



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Estudo do comportamento e localização de Ácidos biliares em bicamadas de POPC através de Dinâmica Molecular

Maria Cristiana das Neves

*Licenciatura em Química*

*Relatório de Estágio Laboratorial*

*Prof. Doutora Maria João Moreno*

*Ano Letivo: 2015/2016*

## Resumo

Neste trabalho foram estudados vários parâmetros referentes à localização, orientação e comportamento de três ácidos biliares e dos respectivos sais de sódio, ácido cólico/colato de sódio (CAH/CA), ácido quenodesoxicólico/quenodesoxicolato de sódio (CDCAH/CDCA) e ácido desoxicólico/desoxicolato de sódio (DCAH/DCA), em bicamadas de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina), usando simulações de dinâmica molecular. Em todos os casos, os sistemas estudados usaram uma concentração relativamente baixa de soluto (2 moléculas deste para 128 de fosfolípido).

Verificou-se que, independentemente da posição inicial dos solutos (no meio aquoso ou no centro da bicamada), observam-se localizações e orientações de equilíbrio semelhantes para as diversas espécies com o mesmo estado de ionização. Em particular, observa-se uma localização ao nível da região dos grupos glicerol/carbonilo dos lípidos, consistente com a natureza anfifílica dos solutos estudados, com o sistema de anéis assumindo orientação aproximadamente alinhada com o plano da bicamada. Na origem destas propriedades conformacionais está o estabelecimento de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo/carboxílico deslocalizados na estrutura dos diferentes ácidos/sais biliares, com átomos adequados de POPC e de solvente (água), assim como interações eletrostáticas favoráveis entre grupos carboxilato aniónicos dos sais biliares e grupos colina catiónicos do fosfolípido. Estas últimas interações não estão presentes quando o grupo carboxílico se encontra protonado, o que leva a uma posição mais interna deste na bicamada. Efeitos pequenos e pouco conclusivos foram observados no que respeita a propriedades da membrana como área por lípido, espessura da bicamada, ou perfis de parâmetros de ordem.

## Agradecimentos

No estágio laboratorial tive oportunidade de trabalhar em dinâmica molecular e no laboratório, o que o tornou numa experiência fantástica e também num desafio.

Em primeiro lugar, agradeço à Prof. Doutora Maria João Moreno pela oportunidade de realizar este estágio, por me ter esclarecido as dúvidas e me ter transmitido novos conhecimentos. Agradeço também ao Prof. Doutor Luís Loura por me ter mostrado um novo conceito da Química, a dinâmica molecular, foi uma experiência diferente, que me proporcionou novos desafios, agradeço também por estar sempre disponível para me transmitir todos os seus conhecimentos.

Quero agradecer também há minha mãe e ao meu irmão, por me apoiarem incondicionalmente, por todo o carinho, pela força e por não me fazerem desistir e estarem sempre lá para mim, nos bons e maus momentos. Quero também agradecer ao meu pai, independente de já não estar comigo, por toda a força que me deu ao longo da vida, que me faz seguir em frente e nunca desistir.

Agradeço às minhas amigas, especialmente à Susana e Rita, por me apoiarem em todas as minhas decisões, por acreditarem sempre em mim, por me ouvirem nos dias maus e bons e por me proporcionarem momentos de alegria quando os dias correm mal.

Ao Diogo, por estar sempre presente quando precisei, pelo apoio, paciência, disponibilidade e pela coragem que me transmitiu que nunca me fez desistir.

# Índice

1. Introdução.....	4
a. <i>Membranas biológicas</i> .....	4
b. <i>Ácidos biliares</i> .....	7
c. <i>Dinâmica Molecular</i> .....	8
d. <i>Âmbito do presente trabalho</i> .....	9
2. Detalhes das simulações .....	10
3. Apresentação e Discussão de Resultados.....	12
a. <i>Área por lípido e espessura da bicamada</i> .....	12
b. <i>Localização transversal dos ácidos/sais biliares</i> .....	13
c. <i>Orientação dos ácidos/sais biliares na membrana</i> .....	14
d. <i>Ligações de Hidrogénio</i> .....	15
e. <i>Interações com os grupos polares de POPC</i> .....	17
f. <i>Parâmetros de ordem de POPC</i> .....	18
4. Conclusões.....	20
5. Perspetivas Futuras.....	21
6. Referências.....	23

# 1. Introdução

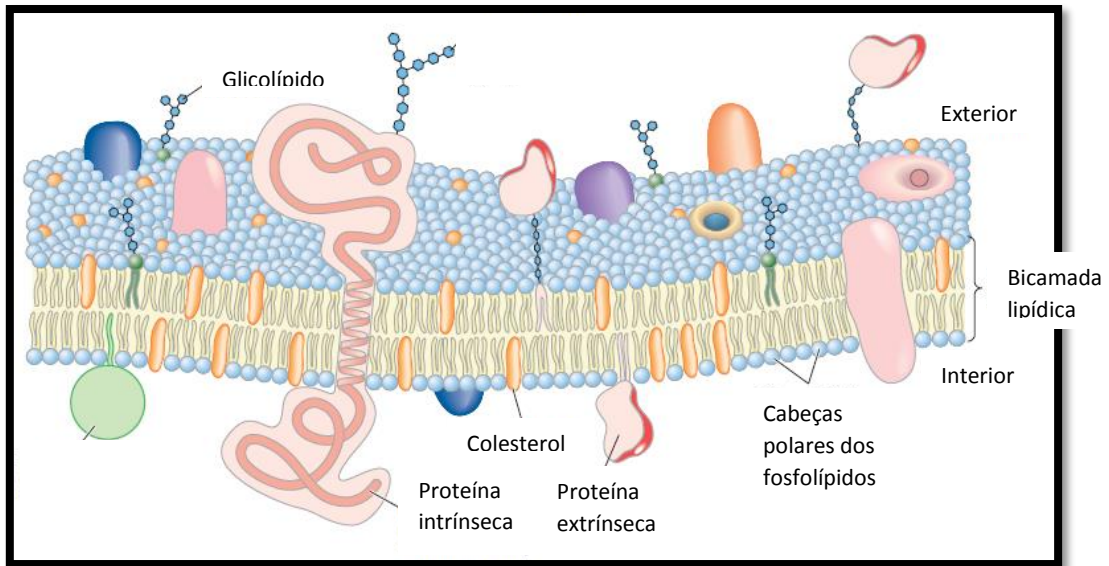
## **a. Membranas Biológicas**

As membranas biológicas promovem a organização dos processos biológicos. Sendo estruturas organizadas, são sistemas bastante complexos devido à diversidade de lípidos, proteínas e hidratos de carbono que se podem encontrar em diferentes proporções em cada célula e organelos.<sup>1</sup> Estas estão presentes tanto em organismos eucariotas como em procariotas, delimitando os compartimentos celulares isto é, separando o citoplasma e os organelos celulares do meio extracelular. As biomembranas regulam a composição do meio intracelular através do controlo do fluxo de nutrientes, produtos de degradação e iões para dentro e para fora da célula.<sup>2</sup>

As biomembranas são estruturas laminares fluidas, tendo apenas duas moléculas de lípido de espessura.<sup>1</sup> São bicamadas lipídicas, onde os lípidos estão orientados de tal forma que constituem um fluido bidimensional, apresentando uma estrutura flexível. A elas estão associadas proteínas intrínsecas e extrínsecas, sendo que as primeiras encontram-se fortemente ligadas às membranas através de interações hidrofóbicas que não são ligações covalentes, uma vez que esta interação dá origem a uma maior estabilidade termodinâmica, através da diminuição de interações entre o meio aquoso e proteína.<sup>2</sup>

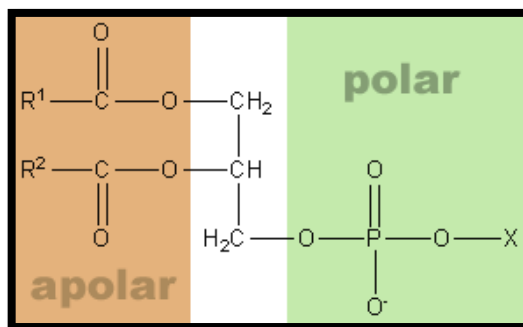
As proteínas intrínsecas estão mergulhadas e solvatadas pelas membranas, podendo apenas ser separadas através do tratamento com agentes que rompem a membrana (solventes orgânicos, detergentes e iões que “rompem” a estrutura da água enfraquecendo o efeito hidrofóbico, denominados agentes caotrópicos). Já as proteínas extrínsecas estão ligadas às cabeças polares dos lípidos através de interações electrostáticas e pontes de hidrogénio, podendo também estar ligadas às proteínas intrínsecas. As interações destas proteínas podem ser quebradas através da alteração do pH ou pela adição de iões (soluções salinas com força iónica elevada) deixando a membrana intacta.<sup>2</sup> Isto é possível devido à disposição dos lípidos nas membranas que têm uma estrutura comum, apresentando as partes hidrofóbicas (partes apolares) voltadas para dentro, longe do solvente (água), e as cabeças polares que são hidrofílicas, voltadas para fora em contacto com o solvente.

Seymour Jonathan Singer e Garth Nicolson, em 1972, propuseram o modelo do mosaico fluido (Figura 1), segundo o qual as membranas são soluções bidimensionais de proteínas globulares dispersas em lípidos orientados. Assim, a bicamada lipídica tem um duplo papel: por um lado é um solvente para proteínas intrínsecas de membrana e por outro lado é uma barreira de solubilidade. As proteínas de membrana são livres para se difundir lateralmente na bicamada lipídica, a não ser que estejam limitadas por interações especiais. Embora a difusão lateral (isto é, no plano da bicamada) possa ser rápida, a translocação espontânea de uma monocamada para a outra é um processo lento, sendo denominado por difusão transversal ou processo flip-flop.<sup>1,3</sup>



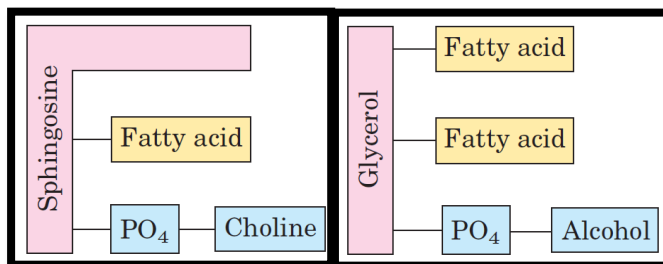
**Figura 1-** Modelo do mosaico fluido para a estrutura de uma membrana biológica.<sup>4</sup>

Nas membranas biológicas existem 3 tipos principais de lípidos: os fosfolípidos, os glicolípidos e os esteróis.<sup>1</sup>



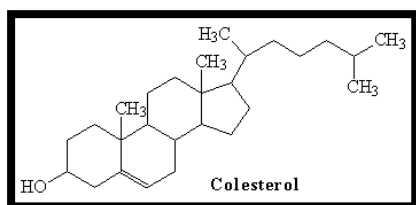
**Figura 2-** Estrutura básica de um glicerofosfolípido.

Os glicerofosfolípidos são os componentes fosfolipídicos mais abundantes nas membranas. São constituídos por dois ácidos gordos (de cadeias alifáticas R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup>, como se observa na figura 2), esterificados pela mesma molécula de glicerol, nas posições 1 e 2 desta. Por sua vez, a posição 3 do glicerol esterifica um grupo fosfato, que apresenta ainda um grupo de natureza variável (X na figura 2; pode ser um grupo colina, serina, entre outros) ligado a outro dos seus átomos de oxigénio. Globalmente, os fosfolípidos são moléculas anfifílicas, apresentando uma região apolar (cadeias alifáticas R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup>) e uma polar (fosfato e substituinte X).<sup>4</sup> Numa outra família de fosfolípidos, os esfingofosfolípidos, um resíduo de ácido gordo liga-se a uma molécula de esfingosina (Figura 3).<sup>4</sup>



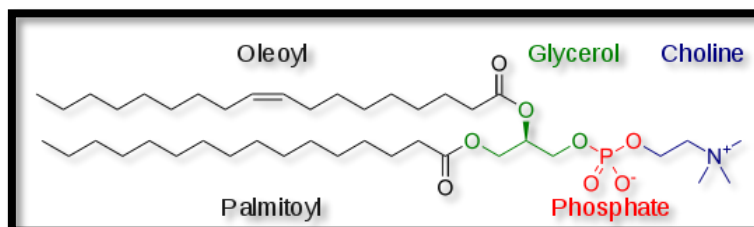
**Figura 3** – Comparação das estruturas básicas de um glicerofosfolípido (esquerda) e de um esfingofosfolípido (direita).<sup>4</sup>

Os glicolípidos são lípidos que têm na sua constituição hidratos de carbono. O esteroide mais comum nas membranas animais é o colesterol (Figura 4) que tem uma estrutura rígida e compacta, sendo uma molécula hidrofóbica, tendo apenas uma pequena parte polar: um grupo hidroxilo. Este componente regula a fluidez de membranas desordenadas, aumentando a ordem das cadeias laterais alifáticas, reduzindo a mobilidade dos constituintes desta e diminui a sua permeabilidade.<sup>1,2</sup>



**Figura 4** – Molécula de colesterol.

A molécula de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; Figura 5) é neutra a pH fisiológico (zwitteriônica) e é um representante típico dos fosfolípidos mais abundantes nas membranas animais, os glicerofosfolípidos.<sup>5</sup> No POPC, um dos resíduos de ácido gordo é uma cadeia saturada composta por ácido palmítico e a outra cadeia é monoinsaturada composta por ácido oleico.



**Figura 5**- Estrutura de uma molécula de POPC.

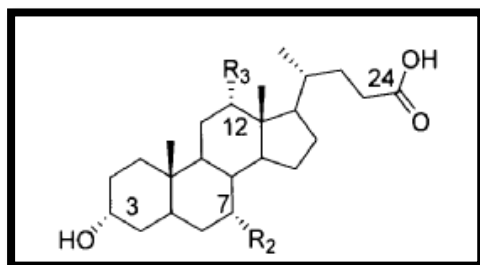
Membranas formadas unicamente por POPC apresentam uma transição de fase gel (fase ordenada)-fluido (fase desordenada) à temperatura de -2 °C,<sup>13</sup> abaixo da temperatura ambiente. Por este motivo, nas condições normais, o POPC encontra-se num estado líquido-desordenado, compatível com a difusão rápida de componentes no plano da membrana.

### **b. Ácidos Biliares**

Os ácidos biliares (ABs) pertencem à família dos esteróides. São detergentes biológicos sintetizados no fígado (nos hepatócitos) de animais vertebrados a partir do colesterol, tendo a capacidade de formar agregados (micelas). Estes são conhecidos por serem moléculas digestivas, participando na digestão e absorção de lípidos e vitaminas lipossolúveis.<sup>6</sup> Os ácidos biliares representam os principais solutos na bília e estão envolvidos também em várias funções, não só no fígado, como também nos intestinos.<sup>7</sup> Eles fazem parte de uma família de moléculas anfifílicas que diferem entre si na estrutura, propriedades físicas, químicas e biológicas, tendo algumas características semelhantes: todas estas moléculas têm um núcleo esteróide rígido, constituído por três anéis de seis membros e um anel de 5 membros (Figura 6).<sup>6,8</sup>

Nos seres humanos, os ácidos biliares mais abundantes são os ABs primários, o ácido cólico (CA) e ácido quenodesoxicólico (CDCA) e os ABs secundários, o ácido desoxicólico (DCA) e o ácido litocólico (LCA). Os ABs primários são sintetizados

diretamente a partir do colesterol pelo hepatócito, através da adição de grupos hidroxilo e da oxidação da cadeia lateral, para a formação de um produto final mais solúvel em água. Esta hidroxilação ocorre sempre num dos lados da molécula, resultando então numa molécula anfipática. Por outro lado, os ABs secundários são formados no intestino através de bio transformação bacteriana de CA e CDCA, respetivamente. <sup>7,9</sup>



**Figura 6** – Estrutura geral dos ácidos biliares.

### c. Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular têm sido amplamente utilizadas em estudos de sistemas modelo de membranas biológicas, pois proporcionam informação a nível de organização espacial e temporal do sistema, onde as partículas representam átomos de lípidos, água e solutos que são seguidos ao longo do tempo. <sup>10</sup>

Nestas simulações todos os átomos no sistema são tratados de maneira clássica, assumindo que a aproximação de Born-Oppenheimer se verifica e os núcleos podem ser tratados como partículas clássicas. As interações atômicas estão divididas em interações ligantes entre átomos ligados através de ligações químicas covalentes e interações não-ligantes, geralmente entre qualquer par de átomos que estão dentro de um determinado raio de corte (*cutoff radius*). Para as interações não ligantes (interações eletrostáticas e de van der Waals), uma carga parcial e parâmetros para a repulsão e atração são atribuídos a cada átomo. Por outro lado, as interações ligantes são descritas através de termos correspondentes a ligações, ângulos e diedros. As ligações e os ângulos são usualmente descritas como osciladores harmónicos e os ângulos diedros são descritos normalmente por uma função periódica adequada. A típica função do potencial, também conhecida por campo de forças (Equação 1), tem a seguinte forma. <sup>11,12</sup>

$$V = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i < j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \sum_{\text{ligações}} \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij}^0)^2 + \quad (\text{Equação 1})$$

$$+ \sum_{\text{ângulos}} \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 + \sum_{\text{diedros}} k^\phi [1 + \cos(n(\phi - \phi^0))]$$

Nesta equação,  $r_{ij}$  é a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ,  $q_i$  é a carga parcial do átomo  $i$ ,  $A_{ij}$  e  $B_{ij}$  são parâmetros de Lennard-Jones,  $k^b$ ,  $k^\theta$  e  $k^\phi$  são constantes de força para ligações, ângulos e diedros,  $n$  é a multiplicidade dos diedros e  $b^0$ ,  $\theta^0$ ,  $\phi^0$  são os valores de equilíbrio para o comprimento de ligação, ângulos e diedros. <sup>11</sup>

Esta forma geral mostra os pressupostos mais importantes que são assumidos em dinâmica molecular: apenas as interações não-ligantes envolvendo pares de átomos são tidas em conta, as interações não-ligantes envolvendo três ou mais átomos são



negligenciadas, os átomos são representados por cargas pontuais, a polarizabilidade eletrônica é normalmente negligenciada e geralmente usam-se formas quadráticas simples. A forma precisa desta função de potencial é uma escolha para a qual existem muitas opções. Em particular, existem diferentes formas de uso comum para as interações de Van der Waals e dos diedros e as ligações são muitas vezes constrangidas nas simulações.<sup>11,12</sup>

Para um dado instante  $t$ , a partir da energia potencial  $V(\mathbf{r}_i)$  calculada através da Eq. 1 na posição  $\mathbf{r}_i$  correspondente a cada partícula  $i = 1, \dots, N$ , a força  $\mathbf{F}_i(t)$  que atua é obtida através do gradiente de  $V$  (Eq. 2). Esta força é, por sua vez, utilizada para resolver a equação diferencial correspondente à segunda lei de Newton (Eq. 3), de modo a calcular  $\mathbf{r}_i$  num instante  $t + \Delta t$ .

$$\mathbf{F}_i = -\frac{dV}{d\mathbf{r}_i} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2\mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (\text{Equação 3})$$

Estas equações são resolvidas simultaneamente em pequenos intervalos de tempo  $\Delta t$ , normalmente entre 1 fs ( $10^{-15}$ s) e 4 fs. Deve ter-se em atenção o facto de que a temperatura e a pressão devem permanecer nos valores necessários, o que é conseguido através do acoplamento do sistema a “reservatórios” de temperatura (termóstato) ou pressão (baróstato), respetivamente. Após um certo número de passos realizados, a simulação é concluída. O resultado principal da simulação consiste nas sequências temporais das posições e/ou velocidades de cada uma das partículas, usualmente designado por trajetória do sistema. Depois de alterações iniciais, o sistema normalmente alcança um estado de equilíbrio. Através da média de várias trajetórias de equilíbrio são retiradas propriedades macroscópicas. Adicionalmente, uma vez que há correspondência direta e bem estabelecida entre os passos da simulação e o tempo físico, podem ser igualmente estudadas as velocidades de processos que ocorrem à escala microscópica.

#### **d. Âmbito do presente trabalho**

Para além da sua ação como veículos para transporte de substâncias hidrofóbicas na digestão, os ABs também interatuam com as biomembranas, modificando as suas propriedades. Os seus efeitos dependem largamente da sua concentração membranar. Quando esta é elevada, a agregação de ABs conduz à formação de poros, aumento da permeabilidade através da bicamada e sua eventual dissolução. A concentrações mais reduzidas, contudo, a interação deverá ser sobretudo interfacial e os efeitos são mais subtis, refletindo-se sobretudo num aumento de fluidez.<sup>14</sup> Uma maneira de obter informação detalhada sobre a conformação dos ABs em membranas a baixas concentrações locais e o respetivo impacto é através da utilização de simulações de dinâmica molecular.

Para este efeito, no presente trabalho utiliza-se uma razão AB: lípido igual a 1:64 (2 moléculas de soluto numa bicamada com 128 moléculas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC)) de três ácidos biliares: ácido cólico (CA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) e ácido desoxicólico (DCA), que são os ácidos biliares mais

abundantes nos seres humanos (Figura 7). O presente trabalho incide na parametrização, localização e orientação das moléculas em bicamadas pouco perturbadas, comparando os três ácidos biliares na forma protonada, com a sua forma desprotonada. Ele surge na sequência dum estudo que incidiu sobre as correspondentes formas conjugadas com glicina dos sais de sódio destes ABs (glicocolato, glicoquenodesoxicolato e glicodesoxicolato).<sup>39</sup> Este trabalho evidenciou uma localização próxima da interface lípido/água para esses três sais, com os respetivos grupos polares adotando uma conformação favorecida pela possibilidade de interações (ligações de hidrogénio, pares iónicos) com átomos apropriados de fosfolípido e solvente. É intenção do presente estudo investigar se as formas não conjugadas apresentam ou não um comportamento distinto das conjugadas com glicina e se o grau e as posições de hidroxilação conduzem a diferenças assinaláveis no comportamento daquelas no regime das baixas concentrações.

## 2. Detalhes da simulação

A simulação de dinâmica molecular e a análise das trajetórias foram feitas utilizando o pacote GROMACS 5.0.5.<sup>16,17,18</sup> O modelo de água usado foi o SPC.<sup>19</sup> A topologia das moléculas de POPC (usando uma descrição unificada para os grupos CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, baseada nos parâmetros de Berger et al.<sup>20</sup> para 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC)) foi obtida do *site* do grupo do Dr. Peter Tieleman ([http://moose.bio.ucalgary.ca/ndex.php?page=Structures\\_and\\_Topologies](http://moose.bio.ucalgary.ca/ndex.php?page=Structures_and_Topologies)).<sup>21</sup>

O sistema-base consistiu numa bicamada totalmente hidratada (128 POPC: 5412 H<sub>2</sub>O), montado usando programas de construção do GROMACS. Como os valores de  $pK_a = -\log K_a$  (sendo  $K_a$  a constante de ionização) dos ácidos biliares em estudo na presença de membranas são muito próximos do pH fisiológico<sup>14</sup>, cada ácido foi modelado tanto na sua forma não ionizada, como na forma do correspondente sal de sódio. Para este fim, o sistema de anéis tetracíclicos foi descrito de acordo com o modelo de Høltje et al., desenvolvido inicialmente para o colesterol.<sup>22</sup> Este modelo é baseado no campo de forças GROMOS87.<sup>23</sup> Os parâmetros dos grupos ligados ao sistema de anéis, bem como os contra iões Na<sup>+</sup>, foram igualmente retirados do campo de forças GROMOS87.

As cargas parciais dos iões biliares foram obtidas através de cálculos quânticos *ab initio*,<sup>24</sup> usando o software Gamess-US.<sup>25</sup> A estabilidade das topologias assim obtidas foi verificada através de simulações de moléculas isoladas em vácuo. Posteriormente, para cada ácido/sal biliar, foram realizados dois conjuntos de simulações: no primeiro, duas moléculas de CAH, DCAH ou CDCAH (estruturas representadas na Figura 7), ou dois iões de CA, GDCA ou GCDCA, foram posicionados no meio aquoso; no segundo, duas moléculas ou dois iões de cada espécie foram colocados inicialmente no centro da bicamada de POPC, com o sistema de anéis paralelo ao plano da membrana.

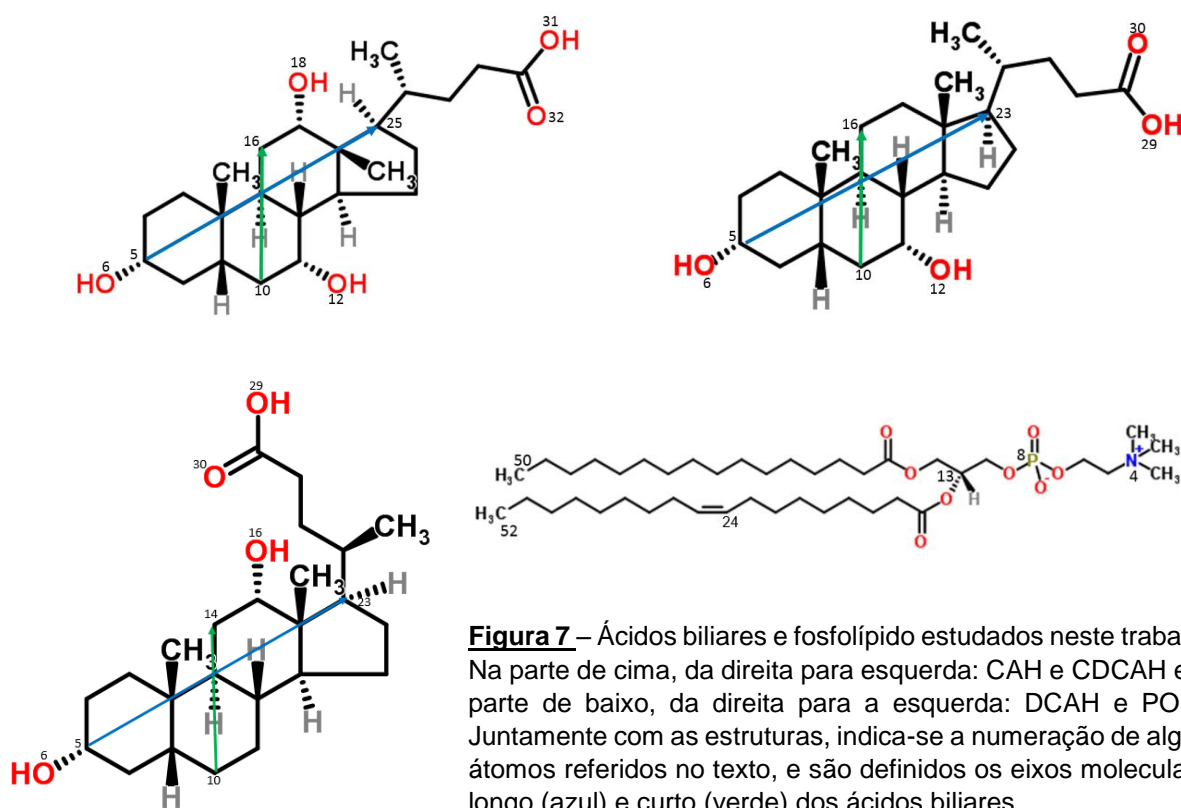
Em todos os sistemas realizou-se uma minimização da energia, de modo a remover contactos atómicos desfavoráveis, e para todos eles foi feita uma pequena corrida (100 ps) usando passo de integração de 0,5-1 fs, seguido de uma corrida de 200 ns com um passo de integração de 0,5 fs (espécies protonadas) ou 2 fs (aniões). Todos

os comprimentos de ligação foram constrangidos aos respetivos valores de equilíbrio usando os algoritmos SETTLE,<sup>26</sup> para a água, e LINCS,<sup>27</sup> para todas as outras ligações.

Todas as simulações foram efetuadas a pressão (1 bar), temperatura (298,15 K) e número de partículas constante, bem como com condições fronteira periódicas. O controlo da pressão e temperatura foi feito através do esquema de acoplamento fraco de Berendsen,<sup>28</sup> e do termóstato *V-rescale*,<sup>29</sup> com tempos de relaxação de 1,0 ps e 0,1 ps, respetivamente. Utilizou-se controlo semi-isotrópico da pressão, controlando de modo independente as componentes segundo as direcções *xy* (no plano da membrana) e *z* (normal a este plano). As interações de Van de Waals e de Coulomb foram truncadas a 1,0 nm, enquanto o tratamento Particle Mesh Ewald,<sup>30</sup> foi aplicado para interações electrostáticas de longo alcance.

Quando os solutos foram colocados inicialmente no centro da bicamada, observou-se a sua deslocação para a localização transversa de equilíbrio nos primeiros 50 ns de cada corrida, podendo os restantes 150 ns serem utilizados para análise. Por outro lado, em alguns sistemas em que as moléculas/íões foram inicialmente colocados na fase aquosa, verificou-se uma convergência lenta para a posição final de equilíbrio, que exigiu o prolongamento das respetivas simulações para um tempo total de várias centenas de ns (resultado não mostrado).

Comparando os dois conjuntos de simulações, verificou-se que em ambos a posição final foi semelhante, apresentando, no entanto, as simulações em que os solutos partiram da fase aquosa maior variabilidade. Por esta razão os resultados apresentados abaixo serão relativos aos ácidos/íões biliares inicialmente localizados no centro da membrana, a menos que explicitado em contrário.



**Figura 7** – Ácidos biliares e fosfolípido estudados neste trabalho. Na parte de cima, da direita para esquerda: CAH e CDCAH e na parte de baixo, da direita para a esquerda: DCAH e POPC. Juntamente com as estruturas, indica-se a numeração de alguns átomos referidos no texto, e são definidos os eixos moleculares longo (azul) e curto (verde) dos ácidos biliares.

### 3. Apresentação e Discussão de Resultados

#### a. Área por lípido e espessura da bicamada

A área por lípido foi calculada através da divisão da área lateral (plano xy) da caixa de simulação pelo número de lípidos em cada monocamada. A comparação deste critério com valores experimentais permite avaliar uma propriedade fundamental da bicamada lipídica, a qualidade do campo de força. É possível concluir se o sistema chegou ou não ao equilíbrio durante o tempo de simulação, através dos valores de área por lípido de cada sistema. Se o sistema chegou ao equilíbrio, deve escolher-se a janela temporal que vai ser usada na análise. No trabalho em questão, em que os sistemas usados basearam-se numa bicamada de POPC hidratada previamente equilibrada, a área por lípido instantânea apresentou variações ligeiras e não sistemáticas desde os instantes iniciais em todas as simulações. Na tabela 1 estão apresentados os valores das áreas por lípido, para os sistemas estudados.

POPC/CA	POPC/CDCA	POPC/DCA
(0,657± 0,010) nm <sup>2</sup>	(0,654± 0,012) nm <sup>2</sup>	(0,661± 0,010) nm <sup>2</sup>
POPC/CAH	POPC/CDCAH	POPC/DCAH
(0,664± 0,009) nm <sup>2</sup>	(0,658± 0,011) nm <sup>2</sup>	(0,665± 0,011) nm <sup>2</sup>

**Tabela 1** – Valores médios e desvios-padrão das áreas por lípido dos sistemas estudados, no intervalo [50 ns, 200 ns].

É aparente destes resultados que as diferenças entre as áreas moleculares médias não são significativas, e em todos os casos os valores assemelham-se ao obtido para uma bicamada de POPC puro usando um protocolo de simulação idêntico ((0,66±0,02) nm<sup>2</sup>).<sup>15</sup> Podemos observar que estes ácidos/sais biliares quando incorporados nas membranas numa proporção de 1:64, não levam a alterações importantes nas propriedades estruturais globais da bicamada. Um outro parâmetro que pode ser calculado é a espessura da bicamada. A espessura é definida como a distância média entre os átomos de fósforo de POPC (representado na figura 7 como P8) de monocamadas opostas. Este parâmetro apresenta geralmente variação inversa à da área por lípido. A espessura da bicamada, juntamente com a área molecular por lípido, é uma das principais propriedades estruturais do sistema. Na Tabela 2 encontram-se representados os valores da espessura da bicamada para cada sistema estudado.

POPC/CA	POPC/CDCA	POPC/DCA
(3,703± 0,050) nm	(3,698± 0,057) nm	(3,669± 0,046) nm
POPC/CAH	POPC/CDCAH	POPC/DCAH
(3,656± 0,044) nm	(3,682± 0,050) nm	(3,649± 0,057) nm

**Tabela 2** – Valores da espessura da bicamada de POPC dos sistemas estudados.

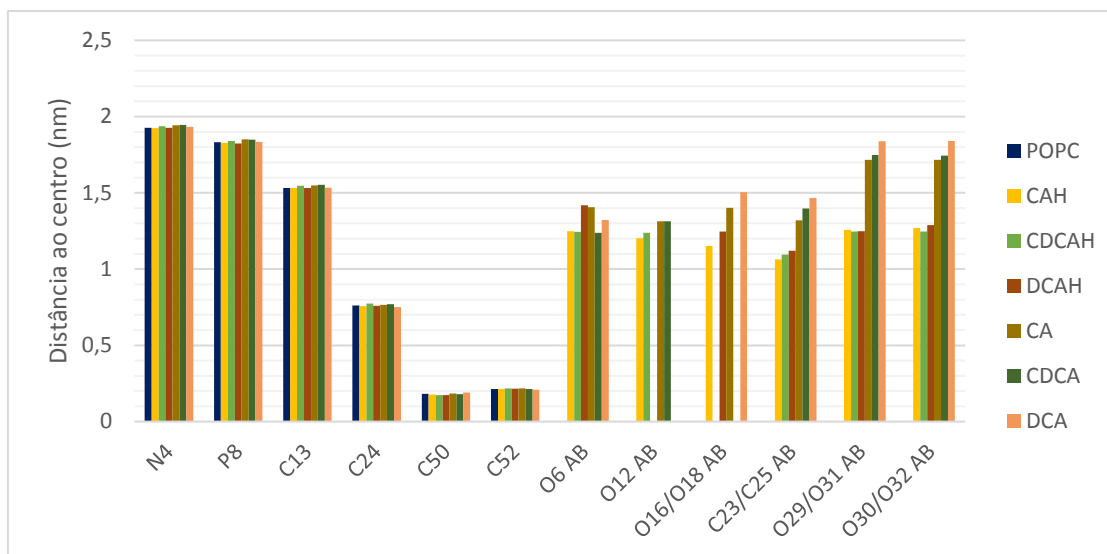
O valor para a espessura da bicamada para o POPC puro é de (3,66± 0,10) nm.<sup>15</sup> Na presença dos sais biliares (CA, CDCA e DCA), o sistema CA apresenta uma maior

espessura da bicamada, enquanto o DCA apresenta uma espessura da bicamada menor, ao contrário do que se observa na área por lípido, onde esta é maior no DCA e menor no CA, confirmando-se uma relação contrária. O mesmo se observa para os ácidos biliares (CAH, CDCAH e DCAH), onde o sistema CDCAH apresenta uma maior espessura, enquanto o DCAH apresenta uma espessura menor, ao contrário do que se observa na área por lípido, onde esta é maior no DCAH e menor no CDCAH. Verifica-se deste modo a esperada variação inversa da espessura da bicamada em relação à área por lípido em ambos os conjuntos de sistemas (sais/ácidos). Isto é devido ao facto de membranas onde as cadeias acilo estejam mais desordenadas apresentarem simultaneamente uma menor dimensão na direção normal à bicamada (isto é, estão menos alinhadas nessa direção) e uma maior área média por lípido (as cadeias têm uma distribuição lateral mais alargada). A diferença entre os valores dos sistemas estudados não é significativa, tal como verificado para a área molecular média.

### ***b. Localização transversal dos ácidos/sais biliares***

Para além do átomo P8 considerado na secção anterior para o cálculo da espessura da bicamada, outros átomos de diferentes regiões (colina: N4; glicerol: C13; cadeias acilo: C24, C50, C52; ver numeração na Figura 7) de POPC apresentam uma posição média idêntica para os diferentes sistemas e semelhante à analisada para o POPC puro (Figura 8, esquerda).<sup>31</sup> Esta semelhança entre diferentes sistemas também é verificada na localização transversa de átomos correspondentes dos vários ácidos/sais biliares para um dado estado de ionização, uma vez que os valores médios para os átomos apresentados na parte direita da Figura 8 são próximos. Os átomos escolhidos mais próximos do sistema de anéis (O6, O12 e O16 da numeração da Figura 7 para CAH e CA, e átomos correspondentes para os outros ácidos/sais biliares) têm em todos os casos uma localização correspondente à zona do glicerol (C13) ou parte superior das cadeias acilo do POPC (entre C13 e C24 do fosfolípido). Em todos os ABs protonados, de entre os átomos cujas coordenadas foram seguidas em detalhe, o mais interno (localizado em média a 1,1-1,2 nm do centro) foi o C23 (CDCAH, DCAH) / C25 (CAH), isto é o átomo do sistema de anéis onde se liga a cadeia. Os diferentes átomos de oxigénio dos grupos hidroxilo têm uma localização ligeiramente mais superficial (1,2-1,4 nm do centro). Destes átomos, em cada sistema, é o O6 aquele que tem uma localização mais externa, mas as diferenças não são significativas. Estas localizações pressupõem que o sistema de anéis assume uma orientação quase paralela ao plano da membrana. Já os átomos terminais da cadeia, possivelmente devido à polaridade do grupo carboxílico que lhe permite interagir favoravelmente com os dipolos dos carbonilos do POPC, têm uma localização geralmente mais superficial do que o C23/C25, mas não mais do que O6 para estas formas protonadas.

No que respeita às formas desprotonadas, enquanto os hidroxilos mais afastados da cadeia (O6, O12) têm localizações idênticas às assumidas nas respetivas formas protonadas, já os átomos terminais da cadeia têm uma localização significativamente mais externa, próxima do grupo polar dos lípidos (~1,7-1,8 nm do centro da bicamada). Esta posição do grupo carboxilato ionizado "puxa" a cadeia na direção da interface, conduzindo a uma localização mais externa do C23/C25 e mesmo do hidroxilo mais próximo da cadeia no CA e DCA, o O16/O18.



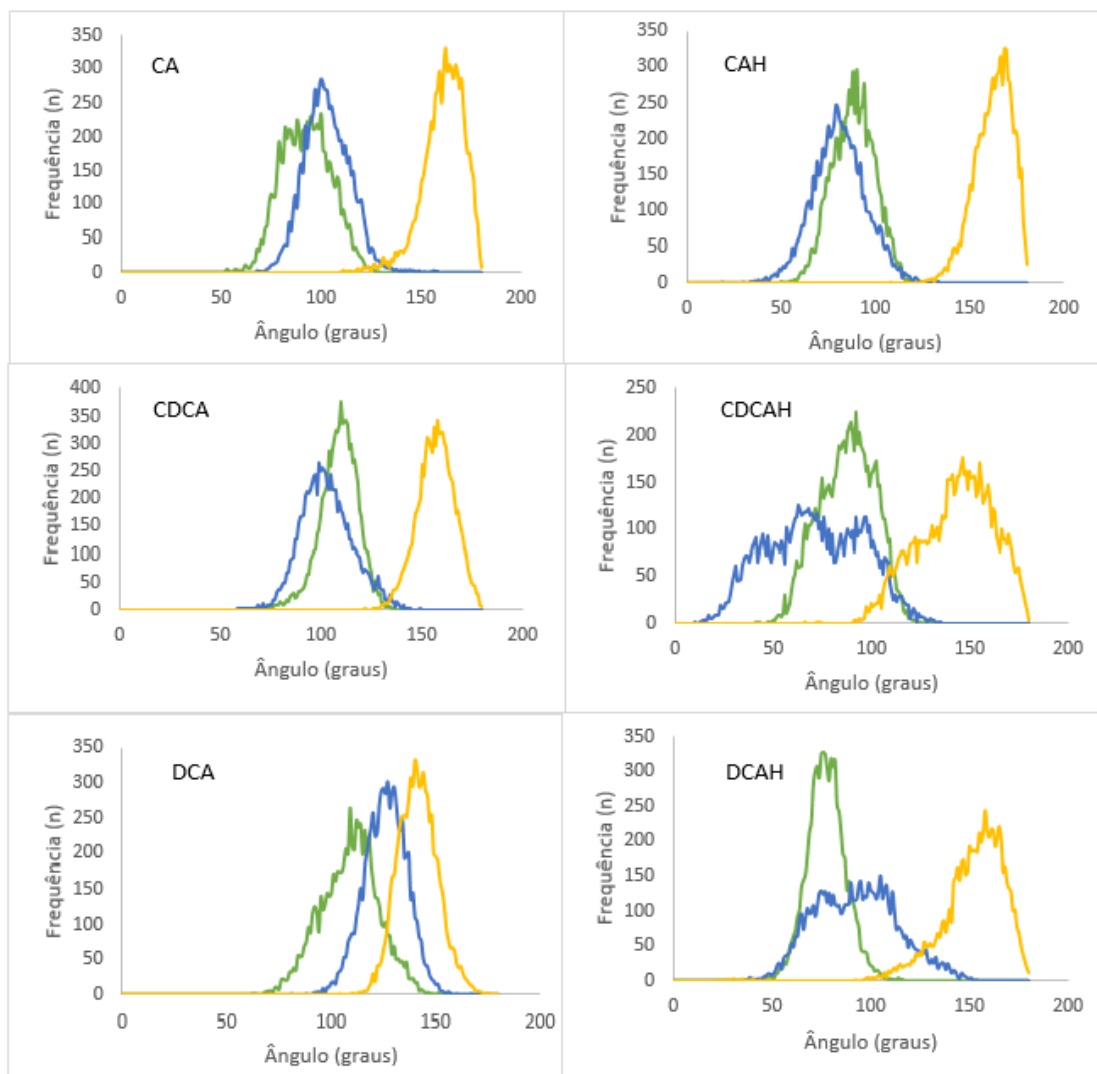
**Figura 8** – Posições transversas médias de átomos selecionados para bicamadas constituídas apenas por POPC (barras a azul) ou contendo também ácidos e sais biliares na proporção POPC/AB de 64:1.

### c. Orientação dos ácidos/sais biliares na membrana

Na Figura 9 estão representadas as distribuições dos ângulos entre a normal à bicamada lipídica e o eixo longo (definido como o vetor entre o átomo C5 e C25 para o CAH e CA, e C5 e C23 para o CDCAH, CDCA, DCAH e DCA, como se pode observar na Fig. 7), o eixo curto (definido como o vetor entre o átomo C10 e C14 para o DCAH e DCA, e C10 e C16 para o CAH, CA, CDCAH e CDCA como se pode observar na Fig. 7) e a normal ao plano do sistema de anéis (definida pelo produto externo dos vetores que definem os eixos longo e curto). Apesar de existirem algumas diferenças entre os gráficos para os vários sistemas, estes apresentam um padrão comum. Os eixos curto e longo apresentam poucas diferenças na orientação conformacional dos vários ácidos/sais biliares. Estes dois eixos apresentam valores entre  $60^\circ$  e  $110^\circ$ , o que está de acordo com a orientação do sistema de anéis predominantemente paralela ao plano da bicamada.

Para o eixo curto, tanto para as espécies desprotonadas, como para as protonadas, os máximos seguem uma ordem crescente  $CDCA < CA < DCA$ . Isto pode estar relacionado com as estruturas dos três ácidos e sais biliares, em particular com os grupos hidroxilo existentes nos anéis tetracíclicos. Ao observar a Figura 7, vemos que o CAH tem três grupos hidroxilo, tal como o seu sal (CA). Estes grupos encontram-se dispostos de maneira mais ou menos simétrica relativamente ao eixo longo (O6 alinhado com o eixo longo, O12 e O18 encontram-se em lados opostos deste eixo), enquanto o CDCAH, DCAH e os seus respetivos sais apenas têm dois grupos hidroxilo. Destes, o O6 encontra-se alinhado com o eixo longo como no caso do CAH e o O12 (do DCAH) e O16 (do CDCAH) estão situados em lados opostos da estrutura rígida de anéis. Esta diferença pode relacionada com a diferença nas distribuições angulares. Tomemos como exemplo o CDCAH e o respetivo sal, onde falta o grupo hidroxilo O18 (na numeração do CAH da Figura 7). Isto faz com que esse lado do sistema de anéis, por não conseguir estabelecer interações de ligação de hidrogénio com átomos mais externos de POPC, adote posições ligeiramente mais internas na bicamada, o que faz

corresponder a ângulos médios maiores entre o eixo curto e a normal à bicamada. O CAH e o seu sal adotam uma orientação intermédia, já o DCAH e DCA adotam uma orientação inversa à do CDCAH e CDCA. Em relação à normal ao plano, obtêm-se distribuições com um máximo entre 140° e 170°, o que corresponde a orientações dos sistemas de anéis aproximadamente paralelas ao plano da bicamada.

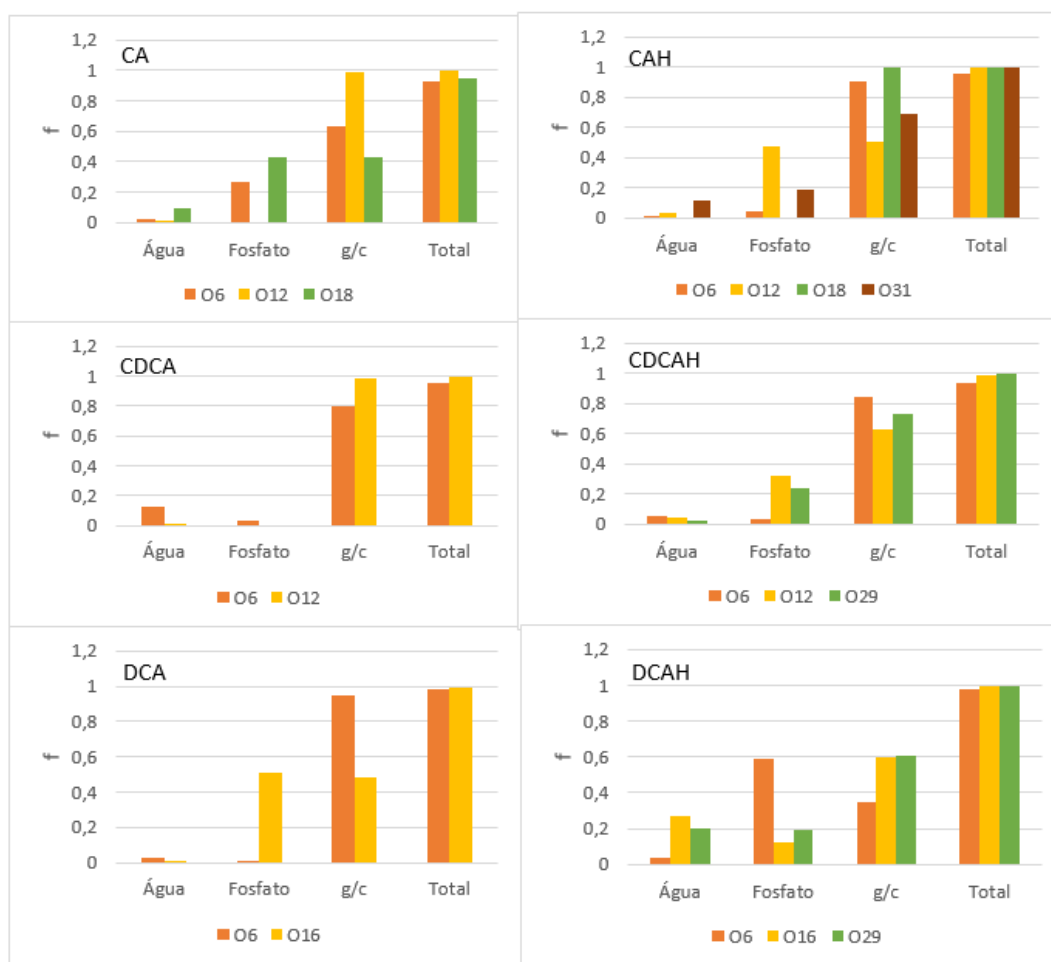


**Figura 9** – Distribuições dos ângulos entre os eixos longo (verde), curto (azul) e normal ao sistema de anéis (amarelo), e a normal à bicamada, para os ácidos e sais biliares em estudo. Os eixos moleculares foram definidos conforme a Figura 7.

#### **d. Ligações de Hidrogénio**

A análise dos tópicos anteriores indica que a localização e a orientação dos ácidos e sais biliares na bicamada é afetada pelo facto de se estabelecerem ou não interações com o POPC e água, incluindo ligações de hidrogénio. Os ácidos e sais biliares em estudo possuem vários átomos de oxigénio que podem funcionar como aceitadores de ligações de hidrogénio, e também grupos hidroxilo que podem ser dadores e aceitantes nestas ligações. Nestas simulações foi analisada a ocorrência de ligações de hidrogénio, registando-se uma ligação de hidrogénio quando a distância entre os átomos de dador e aceitante era inferior a 0,35 nm e o ângulo entre a ligação ao H do dador e o vetor entre o H e o grupo aceitante era menor que 30°.

Na figura 10 estão representadas as frequências de ligações de hidrogénio onde os ácidos/sais se comportam como dadores de H. Ilustram-se aqui todos os sistemas que participam neste tipo de ligações, mais frequentemente com átomos de oxigénio do resíduo de glicerol e do carbonilo da molécula de POPC, em conformidade com a localização e posição de cada ácido/sal biliar no respetivo sistema. Para átomos de oxigénio da água ou do grupo fosfato de moléculas de POPC, foram registradas menores frequências para as ligações de H, em todos os sistemas.

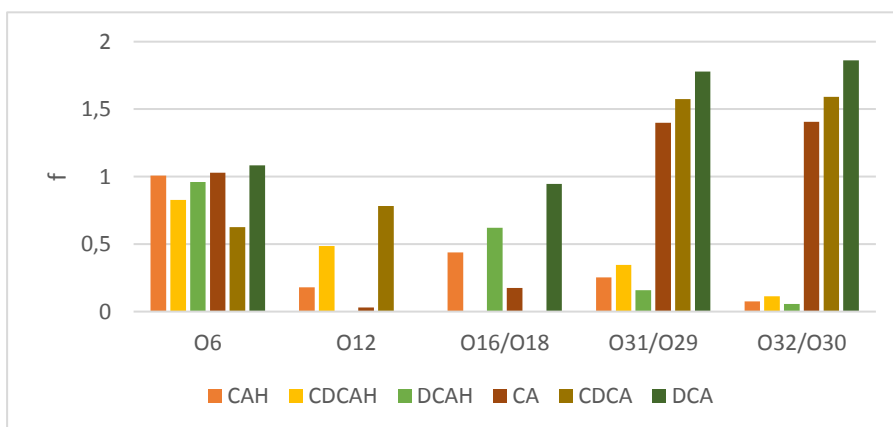


**Figura 10** – Frequências das ligações de hidrogénio entre grupos dos sais (ácidos) biliares que participam como dadores e grupos do POPC ou água que participam como aceitantes. (g/c – glicerol/carbonilo da molécula de POPC).

Nos sistemas desprotonados, o CDCA e o DCA parecem estabelecer menos ligações de hidrogénio como dador para os oxigénios do fosfato, enquanto para o CA, o O6 estabelece um número elevado de ligações de H com o grupo fosfato do POPC. Já nos sistemas protonados, o O6 do DCAH estabelece mais ligações de H com os oxigénios do fosfato, ao contrário do CAH e CDCAH. Em ambos os casos, a maior ocorrência de ligações de H para os fosfatos (cuja localização é mais externa do que a dos grupos glicerol/carbonilo) correlaciona-se com uma posição transversa mais exterior de O6 dessa espécie do que nos outros sistemas com o mesmo grau de protonação. Contudo, não é aparente qualquer relação direta com a estrutura química da molécula doadora.



Nos ácidos/sais biliares, os oxigénios dos grupos –OH do sistema de anéis apresentam também alguma capacidade de aceitar ligações de H provenientes da água, especialmente o átomo O6, que se encontra menos impedido estereoquimicamente, conforme ilustrado na Figura 11. Uma exceção, relativamente ao comentado anteriormente, é o DCAH, onde o mesmo átomo (O6) surge como dador frequente para os oxigénios do grupo fosfato de POPC (Figura 10). Um comportamento idêntico é observado para o seu sal (DCA), mas com o O16. Nos sistemas desprotonados, os oxigénios carboxílicos apresentam uma maior frequência de aceitação de ligações de hidrogénio provenientes de átomos dadores de água, o que é consistente com a sua localização mais externa e conseqüente maior acessibilidade ao solvente. Podemos concluir que os átomos mais eletronegativos dos três ácidos/sais biliares estudados estão constantemente envolvidos em ligações de H como dadores e frequentemente como aceitantes. Por último, é de referir que a análise acima escrita incidiu exclusivamente sobre interações intermoleculares. Com efeito, nas simulações em vácuo de moléculas isoladas (destinadas a testar as topologias) observou-se o estabelecimento de ligações de hidrogénio intramoleculares (não mostrado), estas não foram detetadas para moléculas em interação com bicamadas lipídicas hidratadas.



**Figura 11** - Frequências das Ligações de Hidrogénio entre átomos de água que participam como dadores e ácidos/sais biliares que participam como aceitantes.

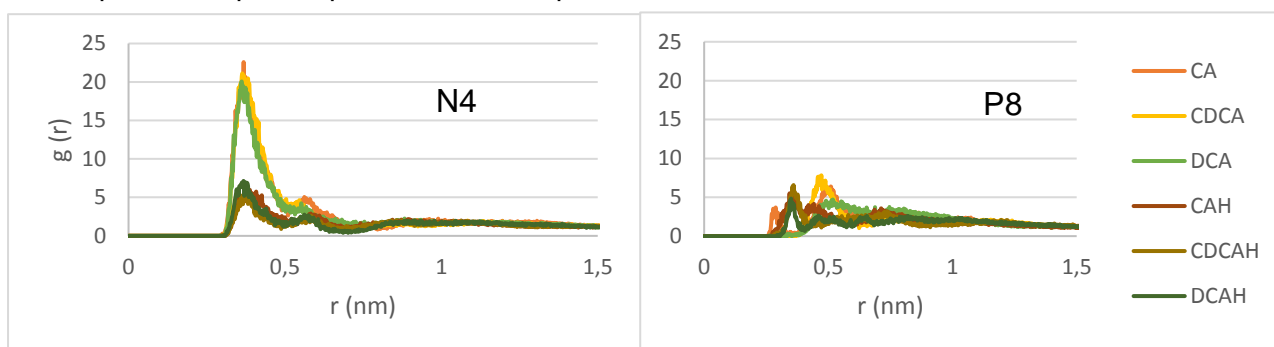
#### ***e. Interações com os grupos polares de POPC***

A localização mais externa dos átomos de oxigénio dos grupos carboxilo e carboxilato dos diferentes ácidos/sais biliares favorece o estabelecimento de interações electrostáticas localizadas, com átomos ou grupos de átomos mais eletropositivos do grupo polar de POPC. Para ver se isto acontece, foram calculadas funções de distribuição radial (RDFs) dos átomos N4 e P8 de POPC à volta dos oxigénios dos grupos carboxilo/carboxilato dos ácidos/sais biliares (para o CAH e respetivo sal foram considerados os átomos O31 e O32, e para o CDCAH e DCAH e respetivos sais foram considerados os átomos O29 e O30), como se pode observar na Fig. 12.

Esta função é definida como a densidade local de átomos do segundo tipo em função da distância a átomos do primeiro grupo, normalizada por divisão pela densidade global dos átomos do segundo grupo. As RDF manifestam-se através de um fator de enriquecimento ( $g(r) > 1$ ) ou empobrecimento ( $g(r) < 1$ ) da densidade local de átomos do segundo grupo. Observa-se que, para um dado estado de ionização, as RDFs calculadas apresentam semelhança entre os vários sistemas em estudo. Contudo, existe uma diferença crucial entre os ácidos e os sais, com se explica abaixo.

Para os sais biliares, as funções de distribuição radial do átomo de N4 à volta dos carboxilatos apresentam um máximo bem definido e valores significativamente mais elevados. O máximo ocorre a aproximadamente 0.35-0.40 nm. O que se observa no caso do átomo de N4 é uma interação com todo o conjunto tetraédrico (-CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) do POPC, onde o átomo N4 ocupa o centro geométrico e não uma interação específica do carboxilato dos ácidos/sais biliares com o átomo N4 do POPC em particular. Isto ocorre devido ao átomo N4 ser eletronegativo (tem carga parcial -0.50 no modelo utilizado), mas este está rodeado por três grupos metilo (com carga atómica +0.40×3) e um metileno (com carga atómica +0.30), o que confere carga +1 ao grupo colina. As distâncias correspondentes ao máximo são demasiado elevadas para interação direta entre dois átomos e refletem portanto uma interação entre grupos (carboxilato e colina). Crucialmente, o pico correspondente a esta interação é muito menos intenso nos ácidos do que nos sais, como consequência da protonação, o que confirma a sua natureza eletrostática.

Apesar da elevada carga positiva (+1,7) no modelo usado e da sua localização transversa semelhante à dos átomos N4, as RDF do átomo P8 não são tão bem definidas e apresentam valores mais baixos no máximo. O que acontece é que o átomo P8 está rodeado com 4 átomos eletronegativos de O, o que confere ao grupo PO<sub>4</sub> uma carga global -1. As RDFs observadas para o átomo P8 refletem apenas a interação específica do carboxilato com o grupo colina próximo, pois os oxigénios periféricos servem para uma blindagem eficiente relativamente à possibilidade de interação electrostática entre os oxigénios carboxílicos e o átomo P8. Esta situação é semelhante para as espécies protonadas e desprotonadas.



**Figura 12** – RDFs dos átomos N4 e P8 de POPC em relação aos oxigénios dos grupos carboxilato e carboxilo dos sais/ácidos biliares.

#### f. Parâmetros de Ordem de POPC

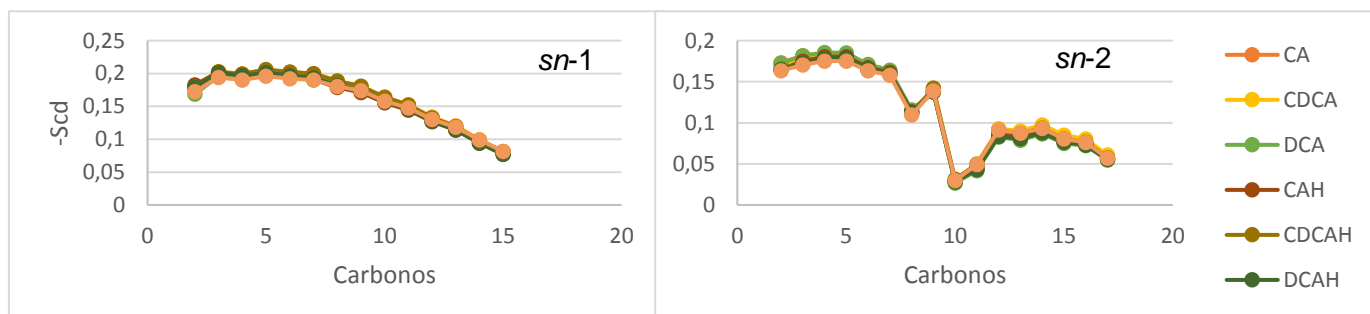
Os parâmetros de ordem referentes aos carbonos das cadeias acilo do POPC foram calculados para cada um dos sistemas onde foram adicionados ácidos/sais biliares no sistema apenas com POPC. A análise deste parâmetro indica a variação da ordem dos lípidos na bicamada,<sup>32</sup> representada na Figura 13, correspondendo os painéis esquerdo e direito às cadeias acilo saturada e insaturada, respetivamente. Esta variação é calculada com base nas seguintes equações:

$$-S_{CD}^{sat} = \frac{2}{3}S_{xx} + \frac{1}{3}S_{yy} \quad (\text{Equação 4})$$

$$-S_{CD}^{unsat} = \frac{1}{4}S_{zz} + \frac{3}{4}S_{yy} + \frac{\sqrt{3}}{2}S_{xy} \quad (\text{Equação 5})$$

$$S_{ab} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos \theta_a 3 \cos \theta_b - \delta_{ab} \rangle, a, b = x, y, z \text{ (Equação 6)}$$

onde  $\theta_a$  (ou  $\theta_b$ ) é o ângulo entre o  $a$ -ésimo (ou  $b$ -ésimo) eixo molecular e a normal à bicamada, enquanto  $\delta_{ab}$  é discriminador de Kronecker ( $\langle \rangle$  simboliza a média tanto temporal como sobre todas as moléculas de POPC).<sup>31</sup>



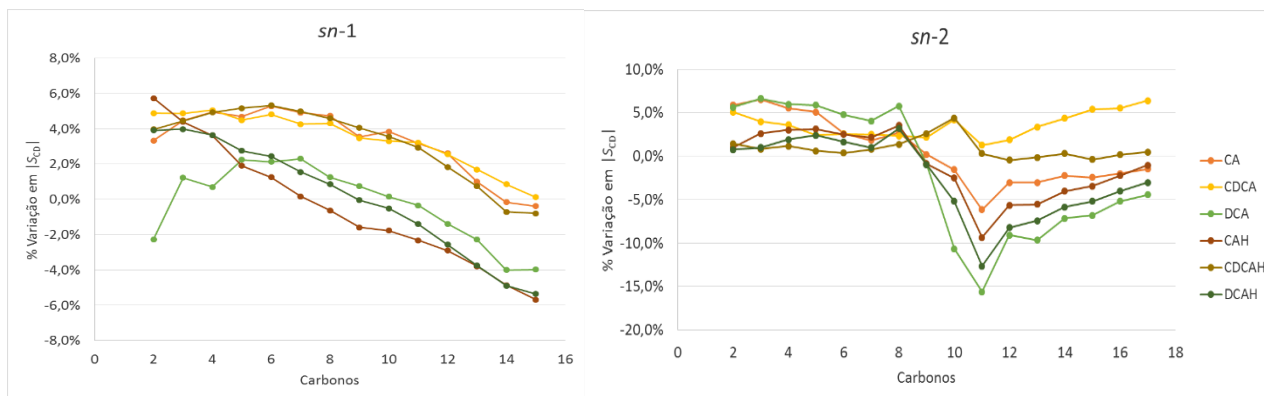
**Figura 13** – Parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-1 e sn-2 do POPC.

Os valores calculados encontram-se de acordo com os valores experimentais em POPC puro.<sup>33</sup> Para os valores representados na figura 13, relativamente à cadeia *sn-1*, podemos observar que eles variam sensivelmente entre 0.2 e 0.08, onde o valor máximo (0.2) corresponde ao carbono 5 da cadeia acilo. Já o valor mínimo corresponde ao carbono 15, uma vez que, o parâmetro de ordem de POPC decresce ao longo da cadeia, em concordância com a maior mobilidade. Relativamente aos valores do parâmetro de ordem *sn-2*, também representados na Fig.13, podemos observar que estes são semelhantes aos valores experimentais, neste caso, o valor mínimo corresponde ao carbono 10 da cadeia acilo, carbono que participa na ligação dupla desta cadeia. Sem surpresa, dado o número reduzido de solutos inseridos, é difícil observar variações entre os diferentes solutos comparando os valores absolutos do parâmetro de ordem. Por este motivo, representam-se na Figura 14 as variações de  $-S_{CD}$  relativamente aos valores calculados para POPC puro.

Na comparação entre os diversos sistemas, um fator que deverá ser tido em conta, no caso das espécies desprotonadas, é que a adição de catiões ( $\text{Na}^+$ ) ao sistema conduz à ligação destes aos grupos eletronegativos do fosfolípido, aumentando o parâmetro de ordem.<sup>34</sup> Este efeito também foi observado experimentalmente, embora para concentrações salinas muito elevadas ( $\sim 1 \text{ M}$ ),<sup>35</sup> pelo que um aumento significativo de parâmetro de ordem na presença de dois iões sódio deverá ser aqui entendido como artificial. Deste modo, justifica-se que, para cada um dos três ácidos/sais biliares estudados, obtenham-se em geral perfis de parâmetros de ordem mais elevados para bicamadas com as formas ionizadas destas moléculas (uma exceção é o par DCA/DCAH, em algumas regiões da bicamada). Comparando os diferentes ácidos/sais no mesmo estado de ionização, verifica-se que o CDCA/CDCAH conduz a valores de parâmetro de ordem aumentados, relativamente a POPC puro e aos sistemas contendo outros ácidos/sais. Contudo, as diferenças são pouco acentuadas e não é clara a relação de tal efeito com a estrutura molecular das várias espécies.

Na verdade, a baixa concentração de ácidos/sais biliares utilizada neste estudo não permite a observação de eventuais alterações globais na ordem da bicamada como resultado da adição destas espécies anfífilas. É provavelmente este o motivo que as

alterações entre os vários sistemas da Fig.13 não são significativas. Por limitações de tempo, esta discussão incidiu sobre os parâmetros de ordem de todas as moléculas de POPC de cada sistema. Estas trajetórias poderão ser alvo de uma análise mais detalhada, focada nas moléculas de POPC na vizinhança imediata de cada soluto. No caso dos sais biliares conjugados com glicina, tal análise, por exemplo, permitiu estabelecer um efeito de desordenamento local para as três espécies ionizadas, embora sem diferenças significativas entre elas.<sup>36</sup>



**Figura 14** – Variações relativas dos parâmetros de ordem das cadeias acilo sn-1 e sn-2 do POPC, face aos valores calculados na ausência de solutos.

#### 4. Conclusão

Neste trabalho foi estudado o comportamento, localização e orientação de três ácidos biliares e dos respetivos sais de sódio em bicamadas de POPC através de simulações de dinâmica molecular. Ao longo deste trabalho foram analisados e discutidos vários parâmetros, que permitiram observar a localização e orientação das diversas espécies protonadas e desprotonadas, próximas da interface entre a bicamada e a água, aproximadamente paralelas ao plano da bicamada, com os grupos polares adotando uma conformação que é favorecida pela possibilidade de se estabelecerem ligações de hidrogénio com átomos adequados de POPC e de solvente (água). Assim como interações eletrostáticas favoráveis entre grupos carboxilato aniônicos dos sais biliares e grupos colina catiónicos do fosfolípido. Estas últimas interações não estão presentes quando o grupo carboxílico se encontra protonado, o que leva a uma posição mais interna deste na bicamada. Quando comparados os vários parâmetros dos diferentes ácidos/biliares entre si, não se encontram diferenças significativas entre eles. Para além da evidente semelhança estrutural entre as diferentes moléculas, a utilização de uma baixa concentração (dois solutos para 128 fosfolípidos), comparativamente à concentração local existente no meio fisiológico, poderá contribuir para não se terem observado diferenças significativas.

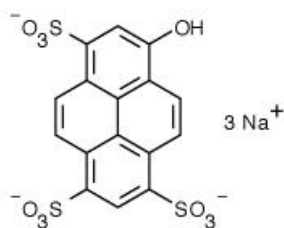
## 5. Perspetivas Futuras

Este estudo de simulação de ácidos/sais biliares não conjugados, em interação com bicamadas de POPC a baixas concentrações deverá ser entendido como um ponto de partida para um estudo mais completo e conclusivo. Na continuação deste estudo, serão de considerar simulações com um número mais elevado de solutos, próximo de razões AB/lípido fisiológica, eventualmente com escalas de tempo mais prolongadas. Será igualmente de considerar a parameterização destas espécies com um campo de forças *coarse-grained*,<sup>37</sup> que permita o estudo de escalas de tempo mais prolongadas (de alguns  $\mu$ s até aos ms) e o seguimento de processos inacessíveis a simulações atomísticas como as presentes (como alterações morfológicas de grande escala). Contudo, mesmo nesse cenário, o trabalho atual terá sempre utilidade na calibração dessa eventual parametrização *coarse-grained*, sempre necessária nesse tipo de simulações.

Outro aspeto que irá ser analisado no futuro é a velocidade de permeação dos diferentes ácidos biliares através de biomembranas. O objetivo da continuação deste trabalho é o estudo da cinética da translocação dos ácidos biliares, através da membrana de vesículas unilamelares grandes (LUVs) de POPC na fase liquido-desordenado, para esse efeito o compartimento aquoso interno dos LUVs será marcado com uma sonda fluorescente sensível ao pH – piranina (HPTS).

Se a velocidade de translocação dos ácidos biliares através da membrana de POPC for lenta, pode haver um excesso de ABs na monocamada externa da membrana, levando a uma perturbação desta. Por outro lado, se a velocidade for rápida há uma distribuição mais equilibrada entre cada monocamada, não ocorrendo a sua perturbação. Resultados obtidos anteriormente mostram que a velocidade de translocação através da membrana de POPC é maior nos ABs não conjugados do que nos ABs conjugados com glicina e sugerem que a translocação dos ABs trihidroxi (CA) é mais rápida que a dos ABs di-hidroxi (DCA e CDCA).<sup>14</sup> Pretende-se complementar estes resultados com outras técnicas para melhor suportar esta interpretação e obter informação quantitativa para a velocidade de translocação dos diferentes ácidos/sais biliares.

Na fase aquosa externa ao lipossoma, os ácidos biliares têm carga negativa, tal como na fase aquosa no interior dos lipossomas, onde se encontram moléculas de HPTS. Os ácidos biliares translocam a membrana na forma protonada, mas vão ionizar quando entram em contacto com a solução, ocorrendo, assim, a libertação de um protão para a solução no interior dos lipossomas, alterando o estado de protonação do grupo OH. Com a variação do pH a estrutura da sonda fluorescente de HPTS sofre alterações, modificando a sua estrutura, o que faz variar a intensidade de fluorescência.



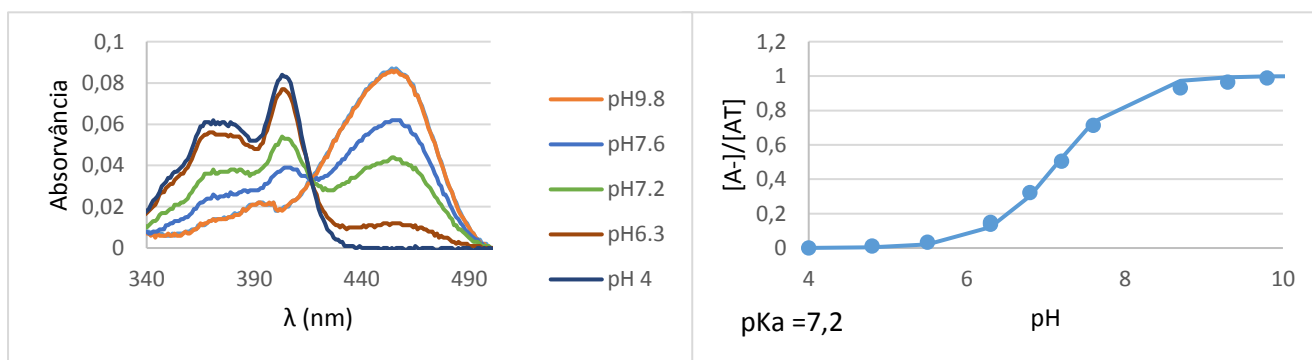
**Figura 15** – Estrutura da piranina.

Na parte inicial deste trabalho foi preparada uma solução tampão de fosfato a pH 7 filtrada que foi preparada com hidrogenofosfato de sódio, 1mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); cloreto de sódio, 0.15M (NaCl) e EDTA 1mM. Foi ainda caracterizada a variação na absorvância e na intensidade de fluorescência de uma solução de HPTS 50 micromolar (μM) em função do pH da solução (variado por adição de pequenos volumes de HCl ou NaOH). Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas figuras 16, 17 e 18.

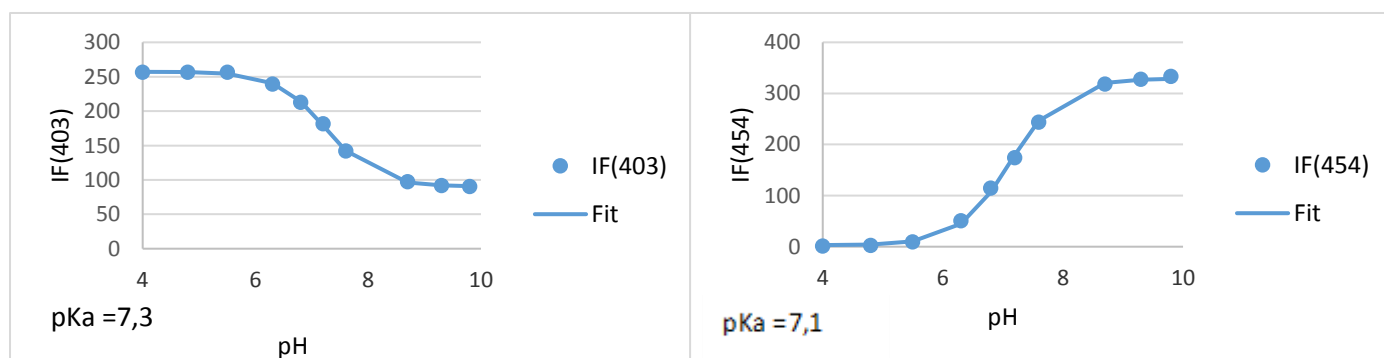
As curvas de variação da absorvância e de fluorescência em função do pH da solução, foram ajustadas através das equações 4 e 5, respetivamente, permitindo obter o pKa para a ionização da piranina.

$$A^- = \frac{A_T \times 10^{(pH-pKa)}}{1 + 10^{(pH-pKa)}} \quad \text{Equação 4}$$

$$IF^{454} = \phi_F^{454}(HA) \times [HA] + \phi_F^{454}(A^-) \times [A^-] \quad \text{Equação 5}$$



**Figura 16** – Do lado esquerdo é representado o espectro da absorção da solução de HPTS a diferentes valores pH. Do lado direito é representada a curva de calibração experimental que relaciona a concentração com a dependência do pH.



**Figura 17** – Curva de calibração experimental que relaciona a intensidade de fluorescência da HPTS a comprimentos de onda 403 e 454 nm em função do pH.

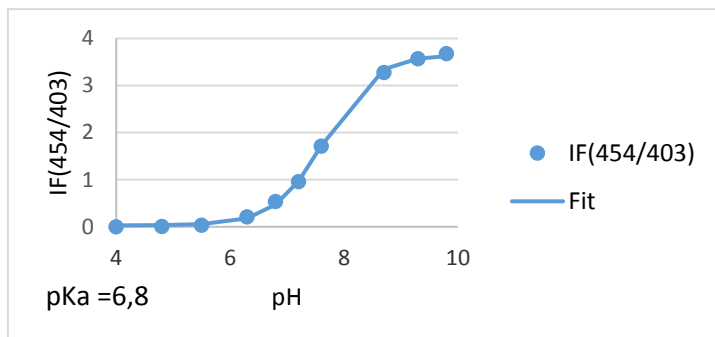
Com a equação de ajuste (Equação 5), obteve-se a curva de calibração da Figura 18 que relaciona a intensidade de fluorescência para o comprimento de onda de 403 nm e 454 nm em função do pH.

$$\frac{\phi_F^{454}}{\phi_F^{403}} = \frac{a \times [H^+] + K_a}{b \times [H^+] + c \times K_a}$$

Onde a, b e c são:

$$a = \Phi \left( \frac{HA_{454}}{A_{454}^-} \right) \quad b = \Phi \left( \frac{HA_{403}}{A_{403}^-} \right) \quad c = \Phi \left( \frac{A_{403}^-}{A_{454}^-} \right)$$

sendo  $\Phi$  a intensidade de fluorescência em cada caso.



**Figura 18** – Curva de calibração experimental que relaciona a razão entre a intensidade de fluorescência da HPTS com os comprimentos de onda de 454 e 403 nm (IF(403/454)) em função do pH.

Os valores de pKa obtidos para os diferentes métodos apresentam diferentes valores, mais tarde deverá ser feito um estudo mais aprofundado, como por exemplo, avaliar a pureza da sonda HPTS.

## 6. Referências

1. Berg, Jeremy; Tymoczko, John; Stryer, Lubert. *Biochemistry*. W. H. Freeman, 2010, 7<sup>th</sup> edition.
2. Voet, Donald, Voet, Judith. *Biochemistry*. Universidade de Michigan: Wiley, 2003, 3<sup>rd</sup> edition.
3. Singer S.J., Garth L. Nicolson. (1972) "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes." *Science*: 175(4023), 720.
4. Nelson, David Lee; Cox, Michael. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman, 2013, 6<sup>th</sup> edition.
5. Benedetto, Antonio; Bingham, Richard; Ballone, Pietro. (2015) "Structure and dynamics of POPC bilayers in water solutions of room." *The Journal Of Chemical Physics* 142.
6. Monte, Maria; Marin, Jose; Antelo, Alvaro; *et al.* (2009) "Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology." *World Journal of Gastroenterology*: 15(7), 804.
7. Perez, Maria; Briz, Oscar. (2009) "Bile-acid-induced cell injury and protection." *World Journal of Gastroenterology*: 15(14), 1677.
8. Mukhopadhyay, Samrat; Maitra, Uday. (2004) "Chemistry and biology of bile acids." *Current Science*: 87(12), 1666.
9. Zwicker, Brittnee; Agellon, Luis. (2013) "Transport and biological activities of bile acids." *The International Journal of Biochemistry*: 45(7), 1389.
10. Feller, Scott. "Molecular dynamics simulations of lipid bilayers. (2000) " *Current Opinion in Colloid & Interface Science*: 5, 217.

11. Tieleman, D.; Marrink S.; Berendsen H.. (1997) "A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems." *Biochimica et Biophysica Acta*: 1331(3), 235.
12. Filipe, Hugo Alexandre. (2014) *Following amphiphilic molecules on their way through lipid membranes: development of a kinetic model of passive permeation through the blood-brain barrier*. Coimbra: Tese de doutoramento. (retirada de <https://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/handle/10316/27079>)
13. *avantilipids*. s.d. <http://avantilipids.com/> (acedido em 4 de Junho de 2016).
14. Coreta-Gomes, Filipe; Martins, Patrícia; Velazquez-Campoy, Adrián; *et al.* (2015) "Interaction of Bile Salts with Model Membranes Mimicking the Gastrointestinal Epithelium: A Study by Isothermal Titration Calorimetry." *American Chemical Society*: 31(33), 9097.
15. Filipe, Hugo; Santos, Lennon; Ramalho, J.; *et al.* (2015) "Behaviour of NBD-head group labelled phosphatidylethanolamines in POPC bilayers: a molecular dynamics study." *Physical chemistry chemical physics*: 17, 20066.
16. Abraham, Mark; Murtolad, Teemu; Schulz, Roland; *et al.* (2015) "GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers." *ScienceDirect*: 1, 19.
17. Pronk, Sander; Páll, Szilárd; Schulz, Roland. (2013) "GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit." *Bioinformatics*: 29(7) 2013, 845.
18. Hess, Berk; Kutzner, Carsten; Spoel, David. (2007) "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation." *J. Chem. Theory Comput.*: 4(3): 435.
19. Berendsen, H.; Postma, J.; Van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. (1981) *Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration*. In *Intermolecular Forces*, ed. B. Pullman, Reidel, Dordrecht, The Netherlands, 331.
20. Berger, O; Edholm, O; Jähnig, F. (1997) "Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature." *Biophysical Journal*: 72(5), 2002.
21. Hoff, Barbara; Strandberg, Erik; Ulrich, Anne; *et al.* (2005) "2H-NMR Study and Molecular Dynamics Simulation of the Location, Alignment, and Mobility of Pyrene in POPC Bilayers." *Biophysical Journal*: 88(3), 1818.
22. Høltje, Monika; Förster, Thomas; Brandt, Birte; *et al.* (2001) "Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol." *Biochimica et Biophysica Acta*: 1511(1), 156.
23. Hermans, J.; Berendsen, H.; Gunsteren, W.; *et al.* (1984) "A consistent empirical potential for water-protein interactions." *Biopolymers*: 23, 1513.
24. Besler, Brent; Merz, Kenneth; Kollman, Peter. (1990) "Atomic charges derived from semiempirical methods." *Journal of Computational Chemistry*: 11, 431.



25. Schmidt, Michael ; Baldrige, Kim; Boatz, Jerry; *et al.* (1993) "General atomic and molecular electronic structure system." *Journal of computational chemistry*:14(11), 1347.
26. Miyamoto, Shuichi, Kollman, Peter. (1992) "Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models." *Journal of Computational Chemistry*:13(8), 952.
27. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; *et al.* (1997) "3 LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations." *J. Comp. Chem.*: 18, 1463.
28. Berendsen, H.; Postma, J.; Gunsteren, W.; *et al.* (1984) "Molecular dynamics with coupling to an external bath ." *The Journal of Chemical Physics*: 81(3684), 3684.
29. Bussi, Giovanni; Donadio, Davide; Parrinello, Michele. (2007) "Canonical sampling through velocity rescaling ." *J. Chem. Phys.*: 126, 014101.
30. Essmann, Ulrich; Perera, Lalith; Berkowitz, Max; *et al.* (1995) "A smooth particle mesh Ewald method." *The Journal of Chemical Physics*: 103(19), 8577.
31. Filipe, Hugo; Moreno, Maria; Loura, Luís. (2011) "Interaction of 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-Labeled Fatty Amines with 1-Palmitoyl, 2-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine Bilayers: A Molecular Dynamics Study." *The Journal of Physical Chemistry B*:115(33), 10109.
32. Poger, David; Mark, Alan. (2012) "Lipid Bilayers: The Effect of Force Field on Ordering and Dynamics." *Journal of Chemical Theory and Computation*: 8(11), 4807.
33. Ferreira, Tiago; Coreta-Gomes, Filipe; Ollila, O. H.; *et al.* (2013) "Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state 1H–13C NMR and MD simulation studies." *Physical chemistry chemical physics*: 15, 1976.
34. Böckmann, Rainer; Hac, Agnieszka; Heimburg, Thomas; *et al.* (2003) "Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer." *Biophysical Journal*: 85(3), 1647.
35. Pabst, Georg; Hodzic, Aden; Štrancar, Janez. (2007) "Rigidification of Neutral Lipid Bilayers in the Presence of Salts." *Biophysical Journal*: 93(8), 2688.
36. Luís M. S. Loura (2016), comunicação pessoal.
37. Marrink, Siewert; Risselada, Jelger; Yefimov, Serge. (2007) "The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations." *The Journal of Physical Chemistry B*: 111(27), 7812.
38. Dias, Joana. (2014) "Estudo da translocação do ácido biliar através de uma membrana de POPC na fase Líquido-Desordenado." Universidade de Coimbra.
39. Silva, Rita Leones. (2013) "Estudo da localização e comportamento de sais biliares em bicamadas de POPC por dinâmica molecular." Universidade de Coimbra.