

# Estudo do comportamento de moléculas anfifílicas em membranas por dinâmica molecular

Nisa Magalhães, Hugo A. L. Filipe, e Luís M. S. Loura

CQC-Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra

*Rodamina 123, POPC, Glicoproteína-P (P-GP), Dinâmica molecular*

---

**Resumo:** A Rodamina 123 é um corante fluorescente da classe dos xantenos. É usada como um modelo de substratos da glicoproteína-P, e quando se acumula no interior de células pode ser usado para medir a sua expressão. Neste trabalho recorreu-se a simulações de dinâmica molecular para se estudar diversos parâmetros ligados à interação da Rodamina 123, na sua forma neutra e protonada (Rh (0) e Rh (+1), respetivamente), com bicamadas de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (POPC), usadas como modelo de membranas biológicas. Os parâmetros estudados foram a localização, orientação e capacidade de formação de ligações de hidrogénio. Além disso, ainda foram analisadas algumas propriedades do lípido (área por lípido, localização de átomos de POPC, parâmetros de ordem, orientação dos grupos polares), e a maneira como estes eram afetados quando foi inserida a Rodamina 123 em ambos os seus estados de ionização. Conclui-se que a Rodamina 123 se localiza preferencialmente na zona correspondente a grupo glicerol e à parte superior das cadeias acilo do fosfolípido. Na sua forma ionizada, a rodamina adota posições mais externas e orienta-se com o plano dos anéis xanténicos paralelo ao plano da bicamada. Por outro lado, na sua forma neutra, a localização preferencial é mais interna, havendo uma maior exposição do grupo amina desprotonado à região polar da bicamada, com alguma inserção do resto da molécula no interior da bicamada.

---

## Introdução

A penetração de um fármaco através da membrana é importante para a sua eficácia, uma vez que a permeabilidade de um fármaco permite prever a biodisponibilidade do mesmo<sup>[1]</sup>. No entanto, para além das várias membranas que atuam como barreiras para fármacos, existem proteínas de efluxo que tendem a expulsar os fármacos para o exterior das células alvo. Entre essas está a glicoproteína-P (P-GP), que é uma proteína pertencente à família de transportadores ABC e que se encontra localizada na membrana apical<sup>[2]</sup>. Neste trabalho, vamos estudar a Rodamina 123 que é considerada um composto modelo da interação com a P-GP, ou seja, é considerado um substrato paradigmático deste transportador, comportando-se como uma molécula fluorescente e não tóxica<sup>[3]</sup>. A P-GP possui dois locais de ligação de subs-

tratos sendo que um desses locais é seletivo para rodamina 123<sup>[4,5]</sup>. A Rodamina 123 é um exemplo da família de compostos orgânicos denominados xantenos, exibindo fluorescência intensa.<sup>[6]</sup> Estruturalmente esta molécula (representada na figura 1) é constituída por três anéis fundidos (xanténicos, também designados no texto por "anéis superiores"), ligado à posição 2 de um grupo benzoato de metilo. Em determinados trabalhos a rodamina 123 é utilizada como um de vários corantes catiónicos que se distribuem pela matriz mitocondrial podendo, deste modo ser usada para medir o potencial elétrico mitocondrial em células vivas por citometria de fluxo, enquanto que em outros trabalhos, quando esta molécula se acumula no interior das células pode ser usada para medir a expressão da P-GP, sendo útil para pesquisas relacionadas com o cancro<sup>[6,7]</sup>.

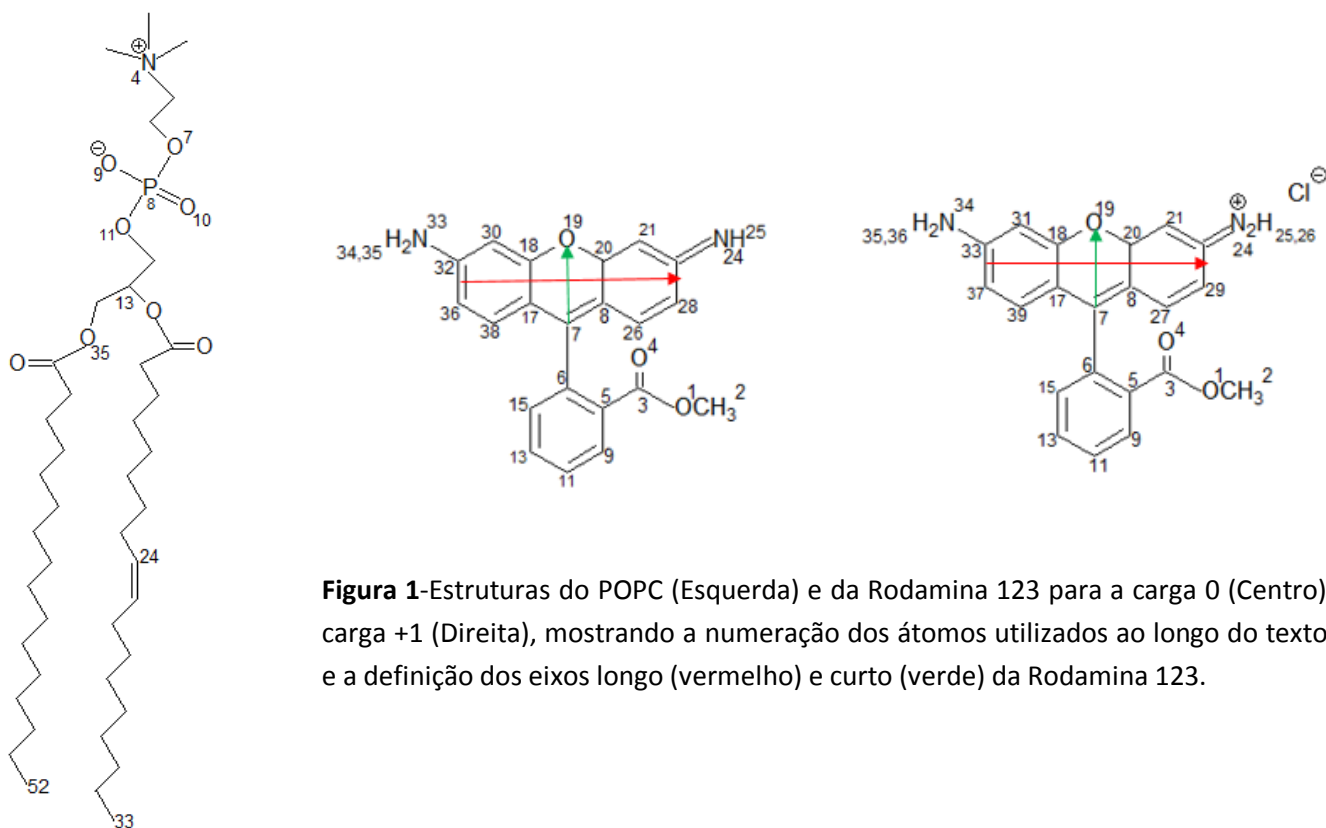
Este trabalho está integrado num projeto mais abrangente que visa estudar a interação da P-GP com os seus substratos. Uma vez que a Rodamina 123 é um composto anfifílico que por si própria interatua com a membrana, a posterior interação com a P-GP vai provavelmente ocorrer a partir da membrana. Deste modo é importante primeiramente estudar a interação da rodamina 123 com a bicamada lipídica, recorrendo à dinâmica molecular, de modo a conhecer a sua localização e orientação, que irão servir para a construção de modelos que considerem também a P-GP.

No presente trabalho procedeu-se à simulação da rodamina 123 na sua forma protonada (Rh (+1)) e na sua forma neutra (Rh (0)).

A única diferença a nível estrutural entre ambas é que a rodamina 123 na sua forma neutra possui menos um hidrogénio no azoto N24 em relação á sua forma protonada. No entanto, ambas são altamente hidrofílicas [6].

Em soluções aquosas neutras, a rodamina 123 encontra-se na sua forma catiónica.[8] Contudo, uma vez que o seu  $pK_a$  é próximo da neutralidade, [9] na presença de bicamadas lipídicas é importante estudar a rodamina 123 igualmente na forma neutra, dado que dentro da membrana esta forma deverá ser estabilizada.

Conforme descrito abaixo, das simulações de dinâmica molecular, obteve-se um conjunto de resultados, que uma vez analisados, permitem a obtenção de informação detalhada sobre o comportamento da rodamina 123 inserida em bicamadas lipídicas.



**Figura 1**-Estruturas do POPC (Esquerda) e da Rodamina 123 para a carga 0 (Centro) carga +1 (Direita), mostrando a numeração dos átomos utilizados ao longo do texto e a definição dos eixos longo (vermelho) e curto (verde) da Rodamina 123.

## Detalhes da Simulação

A simulação de dinâmica molecular e a análise das trajetórias foram realizadas utilizando o pacote GROMACS 5.1.4<sup>[10]</sup> com o campo de forças Gromos 53a6<sup>[11]</sup>. O modelo de água usado foi o SPC<sup>[12]</sup>.

A figura 1 mostra a estrutura das moléculas POPC e Rh (esta última com carga 0 e +1) e a respetiva numeração dos átomos mais importantes. A descrição do fosfolípido POPC foi obtida do site <https://lipidbook.bioch.ox.ac.uk/version/zip/id/57.html>, enquanto que as topologias das rodaminas foram construídas no servidor ATB (<https://atb.uq.edu.au>), sendo posteriormente verificadas e refinadas com cálculos quânticos de estrutura molecular e cargas atômicas (indicadas na Tabela A1 anexa), efetuados no programa GAMESS-US<sup>[13,14]</sup>. As bicamadas preparadas possuem 4 moléculas de rodamina introduzidas dentro da bicamada de 128 moléculas de POPC (hidratada com 40 moléculas de água por cada molécula de POPC), sem substituição de fosfolípidos. Para cada estado de ionização da rodamina foram efetuadas três simulações independentes de bicamadas 128 POPC: 4 rodamina. Em duas dessas simulações tem-se 2 moléculas de rodamina em cada monocamada, enquanto na outra as 4 moléculas estão inicialmente no centro da bicamada. Nas corridas com rodamina ionizada, um número correspondente de iões cloreto foi adicionado à fase aquosa.

Para remover os contactos atômicos desfavoráveis todos os sistemas foram submetidos a uma minimização de energia. De seguida, efetuou-se uma corrida curta de dinâmica molecular (100 ps) com um pequeno passo de integração (1 fs). Finalmente, para cada sistema, realizou-se uma corrida longa (200 ns), usando um passo de integração de 2 fs, em que os primeiros 100 ns foram utilizados para equilíbrio e os restantes 100 ns foram utilizados para análise.

Os comprimentos de ligação, bem como os ângulos de ligação, foram restringidos aos seus respetivos valores de equilíbrio através dos algoritmos

SETTLE<sup>[15]</sup> (água) e LINCS<sup>[16]</sup> (outras ligações). Todas as simulações foram executadas a pressão (1 bar), temperatura (298,15 K) e com condições de fronteira periódicas. Para fazer o controlo da temperatura e pressão foram usados os esquemas de Berendsen<sup>[17]</sup>, e o termóstato V-rescale<sup>[18]</sup> com tempos de acoplamento de 1,0 e 0,1 ps, respetivamente. Recorreu-se a um controlo semi-isotrópico da pressão, regulando de forma independente as componentes segundo as direções xy (no plano da membrana) e z (normal a este plano). Foi efetuado o tratamento *Particle-MeshEwald*<sup>[19]</sup> para interações eletrostáticas de longo alcance, enquanto que as interações de Van Der Waals e de Coloumb de curto alcance foram truncadas a 1,0 nm. Para visualização de configurações e trajetórias, usou-se o software VMD (Universidade de Illinois).<sup>[20]</sup>

## Resultados e Discussão

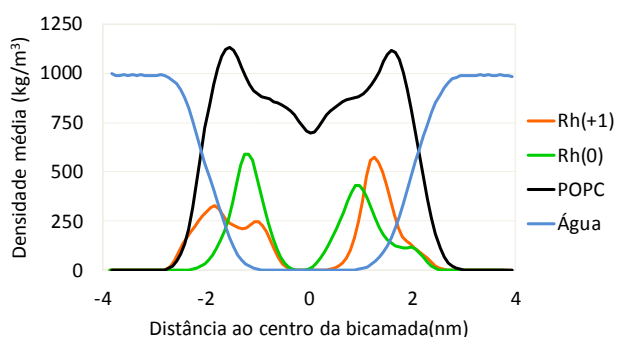
- **Área por lípido**

A partir das simulações realizadas foi possível fazer uma análise a diversos parâmetros que nos permitirão compreender o comportamento da molécula em estudo, quando esta é introduzida na bicamada. A área por lípido foi determinada através da divisão da área lateral da caixa de simulações pelo número de lípidos em cada monocamada. Comparando com os valores experimentais podemos avaliar a qualidade do campo de forças. O POPC apresenta uma área por lípido de  $(62,7 \pm 0,7) \text{ \AA}^2$ . Este valor está muito próximo de outros valores obtidos em trabalhos anteriores<sup>[21]</sup>. Com a inserção da Rh (0) e Rh (+1), obtiveram-se áreas por lípido de  $(63,3 \pm 0,7) \text{ \AA}^2$ , e  $(62,8 \pm 0,7) \text{ \AA}^2$ , respetivamente (anexo 1 – Figura A1). As diferenças entre estes valores estão contidas na respetiva incerteza, sendo pois não significativas, de acordo com a baixa concentração global do soluto na bicamada.

- **Variações temporais do centro de massa da bicamada do soluto**

Analisando a figura A2, verifica-se que durante os primeiros 100 ns de simulação, ocorrem variações sistemáticas para os diferentes replicados. Apenas a partir deste ponto se pode considerar que a posição do fluoróforo está equilibrada na generalidade dos sistemas simulados, flutuando em torno de um valor médio. Deste modo, foram selecionados os últimos 100 ns de cada uma das simulação como a janela de análise das diferentes propriedades moleculares.

- **Perfis de densidade e localizações atômicas**

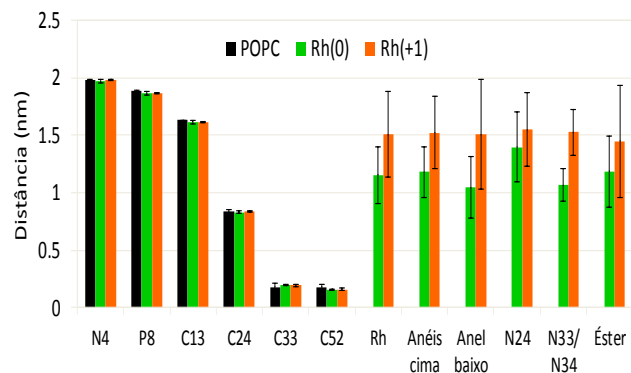


**Figura 2-** Distribuição de densidades do POPC e água. Os perfis da Rh foram multiplicados por 16 para obter uma melhor visualização.

A figura 2 mostra os perfis de densidades obtidos para a água, POPC e para a Rh (0) e Rh (+1), na direção normal ao plano da membrana (z). Uma vez que os centros de massa das bicamadas variam com o tempo, é necessário determinar a posição de todos os átomos em relação ao centro de massa em cada simulação. Verifica-se assim que há uma distribuição do soluto mais ou menos alargada para ambos os estados de ionização, compreendendo tanto regiões onde a densidade da água é significativa ( $|z| > 1.5$  nm) como regiões onde não há penetração ( $|z| < 1.0$  nm). Deste modo, pode-se confirmar que a Rh reporta heterogeneidade de ambientes moleculares. Através deste gráfico observa-se que a Rh (+1) encontra-se em localizações mais externas em compa-

ração com a Rh (0). Esta posição mais externa da forma ionizada também é visível no gráfico da figura 3 (posições transversais médias relativamente ao centro da bicamada). A diferença média entre os estados de ionização é de aproximadamente 0,3 nm, sendo que a posição média ao centro de massa para a Rh (+1) é  $(1,5 \pm 0,4)$  nm e para Rh (0) é  $(1,2 \pm 0,3)$  nm. Na figura 3 mostram-se ainda as posições transversais médias calculadas para átomos característicos do POPC e Rh. Através deste gráfico pode-se concluir que as posições atômicas do POPC não sofrem alterações significativas, de acordo com o comentado acima a propósito da área por lípido.

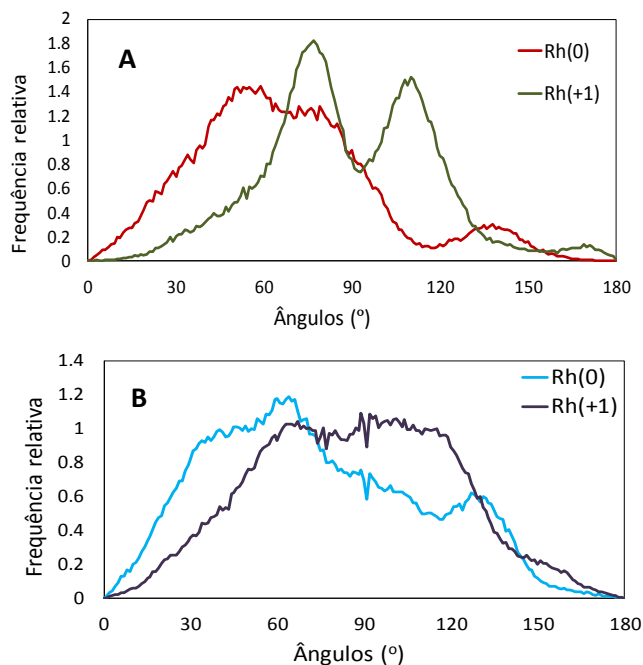
Diferenças claras podem ser observadas entre os átomos correspondentes dos dois estados de ionização da Rh. Todos os átomos da Rh (+1) têm uma localização muito próxima, o que nos faz supor que o plano dos anéis superiores da molécula terá uma orientação aproximadamente paralela à da bicamada. Neste estado de ionização, apenas o grupo éster se apresenta em média ligeiramente voltado para dentro da bicamada, com uma ligeira internalização do grupo metilo, visível em algumas das configurações ilustradas na Figura A3. Já para a Rh (0) verifica-se algumas diferenças, visto que os anéis xanténicos estão aproximadamente 0,2 nm acima do anel benzoato. Adicionalmente, dentro dos anéis de cima, o átomo mais externo é o azoto que se encontra ligado a um único hidrogénio (N24).



**Figura 3-** Posições transversais médias de átomos característicos do POPC e da Rh (0) e Rh (+1).

- **Orientações**

As considerações acima expostas podem ser evidenciadas através de distribuições dos ângulos formados entre eixos moleculares dos solutos e a normal à bicamada (Figura 4). Dois eixos moleculares foram considerados, o eixo longo e o eixo curto (definidos na figura 1).



**Figura 4-** Distribuição dos ângulos entres o eixo longo (A) e o eixo curto (B) das moléculas de Rh (0) e Rh (+1) e a normal ao plano da bicamada.

O gráfico da figura 4A, correspondente ao eixo longo, mostra que para a Rh (+1) a sua distribuição apresenta dois máximos, a 70° e 110°. Estes máximos dispõem-se simetricamente em relação à normal à bicamada, o que já era esperado dada a simetria da molécula. Em média, a molécula dispõe o eixo longo mais ou menos paralelamente ao plano da bicamada ( $\theta = 90^\circ$ ), alterando entre duas configurações preferenciais ligeiramente inclinadas, possivelmente de modo a expor mais à fase aquosa um dos dois grupos amina. Já para o eixo curto, as moléculas na sua forma +1 têm uma distribuição mais ou menos alargada, centrada a 90°. Considerando os dois eixos em conjunto, confirma-se

a orientação preferencial da Rh (+1) paralela ao plano da bicamada.

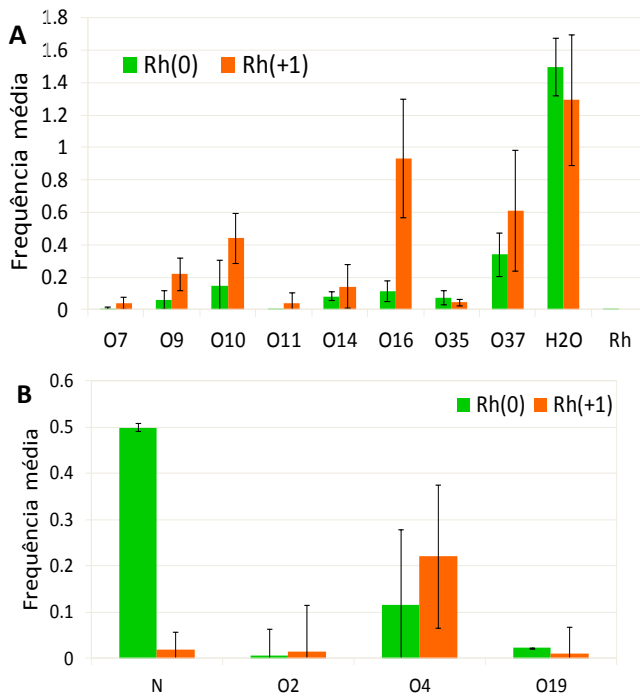
Já para a forma neutra, são observados ângulos agudos tanto para o eixo curto como para o eixo longo. Os valores preferências  $< 90^\circ$  para o eixo longo refletem a posição mais externa do átomo N24 relativamente ao átomo N33, já visível na Figura 3. Por sua vez, os valores predominantemente agudos do eixo curto de Rh (0) refletem a posição mais interna do anel benzoato (também visível na Figura 3), em comparação com os outros anéis.

- **Ligações de Hidrogénio**

A afinidade da rodamina com a bicamada pode ser influenciada pela interação entre a Rh e os lípidos ou água, por pontes de hidrogénio. A molécula de POPC contém vários átomos de oxigénio que atuam como aceitadores em ligações de hidrogénio e as moléculas de Rh contém grupos -NH<sub>2</sub> que podem atuar sobretudo como dadores, enquanto que o grupo -NH (da forma neutra) atua como dador ou aceitador de ligações de hidrogénio.

Através da figura 5 pode-se constatar que os átomos de azoto estão envolvidos quase continuamente (número médio de ligações por grupo próximo ou superior a 1) como dadores em ligações de hidrogénio para o lípido, especialmente na sua forma ionizada. Para a forma neutra, a frequência média de ligações de hidrogénio de -NH/-NH<sub>2</sub> para os átomos de lípido é menor, em parte devido às posições mais internas e portanto mais distantes dos grupos fosfato e glicerol do POPC. No entanto a frequência de ligações com a água (tanto como dador ou sobretudo como aceitante) é mantida ou até mesmo reforçada na forma neutra, o que se deve ao átomo N24 (NH), mais externo e mais acessível estereoquimicamente (por estar ligado a menos átomos do que os azotos ligados a dois hidrogénios). Após termos estudados alguns parâmetros ligados áRh agora vamos observar

de uma forma breve o efeito destes solutos sobre propriedades configuracionais do lípido POPC.

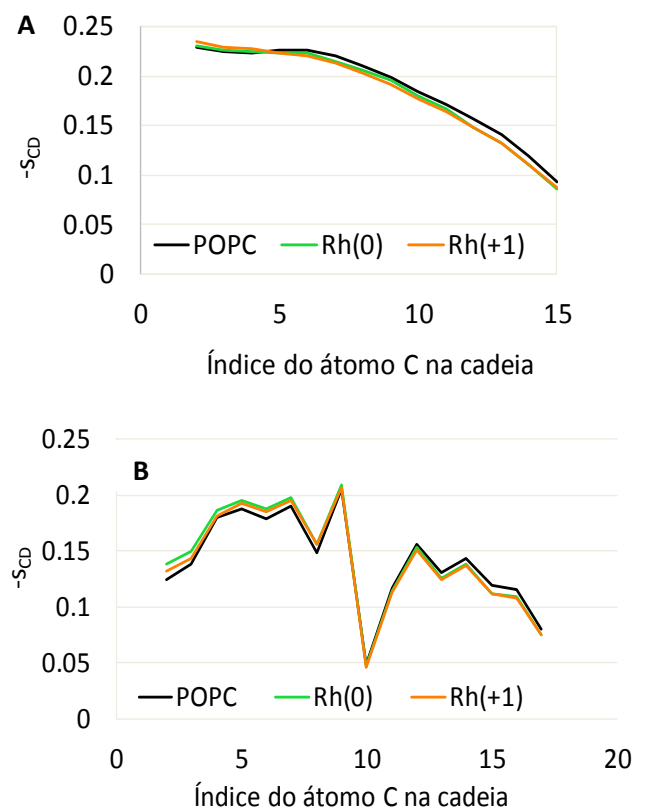


**Figura 5-** Frequências médias das ligações de hidrogênio envolvendo os átomos de Rh (0) ou Rh (+1). A: ligações de doadores NH ou NH<sub>2</sub> de Rh para aceitantes lipídicos ou água. B: ligações de água para átomos aceitantes (N ou O) de Rh (0) ou Rh (+1). As barras de erro correspondem aos desvios padrão das três simulações efetuadas para cada um dos estados de ionização.

- **Parâmetros de ordem**

Foram analisados os parâmetros de ordem das cadeias acilo do POPC em cada um dos sistemas onde foi adicionado Rh e no sistema que continha apenas o POPC. A análise deste gráfico indica a variação da ordem dos lípidos na bicamada. Estes parâmetros de ordem são calculados conforme descrito na literatura.<sup>[22]</sup> Mediante o gráfico da figura 6 pode-se observar que os parâmetros de ordem têm tendência a baixar ao longo da cadeia, refletindo a maior desordem no interior da membrana. Esta variação é bem conhecida e já foi observada numerosas vezes tanto

experimentalmente como por simulação<sup>[22]</sup>, estando os perfis obtidos neste estudo em boa concordância



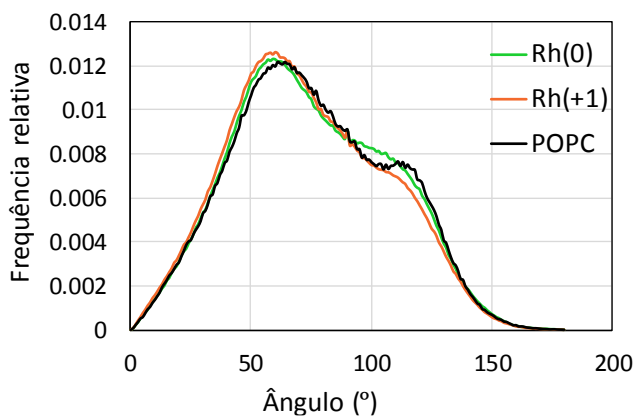
**Figura 6-** Parâmetros de ordem das cadeias acilo *sn-1* (A) e *sn-2* (B) de POPC.

com os reportados na literatura. Por incorporação de Rh, observam-se alterações menores tanto na ordem da cadeia *sn-1* (Figura 6A) como *sn-2* (Figura 6B). Aparentemente, tanto a Rh (0) como Rh (+1) induzem ligeiros aumentos nos valores do parâmetro de ordem dos segmentos superiores (até ao carbono 4 da cadeia *sn-1* ou até à ligação dupla na cadeia *sn-1*), em comparação com o POPC. Para os segmentos posteriores de ambas as cadeias, o parâmetro de ordem apresenta valores menores do que em POPC puro. Estes efeitos poderão estar relacionados com a localização preferencial da molécula na parte superior das cadeias hidrocarbonadas, onde, possivelmente devido à estrutura planar rígida dos anéis superiores, poderá promover um aumento local na ordem daquelas. Pelo contrário, por não se localizarem preferencialmente junto ao centro da bicamada, as molé-

culas de soluto criam um vazio local nesta zona interna, que, ao ser preenchido por extremos de cadeias acilo de lípidos adjacentes, fazem reduzir a ordem daquelas. Apesar de estas variações serem globalmente modestas, o facto de se observarem num sistema diluído faz supor a hipótese de existirem efeitos locais consideráveis, à semelhança de outros solutos estudados em bicamadas. [23,24]

- **Eixo P-N**

Em bicamadas de POPC puro, verifica-se que o vetor fosfato-colina (eixo P-N) apresenta uma distribuição larga (Fig. 8), com um ângulo médio de  $75,79^\circ$  em relação à normal à bicamada. No gráfico da figura 7, verifica-se que o eixo P-N tem tendência a deslocar-se ligeiramente para valores menores na presença da Rh. Isto está relacionado com o facto de a presença da molécula de Rh na região interfacial induzir o "fecho" do ângulo do eixo P-N em relação ao normal à bicamada. Este efeito é mais evidente para a Rh (+1), visto que esta encontra-se em localizações mais externas, com um ângulo médio de  $73,39^\circ$  em relação à normal da bicamada, já a Rh (0) tem um ângulo médio de  $75,38^\circ$  que é um valor muito próximo ao do POPC puro.



**Figura 7-** Distribuição dos ângulos para os eixos P-N em POPC puro e após inserção de Rh (0) ou Rh (+1).

## Conclusão

Neste trabalho fez-se um estudo detalhado sobre o comportamento das moléculas de Rh (0) e Rh(+1) em bicamadas de POPC. Obteve-se informação à escala atômica sobre vários parâmetros. Entre estes, destacam-se a orientação e a localização que permite prever qual a orientação e posição mais característica para cada um dos estados estudados. Cada um dos parâmetros obtidos foram analisados e comparados entre si ao longo deste trabalho e chegou-se à conclusão que a Rh (+1) tem tendência para se localizar na superfície da bicamada, ou seja, em posições mais externas, enquanto que a Rh (0) encontra-se mais internalizada. Enquanto que a Rh (+1) adota uma orientação preferencial com o anel xanténico paralelo ao plano da bicamada, já a forma neutra preferencialmente expõe o grupo amina desprotonado à região polar da membrana, maximizando o seu potencial acrescido para o estabelecimento de ligações de hidrogénio, resultante do seu menor impedimento estereoquímico. Como resultado, ocorre uma maior inserção do resto da molécula na bicamada, adquirindo posições mais internas do que os átomos correspondentes da forma carregada.

As informações retiradas deste estudo podem vir a ser úteis para o desenvolvimento de um trabalho futuro, em que se simulará a interação desta molécula, inserida na membrana, com a glicoproteína-P, de modo a proceder-se a um estudo detalhado do mecanismo do efluxo realizado por esta proteína, que está implicado em aspetos importantes como a reduzida eficácia de fármacos dirigidos ao sistema nervoso central e a aquisição de resistência de células cancerígenas contra fármacos anti carcinogénicos.

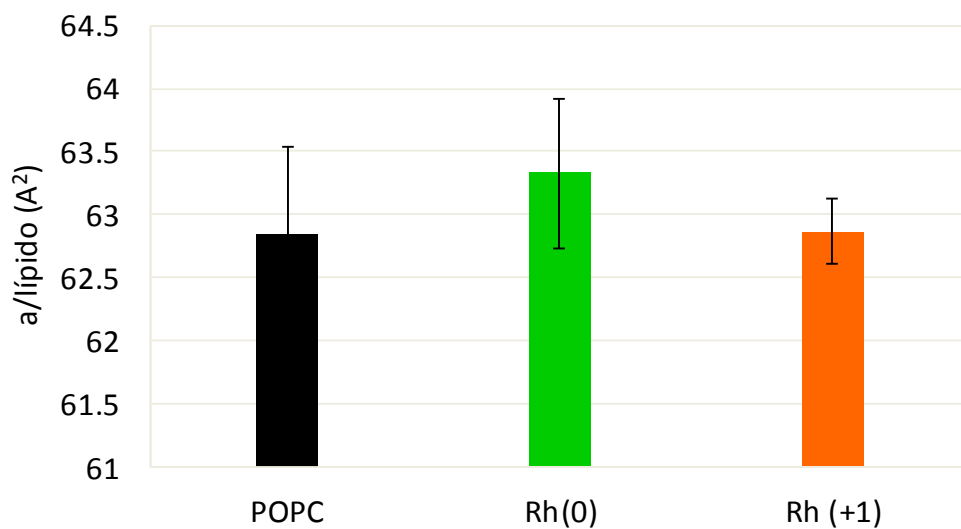
## Referências

[1] J. de Souza , Z. M. F. Freitas , S. Storpirtis. (2007). Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* Vol. 43, pp. 515-527.

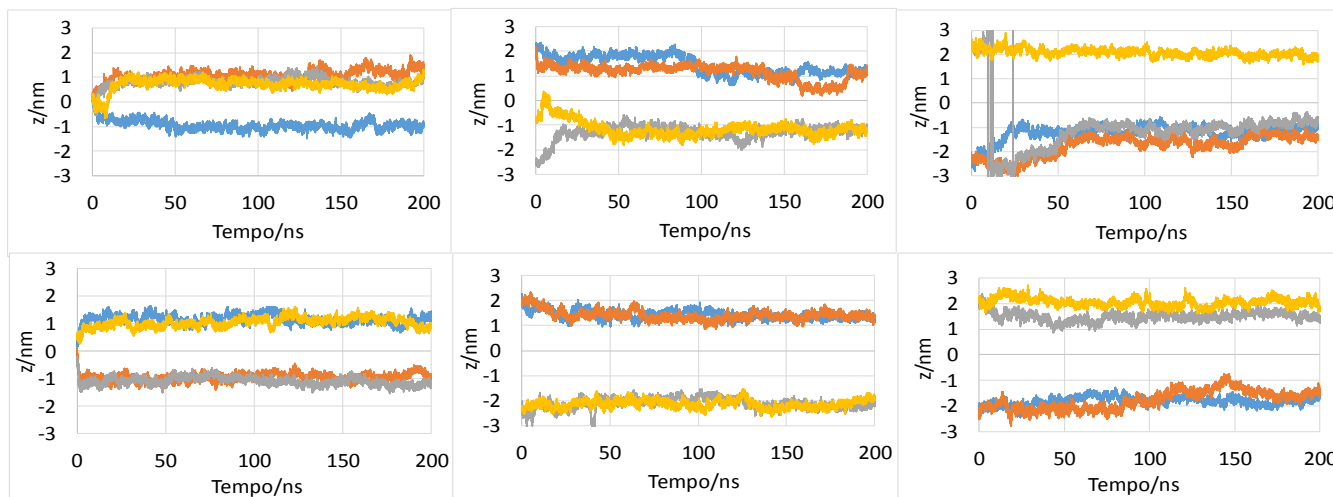
- [2] Frances Jane Sharom. (2014). Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Frontiers in oncology*. Vol.4, 41
- [3] A. I. F. Martins. (2010) *Determinação Fluorimétrica da Rodamina 123 em plasma de ratos: Ferramenta para a avaliação in vivo da atividade da glicoproteína-P*. Tese de Mestrado. UBI, Covilhã. Disponível em <http://hdl.handle.net/10400.6/3948>
- [4] Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V. (1999). Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem*. Vol. 259, pp 841-850
- [5] I. N. Junior. (2013) *Avaliação da expressão do gene MDR1 (Glicoproteína-P) e atividade de efluxo em células do sangue periférico de paciente sob tratamento da tuberculose multirresistente*. Tese de Douturamento. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro. Disponível em <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/14389>
- [6] X. Bao, L. Shuiyu, J.-S. Liow, C. L. Morse, A. Kacey, S. S. Zoghbi, R. B. Innis, V. W. Pike (2012). [<sup>11</sup>C]Rhodamine-123: synthesis and biodistribution in rodents. *Nucl Med Biol*. Vol. 39, pp 1128-1136
- [7] A. Baracca, G. Sgarbib, G. Solainib, G. Lenaz. (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F<sub>0</sub> during ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. Vol.1606, pp 137-146
- [8] LV Johnson, ML Walsh e LB Chen. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol.77, pp 990-994
- [9] M. Duvvuri, Y. Gong, D. Chatterji, J.P. Krise. (2004). Weak base permeability characteristics influence the intracellular sequestration site in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60. Vol. 279, pp 32367-32372
- [10] Hess, B.; Kutzner, C.; Spoel, D. (2007). GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput*. Vol.4, pp 435-447
- [11] Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput. Chem*. Vol.25, pp 1656–1676.
- [12] Berendsen. H, Postma, J., Van Gunsteren, W. F., Hermans, J. (1981). Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In *Intermolecular Forces* ( Vol.14, pp 331-342), ed. B. Pullman: The Netherlands.
- [13] M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. Su, T. L. Windus, M. Dupuis and J. A. Montgomery. (1993). General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *Journal of Computational Chemistry*. Vol.14, pp 1347–1363.
- [14] M. S. Gordon and M. W. Schmidt. (2005). *Theory and Applications of Computational Chemistry, the first forty years* (Vol.41, pp 1167-1189). ed. C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Lim and G. E. Scuseria: Amsterdam
- [15] S. Miyamoto and P. A. Kollman. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry*. Vol.13, pp 952–962
- [16] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. Em and M. Fraaije. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem*. Vol.18, pp 1463–1472
- [17] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys*. Vol.81. pp 3684-3690
- [18] Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys*. Vol.12
- [19] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz. (1995). "A smooth particle mesh Ewald method". *J. Chem. Phys*. Vol.103, pp 8577
- [20] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. Vol.14, pp 33-38
- [21] H. A. L. Filipe, M. J. Moreno, L. M. S. Loura. (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. *J. Phys.Chem. B*. Vol.115, pp 10109-10119
- [22] Ferreira TM, Coreta-Gomes F, Ollila OH, Moreno MJ, Vaz WL, Topgaard D. (2013). Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state 1H-13C NMR and MD simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys*. Vol.15, pp 1976-89.
- [23] Loura LM, do Canto AM, Martins J. (2013). Sensing hydration and behavior of pyrene in POPC and POPC/cholesterol bilayers: a molecular Dynamics study. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)*. Vol.1828, pp 1094-1101.
- [24] J. R. Robalo, J.P. Prates Ramalho, L.M. S. Loura. (2013). NBD-Labeled Cholesterol Analogues in Phospholipid Bilayers: Insights from Molecular Dynamics. *J. Phys. Chem. B*. Vol.117, pp 13731-13742.



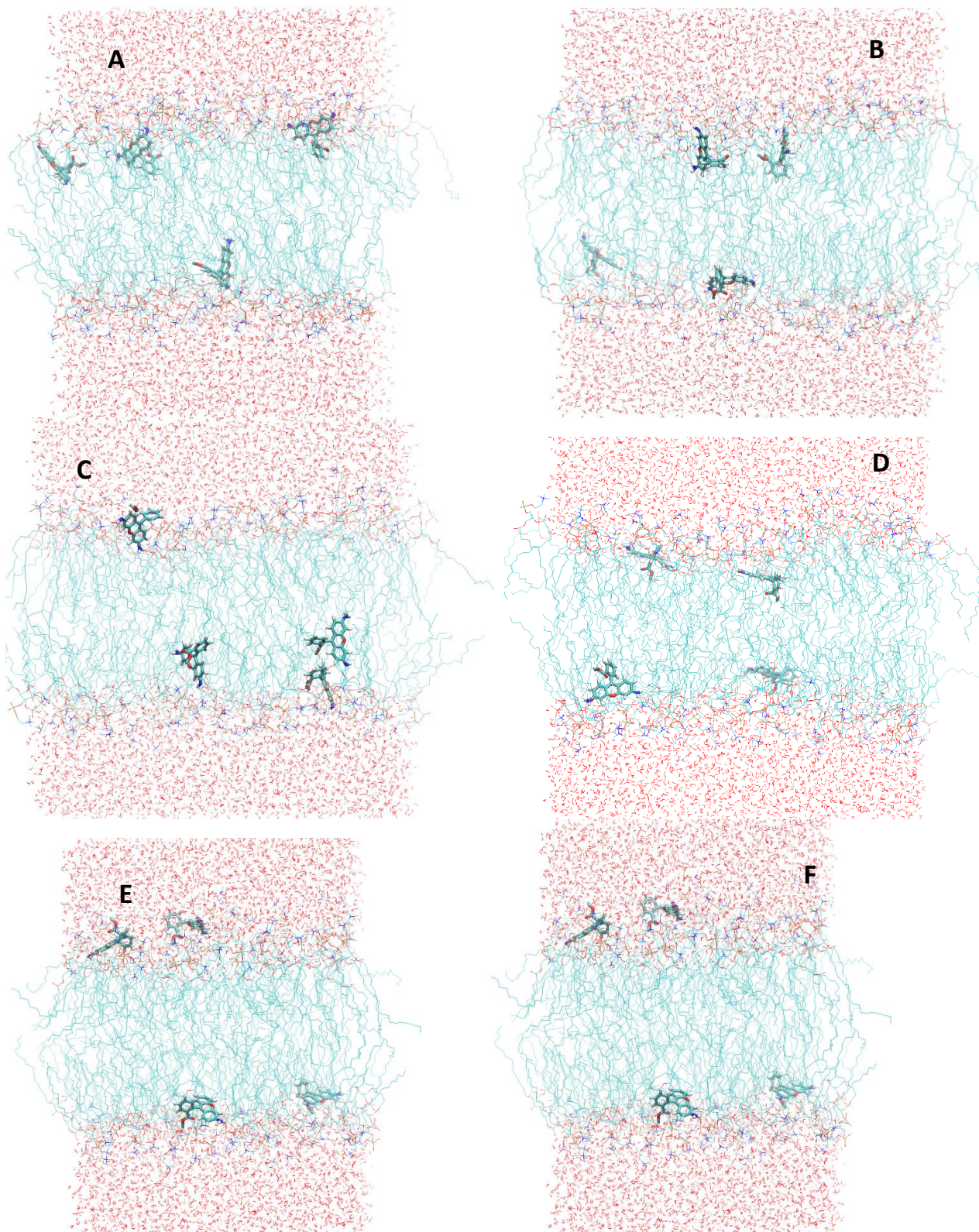
## Anexos



**Figura A1-** Representação da área por lípido para o POPC e para as moléculas de Rh (0) e Rh (+1) quando inseridas na bicamada.



**Figura A2-** Evolução temporal dos centros de massa de cada molécula de Rh nas seis simulações. Os painéis superiores correspondem á Rh (0) e os inferiores á Rh (+1).



**Figura A3**-Configurações finais das bicamadas de POPC que incluem moléculas de Rh. As primeira três *snapshots* (A,B,C) correspondem aos replicados de Rh (0), e as restantes três (D,E,F) correspondem aos de Rh (+1).

Rh (+1)					
Átomos	Cargas	Átomos	Cargas	Átomos	Cargas
C1	0.189	C13	-0.031 (0.136)	H26	0.437
O2	-0.274	C15	-0.282 (0.152)	C27	-0.051 (0.158)
C3	0.712	C17	-0.247	C29	-0.355 (0.187)
O4	-0.467	C18	0.524	C31	-0.567 (0.228)
C5	-0.337	O19	-0.316	C33	0.639
C6	0.290	C20	0.524	N34	-0.907
C7	0.187	C21	-0.567 (0.228)	H35	0.437
C8	-0.247	C23	0.639	H36	0.425
C9	-0.014 (0.116)	N24	-0.907	C37	-0.355 (0.187)
C11	-0.151 (0.148)	H25	0.425	C39	-0.051(0.158)

Rh (0)					
Átomos	Cargas	Átomos	Cargas	Átomos	Cargas
C1	0.173	C13	-0.070 (0.127)	C26	-0.178 (0.147)
O2	-0.309	C15	-0.258 (0.140)	C28	-0.291 (0.160)
C3	0.760	C17	-0.084	C30	-0.456 (0.195)
O4	-0.482	C18	0.409	C32	0.437
C5	-0.370	O19	-0.314	N33	-0.832
C6	0.393	C20	0.430	H34	0.373
C7	-0.084	C21	-0.604 (0.186)	H35	0.362
C8	-0.068	C23	0.695	C36	-0.312 (0.165)
C9	-0.044 (0.110)	N24	-0.825	C38	-0.150 (0.146)
C11	-0.148 (0.129)	H25	0.342		

**Tabela A1-** Representação das cargas dos átomos da Rh (+1) (em cima)Rh (0) (em baixo). Os valores entre parêntesis referem-se às cargas dos átomos de H que estão ligados ao átomo pesado indicado na tabela (cuja carga não está entre parêntesis).