PEG durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹, no vácuo (A), na monocamada (B) e na fase aquosa (C).

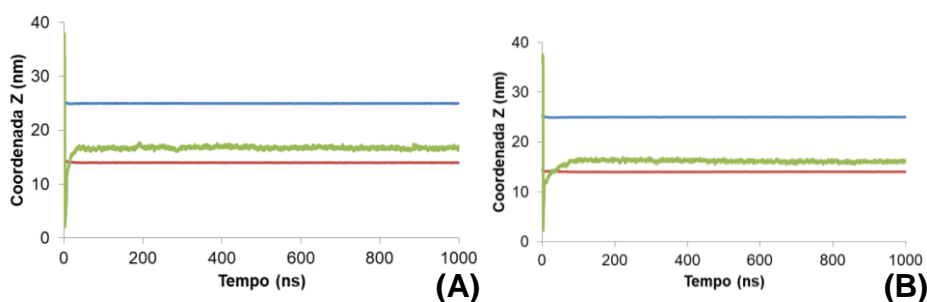


Figura 25. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula Au(C3)NP-BP100-PEG (A) e Au(C1)NP-BP100-PEG (B), durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹.

Monocamada inferior (vermelho), monocamada superior (azul) e a nanopartícula com o BP-100 adsorvido na superfície e encapsulado com PEG (verde).

5.8.3

Método de amostragem guarda-chuva

Nos dois sistemas que apresentaram espontaneidade na transposição da nanopartícula, a simulação direcionada (tempo de 200 ns e constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$) foi realizada para avaliar o quão espontâneos foram ambos sistemas. Os perfis de energia para essas transposições são mostrados na Figura 26. Para fins de comparação, a nanopartícula com o grão C5 também é incluída.

A energia livre de Gibbs do sistema Au(C1)NP-BP100-PEG foi de aproximadamente $-167,60 \pm 2,01$. O sistema Au(C3)NP-BP100-PEG apresentou uma energia um pouco maior, de aproximadamente $-192,43 \pm 1,62$. O sistema Au(C5)NP-BP100-PEG apresentou uma energia de aproximadamente $-223,37 \pm 1,28$ e as barreiras energéticas de interação entre as cabeças polares dos fosfolipídios do modelo de surfactante pulmonar e das nanopartículas foram aproximadamente $52,17 \pm 0,21$, $30,44 \pm 0,03$ e $21,13 \pm 0,13 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente. Esses valores acabam não sendo precisos uma vez que não foi atingido um platô de energia ao final da simulação. Os grãos C3 e C1 são menos polares do que o grão C5. Isso fica evidenciado nos perfis de energia, sendo o grão C3 com uma energia de transposição intermediária e o grão C1 com a maior energia de transposição entre os três modelos. Os valores energéticos indicam que a interferência qualitativa sobre a espontaneidade da transposição, não depende dos modelos da nanopartícula AuNP testados. Além disso, a estabilidade dos filmes, onde ocorreu a permeação das nanopartículas com grãos C3 e C1, foi semelhante ao resultado do sistema da nanopartícula com o grão C5. Os histogramas (Figuras C.1 A e B) dos sistemas com as nanopartículas de ouro parametrizadas com C1 e C3 encontram-se no Apêndice C.

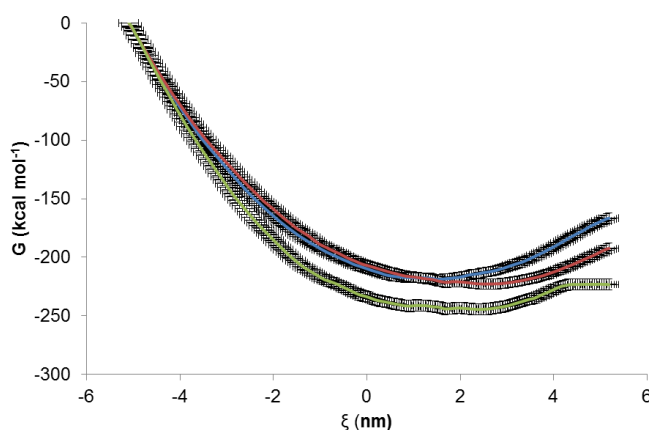


Figura 26. A energia livre de Gibbs de transferência da nanopartícula AuNP-BP100-PEG da fase gasosa para a fase aquosa, a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . As partículas de ouro são parametrizadas com C1 (azul), C3 (vermelho) e C5 (verde). As energias são calculadas ao longo da coordenada da reação ξ usando amostragem guarda-chuva. As barras de erro ($\pm \sigma$, $N = 50$) são calculadas usando o método de reamostragem *bootstrap* (KUMAR et al., 1992).

5.9

Polietilenoglicol com terminação tiol

O PEG com terminação tiol (-SH), PEG(tiol), é utilizado para aumentar a estabilidade do revestimento de nanopartículas AuNP em experimentos *in vitro* e *in vivo*, uma vez que o grupamento tiol (-SH) interage mais fortemente com as nanopartículas de ouro (HO et al., 2019; KLEBOWSKI et al., 2018). Neste estudo, também foi avaliada a influência da terminação tiol do PEG na energia livre da transposição da nanopartícula e na dessorção das moléculas de PEG na superfície das AuNP. Com este intuito, o grão da extremidade da molécula do PEG foi alterado do tipo SP2 para o tipo N0 (Tabela 5), para representar a interação da ligação do enxofre (S) com a nanopartícula AuNP (MARRINK et al., 2007; SONG et al., 2012). A nanopartícula utilizada foi a que possui o grão C5. A Tabela 5 abaixo apresenta a alteração realizada.

Tabela 5. Representação dos grãos das moléculas do PEG e PEG(tiol) a partir do itp original.

PEG itp original			PEG(tiol) itp modificado	
Grão	Tipo de Grão	Grupos	Tipo de Grão	Grupos
1	SP2	OH	N0	S
2 - 27	SN0	O1	SN0	O1
28	SP2	OH	SP2	OH

O sistema contendo o PEG com terminação tiol (Figura 27 A) também permeou a monocamada de forma espontânea (Figuras 27 B e 27 C), apresentando o mesmo comportamento das demais nanopartículas estudadas. Através do gráfico do perfil ao longo da coordenada Z do sistema (Figura 28), pôde-se observar que a nanopartícula, após permear a monocamada e atingir a fase aquosa, permaneceu próxima dos fosfolípidios durante todo o tempo de 1 μ s de simulação (1000 ns).

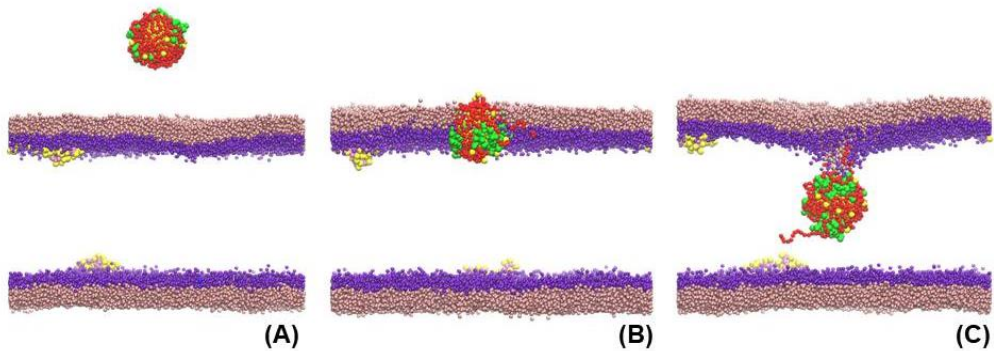


Figura 27. Representação do sistema AuNP-BP100-PEG(tiol) durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹, no vácuo (A), na monocamada (B) e na fase aquosa (C). *Não foi possível gerar a imagem com a representação da água devida a falhas na resolução da imagem.

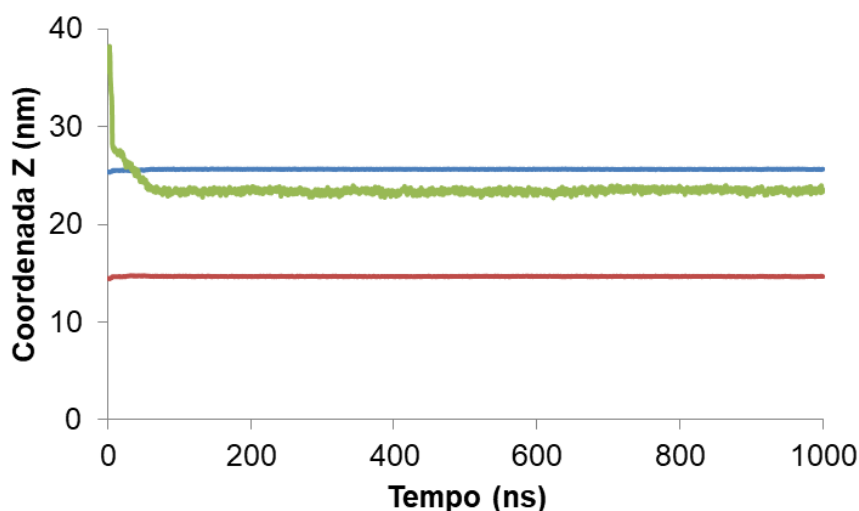


Figura 28. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula AuNP-BP100-PEG(tiol), durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹. Monocamada inferior (vermelho), monocamada superior (azul) e a nanopartícula com o BP-100 adsorvido e encapsulado com PEG (verde).

5.9.1

Método de amostragem guarda-chuva

O sistema também apresentou espontaneidade na transposição da nanopartícula. A simulação direcionada (tempo de 200 ns e constante de força de 500 kJ mol⁻¹ nm⁻²) também foi realizada para avaliar o comportamento energético do sistema. O perfil de energia de transposição da nanopartícula AuNP-BP100-PEG(tiol) através do modelo de surfactante pulmonar está apresentado na Figura 29. Para fins de comparação, a nanopartícula com o PEG também está apresentada.

Os resultados demonstram que a nanopartícula AuNP-BP100-PEG(tiol) também apresenta um perfil espontâneo em comparação com a nanopartícula AuNP-BP100-PEG, embora a energia do sistema tenha sido maior. A energia de transposição da AuNP-BP100-PEG(tiol) é de aproximadamente $-205,16 \pm 1,16$ kcal mol⁻¹. A barreira energética da interação entre as cabeças polares dos fosfolipídios e a nanopartícula AuNP-BP100-PEG(tiol) é de aproximadamente $19,47 \pm 0,43$ kcal mol⁻¹. Importante lembrar que a nanopartícula AuNP-BP100-PEG possui uma

energia de transposição de aproximadamente $-223,37 \pm 1,28 \text{ kcal mol}^{-1}$ e uma barreira energética de $21,13 \pm 0,13 \text{ kcal mol}^{-1}$. O histograma (Figura B.1 C) do sistema PEG(tiol) encontra-se no Apêndice B.

Portanto, a energia de transposição e a barreira energética foram sutilmente diferentes, quando ambos modelos são comparados, ou seja, esses sistemas devem permear similarmente através do modelo de surfactante pulmonar. Acredita-se que a terminação tiol do PEG tenha maiores interações com os aminoácidos polares do BP-100 e a água, refletindo na redução da barreira energética. A estabilidade do filme, onde ocorreu a permeação da nanopartícula encapsulada com o PEG(tiol), foi semelhante ao resultado do sistema da nanopartícula encapsulada com o PEG.

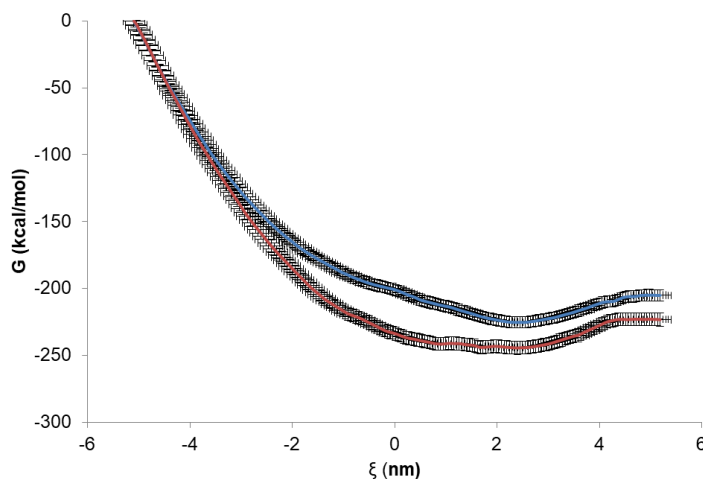


Figura 29. Gráfico da energia livre de Gibbs de transferência da nanopartícula AuNP-BP100-PEG da fase gasosa para a fase aquosa a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} . AuNP-BP100-PEG(tiol) e AuNP-BP100-PEG são representados em azul e vermelho, respectivamente. As energias são calculadas ao longo da coordenada da reação ξ usando amostragem guarda-chuva. As barras de erro ($\pm \sigma$, $N = 50$) são calculadas usando o método de reamostragem *bootstrap* (KUMAR et al., 1992).

5.10

Efeito da hidrofobicidade dos revestimentos

Além do PEG, outros dois polímeros foram estudados como possíveis revestimentos para o BP-100 adsorvido na nanopartícula de ouro, sendo eles um copolímero de PEG ligado em bloco com o PS (PEG-b-PS) e o PS. As duas seções a seguir abordarão o comportamento de cada nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®].

5.10.1

Sistema AuNP-BP100-PEG-b-PS

No sistema AuNP-BP100-PEG-b-PS (Figura 30 A), foi utilizado como revestimento o copolímero PEG-b-PS. Ao ser avaliado o gráfico do perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 32 A), observou-se que a nanopartícula, ao atingir a monocamada, interagiu com as caudas apolares dos fosfolípidios, e após os primeiros 200 ns de simulação, a mesma passou a interagir com as cabeças polares dos fosfolípidios, permanecendo nessa região até o final da simulação de 1 μ s (1000 ns). Neste sistema, quando a nanopartícula atingiu a monocamada (Figura 30 B), parte dela interagiu com a fase aquosa e parte permaneceu entre os fosfolípidios, porém, a mesma não atingiu a fase aquosa efetivamente. Acredita-se que a interação com os fosfolípidios tenha ocorrido devido às características hidrofóbicas do PS, juntamente com os aminoácidos apolares do BP-100. Além disso, a região que interagiu com a fase aquosa pode ser a parte da nanopartícula que foi revestida pelo PEG.

A simulação direcionada (tempo de 200 ns e constante de força de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$) foi realizada e pôde-se observar que a nanopartícula arrastou os fosfolípidios para a fase aquosa, ocorrendo o colapso do filme de surfactante pulmonar (Figura 30 C).

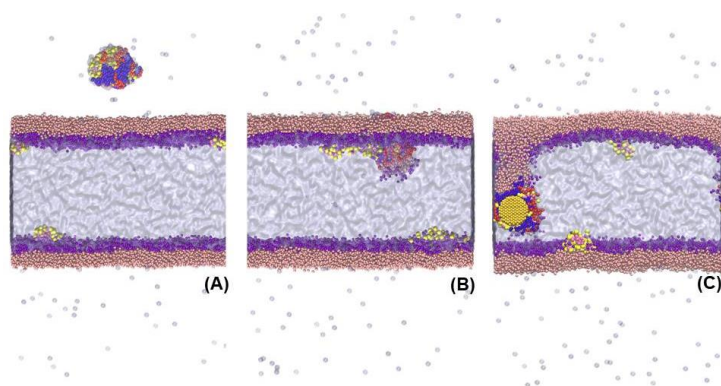


Figura 30. Representação do sistema AuNP-BP100-PEG-b-PS durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m⁻¹, no vácuo (A), na monocamada (B) e após a simulação de 200 ns com a constante de força de 500 kJ mol⁻¹ nm⁻² quando ocorre o colapso (C).

5.10.2

Sistema AuNP-BP100-PS

O PS também foi avaliado como revestimento (Figura 31 A). Através do gráfico do perfil, ao longo da coordenada Z (Figura 32 B), pôde-se notar a interação da nanopartícula com as cabeças polares dos fosfolipídios. Diferente do sistema anterior, esta nanopartícula logo atinge a monocamada fosfolipídica (Figura 31 B) e permanece durante todo o tempo de simulação de 1 μ s (1000 ns). Esse comportamento está relacionado com as interações hidrofóbicas entre o BP-100 e o PS com os fosfolipídios da monocamada.

A simulação direcionada (tempo de 200 ns e constante de força de 500 kJ mol⁻¹ nm⁻²) também foi realizada neste sistema e pôde-se observar que a nanopartícula também arrastou os fosfolipídios para a fase aquosa, ocorrendo o colapso do filme de surfactante pulmonar (Figura 31 C).

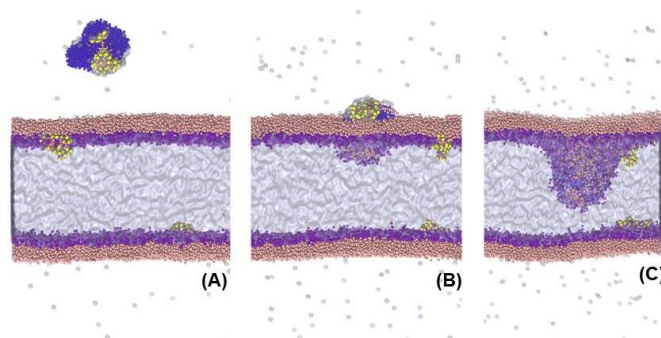


Figura 31. Representação do sistema AuNP-BP100-PS durante a simulação de 1 μ s da transposição da nanopartícula no modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} , no vácuo (A), na monocamada (B) e após a simulação de 200 ns com a constante de força de 500 $\text{kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-2}$ quando ocorre o colapso (C).

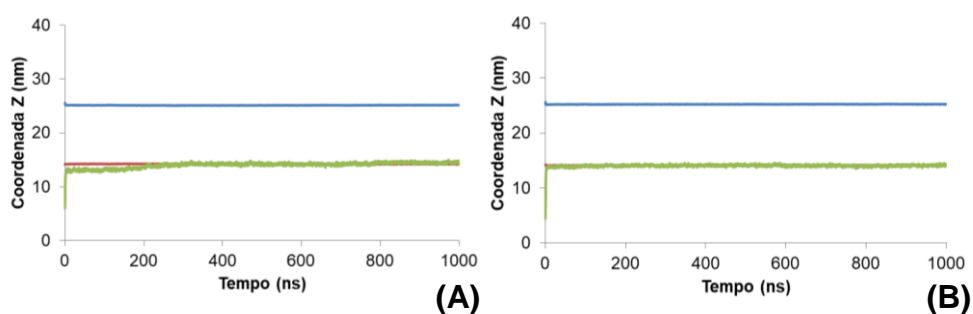


Figura 32. Gráfico de perfil Z da transposição da nanopartícula AuNP-BP100-PEG-b-PS (A) e AuNP-BP100-PS (B), durante o tempo de 1 μ s de simulação, a 310 K e na tensão superficial de 20 mN m^{-1} . Monocamada inferior (vermelho), monocamada superior (azul) e a nanopartícula com o BP-100 adsorvido na superfície e encapsulado com os polímeros (verde).

Conclusões

Nesta dissertação, a simulação molecular da transposição do peptídeo BP-100 adsorvido, em nanopartículas de ouro e encapsuladas com polímeros através do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF[®], foi realizada com sucesso. Os polímeros utilizados para encapsular as nanopartículas de ouro foram PEG, PS e o copolímero PEG-b-PS. Com este fim, sete nanopartículas foram construídas, sendo denominadas: BP100-PEG, AuNP-BP100, AuNP, AuNP-PEG, AuNP-BP100-PEG, AuNP-BP100-PEG-b-PS e AuNP-BP100-PS. Todos os sistemas foram simulados utilizando dinâmica molecular *coarse grained* na tensão superficial de 20 mN m⁻¹ a 310 K.

O método de amostragem guarda-chuva foi utilizado para realizar o cálculo de energia livre de Gibbs para os sistemas que não colapsaram (AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG). Nos demais sistemas, em que ocorreram os colapsos, este comportamento está relacionado com as características hidrofóbicas e com as interações eletrostáticas de cada componente do sistema (nanopartícula de ouro, BP-100 e PS) com os fosfolípidios da monocamada. Portanto, não foi possível realizar o cálculo de energia livre de Gibbs desses sistemas.

A nanopartícula BP100-PEG permeou a monocamada, porém quando esta nanopartícula atingiu a fase aquosa, o PEG se desfez, liberando as moléculas do BP-100, que migraram para a região dos fosfolípidios carregados negativamente. Esse comportamento pôde ser observado através do gráfico de função de distribuição radial. Ao ser avaliada a espontaneidade do sistema, através da simulação direcionada, o filme colapsou. Esse comportamento está relacionado com as interações dos aminoácidos apolares do BP-100, que interagiu com os fosfolípidios da monocamada. No entanto, a interação dos aminoácidos

polares com a água foi capaz de arrastar os fosfolipídios para a fase aquosa.

As nanopartículas AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG não desestabilizaram a estrutura organizacional do modelo de surfactante pulmonar, que permaneceu estável durante todo o tempo de simulação após a transposição. A estabilidade pôde ser demonstrada através das análises de área por lipídio, parâmetro de ordem e difusão lateral. Quando o polímero PEG foi utilizado para encapsular o BP-100 adsorvido na superfície da nanopartícula de ouro, as transposições ocorreram de forma espontânea. Isto possibilita inferir que o PEG é capaz de reduzir as interações hidrofóbicas e eletrostáticas dos fosfolipídios com a nanopartícula de ouro e o BP-100.

Os perfis de energia livre de Gibbs demonstraram a espontaneidade da transposição das nanopartículas AuNP-PEG ($\Delta G = -214,20 \pm 0,72 \text{ kcal mol}^{-1}$) e AuNP-BP100-PEG ($\Delta G = -223,37 \pm 1,18 \text{ kcal mol}^{-1}$) através do modelo de surfactante pulmonar. As barreiras energéticas da interação das nanopartículas AuNP-PEG e AuNP-BP100-PEG com as cabeças polares do modelo do surfactante pulmonar foram de aproximadamente $25,18 \pm 0,67$ e $21,13 \pm 0,13 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente. Essa diminuição da barreira energética pode estar relacionada ao fato do BP-100, ao ser incorporado na nanopartícula, conferir carga à mesma. Portanto, as interações entre as nanopartículas e as cabeças polares do modelo de surfactante pulmonar diminuem quando encapsuladas com o PEG.

Ao ser avaliada a polaridade dos grãos da nanopartícula de ouro, os resultados demonstraram qualitativamente que a espontaneidade da transposição não dependeu da parametrização da nanopartícula AuNP. Além disso, a modificação da parametrização não desestabilizou o modelo de surfactante pulmonar. Quando se utilizou o PEG tiolado, observou-se que a barreira energética da interação da nanopartícula AuNP-BP100-PEG(tiol) com as cabeças polares do modelo do surfactante pulmonar foi sutilmente menor, aproximadamente $19,47 \pm 0,43 \text{ kcal mol}^{-1}$. Porém, a espontaneidade da transposição da nanopartícula AuNP-

BP100-PEG(tiol) através do modelo de surfactante pulmonar foi aproximadamente $-205,16 \pm 1,16 \text{ kcal mol}^{-1}$, ou seja, um pouco maior quando comparado com a nanopartícula AuNP-BP100-PEG. Pode-se inferir que ambas as nanopartículas permeiam similarmente o modelo de surfactante pulmonar. Além disso, o uso do PEG(tiol) não desestabilizou o modelo de surfactante pulmonar.

Finalmente, o BP-100 adsorvido na superfície da nanopartícula de ouro e encapsulado pelo PEG, mostrou-se capaz de transpor o modelo de surfactante pulmonar. Portanto, esses estudos indicam que essa entrega do fármaco pode ser testada em experimentos *in vitro* e *in vivo* para desenvolver um novo tratamento para a pneumonia.

7

Implicações

As implicações deste trabalho estão voltadas para a possibilidade do desenvolvimento de um método de entrega de peptídios antimicrobianos no pulmão para o tratamento da pneumonia. Isto pode vir a ser uma solução para os sérios riscos e problemas de saúde relacionados à resistência bacteriana, uma vez que os mesmos possuem baixa capacidade de induzir a resistência bacteriana em comparação aos antibióticos convencionais.

8

Perspectivas para o trabalho

Para uma possível continuação deste trabalho sugere-se:

- ❖ Avaliar a transposição do BP-100 com outros polímeros biocompatíveis.
- ❖ Realizar simulações da transposição da nanopartícula com BP-100 através de um modelo de muco.
- ❖ Realizar testes *in vitro* e *in vivo* com o BP-100 para verificar a viabilidade de se utilizar o sistema de entrega aqui proposto.
- ❖ Utilização de micropartículas do tipo “cavalo de tróia” para aumentar a eficiência da entrega no pulmão.

ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 5, p. 1589–1615, 2006.

AGASSANDIAN, M.; MALLAMPALLI, R. K. Surfactant phospholipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 3, p. 612–625, 2013.

ALLEN, W. J.; LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. GridMAT-MD: A grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 1952–1958, set. 2009.

ANDERSSON, J. M. et al. The Impact of Nonequilibrium Conditions in Lung Surfactant: Structure and Composition Gradients in Multilamellar Films. **ACS Central Science**, v. 4, n. 10, p. 1315–1325, 2018.

BADOSA, E. et al. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. **Peptides**, v. 28, n. 12, p. 2276–2285, 2007.

BAER, B. et al. New insights into exogenous surfactant as a carrier of pulmonary therapeutics. **Biochemical Pharmacology**, v. 164, n. February, p. 64–73, 2019.

BAHRAMI, B. et al. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. **Immunology Letters journal**, v. 190, n. July, p. 64–83, 2017.

BAI, X.; LI, M.; HU, G. Nanoparticle translocation across the lung surfactant film regulated by grafting polymers. **Nanoscale**, v. 12, n. 6, p. 3931–3940, 2020.

BANASCHEWSKI, B. J. H. J. H. et al. Antimicrobial and biophysical properties of surfactant supplemented with an antimicrobial peptide for treatment of bacterial pneumonia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3075–3083, 2015.

BAOUKINA, S. et al. Pressure–Area Isotherm of a Lipid Monolayer from Molecular Dynamics Simulations. **Langmuir**, v. 23, n. 25, 2007a.

BAOUKINA, S. et al. Pressure-area isotherm of a lipid monolayer from molecular dynamics simulations. **Langmuir**, 2007b.

BAOUKINA, S. et al. The mechanism of collapse of heterogeneous lipid monolayers. **Biophysical journal**, v. 107, n. 5, p. 1136–1145, 2014a.

BAOUKINA, S. et al. The Mechanism of Collapse of Heterogeneous Lipid Monolayers. **Biophysical Journal**, v. 107, n. 5, p. 1136–1145, 2 set. 2014b.

BAOUKINA, S.; TIELEMAN, D. P. Computer simulations of lung surfactant. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, 2016.

BARRETO, E. et al. Local Administration of Gold Nanoparticles Prevents Pivotal Pathological Changes in Murine Models of Atopic Asthma. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1038–1050, 2014.

BENNETT, W. F. D.; TIELEMAN, D. P. Computer simulations of lipid membrane domains. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 8, p. 1765–1776, 1 ago. 2013.

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

BERNARDI, R. C.; MELO, M. C. R.; SCHULTEN, K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects**, v. 1850, n. 5, p. 872–877, 2015.

BERNHARD, W. Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. **Annals of Anatomy**, v. 208, p. 146–150, 2016.

BHATTARAI, H. et al. OpenMD. 2019.

BLANCO, O.; PÉREZ-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, p. 1–15, 2007.

BOEL, L.; BANERJEE, S.; CHAKRABORTY, M. Postnatal steroids in extreme preterm infants: Intra-tracheal instillation using surfactant as a vehicle. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 25, p. 78–84, 2018.

BOSKO, J. T.; TODD, B. D.; SADUS, R. J. Molecular simulation of dendrimers and their mixtures under shear: Comparison of isothermal-isobaric (NpT) and isothermal-isochoric (NVT) ensemble systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 123, n. 3, p. 034905, 2005.

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

CARRETERO, G. P. B. et al. Synthesis, biophysical and functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a cyclic peptide. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1860, n. 8, p. 1502–1516, 2018.

CASALS, C.; CAÑADAS, O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 11, p. 2550–2562, 2012.

CHEN, P. et al. Effect of the surface charge density of nanoparticles on their translocation across pulmonary surfactant monolayer: a molecular dynamics simulation. **Molecular Simulation**, v. 7022, n. June, p. 1–9, 2017.

CILLONIZ, C. et al. Microbial etiology of pneumonia: Epidemiology, diagnosis and resistance patterns. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.

CIMATO, A. et al. Analysis of the structure and surfactant activity of novel formulations containing exogenous pulmonary surfactant and glucocorticoids. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 233, p. 33–40, 2016.

CIMATO, A.; FACORRO, G.; MARTÍNEZ SARRASAGUE, M. Developing an exogenous pulmonary surfactant-glucocorticoids association: Effect of corticoid concentration on the biophysical properties of the surfactant. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 247, n. August 2017, p. 80–86, 2018.

CORRÊA, J. A. F. et al. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. **Materialia**, v. 8, 2019.

CRAMER, C. J. **Essentials of computational chemistry: theories and models**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

CURSTEDT, T.; HALLIDAY, H. L.; SPEER, C. P. A unique story in neonatal research: The development of a porcine surfactant. **Neonatology**, v. 107, n. 4, p. 321–329, 2015.

DE JONG, D. H. et al. Improved parameters for the martini Coarse-Grained protein force field. **Journal of chemical theory and computation**, v. 9, n. 1, p. 687–697, 2013.

DE JONG, W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912–1919, 2008.

DOYLE, L. W.; CHEONG, J. L. Y. Postnatal corticosteroids to prevent or treat bronchopulmonary dysplasia – Who might benefit? **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 290–295, 2017.

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, 2011.

DUNCAN, S. L.; LARSON, R. G. Folding of lipid monolayers containing lung surfactant proteins SP-B (1 – 25) and SP-C studied via Coarse-Grained molecular dynamics simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1798, n. 9, p. 1632–1650, 2010.

EALLES, M. G. et al. Mechanistic and phenotypic studies of bicarinalin, BP100 and colistin action on *Acinetobacter baumannii*. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 6, p. 296–302, 2018.

EINICKER-LAMAS, M. et al. Respiratory and Systemic Effects of LASSBio596 Plus Surfactant in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 821–835, 2016.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles : A review. **Talanta**, v. 184, n. November

2017, p. 537–556, 2018.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method A smooth particle mesh Ewald method. **Journal of Chemical Physics**, v. 19, n. 103, p. 8577–8593, 1995.

ESTRADA-LÓPEZ, 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.

EVANS, D. J.; HOLIAN, B. L. The Nose–Hoover thermostat. **The Journal of Chemical Physics**, v. 83, n. 8, p. 4069–4074, 1985.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, p. 25–64, 2014.

FORNASIER, F. et al. The Lipophilicity of Coarse-Grained Cholesterol Models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2020.

FUJIWARA, T. et al. Artificial Surfactant Therapy In Hyaline-Membrane Disease. **The Lancet**, v. 315, n. 8159, p. 55–59, 1980.

GOERKE, J. **Pulmonary surfactant: Functions and molecular composition** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1998.

GOMES, K. A. G. G. et al. NMR structures in different membrane environments of three ocellatin peptides isolated from *Leptodactylus labyrinthicus*. **Peptides**, v. 103, n. March, p. 72–83, 2018.

GONZÁLEZ, C. M. et al. Artificial biomembrane based on DPPC - Investigation into phase transition and thermal behavior through ellipsometric techniques. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2295–2307, 2015.

GOODMAN, C. M. et al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 897–900, 2004.

GRUNEWALD, F. et al. Transferable MARTINI Model of Poly(ethylene Oxide). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 29, p. 7436–7449, 2018.

GUAGLIARDO, R. et al. Pulmonary surfactant and drug delivery: Focusing on the role of surfactant proteins. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 291, p. 116–126, 10 dez. 2018.

GUSMÃO, K. A. G. et al. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): Characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 2017.

GUZMÁN, E.; SANTINI, E. Lung surfactant-particles at fluid interfaces for toxicity assessments. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**,

v. 39, p. 24–39, 2019.

HAMM, H.; KROEGEL, C.; HOHLFELD, J. Surfactant: A review of its functions and relevance in adult respiratory disorders. **Respiratory Medicine**, v. 90, p. 250–270, 1996.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; GUNSTEREN, W. F. VAN. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, p. 190–196, 2002.

HARRACH, M. F.; DROSSEL, B. Structure and dynamics of TIP3P, TIP4P, and TIP5P water near smooth and atomistic walls of different hydroaffinity. **Journal of Chemical Physics**, v. 140, n. 17, p. 174501, 2014.

HERMANS, E. et al. Lung surfactants and different contributions to thin film stability. **Soft Matter**, v. 11, n. 41, p. 8048–8057, 2015.

HESS, B. et al. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HIDALGO, A.; CRUZ, A.; PÉREZ-GIL, J. Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95, p. 117–127, 2015.

HIDALGO, A.; CRUZ, A.; PÉREZ-GIL, J. Pulmonary surfactant and nanocarriers: Toxicity versus combined nanomedical applications. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 9, p. 1740–1748, 2017.

HIEMSTRA, P. S. et al. Antimicrobial peptides and innate lung defenses: Role in infectious and noninfectious lung diseases and therapeutic applications. **Chest**, v. 149, n. 2, p. 545–551, 2016.

HITTINGER, M. et al. Preclinical safety and efficacy models for pulmonary drug delivery of antimicrobials with focus on in vitro models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 85, p. 44–56, 2015.

HO, D. K. et al. Challenges and strategies in drug delivery systems for treatment of pulmonary infections. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 144, n. May, p. 110–124, 2019.

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.

HOSSAIN, S. I. et al. Molecular insights on the interference of simplified lung surfactant models by gold nanoparticle pollutants. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 8, p. 1458–1467, 2019.

HU, G. et al. Physicochemical Properties of Nanoparticles Regulate Translocation across Pulmonary Surfactant Monolayer and Formation of Lipoprotein Corona. n. 12, p. 10525–10533, 2013.

HUB, J. S.; GROOT, B. L. DE; SPOEL, D. VAN DER. g _ wham - A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. **Journal of Chemical Theory and**

Computation, v. 6, p. 3713–3720, 2010.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

JELINKOVA, P. et al. Nanoparticle-drug conjugates treating bacterial infections. **Journal of Controlled Release**, v. 307, n. June, p. 166–185, 2019.

JONG, D. H. DE et al. Improved parameters for the Martini Coarse-Grained protein force field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, p. 687–697, 2012.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

KÄLLANDER, K.; NSUNGWA-SABIITI, J.; PETERSON, S. Symptom overlap for malaria and pneumonia — policy implications for home management strategies. **Acta Tropica**, v. 90, n. 2, p. 211–214, 2004.

KAMINSKI, G. A. et al. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 28, p. 6474–6487, 2001.

KARADAG, A.; OZDEMIR, R.; DEGIRMENCIOGLU, H. Comparison of Three Different Administration Positions for Intratracheal Beractant in Preterm Newborns with Respiratory Distress Syndrome. **Pediatrics and neonatology**, v. 57, p. 105–112, 2016.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles : Properties , applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

KHONDKER, A.; HUB, J. S.; RHEINSTÄDTER, M. C. Steroid–steroid interactions in biological membranes: Cholesterol and cortisone. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 221, p. 193–197, 1 jul. 2019.

KLEBOWSKI, B. et al. Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1–17, 2018.

KUMAR, S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1011–1021, 1992.

LAING, C.; BAOUKINA, S.; TIELEMAN, P. Molecular dynamics study of the effect of cholesterol on the properties of lipid monolayers at low surface tensions. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 11, p. 1916–1922, 2009.

LAMARRE, S. S.; YOCKELL-LELIÈVRE, H.; RITCEY, A. M. Assembly of polystyrene-coated gold nanoparticles at the air-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 443, p. 131–136, 2015.

LEE, J. et al. Gold nanoparticles in breast cancer treatment : Promise and potential pitfalls. **Cancer Letters**, v. 347, n. 1, p. 46–53, 2014.

LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. Assessing the Stability of Alzheimer's

Amyloid Protofibrils Using Molecular Dynamics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 4, p. 1652–1660, 2010.

LIN, X. et al. Promote potential applications of nanoparticles as respiratory drug carrier: insights from molecular dynamics simulations. **Nanoscale**, v. 6, n. 5, p. 2759–67, 7 mar. 2014.

LIN, X.; ZUO, Y. Y.; GU, N. Shape affects the interactions of nanoparticles with pulmonary surfactant. **Science China Materials**, v. 58, p. 28–37, 2015.

LOPEZ-RODRIGUEZ, E.; PÉREZ-GIL, J. **Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2014.

LUO, Z. et al. The role of nanoparticle shape in translocation across the pulmonary surfactant layer revealed by molecular dynamics simulations. **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 8, p. 1921–1932, 2018.

LYUBARTSEV, A. P.; RABINOVICH, A. L. Force Field Development for Lipid Membrane Simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2483–2497, 1 out. 2016.

MAGALHÃES, B. S. et al. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 4, p. 1057–1061, 2008.

MAHMOODI, N. O.; GHAVIDAST, A.; AMIRMAHANI, N. A comparative study on the nanoparticles for improved drug delivery systems. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 162, p. 681–693, 2016.

MALIK, P.; MUKHERJEE, T. K. Recent advances in gold and silver nanoparticle based therapies for lung and breast cancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, n. 1–2, p. 483–509, 2018.

MALMSTROM, J.; TRAVAS-SEJDIC, J. Block Copolymers for Protein Ordering. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 14, 2013.

MANZINI, M. C. et al. Peptide:Lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 7, p. 1985–1999, 2014.

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, 2007.

MARRINK, S. J.; DE VRIES, A. H.; MARK, A. E. Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 2, p. 750–760, 2004.

MARTINEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Fundamentos de simulação por dinâmica molecular. **Morgon, NH; Coutinho, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, 2007.

MCQUARRIE, D. Statistical mechanics. 2000. **Sausalito, Calif.: University Science Books**, v. 12, p. 641, 2004.

MENON, S.; RAJESHKUMAR, S.; S, V. K. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles , characterization , and its applications. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 516–527, 2017.

MIGUEL, V.; PERILLO, M. A.; VILLARREAL, M. A. Improved prediction of bilayer and monolayer properties using a refined BMW-MARTINI force field. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 11, p. 2903–2910, 1 nov. 2016.

MISIEWICZ, J. et al. Action of the multifunctional peptide BP100 on native biomembranes examined by solid-state NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 61, n. 3–4, p. 287–298, 2015.

MONTICELLI, L. et al. The MARTINI Coarse-Grained force field: Extension to proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 5, p. 819–834, 2008.

MORSE, P. M.; FESHBACH, H. Methods of Theoretical Physics McGraw-Hill, Pt. 1 Chapters 1 to 8. v. 410, n. 1954, 1953.

NAYAK, S. et al. Computational screening of potential drug targets for pathogens causing bacterial pneumonia. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, n. December 2018, p. 271–282, 2019.

OLLILA, O. H. S.; PABST, G. Atomistic resolution structure and dynamics of lipid bilayers in simulations and experiments. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2512–2528, 1 out. 2016.

OLMEDA, B.; MARTÍNEZ-CALLE, M.; PÉREZ-GIL, J. Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. **Annals of Anatomy**, v. 209, p. 78–92, 2017.

OSMAN, G. et al. PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 285, n. July, p. 35–45, 2018.

OWEN, L. S. et al. The evolution of modern respiratory care for preterm infants. **The Lancet**, v. 389, n. 10079, p. 1649–1659, 2017.

PARK, P. et al. Binding and Flip as Initial Steps for BP-100 Antimicrobial Actions. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

PARRA, E. et al. Hydrophobic pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C induce pore formation in planar lipid membranes: Evidence for proteolipid pores. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 1, p. 146–155, 2013.

PARRA, E.; PÉREZ-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, 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.

PATIL, J. S.; SARASIJA, S. Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. **Lung India**, v. 29, n. 1, p. 44–49, 2012.

PERCEBOM, A. M. et al. Janus gold nanoparticles obtained via

spontaneous binary polymer shell segregation. **Journal of Royal Society of Chemistry**, v. 52, n. 23, 2016.

PERCEBOM, A. M.; HELENA, L.; COSTA, M. Formation and assembly of amphiphilic Janus nanoparticles promoted by polymer interactions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 269, p. 256–269, 2019.

PÉREZ-GIL, J. **Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid-protein interactions** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2008.

PÉREZ-ORTIZ, M. et al. Gold nanoparticles as an efficient drug delivery system for GLP-1 peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 25–32, 2017.

PERIOLE, X.; MARRINK, S.-J. The Martini Coarse-Grained Force Field. In: L. MONTICELLI; E. SALONEN (Eds.). **Biomolecular Simulations (Methods and Protocols)**. Vol 924 ed. [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 533–565.

POURMOUSA, M.; PASTOR, R. W. Molecular dynamics simulations of lipid nanodiscs. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2018.

QUE, Y. et al. Stability and catalytic activity of PEG-b-PS-capped gold nanoparticles: A matter of PS chain length. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 4, p. 1960–1970, 2015.

RAMALINGAM, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 271, p. 101989, 2019.

REIS, P. V. M. et al. LyeTxI-b, a synthetic peptide derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom, shows potent antibiotic activity in vitro and in vivo. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–12, 2018.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 64–70, 2018.

ROLDAN, N. et al. Effect of Lung Surfactant Protein SP-C and SP-C-Promoted Membrane Fragmentation on Cholesterol Dynamics. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 8, p. 1703–1713, 2016.

ROSSI, G. et al. Coarse-graining polymers with the MARTINI force-field: polystyrene as a benchmark case. **Soft Matter**, p. 698–718, 2011.

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

SANTOS, D. E. S. et al. SuAVE: A Tool for Analyzing Curvature-Dependent Properties in Chemical Interfaces. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2019.

SANTOS, D. M. et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino Acids**, v. 39, n. 1, p. 135–144, 2010.

SARRASAGUE, M. M. et al. Influence of serum protein and albumin

addition on the structure and activity of an exogenous pulmonary surfactant. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 175, p. 316–321, 2011.

SCHÜRCH, D. et al. Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 10, p. 3290–3299, 2010.

SERNA, J. B. DE LA et al. Segregated ordered lipid phases and protein-promoted membrane cohesivity are required for pulmonary surfactant films to stabilize and protect the respiratory surface. **Faraday Discuss.**, v. 161, p. 535–548, 2013.

SIANI, P. et al. An overview of molecular dynamics simulations of oxidized lipid systems, with a comparison of ELBA and MARTINI force fields for Coarse Grained lipid simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2498–2511, 1 out. 2016.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71–109, 2011.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 274–280, 2008.

SONG, B. et al. Role of surface ligands in nanoparticle permeation through a model membrane: A Coarse-Grained molecular dynamics simulations study. **Molecular Physics**, v. 110, n. 18, p. 2181–2195, 2012.

SØRLI, J. B. et al. Bile salt enhancers for inhalation : Correlation between in vitro and in vivo lung effects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 550, n. 1–2, p. 114–122, 2018.

SOSNOWSKI, T. R. Particles on the lung surface - physicochemical and hydrodynamic effects. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 36, p. 1–9, 2018.

SOUZA, F. R. et al. Interaction of naringin and naringenin with DPPC monolayer at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 584, n. September 2019, 2020.

SOUZA, F. R.; SOUZA, L. M. P.; PIMENTEL, A. S. Permeation of beta-defensin-3 encapsulated with polyethylene glycol in lung surfactant models at air-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, n. July, p. 110357, 2019.

SOUZA, L. M. P. et al. Penetration of antimicrobial peptides in a lung surfactant model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 345–353, 2018.

STELZL, L. S. et al. Dynamic Histogram Analysis To Determine Free Energies and Rates from Biased Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 12, p. 6328–6342, 12 dez. 2017.

TORCATO, I. M. et al. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta -**

Biomembranes, v. 1828, n. 3, p. 944–955, 2013.

TORRES, L. M. F. C. et al. Nanobiostructure of fibrous-like alumina functionalized with an analog of the BP100 peptide: Synthesis, characterization and biological applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 275–283, 2018.

TORRES, L. M. F. C. et al. Antimicrobial alumina nanobiostructures of disulfide- and triazole-linked peptides: Synthesis, characterization, membrane interactions and biological activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, n. January, p. 94–104, 2019.

TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Monte Carlo study of a phase-separating liquid mixture by umbrella sampling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 66, n. 4, p. 1402–1408, 1977.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A Study of the Nucleation and growth processes in the synthesis of Colloidal Gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55–75, 1951.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VELDHUIZEN, E. J. A.; HAAGSMAN, H. P. **Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2000.

VENABLE, R. M.; BROWN, F. L. H.; PASTOR, R. W. Mechanical properties of lipid bilayers from molecular dynamics simulation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 192, p. 60–74, 2015.

VERLET, L. Computer Experiments on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennar-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103, 1967.

VERLY, R. M. et al. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. **Peptides**, v. 29, p. 15–24, 2008.

VERLY, R. M. et al. Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 6, p. 2194–2203, 2009.

VERLY, R. M. et al. Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin. **Nature Publishing Group**, n. November 2016, p. 1–13, 2017.

WADHWANI, P. et al. Dynamical structure of the short multifunctional peptide BP100 in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 940–949, 2014.

WANG, Y. et al. DPPC-cholesterol phase diagram using Coarse-Grained Molecular Dynamics simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 11, p. 2846–2857, 1 nov. 2016.

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, 2015.

WELTE, T. et al. Ceftaroline fosamil as a potential treatment option for *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia in adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 4, p. 410–422, 2019.

WRIGHT, T. W. et al. Pulmonary inflammation disrupts surfactant function during *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 758–764, 2001.

XU, Y. et al. Transport of nanoparticles across pulmonary surfactant monolayer: a molecular dynamics study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 27, p. 17568–17576, 2017.

YANG, Y. et al. Ultrasound assisted one-step synthesis of Au @ Pt dendritic nanoparticles with enhanced NIR absorption for photothermal cancer therapy. **RSC Advances**, v. 9, n. 49, p. 28541–28547, 2019.

YUE, T. et al. Surface patterning of single-walled carbon nanotubes enhances their perturbation on a pulmonary surfactant monolayer: frustrated translocation and bilayer vesiculation. **RSC Advances**, v. 7, n. 34, p. 20851–20864, 2017.

ZAMORA-CARRERAS, H. et al. Alanine scan and ²H NMR analysis of the membrane-active peptide BP100 point to a distinct carpet mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 6, p. 1328–1338, 2016.

ZHANG, H. et al. Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 7, p. 1832–1842, 2011.

ZHANG, K. et al. Interaction Between Hydrophobic Au Nanoparticles and Pulmonary Surfactant (DPPC) Monolayers. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, n. 3, p. 526–535, 2018.

ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14–R19, 2016.

ZHANG, Y. et al. A Coarse-Grained molecular dynamics investigation of the phase behavior of DPPC/cholesterol mixtures. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 185, p. 88–98, 1 jan. 2015.

Apêndices A

Tabela A.1 composição (m/m) do modelo de surfactante pulmonar CUROSURF®.

Fosfolípido	m/m (%)	Nº de moléculas (em cada monocamada)
DPPC	49,46	505
POPC	22,33	228
POPG	1,17	12
POPE	6,46	66
DPPS	3,13	32
DPPI	2,84	29
LPC	6,17	63
DPSM	8,42	86

Apêndices B

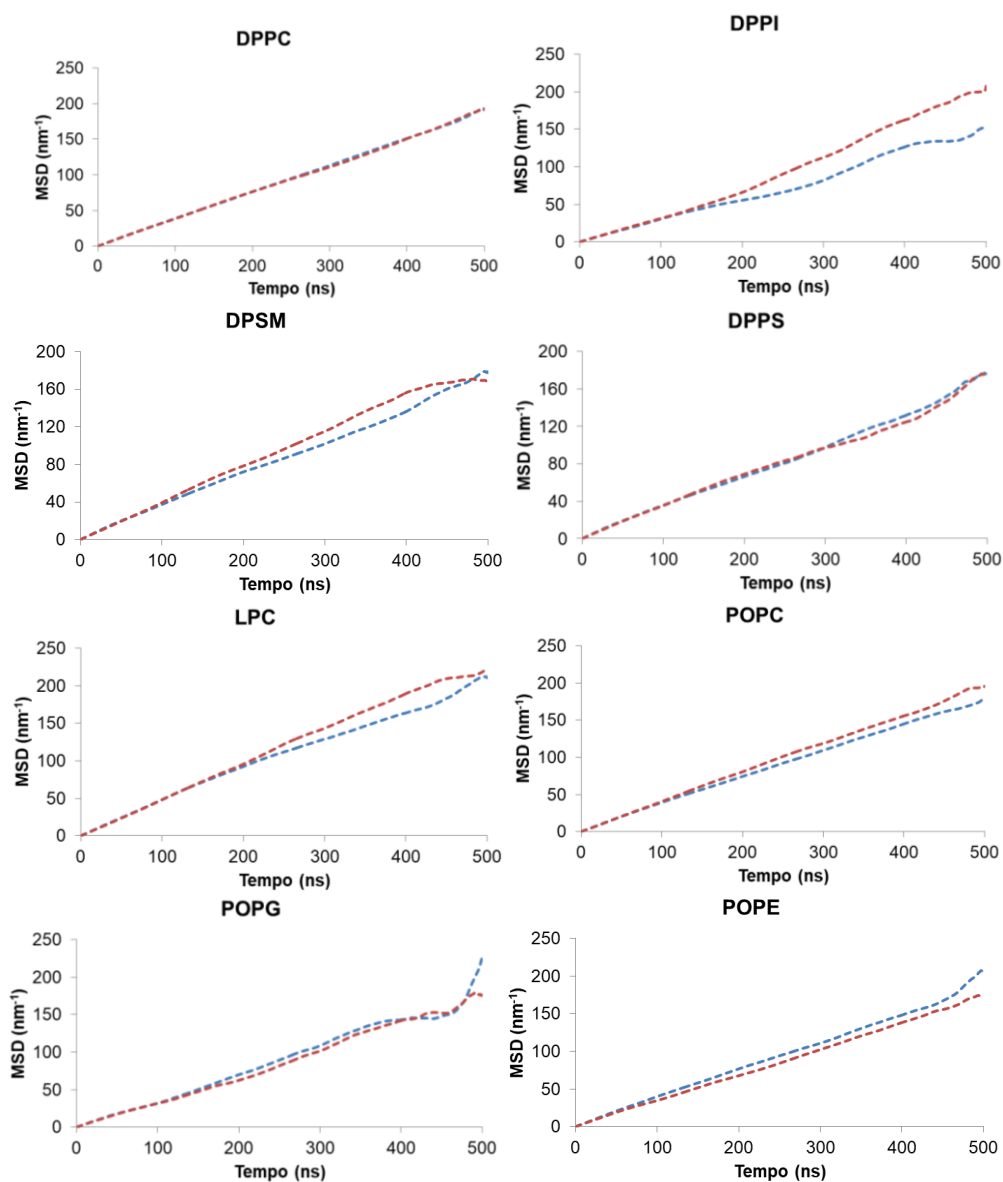


Figura B.1. Gráfico de MSD dos fosfolipídios do sistema AuNP-PEG (azul) e AuNP-BP100-PEG (vermelho), durante os últimos 500 ns de simulação, a 310 K e tensão superficial de 20 mN m^{-1} .

Apêndices C

Gráficos (figuras C.1 A, B e C) da análise dos histogramas ponderados dos sistemas C3, C1 e PEG (tiol) respectivamente.

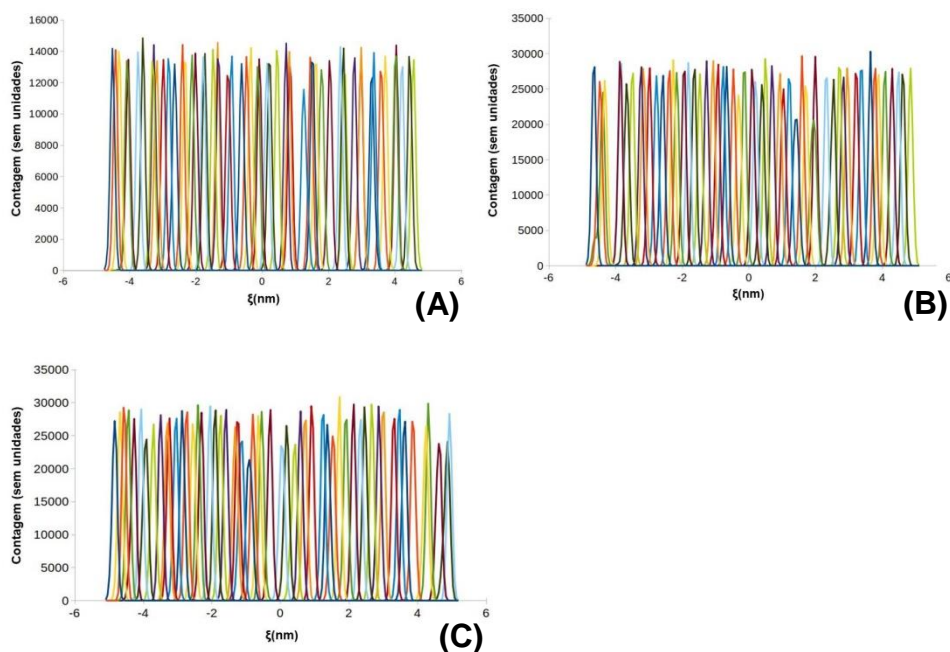


Figura C.1. Análise do histograma ponderado do sistema C3 (A), C1 (B) e PEG (tiol) (C) da sobreposição entre janelas da amostragem de guarda-chuva na coordenada da reação para a transferência da nanopartícula através dos modelos de surfactantes pulmonares CUROSURF[®] a 310 K e tensão superficial de 20 mN m⁻¹.

Apêndices D

Divulgação do Trabalho.

Essa dissertação foi apresentada na forma de pôster na sessão de química teórica durante o XVII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química do Rio de Janeiro (SBQ-Rio). Foi premiado como melhor pôster da sessão.



Figura D.1. Certificado de premiação de pôster do XVII Encontro Regional da SBQ-Rio, dezembro de 2019.