

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Jaciéli Evangelho de Figueiredo

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA ELETROPORAÇÃO DE
MEMBRANAS LIPÍDICAS**

Santa Maria, RS
2016

Jaciéli Evangelho de Figueiredo

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA ELETROPORAÇÃO DE MEMBRANAS
LIPÍDICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração em Física da Matéria Condensada, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Física.**

ORIENTADOR: Prof. Leandro Barros da Silva

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Evangelho de Figueiredo, Jaciéli
Estudo Computacional da Eletroporação de Membranas
Lipídicas / Jaciéli Evangelho de Figueiredo.- 2016.
95 p.; 30 cm

Orientador: Leandro Barros da Silva
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Física, RS, 2016

1. Membrana Lipídica 2. Eletroporação 3. Campo Elétrico
I. Barros da Silva, Leandro II. Título.

©2016

Todos os direitos autorais reservados a Jaciéli Evangelho de Figueiredo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

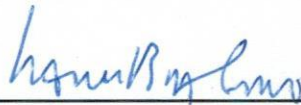
End. Eletr.: jacielifigueiredo@gmail.com.com

Jaciéli Evangelho de Figueiredo

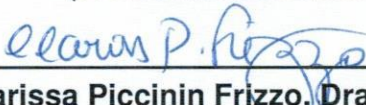
**ESTUDO COMPUTACIONAL DA ELETROPORAÇÃO DE MEMBRANAS
LIPÍDICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração em Física da Matéria Condensada, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Física.**

Aprovado em 3 de agosto de 2016:



Leandro Barros da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Clarissa Piccinin Frizzo, Dra. (UFSM)



Eleonir João Calegari, Dr. (UFSM)



José Rafael Bordin, Dr. (UNIPAMPA)



Jussane Rossato, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmã e ao meu marido Tiago. Sem vocês eu nada seria. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me acompanhar e me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem e por me incentivarem. Pelas várias ligações onde me ouviram e me aconselharam sempre me ensinando ver o lado positivo das coisas e das pessoas. Obrigada pai e mãe pelo carinho e amor que sempre tive de vocês. Agradeço a minha irmã que do jeito dela sempre tentou me ajudar. Ao meu marido, Tiago, por estar presente em todos os momentos, por cada palavra de incentivo, agradeço principalmente pela compreensão paciência e por entender minha ausência. Pelo amor e carinho que nunca faltaram e pelo orgulho que tens de mim.

Aos meus colegas e amigos de LEELMAT, que me auxiliaram ou contribuíram de todas as formas. Em especial ao Guilherme Lorenzet pela disposição em sempre me ajudar sanando muitas dúvidas.

Agradeço o Prof. Ms. Rodrigo Leal pelas discussões acadêmicas. Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro B. da Silva, pelos ensinamentos e conselhos.

A CAPES e UFSM, pelo apoio financeiro. A secretária da pós-graduação, Sainara, pela disponibilidade. Ao CENAPAD-SP, pelo tempo de processamento para a realização dos cálculos. A todos esses, o meu muito obrigada.

*Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.*

(Cora Coralina)

RESUMO

ESTUDO COMPUTACIONAL DA ELETROPORAÇÃO DE MEMBRANAS LIPÍDICAS

AUTORA: Jaciéli Evangelho de Figueiredo

ORIENTADOR: Leandro Barros da Silva

Neste trabalho, apresentamos um estudo computacional do processo de eletroporação de membranas lipídicas na presença de água. Na primeira etapa, realizamos a dinâmica da formação de poros através de simulações baseadas na dinâmica molecular clássica, utilizando o código NAMD. Posteriormente, desenvolvemos um estudo *ab initio*, empregando a teoria do funcional da densidade, conforme implementada no programa SIESTA. Os resultados da primeira análise mostraram a formação de poros no interior da bicamada após 1ns de aplicação de um campo elétrico externo, a uma temperatura de 300 K. Também verificamos que, para temperaturas acima de 300 K, esse tempo se reduz. Observamos um rearranjo das moléculas de água na forma de um cone de Okuno Tanioka devido à ação do campo elétrico. Isso ocasiona um aumento no número de ligações de hidrogênio das mesmas, o que não foi observado com o uso de moléculas apolares como o clorofórmio. Na segunda etapa, realizamos a análise das propriedades eletrônicas e estruturais, utilizando as estruturas dos fosfolipídios provindas dos cálculos de dinâmica molecular. Mostramos que a ação do campo elétrico modifica o *gap* de energia tanto da estrutura do fosfolipídio isolado quanto para a configuração de bicamada lipídica. Através dos mapas do potencial eletrostático, mostramos que a ação do campo elétrico leva a uma polarização do fosfolipídio ocasionando um torque no momentos de dipolo elétrico da molécula. A rotação dos momentos de dipolo elétrico causa um estresse na bicamada, que por si só não é capaz de rompê-la. Dessa forma, a presença da água é fundamental, pois diante a ação do campo elétrico as moléculas se reordenam arranjando-se de maneira a formar um cone. Este fato, associado ao enfraquecimento da membrana lipídica, devido ao estresse causado pelo realinhamento nos momentos de dipolo elétrico, são a origem do processo de poração.

Palavras-chave: Fosfolipídios. Campo Elétrico. poro

ABSTRACT

COMPUTATIONAL STUDY OF ELECTROPORATION OF LIPID MEMBRANES

AUTHOR: Jaciéli Evangelho de Figueiredo

ADVISOR: Leandro Barros da Silva

In this work we present a computational study of the electroporation process of lipid membranes in the presence of water. First, we developed an investigation of the formation of pores through simulations based on classical molecular dynamics using NAMD code. Subsequently we developed ab initio study using density functional theory, as implemented in the SIESTA code. This analysis showed the formation of pores within the lipid bilayer 1ns after the application of external electric field, 300 K. We found that set temperatures above 300 K may reduce the simulation time. We also observed a rearrangement of water molecules of a Okuno Tanioka cone due to the action of the electric field. Interestingly, this induced an increase of the number of hydrogen bonds, which was not observed using apolar molecules such as chloroform. After, we performed the analysis of structural and electronic properties of the structures of phospholipids, which were extracted from the molecular dynamics calculations. It is noteworthy that the action of the electric field changed the energy gap of both the structures of isolated phospholipid as for the lipid bilayer configuration. Through maps of electrostatic potential, we showed that the electric field leads to a polarization of phospholipid, which induced a torque in the electric dipole moments of the water molecule. The rotation of the electric dipole moments gave rise to stress in the lipid bilayer, which by itself was not enough to break it. In summary, the presence of water was critical since under the action of an electric field the molecules rearranged to form a cone. This fact, associated with the weakening of the lipid membrane due the stress from the realignment electric dipole, was the responsible for the poration process.

Keywords: Phospholipid. Electric Field. Pore

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Características da formação de poros em membranas POPC, após aplicação de uma campo elétrico externo.....	51
Tabela 4.1 – Distâncias de Ligação do fosfolípido POPC valores experimentais conforme (ELDER et al., 1977).....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	MEMBRANA LIPÍDICA	11
1.2	TRANSPORTE TRANSMEMBRANAR	14
1.3	POTENCIAL MEMBRANAR	16
1.4	ELETROPORAÇÃO	17
1.5	REVISÃO DA LITERATURA SOBRE MÉTODOS DE ELETROPORAÇÃO	18
2	METODOLOGIA	28
2.1	DINÂMICA MOLECULAR	28
2.2	ALGORITMO DE VERLET	29
2.3	CONDIÇÕES PERIÓDICAS DE CONTORNO	30
2.4	CAMPO DE FORÇA	31
2.5	SOMAS DE EWALD	34
2.6	MÉTODO DE REALIZAÇÃO DOS CÁLCULOS DE DINÂMICA MOLECULAR	36
2.7	MÉTODO <i>AB INITIO</i>	37
2.8	EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER PARA UM SISTEMA DE MUITOS CORPOS	37
2.9	APROXIMAÇÃO DE BORN OPPENHEIMER	38
2.10	TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE	39
2.11	POTENCIAL DE TROCA E CORRELAÇÃO	44
2.12	APROXIMAÇÃO LDA (<i>LOCAL DENSITY APPROXIMATION</i>)	44
2.13	APROXIMAÇÃO GGA (<i>GENERALIZED GRADIENT APPROXIMATION</i>)	45
2.14	PSEUDOPOTENCIAL	45
2.15	FUNÇÕES DE BASE	47
2.16	MÉTODO DE REALIZAÇÃO DOS CÁLCULOS - <i>AB INITIO</i>	48
3	RESULTADOS I: DINÂMICA DA ELETROPORAÇÃO	49
3.1	INTRODUÇÃO	49
3.2	MEMBRANAS LIPÍDICAS - CÁLCULOS DE DINÂMICA MOLECULAR CLÁSSICA	49
3.2.1	Dinâmica da Formação de Poros em Membranas Lipídicas	49
3.3	ANÁLISES COM A BICAMADA LIPÍDICA	55
3.4	ÁGUA <i>BULK</i> SOB AÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO	59
3.5	DISCUSSÕES E RESULTADOS PARCIAIS	63
4	RESULTADOS II- CÁLCULOS <i>AB INITIO</i>	67
4.1	PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E ESTRUTURAIS DO FOSFOLIPÍDIO ISOLADO	67
4.2	PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E ESTRUTURAIS DE MOLÉCULAS FOSFOLIPÍDICAS NA CONFIGURAÇÃO DE BICAMADA	72
4.3	DISCUSSÕES E RESULTADOS PARCIAIS	83
5	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

A forma mais básica e simples da vida humana é a célula. São estruturas complexas organizadas e diversas. Cada célula possui uma finalidade e função diferente, nelas estão contidas as características morfológicas e fisiológicas dos organismos vivos. Portanto, as propriedades de um dado organismo dependem de suas células individuais, cuja continuidade ocorre através de seu material genético (ZAHA et al., 2003).

Em relação a estrutura das células, a membrana celular é um dos elementos mais importantes. A membrana fornece individualidade a cada célula, além de ser uma estrutura dinâmica que permite interações tanto com os ambientes intra e extra celulares como com outras células, facilitando as funções realizadas por elas.

As membranas celulares consistem de uma dupla camada contínua de lipídeos, com a qual proteínas e carboidratos das mais diversas naturezas interagem. Constitui, portanto, uma barreira física que possui diferentes graus de permeabilidade para as diferentes substâncias (CORREIA, A., 2013).

Processos de transporte molecular em bicamadas lipídicas ocorrem naturalmente no nosso organismo a todo instante. Estes desempenham um papel fundamental em muitos mecanismos de regulação celular. Muitos destes processos ocorrem espontaneamente. Por exemplo, moléculas pequenas como a água, oxigênio e dióxido de carbono que circulam em nossa corrente sanguínea e atravessam a bicamada lipídica sem ajuda das proteínas. Já em outros casos seria praticamente impossível uma molécula quebrar a barreira hidrofóbica de uma bicamada lipídica sem ajuda das proteínas, como ocorre com certos medicamentos. As membranas celulares, assim como a parede celular, constituem um difícil obstáculo para o acesso de fármacos hidrofílicos às suas moléculas alvo, dentro das estruturas celulares. Para superar os problemas de administração de fármacos, várias técnicas têm sido desenvolvidas. Dentre elas podemos destacar a utilização de vetores (VALERO et al., 2008), para o tratamento de certas patologias. No entanto, ainda existem poucos estudos nesta área. Entender esse processo de permeação tem despertado interesse de muitos pesquisadores, principalmente farmacêuticos e bioengenheiros que buscam compreender o mecanismo de permeação, não só para o entendimento de funções básicas das biomembranas, mas objetivando o desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas (POURMOUSA et al., 2012).

Recentemente uma das técnicas que vêm sendo desenvolvidas neste âmbito é a eletroporação ou eletropermeabilização (CHEN et al., 2006). Nesta técnica, a membrana é exposta a um campo elétrico suficientemente forte que induz uma tensão transmembranar. O resultado é a formação de poros na membrana, tornando-a

permeável. Isto facilita a entrada de moléculas que de outro modo seriam barradas pela bicamada lipídica (CHEN et al., 2006). Essa mudança estrutural que ocorre na membrana é totalmente reversível se a exposição ao campo elétrico for suficientemente curta. Assim, os lipídios conseguem se reorganizar e voltar ao seu estado de equilíbrio (KOTNIK et al., 2012).

Desde seu aparecimento, a eletroporação tem recebido uma atenção significativa, pois, trata-se de uma ferramenta bastante útil em inúmeras áreas. Dentre elas, podemos citar a medicina e a biotecnologia (STAMPFLI, 1958; NEUMANN; ROSE-NHECK, 1972). Por ser de um procedimento reversível (com aplicação do campo elétrico de forma controlada), pode ser aplicada em tratamentos que visam a introdução de medicamentos quimioterapêuticos em células tumorais (SERSA et al., 2008; TAKAHASHI; KIKKAWA; N., 2015), ou até mesmo induzindo a morte celular (SOZER et al., 2015) através da perda do conteúdo celular. A técnica também oferece uma grande promessa na área da terapia genética, pois reduz os riscos provocados por vetores virais, através da eletro-transferência de DNA (ANDRE; MIR, 2004).

Na biotecnologia, a eletroporação está em ascensão, o número de estudos e aplicações esta cada vez maior. Dentre eles, se destacam: melhoramento genético, que é realizado através da eletroporação reversível (KOTNIK et al., 2015). Nesta técnica é incluído fragmentos de DNA em células que serão herdados na divisão celular (AUNE; AACHMANN, ; TAKAHASHI; KIKKAWA; N., 2015; MILLER, 1994). Inativação de microorganismos através de pulsos elétricos, nesse método a atividade celular, o crescimento e a divisão celular são inibidos (SACK et al., 2010b; MORALES; ELEZ; MARTIN-BELLOSO, 2011; MAHNIČ-KALAMIZA; VOROBIEV; MIKLAVČIČ, 2014). O que evita a contaminação, promissor na conservação de alimentos, tratamento da água, evitando o uso de radiações e de produtos químicos (RIEDER et al., 2008). E por fim, extração de biomoléculas, aqui podemos listar as mais interessantes: eletroporação da uva para extração de polifenóis (PUÉRTOLAS et al., 2010), da beterraba para extração de açúcar, esse já utilizado em muitos países (SACK et al., 2010a).

No entanto, apesar da técnica de eletroporação possuir inúmeras vantagens e aplicações, o mecanismo detalhado deste processo ainda continua a ser objeto de investigação. Também, as aplicações in vivo permanecem muito escassas, em parte por causa do limitado conhecimento e compreensão da base teórica do fenômeno (TAREK, 2005; TEISSIE; GOLZIO; ROLS, 2005; WEAVER, 2003; WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996).

Dentro deste contexto, este trabalho tem como proposta o estudo da interação de campos elétricos externos com membranas fosfolipídicas POPC (*1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine*), com o intuito de avaliar teoricamente o comportamento de partículas e moléculas envolvidas no processo de difusão de membranas biológicas por meio de cálculos de dinâmica molecular e de estrutura eletrônica. Com isso

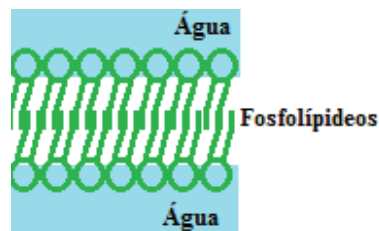
poderemos indicar como o campo elétrico afeta estruturalmente e fisicamente as moléculas fosfolípídicas, e, dessa forma, entender o processo de permeação e a formação de poros.

Para tanto pretendemos realizar os cálculos utilizando o pacote computacional NAMD (*Not (just) Another Molecular Dynamics code*)(PHILLIPS et al., 2005) que permitam a análise dos sistemas utilizando dinâmica molecular clássica, juntamente com cálculos *ab initio* fazendo o uso do código SIESTA (baseado na Teoria do Funcional da Densidade) (SOLER et al., 2002).

1.1 MEMBRANA LIPÍDICA

As membranas lipídicas são estruturas dinâmicas, fluidas, e grande parte de suas moléculas são capazes de se mover-se no plano da membrana. As moléculas lipídicas são arranjadas como uma dupla camada contínua de moléculas fosfolípídicas antiparalelas com aproximadamente 4 nm de espessura, como está no esquema da figura 1.1.

Figura 1.1 – Ordenamento fosfolípídico em uma bicamada lipídica na presença da água.

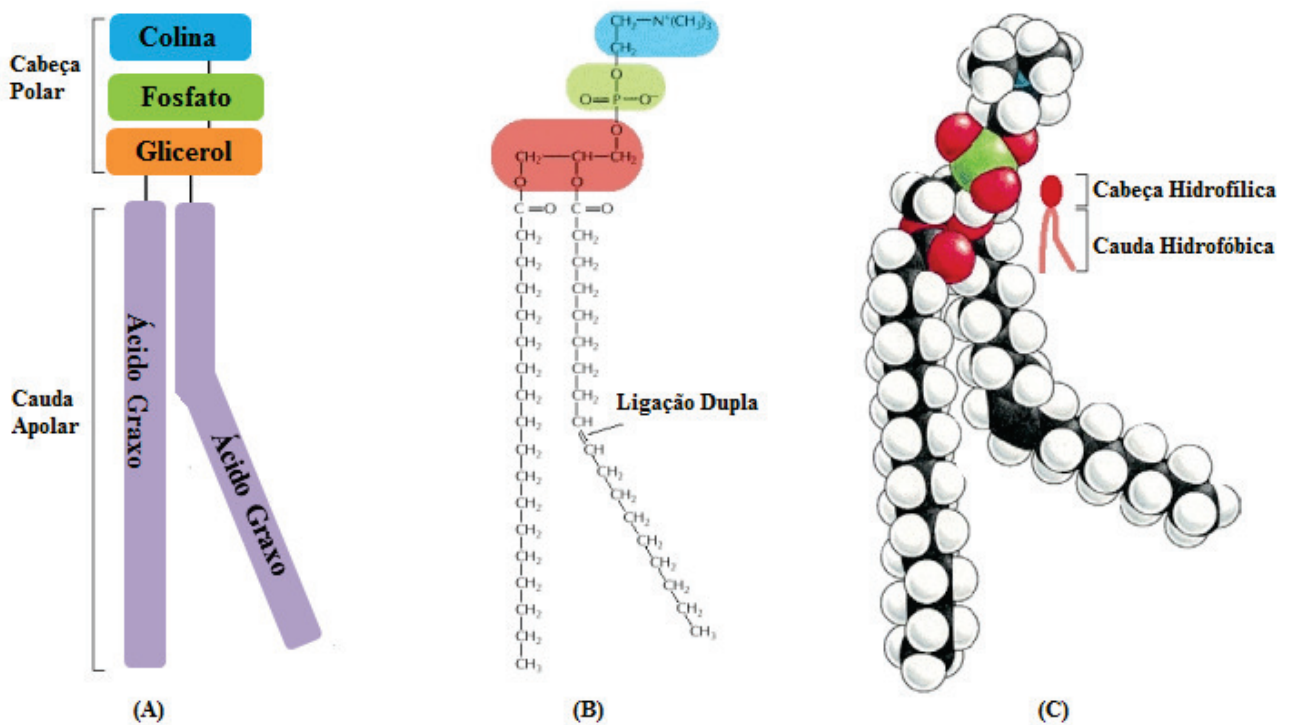


Os fosfolípídios, portanto, fornecem a estrutura básica da membrana. São responsáveis por cerca de 50 % da formação da maioria das membranas celulares animais. O restante é constituído principalmente de proteínas. São aproximadamente 5×10^6 moléculas lipídicas em uma área de $1 \mu m^2$, ou seja, 10^9 moléculas lipídicas em uma pequena célula animal (ALBERTS et al., 2007). As moléculas fosfolípídicas são compostos iônicos e possuem uma característica muito importante: elas são anfipáticas, ou seja, apresentam componentes hidrofílicos e hidrofóbicos. Cada uma destas moléculas se compõem de três porções: a primeira é a porção hidrofílica, ou polar é denominada "grupamento-cabeça". Nessa região, estão localizados os grupamentos fosfato e um álcool. O álcool pode ser serina, etanolamina, inositol ou colina. Os nomes dos fosfolípídios, portanto, incluem fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilcolina. A segunda, ou intermediária, é representada por uma

unidade de glicerol e a terceira, formada por duas moléculas paralelas de ácido graxo que se ligam ao glicerol por carboxilas, é hidrófoba. Essa porção dos fosfolipídios é uma longa cauda hidrocarbonada (estrutura composta por átomos de carbono e átomos de hidrogênio) de ácidos graxos (normalmente contém entre 14 a 24 átomos de carbono).

Enquanto os grupamentos polares da cabeça da camada externa estão voltados para o ambiente externo, as caudas se encontram voltadas para o interior da membrana. Os ácidos graxos podem ser saturados, contendo o número máximo de átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono, ou insaturados, com uma ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono. Podemos observar a estrutura dos fosfolipídios na figura 1.2.

Figura 1.2 – Molécula fosfolipídica, (A) Esquema representativo, (B) Representação das ligações químicas e estruturais (C) Modelo em tridimensional do fosfolipídio.



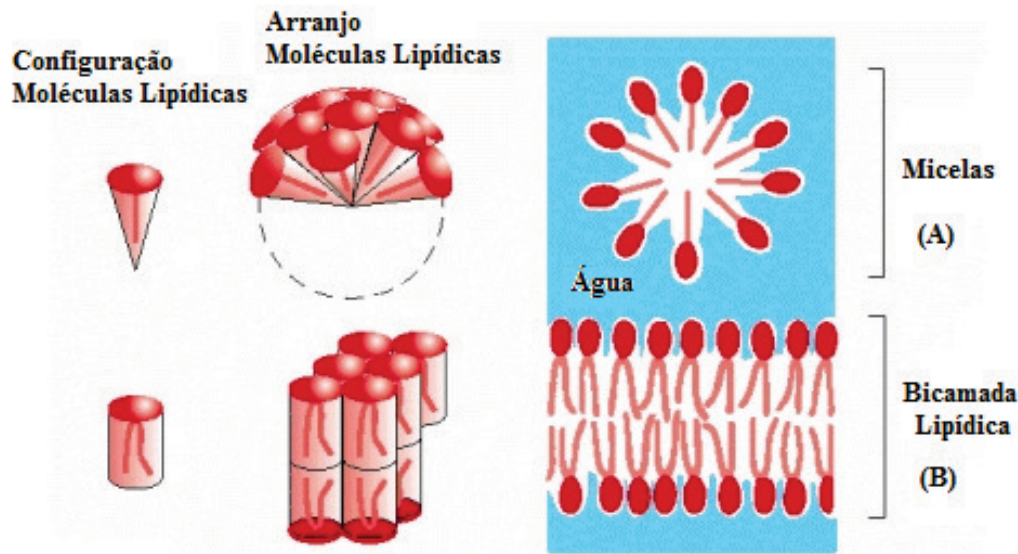
Fonte: Adaptado de (ALBERTS et al., 2007).

A figura 1.2 demonstra que cada ligação dupla acarreta uma pequena flexão na cauda do fosfolipídio (ALBERTS et al., 1994). A extensão das cadeias de ácidos graxos e seu grau de saturação afetam a estrutura da membrana. As cadeias de ácido graxo normalmente se movimentam por meio de flexão (inclinações e flexões), rotação ou deslocamento lateral. Nos pontos onde existem ligações duplas entre os átomos de carbono, ocorrem dobramentos na cadeia, limitando alguns tipo de movimento e

evitando que os ácidos graxos se agrupem com muita proximidade (CHANDAR; S., 2010). Os fosfolípidios das membranas celulares não migram de uma camada para outra (chamado de movimento flip-flop). No entanto, durante o processo de morte celular programada, poderá ocorrer o deslocamento de fosfolípidios da camada mais interna para a camada externa.

A natureza anfipática dos fosfolípidios, os faz formar bicamadas espontaneamente em solução aquosa. Quando um conjunto de moléculas fosfolípídicas são circundadas por água por todos os lados, elas tendem a agregar-se de modo suas cabeças hidrofílicas fiquem expostas a água e suas caudas hidrofóbicas fiquem ocultas no interior. Dependendo de sua forma, elas podem fazer isso de dois modos: se organizam, formando folhas ou bicamadas com as caudas voltadas uma para as outras ou como micelas esféricas, com as caudas voltadas para dentro, como mostra a figura 1.3. Devido ao seu formato cilíndrico, esse arranjo dos fosfolípidios ocorre espontaneamente, pois, quando dispersas na água as cabeças fosfolípídicas conseguem se dissolver rapidamente, devido a presença de grupos polares nesta extremidade. Estes grupos conseguem formar, portanto, interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio com as moléculas de água. O contrário ocorre com as caudas dos fosfolípidios, que por serem apolares, isto é, insolúveis em água, não conseguem formar interações energeticamente favoráveis com as moléculas de água. Depois de arranjadas as cabeças fosfolípídicas, que são hidrofílicas, ficam em contato com a água enquanto que as caudas hidrofóbicas ficam voltadas para parte interna. Esse rearranjo espontâneo dos fosfolípidios também acontece se por alguma razão acontecerem quebras ou falhas na estrutura da bicamada. Tanto causados por um agente externo ou por alguma modificação de suas ligações. As moléculas fosfolípídicas se reorganizam recuperando a sua estrutura de equilíbrio.

Figura 1.3 – Arranjo das moléculas lipídicas em meio aquoso. (A)- Formação de Mice-
las; (B) - Formação de Bicamadas Lipídicas.



Fonte: Adaptado de (ALBERTS et al., 2007).

Uma outra característica da bicamada lipídica é que sua estrutura altamente impermeável, ou seja, ela não permite que moléculas passem livremente através de seu meio. Somente algumas moléculas pequenas conseguem penetrar na membrana, como água e certos gases. Outras moléculas necessitam de ajuda das proteínas para romper a barreira da membrana. Algumas proteínas, por sua vez, possuem “passe livre” na bicamada lipídica. São elas que permitem a interação da bicamada com outras moléculas e também com outras células. Para que isso ocorra naturalmente a bicamada lipídica apresenta uma certa fluidez, o que significa que os seus componentes não ocupam posições definidas e estão susceptíveis a deslocamentos bidimensionais de rotação ou de translação. A fluidez é responsável por sua mobilidade, e facilita o transporte de substâncias para dentro e para fora da membrana.

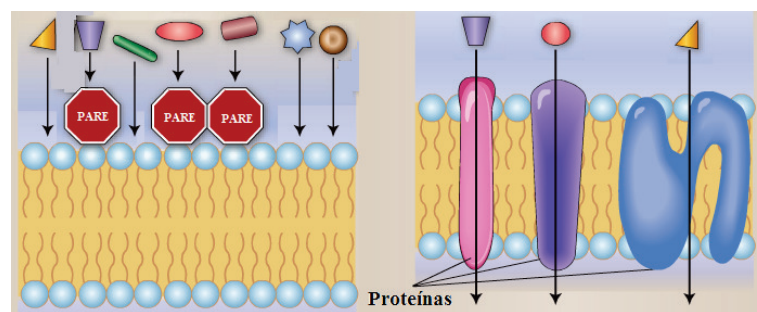
1.2 TRANSPORTE TRANSMEMBRANAR

Por apresentar permeabilidade seletiva, a membrana lipídica permite que moléculas fisiologicamente importantes entrem e saiam das células, ao mesmo tempo em que exclui outras moléculas. Essa função de barreira é de importância fundamental porque permite à célula manter seu volume e balanço de íons necessário para que os processos celulares normais que mantêm a vida ocorram (CHANDAR; S., 2010). Para utilizar essa barreira, contudo, as células tiveram que desenvolver maneiras de

transferir moléculas hidrossolúveis específicas através de suas membranas de modo a ingerir nutrientes essenciais, excretar produtos residuais do metabolismo, e regular concentrações iônicas intracelulares. O transporte de íons inorgânicos e de pequenas moléculas hidrossolúveis é realizado por proteínas transmembranares especializadas, cada uma das quais é responsável pela transferência de um íon específico, ou uma molécula específica ou de um grupo de um grupo de íons ou moléculas análogas. As células também podem transferir macromoléculas e mesmo partículas grandes através de suas membranas, mas os mecanismos envolvidos na maioria desses casos são diferentes e muito complexos (ALBERTS et al., 2007).

Alguns medicamentos também podem ter acesso ao interior das células. Para que isso ocorra, são necessárias proteínas facilitadoras que estão embebidas na membrana lipídica (figura 1.4).

Figura 1.4 – Esquema representativo das proteínas facilitadoras embebidas na membrana.

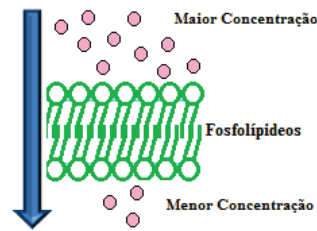


Fonte: Adaptado de (CHANDAR; S., 2010).

Essas proteínas são canais iônicos, transportadores ou bombas. Proteínas de membrana individuais podem ligar certas moléculas especificamente e facilitar seu movimento através da membrana lipídica.

A maior parte dos transportes realizados pela membrana ocorrem sem gasto de energia. O transporte passivo é utilizado quando as moléculas se deslocam através da membrana do meio de maior concentração para o meio de menor concentração como mostra o esquema da figura 1.5.

Figura 1.5 – Gradiente de concentração de solutos a serem transportados (transporte passivo).



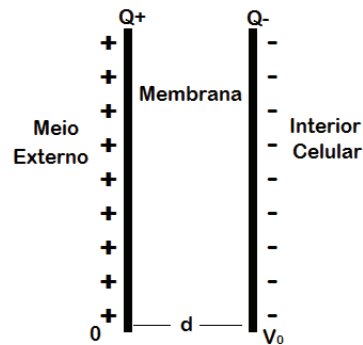
Em contraste, no transporte ativo, as moléculas são deslocadas dos locais em que estão presentes em baixa concentração para locais de alta concentração, em um processo dependente de energia.

1.3 POTENCIAL MEMBRANAR

Como sabemos, a célula está imersa em uma solução salina diluída no meio aquoso. Isso faz com que as moléculas de sal se decomponham em íons, que movem-se livremente nesse fluído. Quando ocorre um desequilíbrio devido a um excesso de íons em um dos lados da célula, um campo elétrico é gerado na superfície celular, por meio das diferenças entre as concentrações iônicas no interior da célula e no meio extracelular (OKUNO; CALDAS; CHOW, 1982). Existe, portanto, uma diferença de potencial eletrostático entre o líquido no interior da célula e o fluído extracelular, também conhecido como potencial de repouso da membrana. Isso fica mais evidente ao imaginarmos a membrana celular como um capacitor, no qual duas soluções condutoras estão isoladas por um fina camada isolante - a membrana (OKUNO; CALDAS; CHOW, 1982).

Observando a figura 1.6 a seguir é possível compreender como se origina o potencial de repouso. Este ocorre devido as cargas elétricas em excesso, Q_+ presente na superfície externa da membrana (excesso de cátions) e Q_- acumuladas na superfície interna da membrana (excesso de ânions).

Figura 1.6 – Membrana Celular na forma representativa de um capacitor.



É importante ressaltar que as concentrações iônicas de dentro e fora da célula são muito distintas. Geralmente íons Na^+ (cátions) permanecem na parte externa da célula, e os íons de Cl^- em grande maioria encontram-se na parte intracelular (DEBRUIN; W., 1999). A concentração de íons de sódio é pelo menos onze vezes maior do lado de fora da célula, o que a torna negativa no seu interior (OKUNO; CALDAS; CHOW, 1982).

É possível medir esse potencial de repouso através de microeletrodos que são ligados ao interior da célula e ao líquido extracelular. Esses eletrodos são pequenos capilares de vidro conectados a um voltímetro. Geralmente o potencial de repouso varia entre -40 a -80 mV , dependendo do tipo de célula (CUNNINGHAM et al., 1971).

1.4 ELETROPORAÇÃO

A eletroporação é o termo utilizado para descrever a presença de poros hidrófilos em membranas artificiais ou celulares devido à ação de campos elétricos externos. Trata-se de um fenômeno relativamente simples, porém poderoso, que consegue romper a barreira da membrana celular. Nesta técnica, a membrana lipídica é exposta a um campo elétrico de alta à média intensidade. Esse campo elétrico é emitido por meio de pulsos elétricos, numa escala de tempo de microssegundos a milissegundos. Estes são suficientes para produzir um potencial elevado tipicamente 200 mV (CHEN et al., 2006; GENG; LU, 2013), podendo ser aplicados em regiões específicas da célula e desligados quando necessário.

Durante o período de desestabilização (quando o campo elétrico está sendo aplicado), a membrana celular se torna altamente permeável devido a várias dobras e quebras transitórias da parede celular (JEON; SURESH; KIM, 2013). Dessa forma, moléculas exógenas presentes nos meios circundantes conseguem facilmente atra-

vessar a barreira celular (CHANG, 1992). Os poros que se formam na desestabilização da membrana geralmente são preenchidos por moléculas de água e íons.

Por outro lado, se o campo elétrico for desligado, a membrana lipídica poderá, em algumas circunstâncias, recuperar-se e voltar ao seu estado de equilíbrio (WEAVER, 2003). Quando submetida a campos elétricos muito intensos, a membrana pode sofrer um colapso irreversível (PORTEL et al., 2011; KRAMAR; MIKLAVCIC; LEBAR, 2007; TEKLE et al., 2005; POLAK et al., 2014).

A eletroporação, portanto, pode ser considerada uma técnica de microporação da membrana, que pode ser aplicada em uma única célula ou em até milhões de células (CHANG, 1992). Essa técnica começou a ser discutida nos anos 1950 e 1960, onde surgiram as primeiras publicações, nas quais um campo elétrico era aplicado externamente, podendo induzir um potencial, chamado potencial transmembrana (CHEN et al., 2006; COLE, 1968). Também foi demonstrado que se o campo elétrico aplicado for excessivamente alto pode levar à lise celular (processo onde ocorre a ruptura ou dissolução da membrana, levando à morte da célula e à liberação de seu conteúdo) (SALE; HAMILTON; KAPER, 1968; NEUMANN et al., 1982).

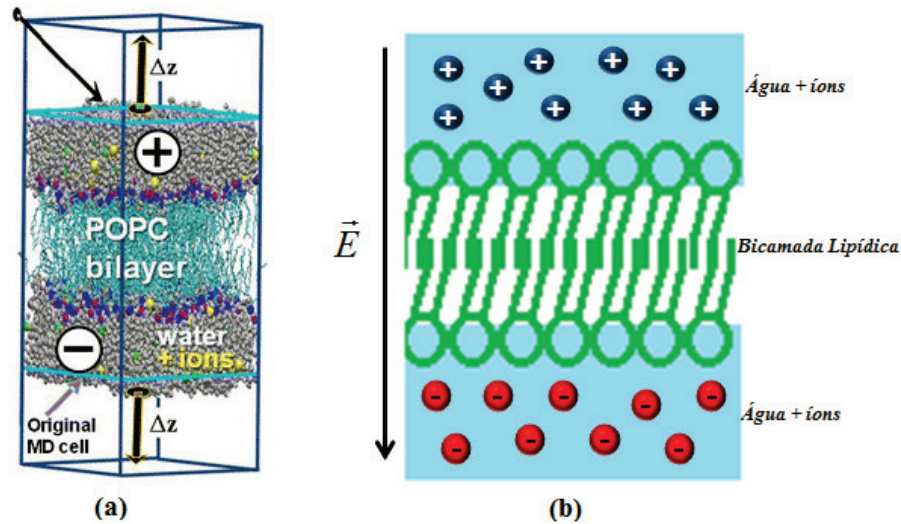
1.5 REVISÃO DA LITERATURA SOBRE MÉTODOS DE ELETROPORAÇÃO

Em simulações computacionais que utilizam cálculos de dinâmica molecular clássica, existem dois métodos que são amplamente utilizados para induzir a eletroporação em membranas lipídicas: a aplicação direta de um campo elétrico externo e o desequilíbrio iônico. No primeiro, é aplicado um campo elétrico constante e perpendicular ao plano da membrana lipídica ocasionando uma diferença de potencial ao longo de todo o sistema (DELEMOTTE; DEHEZ; W., 2008). Esse processo é realizado por meio da aplicação de uma força, $\vec{F} = q_i \vec{E}$ em todos os átomos de carga q_i . Este foi o método adotado para realização de todos os cálculos ao longo deste trabalho. A escolha deste deve-se a possibilidade de podermos determinar e fixar o valor do campo elétrico que será aplicado ao longo da membrana lipídica, e também por reduzir o tempo de simulação.

Quando a eletroporação é induzida por um desequilíbrio iônico, são colocadas dois reservatórios de água em contato com a membrana lipídica, um dos reservatórios com excesso de íons positivos (Na) e outro com excesso de íons negativos (Cl). Como mostra a figura 1.7 (b) a seguir, em suas extremidades existe uma região de vácuo de largura δz que separa o sistema de suas imagens periódicas (a presença desta região não altera as propriedades da membrana). Devido a este desequilíbrio de cargas é possível gerar uma tensão transmembrana e reproduzir pulsos elétricos de baixa

intensidade.

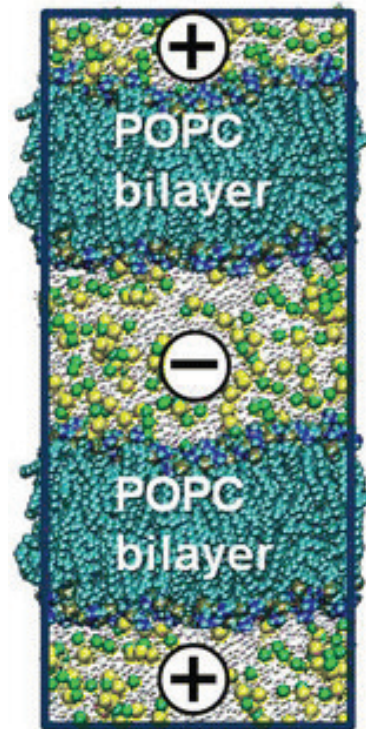
Figura 1.7 – (a)- Eletroporação induzida por desequilíbrio de cargas; (b) Esquema representativo da técnica do desequilíbrio de cargas.



Fonte: (a) Adaptado de (DELEMOTTE; TAREK, 2012).

Outra forma de induzir a eletroporação pelo método de desequilíbrio de cargas é através de três reservatórios de $NaCl$ e água separados por duas camadas de membrana lipídica, conforme a figura 1.8. Da mesma forma que o anterior, devido ao desequilíbrio de carga entre os dois reservatórios é induzida uma tensão transmembranar que gera pulsos elétricos de baixa intensidade. No entanto, este método é raramente utilizado devido ao alto custo computacional.

Figura 1.8 – Eletroporação induzida por desequilíbrio de cargas.



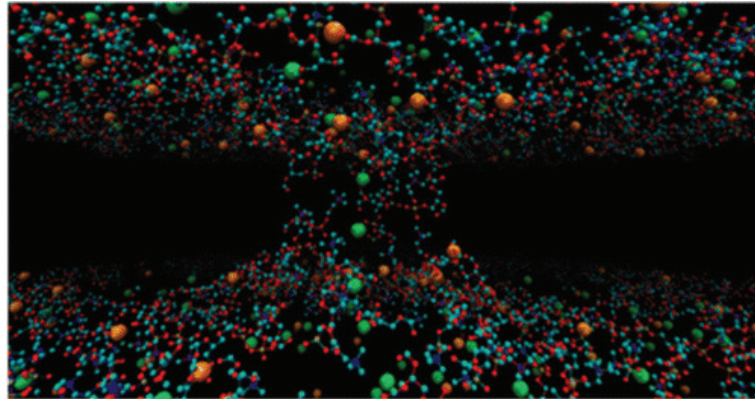
Fonte: Adaptado de (DELEMOTTE; TAREK, 2012).

Nos dois últimos métodos citados, onde temos a indução da eletroporação por desequilíbrio de cargas, não é possível controlar o valor da tensão transmembranar que será gerada e o tempo de simulação é muito maior para que se consiga observar a abertura dos poros. Por isso, neste trabalho utilizamos a aplicação direta do campo elétrico perpendicular a membrana.

Nas últimas décadas as aplicações e o mecanismo prático da eletroporação têm recebido uma atenção crescente, em particular como meio de introdução de uma variedade de fármacos, anticorpos e plasmídeos em células (DELEMOTTE; TAREK, 2012; NEUMANN; ROSENHECK, 1972; PRAUSNITZ; BOSE; LANGER R. WEAVER, 1993; SUZUKI et al., 1998; TSONG, 1987; BRETON et al., 2012; TOKMAN et al., 2013; ZHAN et al., 2012; CAMP et al., 2012).

Dentro deste contexto, podemos citar o trabalho realizado por Ho e colaboradores (HO et al., 2013), que analisaram, através de cálculos de dinâmica molecular clássica, a eletroporação e o transporte de íons em uma membrana POPC, aplicando um campo elétrico externo. Foram utilizados campos elétricos de diferentes intensidades, variando de 100 a 400 MV/m para algumas concentrações de íons de *NaCl* e *KCl*. Nesta pesquisa, foram estimados os raios dos poros formados após aplicação do campo elétrico, como mostra a figura 1.9.

Figura 1.9 – Formação de Poros em uma Membrana POPC.



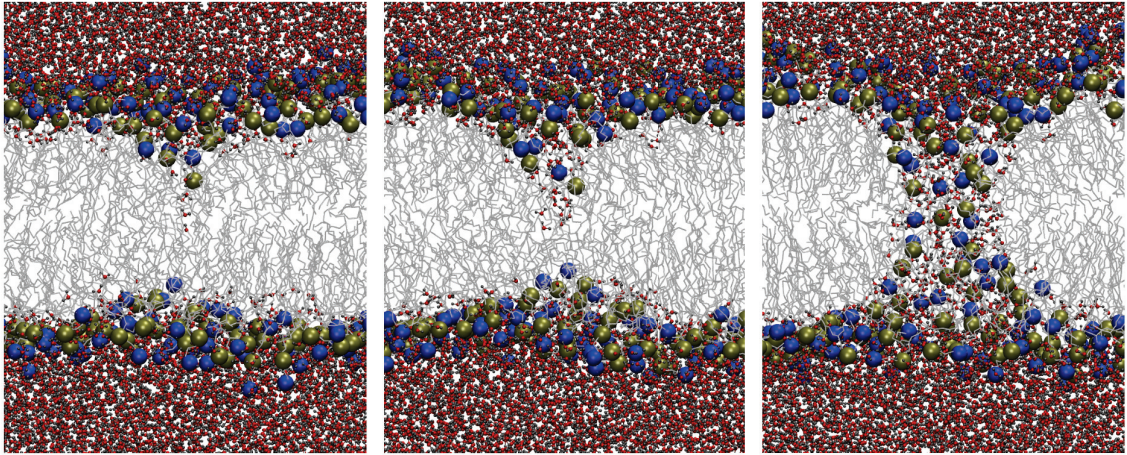
Fonte: Adaptado de (HO et al., 2013).

Por meio deste estudo, os pesquisadores conseguiram observar a abertura de poros e por consequência o transporte de íons para o interior da membrana. Através da aplicação de diferentes valores de campos elétricos, ficou claro que o raio do eletroporo pode ser ajustado conforme o campo elétrico que está sendo aplicado.

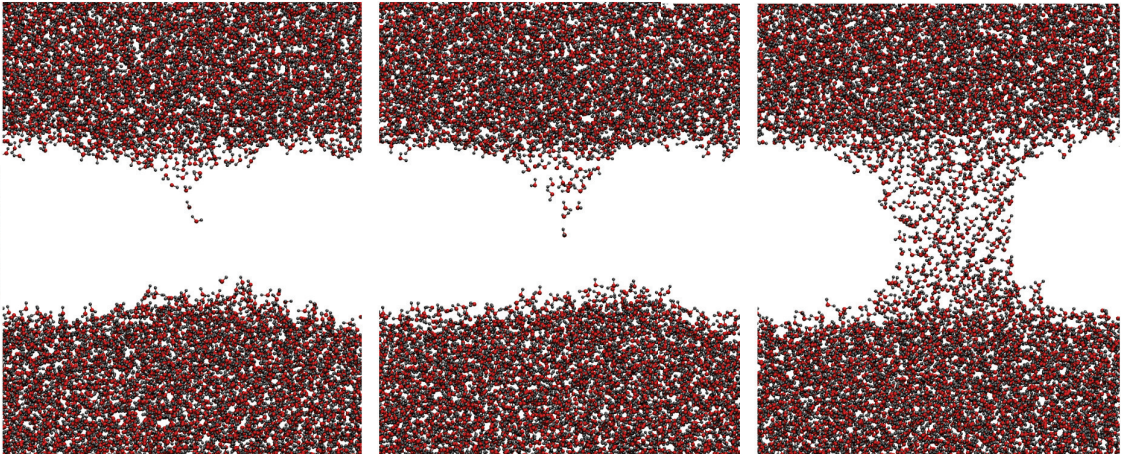
O trabalho realizado por Tokman e colaboradores (TOKMAN et al., 2013) observou a reorganização dos dipolos da água frente a aplicação de um campo elétrico externo. Para tanto, foram feitos cálculos de dinâmica molecular com a utilização de um membrana POPC e também a aplicação de campo elétrico em camadas de água isoladas pelo vácuo, como mostra a figura 1.10.

Figura 1.10 – (a) Formação de Poros em uma Membrana POPC e no (b) vácuo.

(a)



(b)

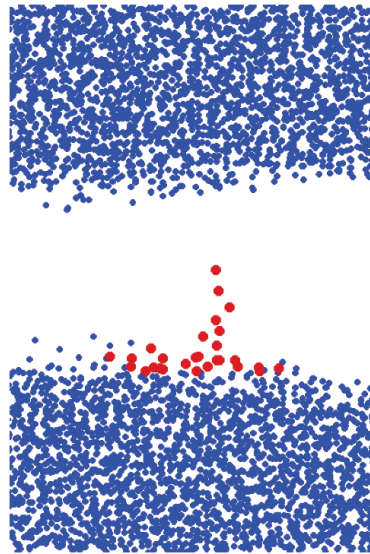


Fonte: Adaptado de (TOKMAN et al., 2013).

Tokman e colaboradores concluíram que a formação de poros para ambos os casos é bastante semelhante.

Este estudo também mostra que a eletroporação é impulsionada pela reestruturação das moléculas de água, na forma de fio de água com alinhamento dos dipólos devido ao campo elétrico que foi aplicado, figura 1.11. O mesmo comportamento foi identificado por Delemotte e colaboradores (DELEMOTTE; TAREK, 2012) e por Polak e colaboradores (POLAK et al., 2014) que observaram a formação de um defeito chamado de “fio de água” no início do processo de eletroporação.

Figura 1.11 – Início do processo de eletropração.

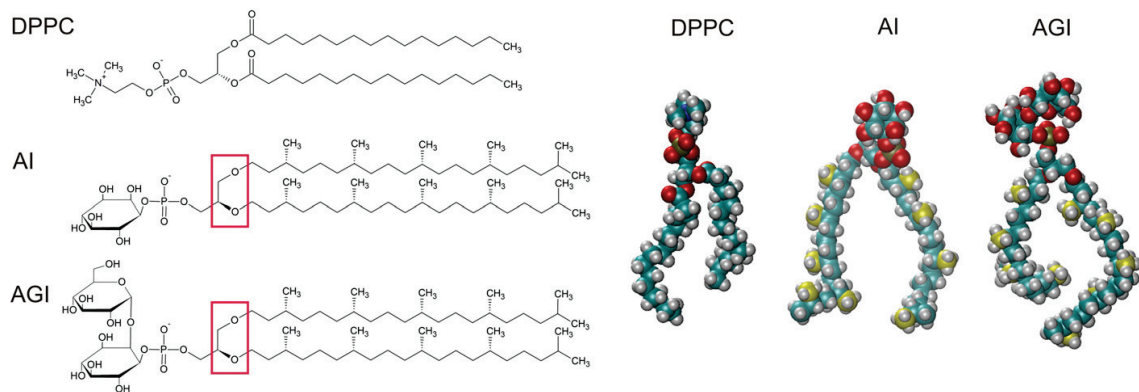


Fonte: Adaptado de (TOKMAN et al., 2013).

Sendo assim, o início do processo de formação de poros da membrana é estabelecido a partir da formação do fio de água, e a partir desse podemos dizer que a membrana é permeável.

No estudo de Polak e colaboradores (POLAK et al., 2014) foram utilizadas membranas *Archaeal* (membranas lipídicas encontradas em bactérias) (*Aeropyrum pernix*) como mostra a figura (1.12) e POPC, este tipo de membrana apresenta ligações éter em vez de ligações éster entre o grupo da cabeça e na região da carbonila e suas caudas são ramificadas com o grupo metil em sua formação, o que as difere das membranas fosfolipídicas do tipo POPC. Esta membrana foi utilizada para os cálculos de dinâmica molecular bem como para os ensaios feitos em laboratório por ser considerada mais estável química e fisicamente. Polak e colaboradores utilizaram o método de desequilíbrio de cargas para impulsionar a eletroporação, com temperatura variando de 298 até 323 K. Foi observado que o tempo para abertura do "fio de água" é em alguns casos dependente da temperatura, do tipo de membrana e da concentração de íons presentes no sistema. O estudo também demonstra que membranas do tipo *archaeal* apresentam maior estabilidade e por isso podem ser consideradas com maior viabilidade para uma possível entrega de fármacos.

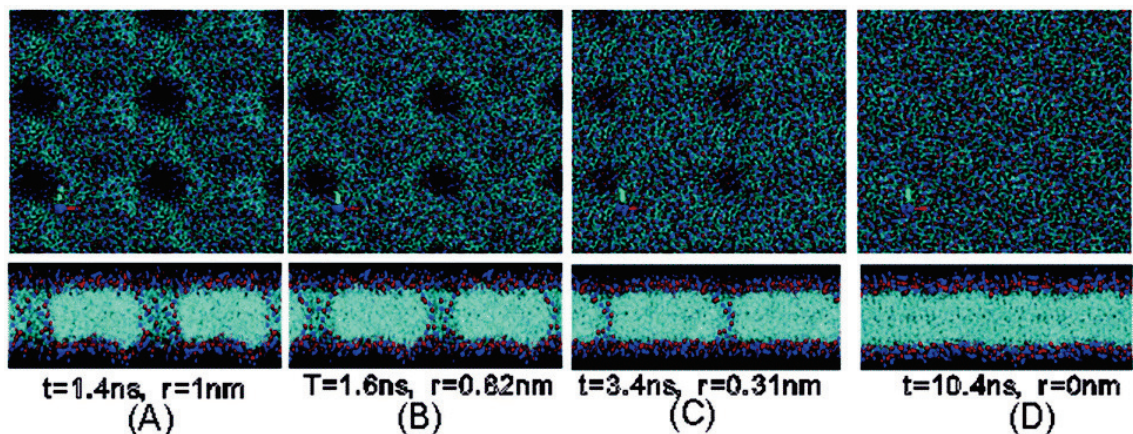
Figura 1.12 – Representação do lipídeo *Archaeal* (*Aeropyrum pernix*) em comparação com lipídeo DPPC (*dipalmitoyl-phosphatidyl-choline*) que compõe a membrana.



Fonte: Adaptado de (POLAK et al., 2014).

Ainda com o uso da dinâmica molecular através do programa NAMD, outro trabalho importante que descreve o processo de eletroporação é o estudo realizado por Majhi e colaboradores (MAJHI et al., 2015). Neste trabalho foram utilizadas membranas lipídicas POPC (*1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine*) e DPPC (*1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), empregando diferentes temperaturas (230 a 350K) para diferentes campos elétricos (0,3 a 1,1 V/nm). Além disso, o trabalho descreve a tempo de crescimento e a tempo de encerramento dos poros de acordo com a temperatura e campo elétrico aplicado. Para a temperatura de 300 K com campo elétrico variando de 0,75 a 2,0 V/nm a tempo de abertura dos poros varia de 1,3 a 13,9 ns. Na figura abaixo podemos observar a dinâmica de fechamento do poro para uma membrana POPC, a temperatura de 350 K onde o campo aplicado foi de 0,32 V/nm.

Figura 1.13 – Dinâmica de fechamento do poro em membrana POPC após desligamento do campo elétrico.



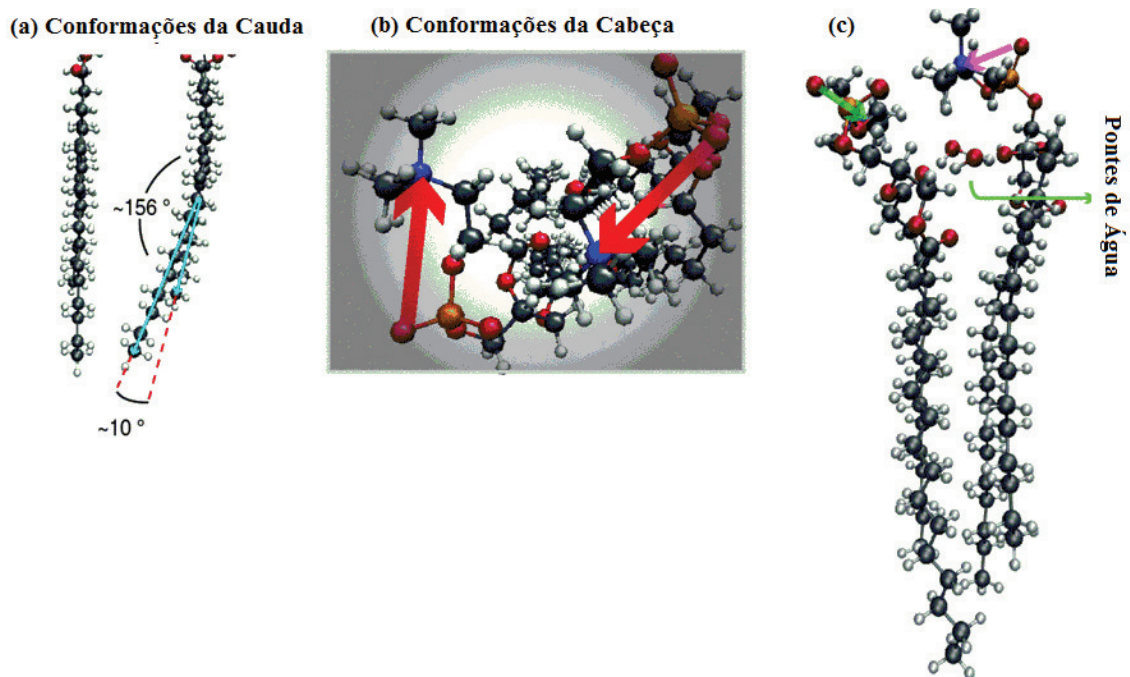
Fonte: Adaptado de (MAJHI et al., 2015).

No quadro A da figura 1.13 mostra a formação do poro após 1,4 ns de aplicação do campo, com aproximadamente 1,5 ns o campo foi desligado e a evolução do fechamento do poro está representada nos quadros B, C e D. Ainda na figura 1.13, podemos observar, nos quadros inferiores, o perfil das cabeças fosfolipídicas de maneira que quando o campo elétrico é desligado os grupos de cabeça lipídicas reorganizam-se para uma configuração mais estável. Assim, o poro desaparece completamente.

Na literatura encontramos diversos trabalhos com membranas lipídicas utilizando dinâmica molecular clássica que é o método mais adequado para o estudo de estruturas complexas que apresentam milhares de átomos. Raríssimos são os estudos que realizam uma análise da estrutura eletrônica desses sistemas. No trabalho realizado por Mashaghi e colaboradores (MASHAGHI et al., 2012), ele estuda as propriedades eletrônicas e estruturais de fosfolípeos DPPC e DPPE (*1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) hidratados. Neste trabalho, ele demonstra como a presença de moléculas de água pode afetar tanto a estrutura dos fosfolípeos como suas propriedades elétricas. Para isso ele utilizou cálculos baseados na teoria do funcional da densidade, por meio do código computacional SIESTA (SOLER et al., 2002).

Mashaghi e colaboradores observaram que, quando comparado ao fosfolípeo puro, figura 1.14(a) (à esquerda), a presença das moléculas de água causa uma inclinação na cauda fosfolipídica (figura 1.14(a) (à direita)) e a estrutura que antes tinha o formato cilíndrico passa a ter o formato de uma “foice”. As moléculas de água também são responsáveis pela oposição das cabeças fosfolipídicas quando estas estão na configuração de membrana, isto é quando temos mais de um fosfolípido interagindo que está indicado na figura 1.14 (b). Além disso, neste arranjo, verificou-se a formação de pontes de água entre a região do grupamento cabeça dos fosfolípidos, figura 1.14 (c).

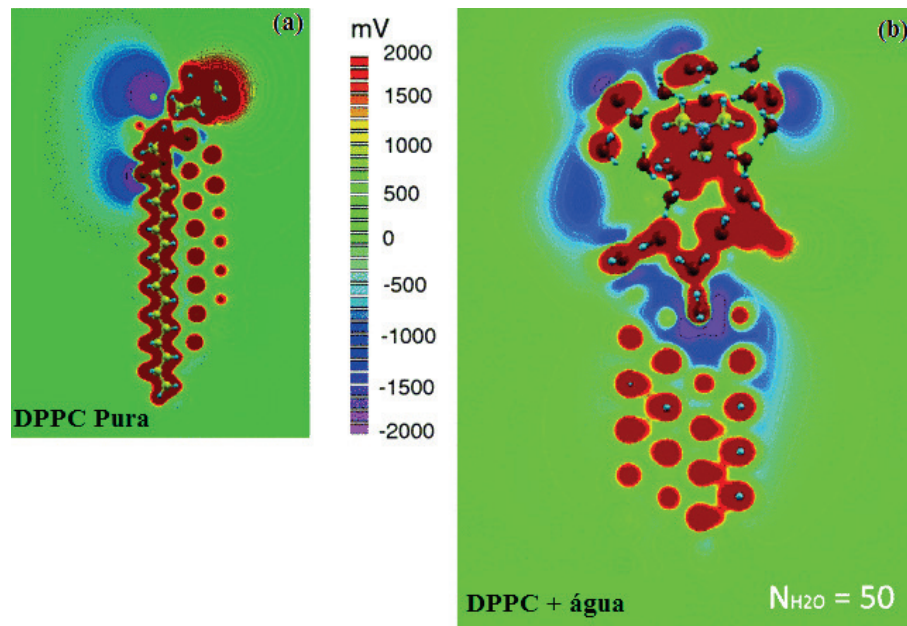
Figura 1.14 – Alterações estruturais na moléculas fosfolipídicas devido a presença da água.



Fonte: Adaptado de (MASHAGHI et al., 2012).

Por fim, o estudo constatou importantes alterações nas propriedades elétricas dos fosfolipídios. Na figura 1.15 (a), podemos visualizar o perfil do potencial eletrostático para um DPPC puro. Neste mapa onde estão presentes as linhas equipotenciais, pode-se observar regiões positivas e negativas muito bem definidas. O contrário acontece quando hidratamos esse fosfolipídio, figura 1.15 (b). A presença de água induz uma mudança conformacional na molécula inteira e, portanto, era esperado também a afetar os momentos elétricos da molécula.

Figura 1.15 – Mapas de Potencial Eletrostático do fosfolípídio DPPC.



Fonte: Adaptado de (MASHAGHI et al., 2012).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é, justamente, o estudo do processo de eletroporação de maneira quantitativa, realizando uma análise sobre todos os processos físicos envolvidos. Para isso, adotaremos as estruturas obtidas a partir dos cálculos de dinâmica molecular, e utilizaremos como base para os cálculos *ab initio*. Assim, será feita uma avaliação completa tanto da dinâmica do processo de abertura dos poros juntamente com uma avaliação eletrônica e estrutural do efeito do campo elétrico nos fosfolípidos POPC.

2 METODOLOGIA

De uma forma geral, a simulação molecular computacional pode ser definida como o uso de métodos computacionais para descrever o comportamento da matéria em nível atômico ou molecular.

Dentro de uma ampla faixa de técnicas, podemos distinguir entre métodos computacionais "*ab initio*" que utilizam a mecânica quântica, e métodos que utilizam a mecânica clássica. Os métodos computacionais *ab initio* levam em conta a estrutura eletrônica dos átomos ou moléculas. Já as simulações de dinâmica molecular baseiam-se na física clássica e as interações entre os átomos são tratadas com funções potenciais empíricas.

A simulação molecular é uma área em ativo crescimento, sobretudo guiada pelos avanços computacionais no que se refere à velocidade na realização de cálculos pelos computadores, bem como pelos avanços metodológicos sendo muito utilizada na predição e compreensão de novos fenômenos.

No caso do estudo de macromoléculas, estruturas extremamente complexas com número elevado de átomos, o uso de cálculos de dinâmica molecular baseados na mecânica clássica vem demonstrando-se uma das técnicas computacionais mais versáteis. Além do menor custo computacional em comparação com *ab initio*, os modelos clássicos possuem a vantagem de serem métodos parametrizados e reproduzem muito bem dados experimentais.

Nas próximas seções serão descritas as duas metodologias utilizadas: a dinâmica molecular clássica, usada para estudar o processo de eletroporação de membranas lipídicas, e a metodologia *ab initio*, a partir da qual estudaremos o comportamento da estrutura eletrônica das moléculas fosfolipídicas. Considerando, as duas metodologias como complementares, espera-se que as propriedades obtidas para os sistemas de interesse sejam bastante acuradas.

2.1 DINÂMICA MOLECULAR

A dinâmica molecular (DM) considera que a evolução temporal das posições atômicas pode ser obtido através da resolução das equações de movimento de Newton para cada partícula que compõe o sistema.

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = -\vec{\nabla} V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad (2.1)$$

com $i = 1, 2, \dots, N$, onde m_i é a massa do átomo i , \vec{r}_i sua posição e V , a energia potencial associada a configuração do sistema e \vec{r}_N representa o conjunto completo das $3N$ coordenadas atômicas. Dessa forma, as equações de movimento devem ser integradas em passos de tempo consideravelmente pequenos onde em cada passo de simulação, as forças nos átomos são calculadas e combinadas com a posição e velocidade instantâneos para gerar novas posições e velocidades. A cada nova posição dos átomos, são calculados novas forças, e assim sucessivamente. Com isso, é gerada uma trajetória que irá descrever como as variáveis dinâmicas mudam com o tempo.

2.2 ALGORITMO DE VERLET

Existem alguns algoritmos disponíveis para integração das equações de movimento, dentre os mais utilizados, podemos citar: o algoritmo de Verlet, Verlet-velocidade (VERLET, 1967) e Leap-Frog (HOCKNEY; GOEL; EASTWOOD, 1974), sendo os dois últimos variações do algoritmo de Verlet. A decisão de qual algoritmo utilizar depende de alguns fatores como custo computacional e conservação da energia. Neste trabalho foi utilizado o algoritmo de Verlet (VERLET, 1967; ALLEN; TILDESLEY, 1997). Este utiliza as posições e acelerações dos átomos no tempo t e as posições do passo anterior, $r(t - \delta t)$, para obtermos as novas posições no tempo $r(t + \delta t)$:

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + a(t)\delta t^2 \quad (2.2)$$

Para implementar este algoritmo, inicialmente calculamos as posições anteriores $r(t - \delta t)$ e as novas posições $r(t + \delta t)$. Utilizando a expansão da série de Taylor truncada em segunda ordem, para cada instante de tempo,

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.3)$$

$$r(t - \delta t) = r(t) - v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.4)$$

Somando as equações 2.3 e 2.4 e isolando $r(t + \delta t)$, obtemos a equação (2.2).

Como estamos tratando da integração das equações de movimento de Newton, aceleração de cada partícula $\vec{a}(t)$, é dada por,

$$\vec{a}(t) = -\frac{1}{m_i}\vec{\nabla}V(r_{ij}) \quad (2.5)$$

Para estimar as velocidades utilizamos a seguinte equação,

$$\vec{v}(t) = \frac{r(t + \delta t) - r(t - \delta t)}{2\delta t}. \quad (2.6)$$

No entanto, as velocidades no algoritmo de Verlet, não são calculadas diretamente. Mesmo não sendo necessárias para conhecermos as novas posições, é indispensável conhecer as velocidades (\vec{v}) para calcularmos a energia cinética e conseqüentemente sua energia total. Para isso, utiliza-se algumas variantes do algoritmo de Verlet, como por exemplo, o algoritmo Verlet-velocidade.

2.3 CONDIÇÕES PERIÓDICAS DE CONTORNO

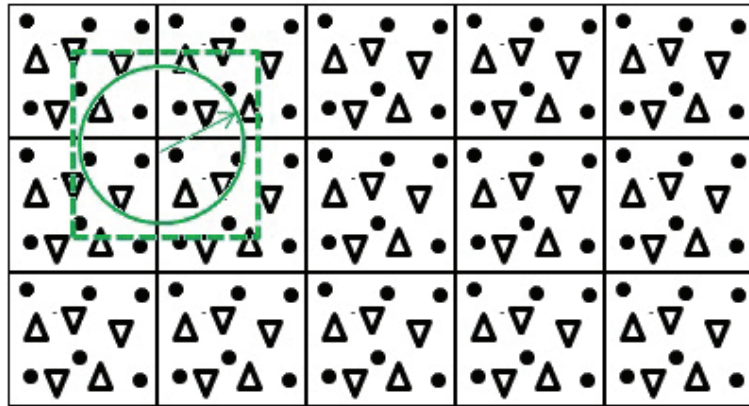
As condições periódicas de contorno (PBC - *Periodic Boundary Condition*) são empregadas com o objetivo de reduzir alguns efeitos de borda. Estes efeitos são gerados, pois o número de partículas considerado nos cálculos é insignificante em comparação ao número de partículas ou átomos contidos em sistemas macroscópicos (sistemas reais). Nas simulações quando comparamos o número total de partículas e o número de partículas na superfície, observamos que o número de partículas na superfície é muito maior, e isso acarreta efeitos de borda que são indesejáveis.

Isso ocorre, pois a “caixa” simulada é muito menor do que sistema real. Replacar o sistema (“a caixa”) em todas as direções com o uso de condições periódicas de contorno, como mostra a figura 2.1, é a forma mais comum de minimizar os efeitos de borda e obter as propriedades macroscópicas a partir das trajetórias das simulações de dinâmica molecular. Os efeitos de superfície conseguem ser minimizados e as partículas consideradas sofrem o efeito das forças como se estivessem no interior do sistema.

Através dessa técnica, os movimentos das partículas na caixa de simulação e de suas imagens são idênticos não existindo mais a limitação das paredes. Durante as simulações, quando uma partícula movimenta-se para fora do limite da caixa, uma das suas imagens entra pela parede oposta com a mesma velocidade, dessa forma, conserva-se o número de partículas em todas as réplicas (FRENKEL; D.SMITH, 2002).

Além do uso das condições periódicas de contorno, também é utilizado o método da mínima imagem (figura 2.1). Esse método é importante para o cálculo de interação de primeiros e segundos vizinhos, isto é, interações de curto alcance. Sendo assim, a imagem de cada partícula é considerada, evitando a interação desta com a mesma partícula duas vezes. No uso do método de mínima imagem, é estabelecido um raio de corte arbitrário (como mostra a figura 2.1). Normalmente, este possui me-

Figura 2.1 – Representação da replicação do sistema nas direções x e y / aplicação das condições periódicas de contorno, juntamente com o esquema do método da mínima imagem.



tade do valor da diagonal da caixa de simulação, de maneira que a interação ocorrerá sempre com a imagem replicada da partícula que se encontra dentro do raio de corte (a de menor distância). O raio de corte é estabelecido de maneira que não sejam gastos recursos computacionais realizando cálculos de interações de pares demasiadamente distantes e com contribuições insignificantes. Com isso, cálculos com um grande número de átomos terão melhor desempenho.

2.4 CAMPO DE FORÇA

Em dinâmica molecular, as forças são descritas por meio de campos de força que são constituídos por um conjunto de parâmetros obtidos experimentalmente. De maneira geral, a forma funcional para o campo de força usado para modelar conjuntos de átomos e/ou moléculas, é descrito pelas forças inter e intra-moleculares. As ligações inter-moleculares também denominadas não-ligadas, representam tipicamente interações físicas, tais como coulombiana (eletrostática) e van der Waals. O campo de forças típico é descrito pelo potencial,

$$V_{total} = \underbrace{V_{lig.} + V_{angular} + V_{diedros}}_{V_{intra}} + \underbrace{V_{n-lig.}}_{V_{inter}}, \quad (2.7)$$

onde, o primeiro termo $V_{lig.}$ representa os estiramentos, isto é as distâncias de ligação entre os átomos, já o segundo termo descreve as deformações angulares $V_{angular}$, que nada mais é do que as oscilações no ângulo θ sofrida pelos átomos. Ambos os termos

obedecem a lei de Hooke e, por isso, possuem forma quadrática,

$$V_{lig.} = \sum_{lig.} K_i (l - l_i)^2, \quad (2.8)$$

$$V_{angular} = \sum_{angular} K_i (\theta - \theta_i)^2. \quad (2.9)$$

onde K_i é a constante de força, l_i a distância de equilíbrio da ligação e θ_i o ângulo de equilíbrio das ligações. Os valores de l e θ dependerão da posição dos ângulos dos átomos no instante t .

O terceiro termo da equação (2.7), $V_{diedros}$, possui forma cossenóide e representa o potencial de torção dos ângulos diedros próprios e impróprios da molécula (equação (2.10)). Este potencial representa a rotação de um átomo em torno de uma ligação química, e é dado por

$$V_{diedros} = \sum_{diedros} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(nw + \gamma)], \quad (2.10)$$

onde V_n é a constante de torção, n é a multiplicidade de mínimos, w a variação angular do diedro e γ o ângulo de diferença de fase.

Por fim, temos o último termo da equação (2.7), que trata das interações não-ligadas, $V_{n-lig.}$. Este inclui as interações de van der Waals e eletrostáticas (equação 2.11), que são definidas pelo potencial de Lennard-Jones (ALLEN; TILDESLEY, 1997; FRENKEL; D.SMIT, 2002) e o potencial de Coulomb respectivamente.

$$V_{n-lig.} = V_{L-J}(r_{ij}) + V_C \quad (2.11)$$

O termo de van der Waals (equação 2.12) é dado pelo potencial de LJ e inclui as soma das contribuições repulsivas e atrativas. O primeiro termo do potencial de Lennard-Jones descreve a repulsão para curtas distâncias, enquanto o segundo termo corresponde à contribuição dispersiva de London.

$$V_{L-J}(r_{ij}) = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.12)$$

onde, σ_{ij} é o diâmetro efetivo do átomo, ε_{ij} é a profundidade do potencial de pares (valor onde a energia é mínima) e r_{ij} é a distância de interação dos átomos i e j . Também faz-se necessário calcular a interação entre partículas diferentes. Para tanto utilizamos a regra de Lorentz-Berthelott (ALLEN; TILDESLEY, 1997; FRENKEL; D.SMIT, 2002). Essas são dadas pelas equações,

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_{ii}\varepsilon_{jj}} \quad (2.13)$$

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_{ii}\sigma_{jj}}{2} \quad (2.14)$$

Com isso, os termos da equação 2.12 não necessitam de parametrização, apenas é preciso conhecer os termos σ_{ij} e ε_{ij} de cada partícula.

Por fim, temos o potencial de interação eletrostática que é definido pelo termo de Coulomb (equação (2.15)). Este tipo de interação distintas, estas podem ser atrativas ou repulsivas.

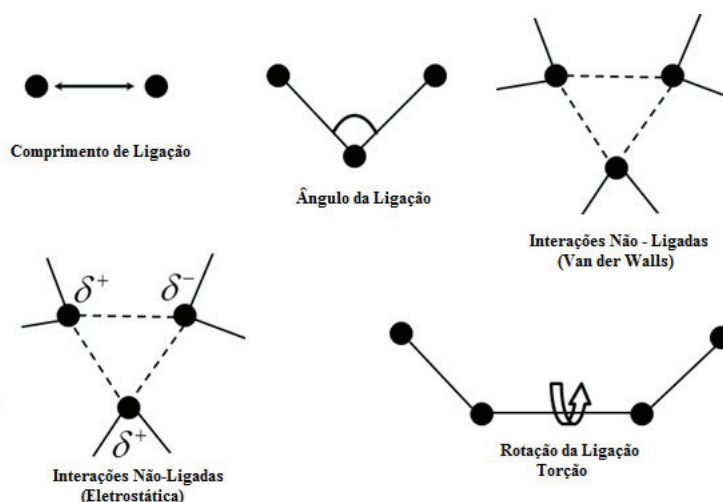
$$V_C(r_{ij}) = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (2.15)$$

Somando-se o potencial de Lennard-Jones e o potencial de Coulomb, temos o potencial não-ligado, que é descrito por,

$$V_{n-lig.} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (2.16)$$

Podemos observar as quatro principais contribuições do campo de força, discutidas, na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Esquema de representação das principais contribuições para o campo de força: comprimento de ligação, ângulo de ligação, Interações não-ligadas (van der Waals), Interações não-ligadas (Eletrostática) e rotação da ligação.



Existem diversos campos de força. Estes são formados por um conjunto de funções que expressam como a energia potencial de uma molécula varia com as posições dos átomos que compõe o sistema. Dentre os mais utilizados podemos citar o OPLS - *Optimized Potentials for Liquid Simulations* (KAMINSKI et al., 2001), que possui parâmetros apropriados para proteínas, lipídios, sacarídeos e outras moléculas orgânicas. O AMBER - *Assisted model building with energy refinement* (CORNELL et al., 1995)- foi parametrizado especialmente para proteínas e ácidos nucleicos, en-

quanto que o GROMOS (CHRISTEN et al., 2005), muito utilizado para predição do movimento dinâmico de moléculas e de solventes, também é aplicado nos cálculos de modelagem de biomoléculas.

Para este trabalho o campo de força escolhido foi o CHARMM (FOLOPPE; MACKERELL, 2000) - *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*, originalmente utilizado para a dinâmica de proteínas e ácidos nucleicos e atualmente tem sido aplicado para uma vasta gama de biomoléculas, solvatação, entre outras.

Estabelecido o campo de força, podemos obter as forças que atuam sobre cada átomo. Para isso, calcula-se a derivada da energia potencial, extraída do campo de força escolhido, em relação às posições dos átomos em questão. A derivada da energia potencial remete diretamente a aceleração da partícula. Integrando a equação de movimento obtêm-se a evolução temporal da posição e velocidade das partículas, de tal forma que podemos calcular diferentes propriedades dos sistemas como energia potencial ou cinética.

O procedimento é aplicado sucessivamente e com isso, adquirimos a trajetória do sistema, que nada mais é do que o conjunto de posições e velocidades de cada partícula ao longo do tempo. A partir da trajetória, a média temporal das propriedades do sistema podem ser obtidas.

Para realizar a integração das equações de movimento é necessário o uso de algoritmos que são fundamentados no método das diferenças finitas. Neste método, a integral é dividida em pequenos intervalos de tempo, δt , o que torna possível calcular os movimentos de maior frequência do sistema.

2.5 SOMAS DE EWALD

Como já discutimos, o potencial intermolecular é formado pelos potenciais de Lennard-Jones e pelo potencial de Coulomb (equação (2.15)). O potencial de Lennard-Jones é um termo de curto alcance, e por isso fica limitado à dimensão da caixa de simulação. O oposto ocorre com as interações eletrostáticas. Supondo que existam N cargas pontuais, q_1, q_2, \dots, q_N nas posições r_1, r_2, \dots, r_N dentro de uma caixa de simulação com carga neutra, isto é, $q_1 + q_2 + \dots + q_N = 0$. Estas cargas, com condições periódicas de contorno, interagem de acordo com a lei de Coulomb. Uma carga q_i , na posição r_i interage com outra carga $q_j, j \neq i$ na posição r_j , bem como com todas suas imagens periódicas nas posições $r_j + (n_1L, n_2L, n_3L)$ sendo n_1, n_2, n_3 inteiros. Ainda, interage com suas próprias imagens periódicas $r_i + (n_1L, n_2L, n_3L)$. Isso torna seu alcance infinito. Dessa forma, considerando as condições periódicas de contorno, o potencial

eletrostático será:

$$V_C = \frac{1}{2} \sum_{i=-\infty}^{n=0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{\vec{r}_{ij} + \vec{n}L} \quad (2.17)$$

onde o primeiro somatório representa os termos com $i=j$ e $n=0$ e a soma sobre \vec{n} é feita sobre todas imagens periódicas e L é o tamanho da caixa de simulação.

No entanto, apesar tratar-se de uma equação exata, o potencial coulombiano, só irá convergir no infinito. O que torna essa soma (equação(2.17)) desvantajosa para simulações computacionais.

Portanto é necessário reescrevê-la como uma soma de termos que irão convergir de maneira mais rápida. Para tanto, serão utilizadas funções Gaussianas e transformadas de Fourier, de maneira que a soma demonstrada na equação (2.17) seja substituída por um termo constante adicionado a duas somas de convergência rápida. Para isso, cada partícula i de carga pontual q_i será envolvida em uma nuvem de carga de mesma intensidade e sinal oposto, de maneira que sua carga total seja nula(FRENKEL; D.SMIT, 2002). Assim, o potencial eletrostático irá corresponder a somente a fração de carga q_i que não está cercada pela nuvem. A longas distâncias, essa fração irá decair rapidamente a zero, e serão consideradas somente as contribuições de curto alcance.

Como nosso objetivo é calcular o potencial eletrostático de um sistema periódico, com número infinito de cargas, além de uma nuvem de carga de sinal contrário a carga da partícula, acrescentamos outra nuvem de carga (gaussiana) q_i . Supomos que a nuvem de carga de compensação em torno da q_i é uma gaussiana com raio $\sqrt{\frac{2}{\alpha}}$,

$$\rho_{gauss}(r) = -q_i \left(\frac{\alpha}{\pi}\right)^{3/2} \exp(-\alpha r^2) \quad (2.18)$$

onde q_i é a carga e α é uma parâmetro arbitrário que controla a largura da nuvem de carga, e dependerá do método computacional escolhido. O uso dessa teoria é o que chamamos de soma de Ewald (ESSMANN et al., 1975).

$$V_{el} = V^{(r)} + V^{(k)} + V^{(s)} \quad (2.19)$$

onde $V^{(r)}$ é a contribuição do espaço real que representa a fração de cargas que não estão cercadas pela nuvem, $V^{(k)}$ é a contribuição do espaço recíproco, que inclui a interação entre nuvem de carga (gaussiana) e a carga q_i e por fim $V^{(s)}$ é o termo de

auto-interação carga-nuvem. Estes termos são definidos como:

$$V^{(r)} = \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N q_i q_j \frac{\text{erfc} \sqrt{\alpha r_{ij}}}{r_{ij}} \quad (2.20)$$

$$V^{(k)} = \frac{1}{2V} \sum_{\vec{k} \neq 0} \frac{4\pi}{k^2} |\rho(\vec{k})|^2 e^{-\frac{k^2}{2\alpha}} \quad (2.21)$$

$$V^{(s)} = - \left(\frac{\alpha}{\pi} \right)^{1/2} \sum_{i=1}^N q_i^2 \quad (2.22)$$

As somas de Ewald convencionais requerem um elevado custo computacional em função do número elevado de cálculos realizados para as inúmeras interações, principalmente para sistemas complexos, composto por N partículas. Por isso, foram desenvolvidas técnicas a partir da teoria das somas de Ewald. Uma delas é o método *Particle-Mesh-Ewald* (PME) este melhora a performance da soma $V(r)$, por meio de interpolações e transformadas de Fourier, tornando o método mais eficiente (SAGUI; T., 1999). O conjunto de parâmetros capaz de definir uma equação de estado de tal forma que diferentes funções termodinâmicas possam ser calculadas, é chamado de ensemble. Durante uma simulação computacional diferentes ensembles podem ser utilizados, de acordo com a configuração do sistema e das propriedades de interesse que serão analisadas ao fim da simulação (ALLEN; TILDESLEY, 1987). Como exemplo, podemos citar os ensembles NVE, NVT, NPT e μ VT, onde N é o número de partículas do sistema, P é a pressão, V o volume, T é a temperatura e μ é o potencial químico da substância.

2.6 MÉTODO DE REALIZAÇÃO DOS CÁLCULOS DE DINÂMICA MOLECULAR

O pacote escolhido para a simulação das estruturas foi o NAMD (*Not (just) Another Molecular Dynamics code*) (PHILLIPS et al., 2005). Este foi desenvolvido com o intuito de otimizar simulações de dinâmica molecular de sistemas biomoleculares. O desempenho do programa está diretamente ligado ao número de processadores disponíveis, visto que, este utiliza computação paralela, coordenando os esforços de numerosos processadores para tratar um único cálculo.

Todas as simulações foram realizadas no ensemble NPT. Neste ensemble, o volume do sistema flutua mantendo fixo a pressão, número de partículas e temperatura.

A temperatura e pressão são controladas pelo termostato e barostato de Langevin (ADELMAN; DOLL, 1976). O tempo para integração das equações do movimento foi de 2 fs utilizando o algoritmo de Verlet. Para reduzir os efeitos de superfície foram aplicadas as condições periódicas de contorno (PBC).

Os sistemas membranares foram termalizados por 10 nanosegundos e após foi aplicado o campo elétrico de 0,5 V/nm pelo período desejado, que na maioria das simulações foi de aproximadamente 17 ns. O modelo da água adotado foi o TIP3P com campo de força CHARMM (MACKERELL et al., 1998), trata-se de um modelo rígido com 3 sítios de interação, este modelo é o mais utilizado em sistemas biológicos (MARK; NILSSON, 2001) e descreve de forma simplificada as propriedades da água.

Além disso, foi utilizado um raio de corte de 12 Å para as interações intermoleculares, e o método PME (*Particle Mesh Ewald*) para as interações eletrostáticas.

2.7 MÉTODO *AB INITIO*

O uso de métodos *ab initio* tem crescido a cada dia e auxiliado na investigação, em nível molecular, de diversos fenômenos. Para o estudo de mecanismos de reação, estes métodos se apresentam como uma ferramenta extremamente útil, uma vez que é possível utilizá-los, tanto para estimar propriedades cinéticas e termodinâmicas, quanto na investigação da estrutura e reatividade de possíveis intermediários reacionais e estados de transição.

Os métodos *ab initio* (do latim “do início”) se propõem a prever as propriedades de sistemas atômicos e moleculares, usando para isso a mecânica quântica e diversas aproximações que serão discutidas ao longo deste trabalho.

2.8 EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER PARA UM SISTEMA DE MUITOS CORPOS

A equação de Schrödinger é uma equação diferencial cuja solução que descreve a evolução temporal de uma função de onda. Sabendo que as propriedades de um sistema são descritas por sua função de onda, a equação de Schrödinger, independente do tempo, será descrita com o intuito de descrever as propriedades do estado fundamental.

$$\hat{H}(\vec{r}, \vec{R})\psi(\vec{r}, \vec{R}) = E\psi(\vec{r}, \vec{R}), \quad (2.23)$$

$$\hat{H}(\vec{r}, \vec{R})\psi(\vec{r}, \vec{R}) = \hat{T}_i(\vec{R}) + \hat{V}_{ii}(\vec{R}) + \hat{T}_e(\vec{r}) + \hat{V}_{ee}(\vec{r}) + \hat{V}_{ie}(\vec{r}, \vec{R}), \quad (2.24)$$

onde

$\hat{H}(\vec{r}, \vec{R})$ o hamiltoniano do sistema;

$T_i(\vec{R})$ o operador energia cinética dos íons,

$$\hat{T}_i(\vec{R}) = \sum_k \frac{\vec{P}_k^2}{2M_k}, \quad (2.25)$$

$V_{ii}(\vec{R})$ o potencial de interação íon-íon, definido por:

$$\hat{V}_{ii}(\vec{R}) = \frac{1}{2} \sum \frac{Z_k Z_{k'}}{R_k R_{k'}}, \quad (2.26)$$

$\hat{T}_e(\vec{r})$ o operador energia cinética dos elétrons,

$$\hat{T}_e(\vec{r}) = \sum_{i=1} \frac{P_i^2}{2}, \quad (2.27)$$

$$\hat{V}_e(\vec{r}) = \frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|}, \quad (2.28)$$

$\hat{V}_{ie}(\vec{r}, \vec{R})$ o potencial de interação íon-elétron,

$$\hat{V}_{ie}(\vec{r}, \vec{R}) = \sum_{ki} \frac{Z_k}{|\vec{R}_k - \vec{r}_i|} \quad (2.29)$$

$\psi(\vec{r}, \vec{R})$ é a função de onda do sistema e E é a energia total do sistema.

A equação de Schrödinger é insolúvel para sistemas com muitos corpos, isto é, não possui solução analítica exata. Portanto, é necessário utilizar aproximações para poder descrevê-la corretamente.

2.9 APROXIMAÇÃO DE BORN OPPENHEIMER

Dentro desta aproximação, o movimento dos núcleos e dos elétrons pode ser tratado separadamente. Assim o desacoplamento dos movimentos eletrônicos e nucleares pode ser utilizado para descrever, de forma aproximada, o movimento dos sólidos e moléculas. Desse modo, a função de onda de muitos corpos pode ser descrita

como o produto de funções de onda:

$$\psi(\vec{r}, \vec{R}) = \phi(\vec{R})\chi(\vec{r}, \vec{R}), \quad (2.30)$$

onde $\phi(\vec{R})$ é a função de onda nuclear e $\chi(\vec{r}, \vec{R})$ é a função de onda eletrônica, dependente da posição dos elétrons.

Substituindo a equação 2.30 na equação 2.23, a equação fica com a seguinte forma:

$$\hat{H}_{e+i}\psi(\vec{r}, \vec{R}) = (\hat{T}_i(\vec{R}) + \hat{V}_{ii}(\vec{R}) + \hat{T}_e(\vec{r}) + \hat{V}_e(\vec{r}) + \hat{V}_{ie}(\vec{r}, \vec{R}))\psi(\vec{r}, \vec{R}) = E_{e+i}\psi(\vec{r}, \vec{R}); \quad (2.31)$$

$$\left[\sum_k \frac{P_k^2}{2M_k} + E_{e+i}(\vec{R}) \right] \phi(\vec{R}) = E\phi(\vec{R}). \quad (2.32)$$

Obtém-se, através dessas equações (2.31 e 2.32), a energia de Bohrn Oppenheimer do sistema e o Hamiltoniano eletrônico H_{e+i} que depende das coordenadas nucleares e descreve a superfície de energia potencial para o sistema.

Esse hamiltoniano eletrônico é utilizado na equação de para separação dos movimentos nucleares (equação 2.31) e eletrônicos (equação 2.32).

Essa aproximação pode ser feita uma vez que a massa dos núcleos é 10^4 a 10^5 vezes maiores que as massas dos elétrons e, em função disso, a velocidade destes é muito superior à dos núcleos. Dessa forma, consideramos os núcleos fixos e resolvemos a parte eletrônica do problema.

2.10 TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE

A Teoria do Funcional da Densidade é considerada um dos métodos *ab initio* mais bem sucedidos na física do estado sólido devido à alta eficiência computacional e aos bons resultados fornecidos, com um tempo de execução e custos computacionais relativamente baixos comparados ao Monte Carlo Quântico ou Hartree-Fock. Através da DFT, a energia total do sistema passa a ser escrita como um funcional da densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$, desta forma, $E[\rho(\vec{r})]$. A vantagem está no fato de que a densidade depende somente de três variáveis e, além disso, é uma quantidade mais simples de ser interpretada e menos abstrata que a função de onda do sistema. A fundamentação da DFT está em dois teoremas propostos em 1964 por Walter Kohn e seu aluno Pierre Hohenberg. Esses teoremas estabeleceram a conexão entre a densidade eletrônica e a equação de Schrödinger para muitas partículas. Dessa maneira, com a densidade eletrônica do sistema no estado fundamental, obtém-se a energia

do estado fundamental, de maneira exata, e as demais propriedades eletrônicas do sistema. A DFT se sustenta através de dois teoremas fundamentais, já demonstrados em (FIGUEIREDO, 2010). O primeiro teorema de Hohenberg-Kohn (HK) apresenta-se da seguinte forma:

Teorema 1: *A densidade de carga do estado fundamental $\rho(\vec{r})$ é determinada de modo unívoco, a menos de uma constante aditiva, a partir do potencial externo $V_{ext}(\vec{r})$. Assim, o funcional da energia total poderá ser escrito como:*

$$E[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{ext}[\rho] \quad (2.33)$$

onde $T[\rho]$ e $V_{ee}[\rho]$ são a energia cinética e potencial.

Podemos agrupar em um único termo $T[\rho]$ e $V_{ee}[\rho]$ que será denominado funcional de Hohenberg-Kohn $F_{HK}[\rho]$. Assim, reescrevendo a equação 2.33,

$$E[\rho] = V_{ext}[\rho] + F_{HK}[\rho] \quad (2.34)$$

em que $F_{HK}[\rho]$ depende somente da densidade, ou seja, é independente do potencial externo.

O segundo teorema de HK baseia-se no princípio variacional da energia, sendo escrito como:

Teorema 2: *O valor mínimo do funcional da energia é a energia do estado fundamental e a densidade com a qual se obtém esse mínimo é a densidade exata de uma partícula no estado fundamental.*

Assim, minimizando-se o funcional $E[\rho]$ da expressão 2.34, com respeito a densidade com o vínculo de que o número de partículas seja constante, pode-se obter a energia eletrônica total. Porém, F_{HK} não é conhecido o que impede de realizar os cálculos de energia total. Assim, faz-se necessário resolver as equações de Kohn-Sham (KS).

Nesta aproximação, a energia cinética T (primeiro termo da equação 2.33) é dividida em duas partes: uma delas representa a energia cinética de um gás de partículas não interagentes T_s e a outra descreve a energia de correlação V_c . O potencial elétron-elétron V_{ee} (segundo termo da equação 2.33) por sua vez, também pode ser escrito como uma soma de dois termos: V_H e V_x , em que o primeiro termo descreve a interação coulombiana entre os elétrons, também chamados de potencial de Hartree e o segundo termo a interação de troca (*exchange*).

Com essa descrição, a energia pode ser reescrita como um funcional da densidade:

$$E[\rho] = \underbrace{T_s[\rho] + V_c[\rho]}_{T[\rho]} + \underbrace{V_H[\rho] + V_x[\rho]}_{V_{ee}[\rho]} + V_{ext}[\rho] \quad (2.35)$$

em que se pode unir o segundo e o quarto termo da expressão 2.35 em um único termo, chamado de potencial de troca-correlação (*exchange-correlation*), ou seja, $V_{xc} = V_x[\rho] + V_c[\rho]$. Assim, reescrevendo a expressão 2.35, tem-se:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + \int \rho(\vec{r})V_{ext}d\vec{r} + V_{xc}[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d(\vec{r})d(\vec{r}') \quad (2.36)$$

O funcional anterior está associado a um sistema de elétrons que não interagem entre sí, pois o termo $T_s[\rho]$ não corresponde à energia cinética do sistema real. O termo $V_{xc}[\rho]$ é mais complexo porque é nele que estão contidas todas as informações excluídas dos outros termos.

A condição de mínimo para o funcional da energia $\delta E[\rho(\vec{r})] = 0$ deve ser restrita, pois existe um vínculo, fazendo com que o número de elétrons do sistema seja constante. O vínculo no número de elétrons pode ser expresso da seguinte forma:

$$\int d\vec{r}\rho(\vec{r}) - N = 0 \quad (2.37)$$

e esse vínculo será incluído na equação para a energia total através de um multiplicador de Lagrange, μ . O funcional a ser minimizado será:

$$F[\rho(\vec{r})] = E[\rho(\vec{r})] - \mu \left[\int d\vec{r}\rho(\vec{r}) - N \right] \quad (2.38)$$

E nesse caso o multiplicador de Lagrange é o potencial químico do sistema. Para encontrarmos o mínimo da equação 2.38, que consiste em fazer as derivadas funcionais em torno da densidade eletrônica e, por fim para igualar essas quantidades a zero, deve-se proceder da seguinte maneira:

$$\frac{\delta}{\delta\rho} \left\{ E[\rho] - \mu \left[\int \rho(\vec{r})d\vec{r} - N \right] \right\}_{\rho=\rho_0} = 0 \quad (2.39)$$

Considerando um sistema de N elétrons não interagentes submetidos a um potencial externo $V_{ext}(\vec{r})$. A energia será dada por:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + V_{ext}[\rho] \quad (2.40)$$

$$E[\rho] = T_s[\rho] + \int \rho(\vec{r})V_{ext}(\vec{r})d\vec{r} \quad (2.41)$$

Minimizando a expressão 2.41, temos:

$$\frac{\delta T_s[\rho]}{\delta\rho_0} + V_{ext} - \mu = 0 \quad (2.42)$$

Escrevendo $T_s = -\frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \int \phi_i^* \nabla^2 \phi_i d\vec{r}$, em que representam as funções de onda de um elétron e dada a densidade de carga do estado fundamental para um sistema não interagente,

$$\rho_0^s = \sum_{i=1}^N |\phi_i(\vec{r})|^2 \quad (2.43)$$

a solução da equação 2.41 pode ser obtida resolvendo a equação de Schrödinger de uma única partícula,

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V_{ext}(\vec{r}) \right] \phi_i(\vec{r}) = \varepsilon_i \phi_i(\vec{r}) \quad (2.44)$$

A energia do estado fundamental é dada pela soma dos autovalores,

$$E[\rho] = T_s[\rho] + \int \rho(\vec{r}) V_{ext}(\vec{r}) d\vec{r} = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i \quad (2.45)$$

Para o caso de um sistema de elétrons interagentes, o sistema de elétrons não interagentes atua como um sistema auxiliar e a energia é dada pela expressão 2.36. Fazendo a minimização do funcional da equação 2.36 da seguinte forma,

$$\frac{\delta}{\delta \rho} \left\{ T_s[\rho] + \int \rho(\vec{r}) d\vec{r} + V_{xc}[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r}) \rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r} d\vec{r}' - \mu \left[\int \rho(\vec{r}) d\vec{r} - N \right] \right\} = 0 \quad (2.46)$$

obtemos,

$$\frac{\delta T_s[\rho_0]}{\delta \rho_0} + \frac{\delta V_{xc}[\rho_0]}{\delta \rho_0} + V_{ext}(\vec{r}) + \int \frac{\rho_0(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' - \mu = 0 \quad (2.47)$$

onde,

$$V_{xc}[\rho_0] = \frac{\delta V_{xc}[\rho_0]}{\delta \rho_0} \quad (2.48)$$

é o potencial de troca e correlação.

Comparando as equações 2.42 e 2.47 podemos definir o potencial efetivo de Kohn- Shan como:

$$V_{eff}(\vec{r}) = V_{ext}(\vec{r}) + \frac{\rho_0(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' + V_{xc}[\rho_0]. \quad (2.49)$$

Assim, a equação 2.44 para um sistema de elétrons interagentes fica agora:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V_{eff}(\vec{r}) \right] \phi_i(\vec{r}) = \varepsilon_i \phi_i(\vec{r}) \quad (2.50)$$

em que

$$\rho_0(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N |\phi_i(\vec{r})|^2 \quad (2.51)$$

As expressões 2.49, 2.50 e 2.51 são conhecidas como as equações de KS, as funções ϕ_i são os orbitais de KS e as energias ε_i são os correspondentes autovalores de KS. A equação 2.51 não pode ser obtida sem o conhecimento das funções ϕ_i , mas para obtermos $V_{eff}(\vec{r})$ é preciso conhecer $\rho_i(\vec{r})$ que depende de ϕ_i . Logo, trata-se de um processo autoconsistente.

O procedimento mais adequado (dentro da DFT) para a determinação da densidade do estado fundamental é:

- Propor um valor inicial $\rho_i(\vec{r})$ para a densidade do estado fundamental $\rho_0(\vec{r})$;
- Construir um potencial efetivo $V_{eff}(\vec{r})$;
- Resolver a equação 2.50, determinando as funções $\phi_i(\vec{r})$;
- Com as funções $\phi_i(\vec{r})$, determinar uma nova densidade $\rho_N(\vec{r})$;
- Comparar a nova densidade com a densidade anterior (N-1), se $\rho_N(\vec{r}) \approx \rho_{N-1}(\vec{r})$, então $\rho_N(\vec{r})$ é a densidade procurada, caso contrário, o ciclo recomeça utilizando uma nova $\rho(\vec{r})$ para a densidade inicial e assim por diante até que a convergência seja alcançada.

Após a determinação autoconsistente de $\rho_0(\vec{r})$, a energia total do estado fundamental pode ser obtida em função dos autovalores ε_i .

Para derivar a expressão para a energia do estado fundamental, escreve-se uma equação análoga à expressão 2.45, ou seja:

$$\sum_{i=1}^N \varepsilon_i = T_s[\rho_0] + \int \rho_0(\vec{r}) V_{eff}(\vec{r}) d\vec{r} \quad (2.52)$$

Substituindo o valor de $V_{eff}(\vec{r})$ dado em 2.49 na equação 2.36 para $\rho = \rho_0$, tem-se:

$$E[\rho_0] = T_s[\rho] + \int \left[V_{eff}(\vec{r}) - \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' - V_{xc}(\vec{r}) \right] \rho(\vec{r}) d\vec{r} + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}d\vec{r}' + V_{xc}[\rho_0] \quad (2.53)$$

Usando a equação 2.52 na equação 2.53, chega-se à expressão para a energia

total do estado fundamental:

$$E[\rho_0] = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}d\vec{r}' - \int \rho_0(\vec{r})V_{xc}(\vec{r})d\vec{r} + V_{xc}[\rho_0] \quad (2.54)$$

A expressão 2.54 mostra que a energia do estado fundamental não é simplesmente a soma dos autovalores de KS. Além disso, esses autovalores, assim com as respectivas autofunções, não apresentam um significado físico bem definido. Para obter os orbitais de KS (autofunções) e seus respectivos valores, resolve-se a equação 2.50 que é do tipo de Schrödinger auxiliar de uma única partícula, cuja utilidade é determinar as autofunções que permitem o cálculo da densidade eletrônica real do sistema no seu estado fundamental.

2.11 POTENCIAL DE TROCA E CORRELAÇÃO

A DFT é, em princípio, exata, mas quando aplicada em sistemas reais, certas aproximações devem ser usadas para o potencial de troca-correlação, uma vez que esse não é conhecido. Para contornar essa dificuldade, dois tipos principais de aproximações são feitos para a energia de troca e correlação: aproximação da densidade local (do inglês: “*Local Density Approximation-LDA*) e aproximação de gradientes generalizados (do inglês: “*Generalized Gradient Approximation– GGA*).

2.12 APROXIMAÇÃO LDA (*LOCAL DENSITY APPROXIMATION*)

Nesta aproximação, o funcional da energia de troca e correlação é puramente local e para sistemas com densidade eletrônica uniforme, ela é exata. Portanto, espera-se que ela descreva bem os sistemas em que a densidade eletrônica varie lentamente com a posição.

A energia de troca e correlação é dada por:

$$E_{xc}[\rho] = \int e_{xc}(\vec{r})\varepsilon_{xc}(\rho(\vec{r}))d\vec{r} \quad (2.55)$$

onde $\varepsilon_{xc}(\rho)$ é a energia de troca e correlação de densidade constante $\rho(\vec{r})$.

A LDA tende a superestimar os valores de energia de ligação. No entanto, ela é muito precisa em se tratando da determinação de comprimentos de ligação, apresentando um erro de apenas 1% em comparação com o valor experimental.

2.13 APROXIMAÇÃO GGA (*GENERALIZED GRADIENT APPROXIMATION*)

Essa aproximação é normalmente utilizada conforme o formalismo de KS, que é mais elaborado e considera aspectos não-locais de densidade eletrônica. Consiste em escrever a densidade de troca-correlação não só em função da densidade $\rho(\vec{r})$, mas também utiliza seu gradiente de densidade,

$$E_{xc}[\rho] = \int f(\rho(\vec{r})) d^3r \quad (2.56)$$

As aproximações LDA e GGA apresentam propriedades bastante particulares, por isso a escolha depende do sistema físico que se pretende estudar.

2.14 PSEUDOPOTENCIAL

O pseudopotencial foi introduzido originalmente com o objetivo de simplificar os cálculos de estrutura eletrônica pela eliminação dos estados eletrônicos de caroço. As vantagens do uso de pseudopotenciais são que eles podem substituir os elétrons do caroço e as funções de ondas são suaves, simplificando os cálculos.

Considerando que os estados eletrônicos das moléculas dividem-se em dois tipos: os de caroço e os de valência. Os de caroço estão fortemente ligados e mais próximos ao núcleo e permanecem quase inalterados mesmo quando o átomo é submetido a diferentes ambientes químicos. Já os de valência são responsáveis pelas ligações químicas. Assim, pode-se analisar somente os graus de liberdade dos elétrons de valência em cálculos de propriedades eletrônicas de moléculas e sólidos, sendo que se deve levar em consideração a ortogonalidade entre os estados de caroço e os estados de valência, e isso é feito, utilizando pseudopotenciais.

Nesse trabalho serão utilizados os pseudopotenciais *ab initio* de norma conservada, que são gerados a partir do cálculo de função de onda atômica de todos os elétrons. Isso é realizado, utilizando a DFT e assumindo a aproximação de um átomo esfericamente blindado, resolvendo autoconsistentemente a equação radial de KS (HOHENBERG; KOHN, 1964).

$$\left[-\frac{1}{2} \frac{d^2}{dr^2} + \frac{l(l+1)}{2r^2} - V[n; r] \right] r R_{nl}(r) = \varepsilon_{nl} r R_{nl}(r) \quad (2.57)$$

onde $R_{nl}(r)$ é a função de onda atômica de todos os elétrons de valência, n, l são os números quânticos principal e momento angular, respectivamente, $V[n; r]$ é a soma

dos potenciais iônicos, de Hartree e de troca e correlação e são dados por:

$$V(n; r) = -\frac{Z}{r} + V_{Hartree}[n; r] + V_{xc}(n(r)) \quad (2.58)$$

onde $n(r)$ é a soma das densidades eletrônicas.

Os pseudopotenciais de norma conservada devem satisfazer algumas condições:

- As pseudofunções de onda de valência (PV), que forem geradas utilizando pseudopotencial, não devem conter nodos, pois se almeja funções de onda mais suaves, e não são conveniente as oscilações decorrentes dos nodos;
- A pseudofunção de onda radial, normalizada com momento angular l , deve ser igual a função de onda radial de todos os elétrons (FE) normalizada acima de um raio de corte r_c escolhido;

$$R_i^{PV}(r) = R_i^{FE}(r) \quad r > r_c \quad (2.59)$$

- A carga contida na esfera de raio r_c é igual, utilizando qualquer uma das duas funções de onda (conservação da norma);

$$\int_0^{r_c} |R_i^{PV}|^2 r^2 dr = \int_0^{r_c} |R_i^{FE}|^2 r^2 dr \quad (2.60)$$

- Os autovalores de todos os elétrons de valência e do pseudopotencial devem ser iguais, ou seja $\varepsilon_i^{PV} = \varepsilon_i^{FE}$

Pode se dizer que o pseudopotencial é de norma conservada se ele obedece às quatro condições descritas acima (BACHELET; HAMANN; SCHLUTER, 1982).

Tendo em mãos a pseudofunção de onda e adotando a aproximação da esfera blindada, pode-se encontrar o pseudopotencial, utilizando a inversão da equação radial de Schrödinger.

$$V_b^{PV} = \varepsilon_i - \frac{l(l+1)}{2r^2} + \frac{1}{2rR_l^{PV}} \frac{d^2}{dr^2} [rR_l^{PV}(r)] \quad (2.61)$$

Para que o pseudopotencial seja contínuo, deve ser obedecida à seguinte condição: a pseudofunção de onda deve apresentar derivadas primeiras e segundas contínuas acima do r_c . Evitando com isso um pseudopotencial com singularidade na origem, a pseudofunção de onda deve se comportar como um r^l próximo da origem.

Os efeitos na blindagem dos elétrons de valência vão depender do ambiente onde eles estiverem colocados. No entanto, se forem removidos os efeitos nos elétrons de valência, alcançar-se-à um pseudopotencial iônico que independe do ambiente, e dessa forma pode-se garantir uma boa transferibilidade para o pseudopotencial. Para calcular esse efeito, é retirado o potencial de Hartree (V_H^{PV}) e o potencial

de troca e correlação (V_{xc}), dos elétrons de valência do potencial blindado, ficando apenas o pseudopotencial iônico.

$$V_{ion,l}^{PV}(\vec{r}) = V_{src,l}^{PV}(\vec{r}) - V_{Hartree}^{PE}(\vec{r}) - V_{xc}^{PE}(\vec{r}) \quad (2.62)$$

O pseudopotencial iônico é dependente do momento angular da pseudofunção de onda, sendo que cada momento angular l sentirá um potencial diferente. Então, o pseudopotencial iônico terá a seguinte forma:

$$\hat{V}_{ion,l}^{PV}(\vec{r}) = V_{ion,loc}^{PV}(\vec{r}) + \sum_l V_{nloc}(\vec{r}) \hat{P}_l \quad (2.63)$$

onde $V_{ion,l}^{PV}$ é o potencial local e P_l é o operador de projeção para o momento angular l , e

$$V_{nloc,l}(\vec{r}) = V_{ion,l}^{PV}(\vec{r}) - V_{ion,loc}^{PV}(\vec{r}) \quad (2.64)$$

é o potencial não local (semilocal) para a componente do momento angular l e projeta a l -ésima componente do momento angular da função de onda. Pode-se transformar o potencial semilocal (equação 2.62) em um potencial não local. Para isso, pode-se utilizar o procedimento de Kleinman e Bylander (BYLANDER; KLEIMAN, 1987).

$$V_{KB}^{nlocal,l}(r) = \frac{|V_{nlocal,l}(r)\phi_l^{PV}\rangle\langle\phi_l^{PV,0}(r)|}{\langle\phi_l^{PV,0}|V_{loc,l}(r)|\phi_l^{PV}\rangle} \quad (2.65)$$

onde V_{nloc} é o potencial da equação 2.64, ϕ_l^{PV} é a pseudofunção de onda atômica, incluindo a componente do momento angular para a qual o pseudopotencial foi calculado. Esta separação do pseudopotencial em local e não local aumenta muito a eficiência de códigos computacionais que utilizam essa ferramenta, como o programa SIESTA (SOLER et al., 2002), o qual foi utilizado para realização deste trabalho.

2.15 FUNÇÕES DE BASE

Para descrever um orbital é necessário resolver as equações de KS. E para isso necessitamos de uma base. Contudo, para se obter bons resultados, um grande número de funções de onda são necessárias para descrever cada orbital, o que envolve um alto custo computacional. Por isso, é indispensável o uso de métodos que tendam a diminuir esse gasto computacional. Uma alternativa para isso é o uso de bases localizadas (SOLER et al., 2002). A sua desvantagem é a falta de uma sistematização para otimizar o cálculo variacional, o que torna necessário um maior cuidado no ajuste

das bases para cada tipo de átomo. Mesmo assim, ótimos resultados são obtidos com o uso desse método.

Os orbitais atômicos numéricos são eficientes, pois permitem uma boa liberdade variacional com um número muito pequeno de funções sem perder uma localidade. Eles são obtidos através da resolução da equação de Schrödinger para pseudoátomos isolados, com as mesmas aproximações para sólidos ou moléculas (SOLER et al., 2002). As funções de base, localizadas, são determinadas através da aplicação de condições de contorno, ou da multiplicação dos orbitais do átomo livre por uma dada função de corte. As características fundamentais desses orbitais são tamanho, alcance e forma radial.

2.16 MÉTODO DE REALIZAÇÃO DOS CÁLCULOS - *AB INITIO*

Para o estudo das moléculas fosfolipídicas na presença de um campo elétrico externo, foram realizados cálculos de primeiros princípios, baseados na DFT (teoria do funcional da densidade) (HOHENBERG; KOHN, 1964). Para isso, foi utilizado o código computacional SIESTA (SOLER et al., 2002). O potencial de troca e correlação foi descrito através da aproximação da densidade local LDA de acordo com parametrização de (PERDEW; ZUNGER, 1981). Foi empregado um pseudopotencial suave de norma conservada de Troullier Martins (TROULLIER; MARTINS, 1991), e o critério de convergência para as forças atômicas foi de 0,05 eV/ e o *energy shift* de 0,05 eV.

3 RESULTADOS I: DINÂMICA DA ELETROPORAÇÃO

3.1 INTRODUÇÃO

O primeiro capítulo apresenta os resultados obtidos com o uso de cálculos de dinâmica molecular clássica com o uso do código computacional NAMD (PHILLIPS et al., 2005). No segundo capítulo, por sua vez, estão descritos os resultados obtidos por meio de cálculos *ab initio*, através do código computacional SIESTA (SOLER et al., 2002).

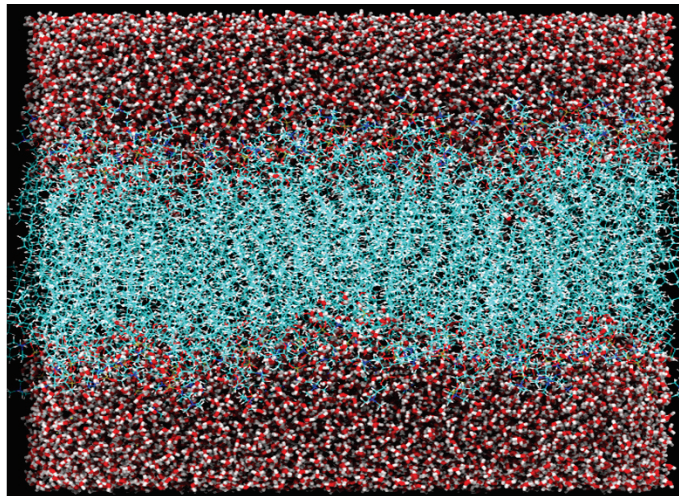
O principal objetivo deste trabalho é entender e analisar os processos físicos envolvidos no processo de eletroporação de ponto de vista atômico, buscando compreender mudanças conformacionais e estruturais que levam a formação de poros no interior das bicamadas.

3.2 MEMBRANAS LIPÍDICAS - CÁLCULOS DE DINÂMICA MOLECULAR CLÁSSICA

3.2.1 Dinâmica da Formação de Poros em Membranas Lipídicas

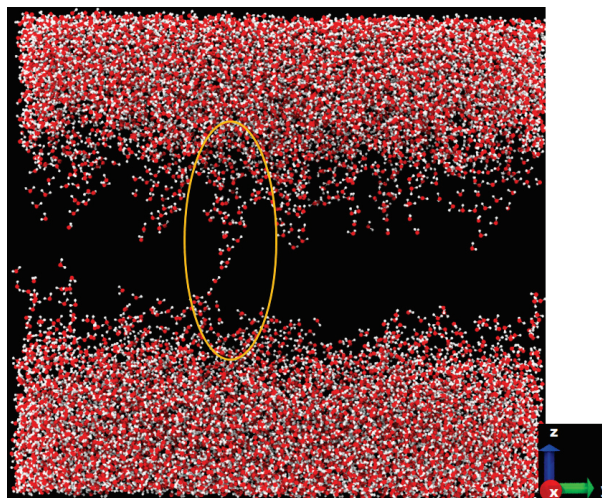
Para realização dos cálculos utilizamos uma bicamada lipídica do tipo POPC com 137 fosfolipídios em cada camada, em contato com dois reservatórios de água no total de 13000 moléculas de água, com 18 átomos de Na e 18 átomos de Cl (0,15 mol/L), conforme figura 3.1. A inserção de íons de Na Cl nos reservatórios de água possui a finalidade de tentar reproduzir as condições fisiológicas.

Figura 3.1 – Bicamada Lipídica POPC;



Inicialmente foram feitos cálculos com aplicação de um campo elétrico fixo, de 0,5 V/nm, e variamos a temperatura de 300 K a 340 K. A escolha do valor do campo elétrico deve-se ao tamanho da bicamada lipídica, e ao tipo de resposta que se deseja, que neste caso é estudar a formação de poros (BOCKMANN et al., 2008; FERNANDEZ et al., 2012; TOKMAN et al., 2013). Através destes cálculos avaliamos a influência da temperatura no tempo de formação do fio de água, evento que precede a formação do poro. Trata-se do ordenamento das moléculas de água no formato de um fio, como mostra a figura 3.2, onde a partir deste definimos o início processo de eletroporação.

Figura 3.2 – Ordenamento das moléculas de água, formando um fio de água. Os átomos da membrana foram omitidos para maior clareza;



O tempo simulado em cada cálculo foi de 17 ns e os raios dos poros foram

estimados por meio do software CAVER (KOZLIKOVA et al., 2007). Os valores são apresentados na tabela 3.1 a seguir, onde t_{fio} é o tempo necessário para formação do primeiro fio de água, e r_{min} e r_{max} são os valores de raio mínimo e máximo do poro respectivamente,

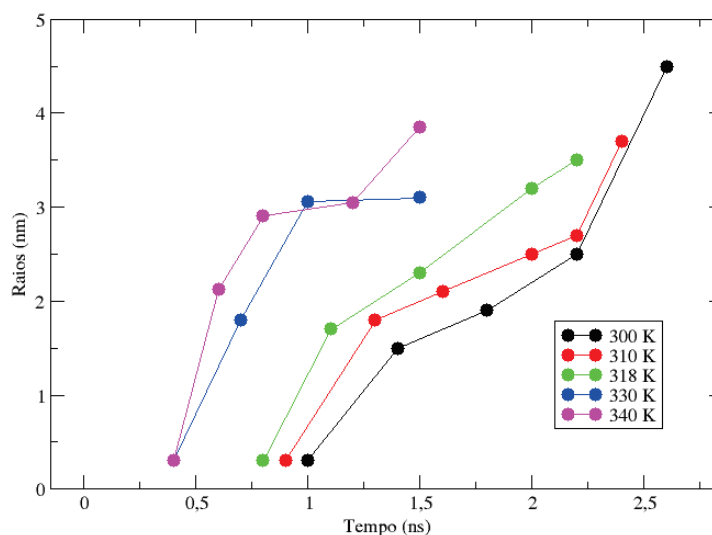
Tabela 3.1 – Características da formação de poros em membranas POPC, após aplicação de uma campo elétrico externo.

Temperatura (K)	$t_{fio}(ns)$	r_{min} (nm)	r_{max} (nm)
300	1,0	1,5	4,5
310	0,9	1,8	3,7
318	0,8	1,7	3,5
330	0,4	1,8	3,1
340	0,4	2,1	3,8

Através dos dados da tabela 3.1, pode-se observar que a temperatura possui grande influência no tempo de abertura do poro. Também, os valores dos raios mínimos e máximo são afetados pelo aumento da temperatura.

No gráfico 3.3, é possível ver de maneira mais clara como a temperatura interfere no tempo de abertura do poro.

Figura 3.3 – Variação do raio do poro com tempo de acordo com a temperatura.



Observamos que quanto maior a temperatura, menor é o tempo para formação do primeiro fio de água. As diferenças chegam 0,6 ns quando comparamos as temperaturas de 300 e 340 K. No entanto, apesar de verificarmos uma redução no tempo inicial de formação do poros para as temperaturas mais elevadas, nota-se que

os mesmos são efêmeros: para 340 K, por exemplo, a membrana sofre ruptura completa após 1,5 ns. Para 300 K, por outro lado, o poro e a estrutura da membrana se mantém mesmo após 2,5 ns de aplicação do campo elétrico.

Nas figuras 3.4 e 3.5 podemos analisar a evolução do raio do poro com o passar do tempo. A determinação do poro foi realizada por meio do software CAVER (KOZLIKOVA et al., 2007), que encontra e preenche o volume da cavidade, determinando assim seu respectivo raio.

Figura 3.4 – Evolução do raio do poro para temperatura de 318 K.

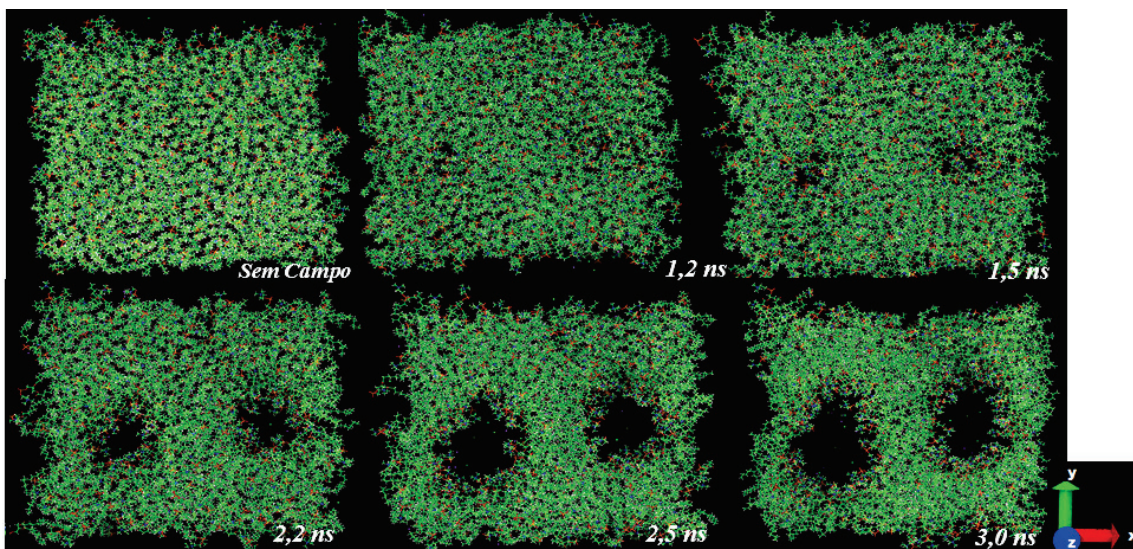
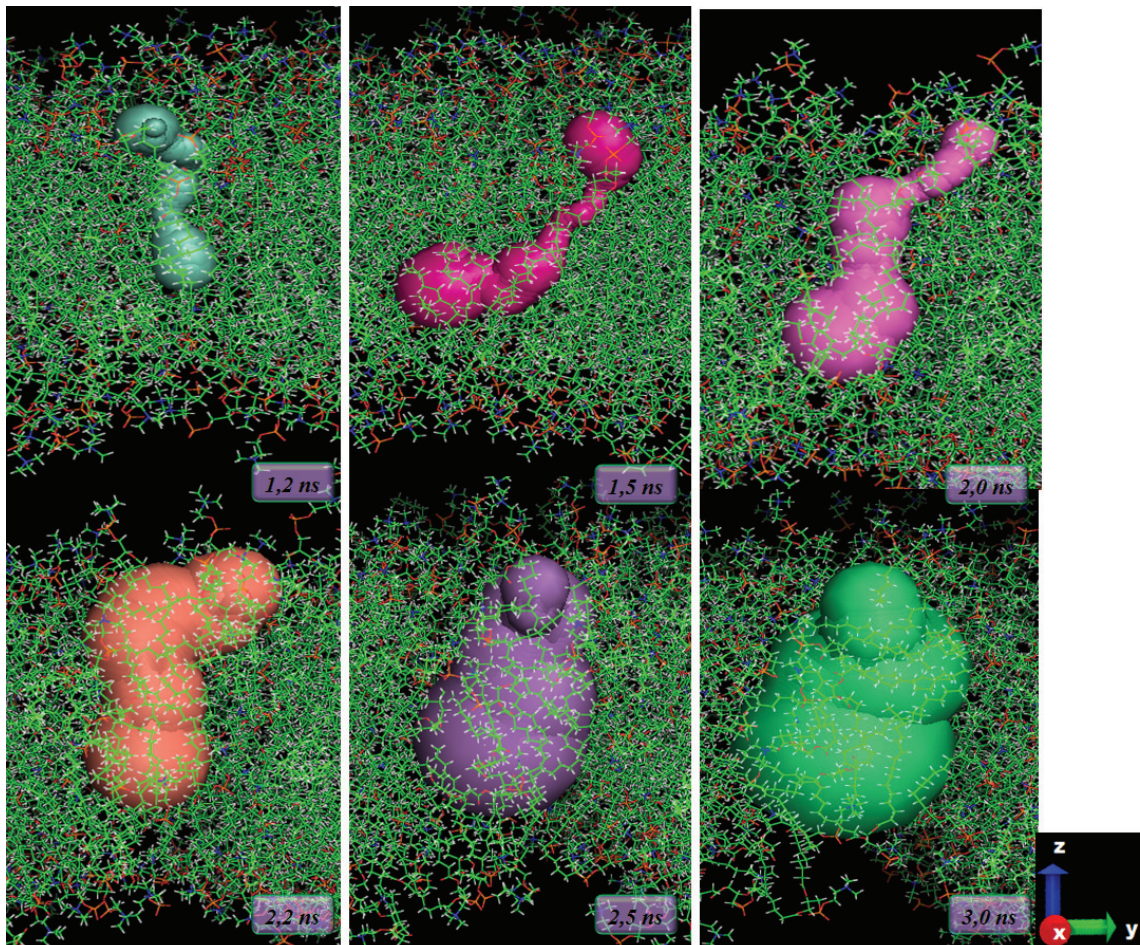
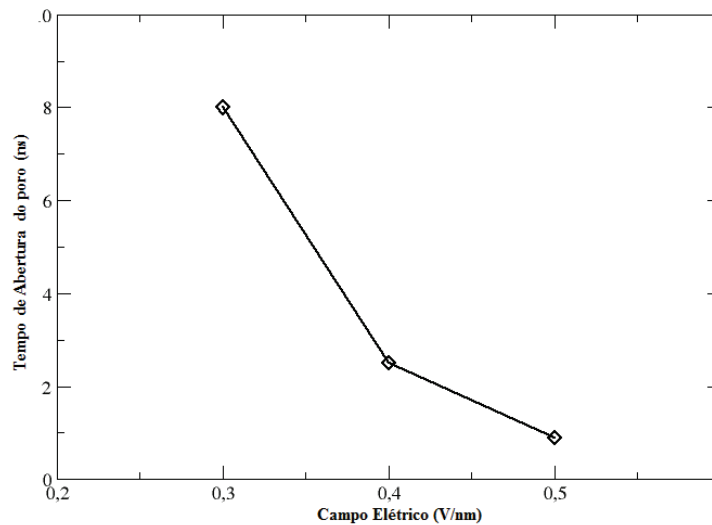


Figura 3.5 – Evolução do poro, de acordo com o software CAVER para temperatura de 318 K (KOZLIKOVA et al., 2007).



Realizamos algumas simulações para campos elétricos inferiores a 0,5 V/nm. Como, por exemplo, para campos da ordem de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 V/nm. Observamos que, devido a menor intensidade do campo, o tempo necessário para formação do primeiro fio de água é maior, o que fica claro na figura 3.6. O campo elétrico foi aplicado por um período de aproximadamente 40 ns e dentro deste intervalo não observamos a formação de poros para os campo elétricos abaixo de 0,3 V/nm o que está de acordo com os resultados encontrados por Majhi e colaboradores (MAJHI et al., 2015).

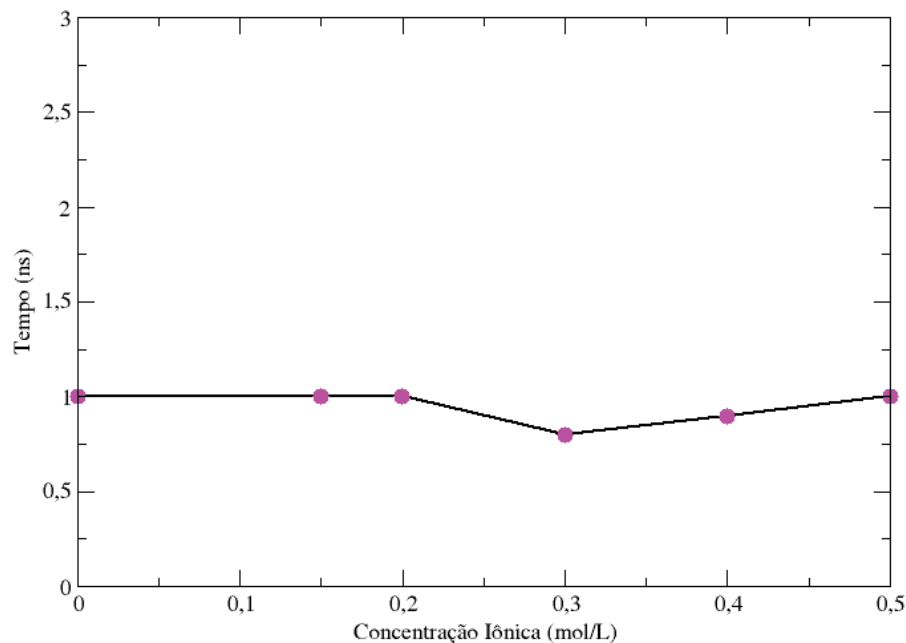
Figura 3.6 – Tempo de formação do fio de água em relação a intensidade do campo elétrico.



Observamos que para temperatura de 300 K ocorre a reconstrução da membrana, com fechamento do poro após a interrupção do campo elétrico. Isso se dá aproximadamente 1 ns após a interrupção. Ressaltamos que o processo de fechamento do poro e reconstrução da membrana lipídica ocorre somente para esta temperatura, não sendo observado para temperaturas maiores que 300 K.

Analisamos ainda, a influência da concentração iônica no tempo de formação do fio de água nas bicamadas lipídicas. Neste cálculo variamos a concentração iônica de zero, representando a ausência de íons de Na^+ Cl^- , até 0,5 mol/L. Observamos que a concentração iônica não afeta consideravelmente o processo de eletroporação, o que podemos verificar no gráfico 3.7 logo a seguir.

Figura 3.7 – Tempo para formação do fio de água com diferentes concentrações iônicas.



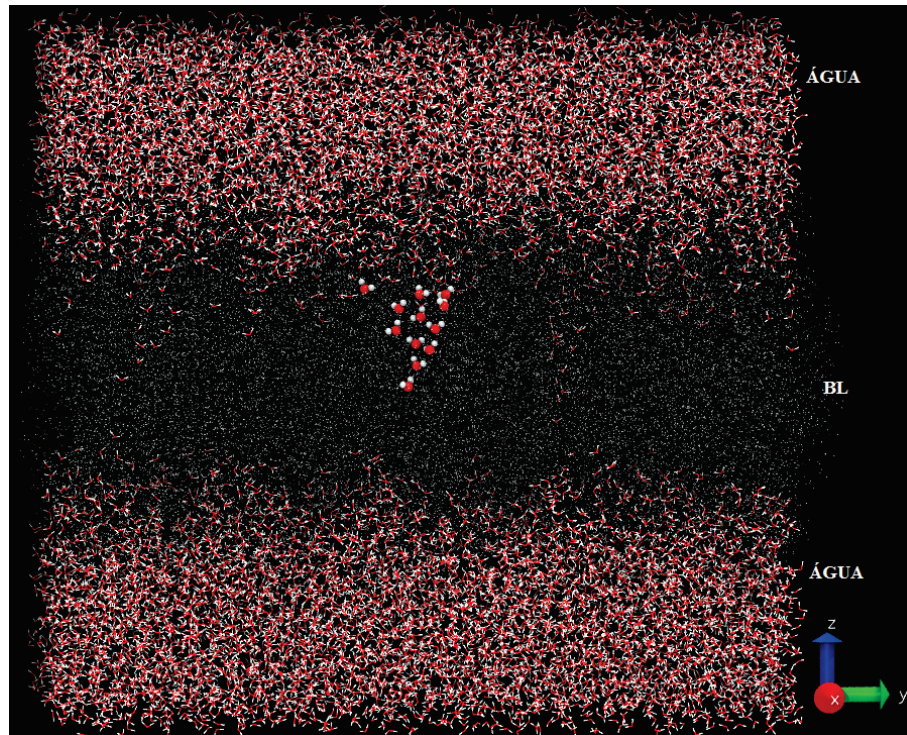
3.3 ANÁLISES COM A BICAMADA LIPÍDICA

Na seção anterior, podemos observar que por meio da aplicação de um campo elétrico, é possível abrir poros nas membranas lipídica e que este procedimento tem inúmeras aplicações, já relatadas anteriormente. Porém, algumas dúvidas sobre sua formação ainda são pertinentes e ainda são tema de diversos estudos (DELEMOTTE; TAREK, 2012; POLAK et al., 2014; TOKMAN et al., 2013; CHEN et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2012; VERNIER; LEVINE; M., 2013; BOCKMANN et al., 2008; TOKMAN et al., 2013). O processo em si ainda não é bem descrito. Ainda resta responder algumas questões: Como forma-se o fio de água? Como a água, um composto polar, consegue romper a camada apolar da membrana? Ocorreriam dobras e ou quebras das cabeças fosfolípídicas que compõem a membrana (CHEN et al., 2006; BOCKMANN et al., 2008)? Ou seria a água que se reorganiza e acaba forçando a abertura da membrana (POLAK et al., 2014; DELEMOTTE; TAREK, 2012; VERNIER; LEVINE; M., 2013; TOKMAN et al., 2013)? Buscando responder essas e outras dúvidas sobre a formação de poros em membranas lipídicas a partir da aplicação de um campo elétrico, algumas análises foram realizadas. Uma delas foi verificar como se inicia o processo de formação do fio de água e como a estrutura da água é afetada no interior da bicamada lipídica. Para isso utilizamos as mesmas configurações anteriores.

A membrana foi termalizada por aproximadamente 10 ns após aplicamos um campo elétrico de 0,5 V/nm. A temperatura de 300 K foi mantida fixa durante todas as simulações.

Através desses cálculos, observamos que, no início da formação dos poros as moléculas de água se arranjam no formato de um cone formado por moléculas de água (BOCKMANN et al., 2008), como pode ser visto na figura 3.8. Na figura a membrana está representada por pequenos pontos para melhor visualização das moléculas de água. O cone formado pelas moléculas de água está destacado das demais moléculas dos reservatórios de água. Esta estrutura recebe o nome de cone de *Okuno-Tanioka* (*O.T.*) (OKUNO et al., 2009).

Figura 3.8 – Formação do Cone de *O.T.* no interior da membrana lipídica. Pequenos pontos representam a membrana. O cone formado por moléculas de água está destacado das demais moléculas dos reservatórios.

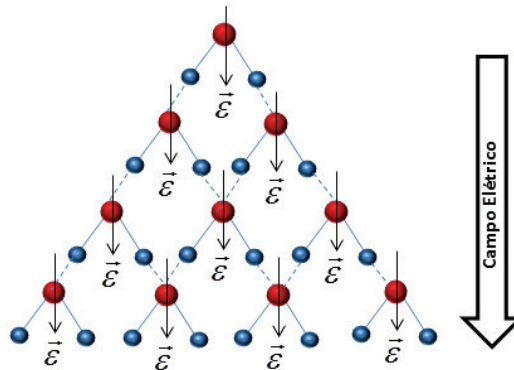


Segundo os autores, a aplicação perpendicular do campo elétrico, faz com que a interação entre as moléculas de água se reduza no *bulk* em razão de um alinhamento dos dipólos da água, ocasionando um aumento na energia potencial total. O que resulta na formação de uma estrutura em forma de cone, figura 3.9. Esse alinhamento maximiza o número de ligações de hidrogênio entre as moléculas. Retornaremos esta discussão com mais detalhes na seção 3.5.

No entanto, quando as moléculas de água penetram a bicamada o cone se desfaz reordenando-se na forma do fio de água que atravessa a mesma. O número

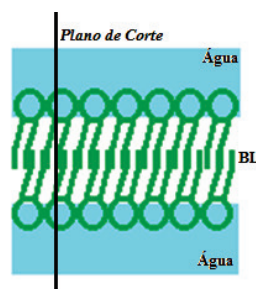
de ligações nas moléculas que formam o fio de água se reduz para 0,5. Este é um comportamento típico da água quando confinada, observado em estudos anteriores (DA SILVA, 2014).

Figura 3.9 – Esquema da formação de cones - rede de ligações de hidrogênio.



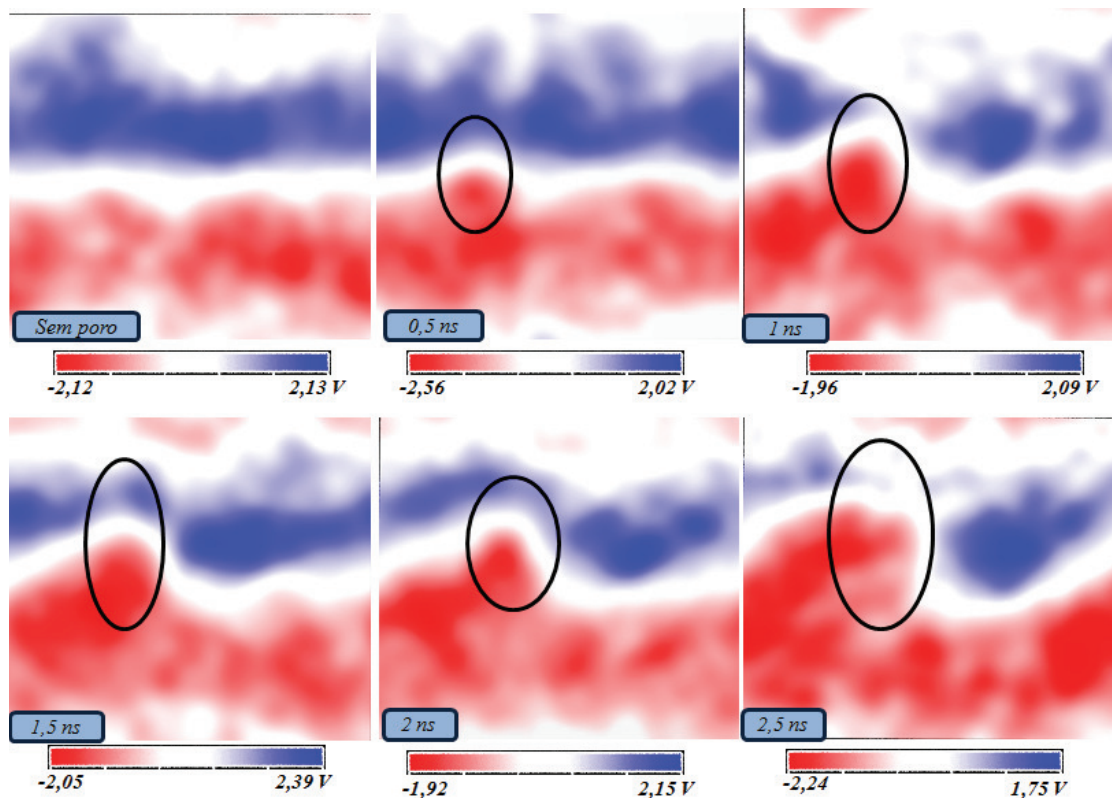
Passemos agora à análise dos perfis do potencial eletrostático desde o início da formação dos cones. Para isso, foi utilizada uma ferramenta disponível no programa VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), chamada *PME Electrostatic*. Os mapas utilizam uma escala de cores onde o vermelho representa regiões onde o potencial é negativo e o azul regiões de potencial positivo. Os mapas foram construídos perpendicularmente ao eixo x, como mostra a figura 3.10, que representa o plano de corte escolhido para construção dos mapas.

Figura 3.10 – Representação esquemática da bicamada lipídica (BL) e plano de corte utilizado para os mapas de Potencial Eletrostático.



Os mapas a seguir, figura 3.11, mostram a evolução do fio de água a cada instante de tempo. As áreas que estão demarcadas com um círculo correspondem as regiões onde ocorreu formação do fio de água. Por meio destes, observamos que na região onde ocorre a formação do cone de *O.T.*, em aproximadamente 0,5 ns, ocorre uma descontinuidade no potencial eletrostático, que amplia-se com o decorrer do tempo.

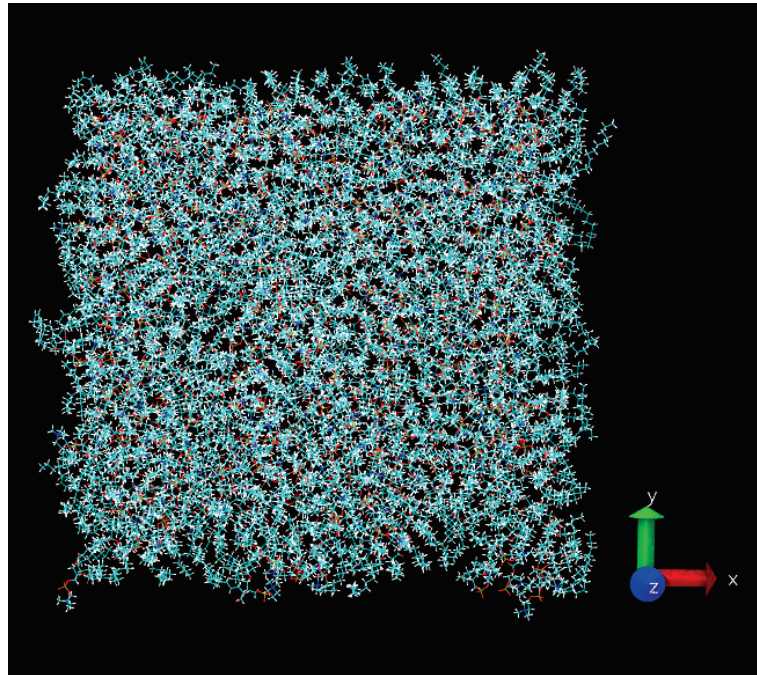
Figura 3.11 – Evolução do potencial eletrostático da bicamada lipídica.



Portanto, fica evidenciado o papel da água na formação dos poros. O fato é a presença dos cones de *O.T.* o fator principal para a formação destes poros, devido a grande repulsão criada por estes nas caudas apolares da membrana. Para investigar essa afirmação aplicou-se por 17 ns o campo elétrico de intensidade 0,5 V/nm na membrana lipídica na ausência das moléculas de água.

Verificamos que não houve abertura de canais na membrana mesmo após 17 ns de aplicação de um campo de 0,5 V/nm, como podemos ver na figura 3.12.

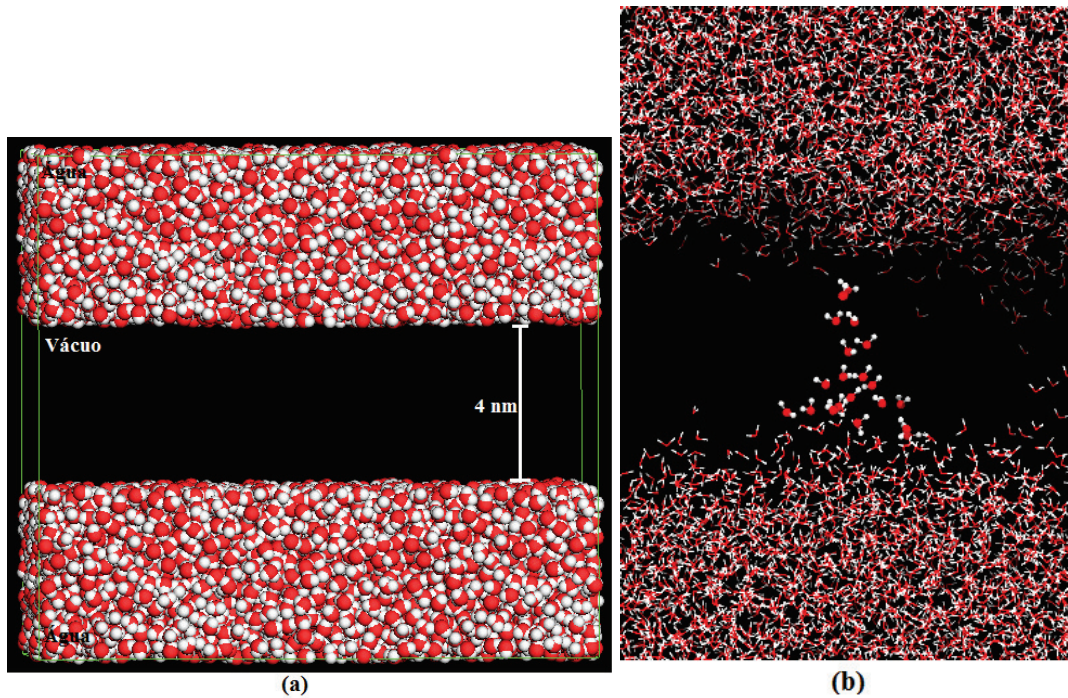
Figura 3.12 – Aplicação do campo elétrico perpendicular a membrana lipídica na ausência das moléculas de água, após 3,5 ns.



3.4 ÁGUA *BULK* SOB AÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO

Considerando que até o momento percebemos que a ação da água sobre a membrana é um fator fundamental no processo de eletroporação, apresentamos nesta seção o estudo da ação do campo elétrico sobre a água *bulk* em condições semelhantes às descritas anteriormente. Para tanto, utilizamos dois reservatórios de água separados por 4nm de vácuo. Esta separação corresponde aproximadamente a espessura de uma bicamada lipídica, figura 3.13. Esta configuração foi termalizada por 10 ns e o sistema manteve-se estável durante todo processo. Após a termalização foi aplicado um campo elétrico de intensidade 0,2 V/nm.

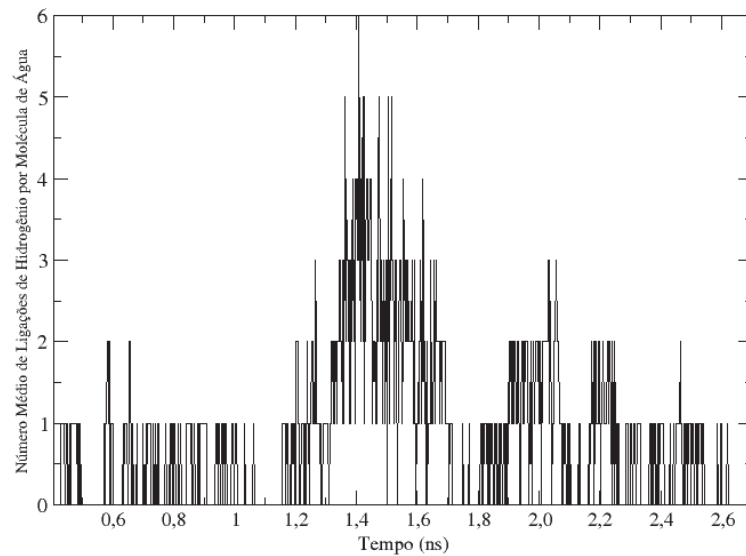
Figura 3.13 – (a)- Célula unitária com reservatórios de água separados por vácuo; (b)-Formação do Cone de O.T. nos reservatórios de água após 1,2 ns.



Observa-se neste caso que a sequência do processo é semelhante no observado na simulação com a membrana entre os reservatórios, isto é, após a aplicação do campo elétrico tem-se a formação do cone e, em seguida, do fio de água, conectando os dois reservatórios. A figura 3.13(b) mostra o sistema após a formação do cone de *O.T.*

O gráfico da figura 3.14, mostra a evolução do número de ligações de hidrogênio no tempo. Para sua construção foram selecionadas somente as moléculas de água que participam da formação do cone.

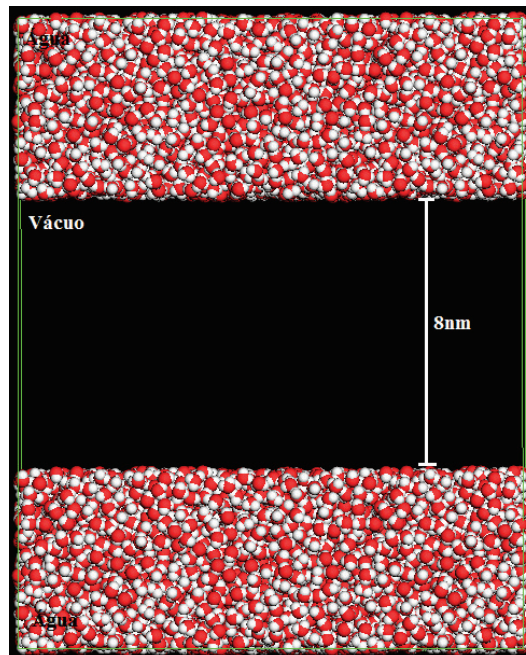
Figura 3.14 – Número Médio de Ligações de Hidrogênio por molécula de água em função do tempo.



Por meio da figura 3.14, percebemos um aumento significativo no número de ligações de hidrogênio no intervalo de tempo de 1,2 até 1,6 ns, intervalo este onde forma-se o cone de *O.T.* Esse aumento é devido ao alinhamento sofrido pelas moléculas de água em resposta ao campo elétrico aplicado. Ao se alinharem as moléculas de água se arranjam da maneira, como mostrada na figura 3.9, configuração na qual é possível formar o número máximo de ligações. Utilizamos como definição de ligação de hidrogênio o critério geométrico, isto é, uma ligação de hidrogênio passa a existir se a distância O - H é inferior a 3,5 e o ângulo entre os átomos de O e H é inferior a -30° .

As análises da influência da temperatura e da concentração iônica, também foram realizadas para os reservatórios de água. Realizamos diversas simulações com temperaturas entre 300 a 340 K e concentrações iônicas de $Na^+ Cl^-$ de 0,1 a 0,5 mol/L, mantendo fixo o campo elétrico de 0,2 V/nm. Porém aqui, utilizamos reservatórios maiores com 14000 moléculas de água e também aumentamos a distância entre os reservatórios passou a ser 8 nm (figura 3.15).

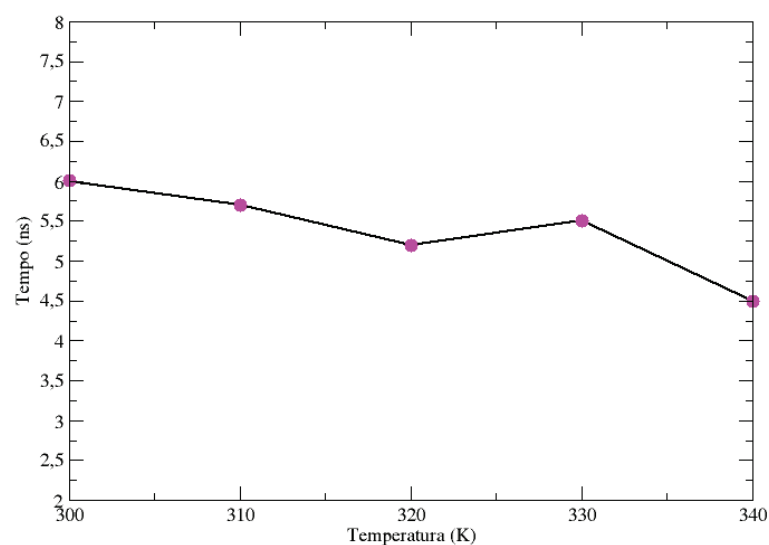
Figura 3.15 – Número Médio de Ligações de Hidrogênio por molécula de água em função do tempo.



O aumento da distância entre os reservatórios deve-se ao fato do curto intervalo de tempo para que ocorra a formação do primeiro fio de água utilizando 4 nm.

O gráfico 3.16 a seguir, exibe a influência da temperatura no tempo de abertura do primeiro fio de água.

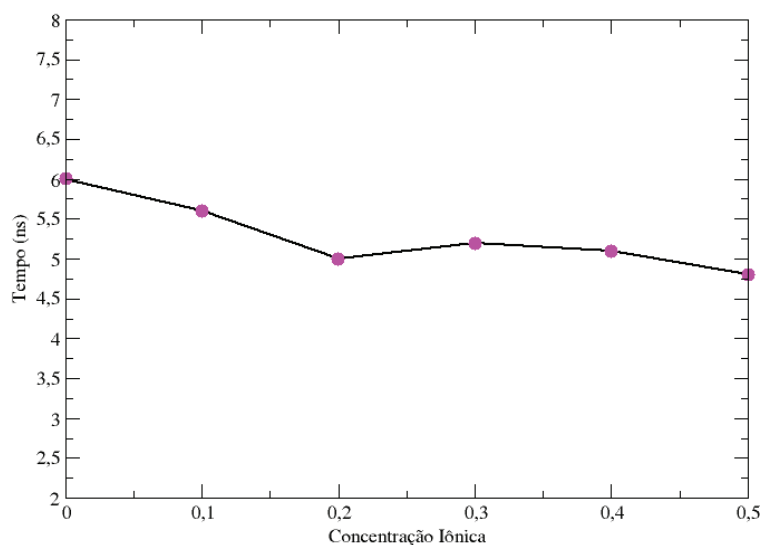
Figura 3.16 – Tempo de abertura do fio de água de acordo com a temperatura.



Diferente das bicamadas lipídicas o efeito do incremento da temperatura sobre o tempo de formação do fio de água é menos significativo. O mesmo ocorre com a

concentração iônica. O gráfico 3.17, mostra a influência da concentração iônica no tempo de abertura do fio de água para os reservatórios separados por vácuo, onde o 0 representa ausência de íons. A presença de íons nos reservatórios não afeta consideravelmente o tempo de formação do fio de água. O tempo para abertura do fio que era de aproximadamente 6,0 ns passa a ser de 5,0 ns com uma pequena redução de aproximadamente 1 ns para a concentração de 0,5 mol/L.

Figura 3.17 – Tempo de abertura do fio de água de acordo com a concentração iônica.

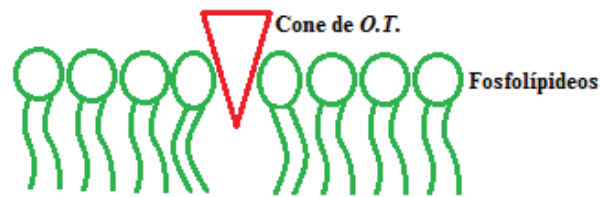


Uma possível explicação é que a presença de íons no reservatório tende a enfraquecer as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Com isso, o reordenamento destas moléculas pela ação do campo elétrico, que culmina na formação do cone *O.T.*, fica facilitada.

3.5 DISCUSSÕES E RESULTADOS PARCIAIS

Observamos, que a presença da água é um fator determinante para formação de poros nas bicamadas lipídicas. Vimos que devido a aplicação de um campo elétrico externo, as moléculas de água se reestruturam no formato de um cone. Devido a essa configuração de “lança” a ação mecânica dessas moléculas conseguem romper a bicamada lipídica, como está demonstrado na representação da figura 3.18 a seguir.

Figura 3.18 – Representação da ação mecânica da moléculas de água.



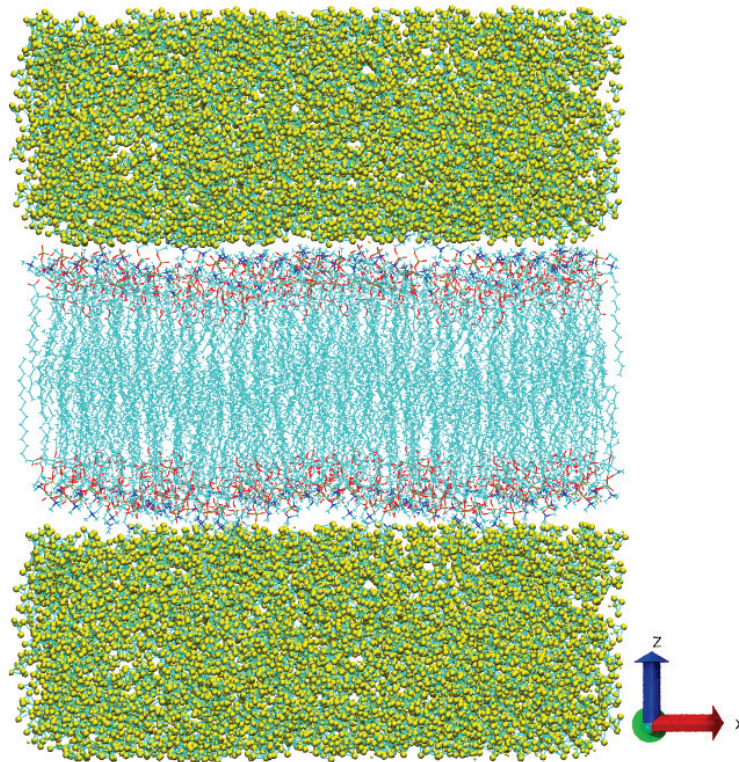
Esse comportamento da água devido a aplicação de um campo elétrico externo, torna as interações entre as moléculas de água muito mais fortes, apresentado características de ligações covalentes (BAI et al., 2015). No trabalho realizado por Bai e colaboradores (BAI et al., 2015), ele descreve essas estruturas como formas anômalas da água, denominadas por ele de “*Water Whiskers*”, que seriam pequenos fios de água mantidos por ligações do tipo covalentes. Nas estruturas compactas formadas após aplicação de campo elétricos muito intensos, as ligações de hidrogênio encurtam 25 %, o que aumenta em 9 vezes a interação entre as moléculas de água e consequentemente, a energia dessa ligação é fortalecida 5 vezes em relação a uma interação normal de um *cluster* de água.

Como já descrito anteriormente a membrana possui certa dificuldade em absorver moléculas polares, e por essa razão que o processo de eletroporação é muito viável no auxílio do transporte desse tipo de molécula para o interior da membrana. Até o momento já discutimos todo o processo e quais fatores afetam a eletroporação da água. Mas o que ocorre com a membrana quando em contato com um solvente apolar? Com o intuito de demonstrar a dinâmica das membranas lipídica em contato com um solvente apolar, foram feitos cálculos utilizando a mesma bicamada lipídica POPC em contato com o clorofórmio.

O clorofórmio foi escolhido por ser uma molécula pequena e apolar. É um composto orgânico que possui efeitos muito particulares na matéria viva como anestésico (REIGADA, 2011).

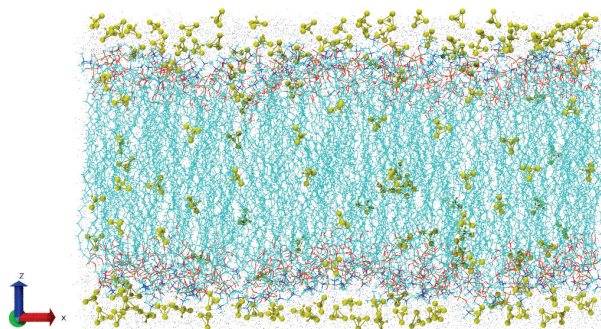
Na figura 3.19, podemos visualizar a membrana juntamente com dois reservatórios de clorofórmio (moléculas amarelas). Cada reservatório contém 2500 moléculas de clorofórmio, e a membrana utilizada possui o mesmo número de moléculas fosfolipídicas que a utilizada nos cálculos anteriores, 137 fosfolípidios POPC em cada camada.

Figura 3.19 – Membrana Lipídica com solvente apolar -clorofórmio;



A estrutura foi termalizada por 5 ns, e nesse intervalo de tempo, observamos a entrada de várias moléculas de clorofórmio para o interior da membrana. Na figura 3.20, destacamos algumas moléculas de clorofórmio (em amarelo) para melhor visualização destas no interior da membrana. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Reigada (REIGADA, 2011). Segundo ele, a presença do clorofórmio causa folgas na bicamadas, alterando assim a organização dos fosfolípidos. Este mecanismo de fácil acesso a membrana é mediado pelos fosfolípidos sendo responsável pelo efeito anestésico de clorofórmio e de outros compostos voláteis anestésicos de estrutura pequena (TURKYILMAZ et al., 2009).

Figura 3.20 – Membrana Lipídica após a termalização; moléculas de clorofórmio (na cor amarela) presentes no interior da bicamada lipídica;



Também foram realizados cálculos somente com dois reservatórios contendo moléculas de clorofórmio, esta configuração foi termalizada por 5 ns e após foi aplicado campo elétrico de 0,2 V/nm. Não observamos a formação de cones de *O.T.* para estas estruturas.

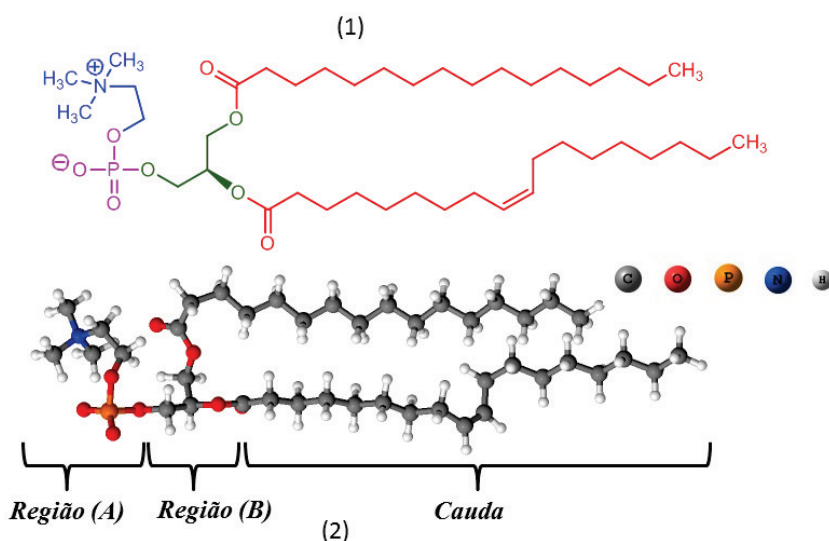
4 RESULTADOS II- CÁLCULOS *AB INITIO*

A etapa seguinte consiste em cálculos *ab initio* utilizando como ponto de partida fosfolípidos da membrana previamente termalizados em simulações de dinâmica molecular.

4.1 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E ESTRUTURAIS DO FOSFOLÍPIDIO ISOLADO

Os cálculos inicialmente foram realizados utilizando apenas um fosfolípido isolado, a célula unitária consiste em um fosfolípido, cuja estrutura é mostrada na figura 4.1 (2). Para facilitar as análises que serão realizadas ao longo desse capítulo optamos por considerar a estrutura em regiões distintas, a saber: Região (A), Região (B) e Cauda, conforme mostrados na figura 4.1 (2). A região (A) é onde se encontra o grupamento fosfato e colina e na região (B) temos o grupo glicerol juntamente com ambas carboxilas pertencentes a cauda do fosfolípido, conforme indicado na figura 4.1 (2).

Figura 4.1 – 1-Estrutura química do fosfolípido; 2- Estrutura otimizada do fosfolípido com as divisões utilizadas para as análises.



As distâncias interatômicas do fosfolípido POPC e também o valor experimental determinados por difração de raios-X (ELDER et al., 1977) estão listadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Distâncias de Ligação do fosfolipídio POPC valores experimentais conforme (ELDER et al., 1977).

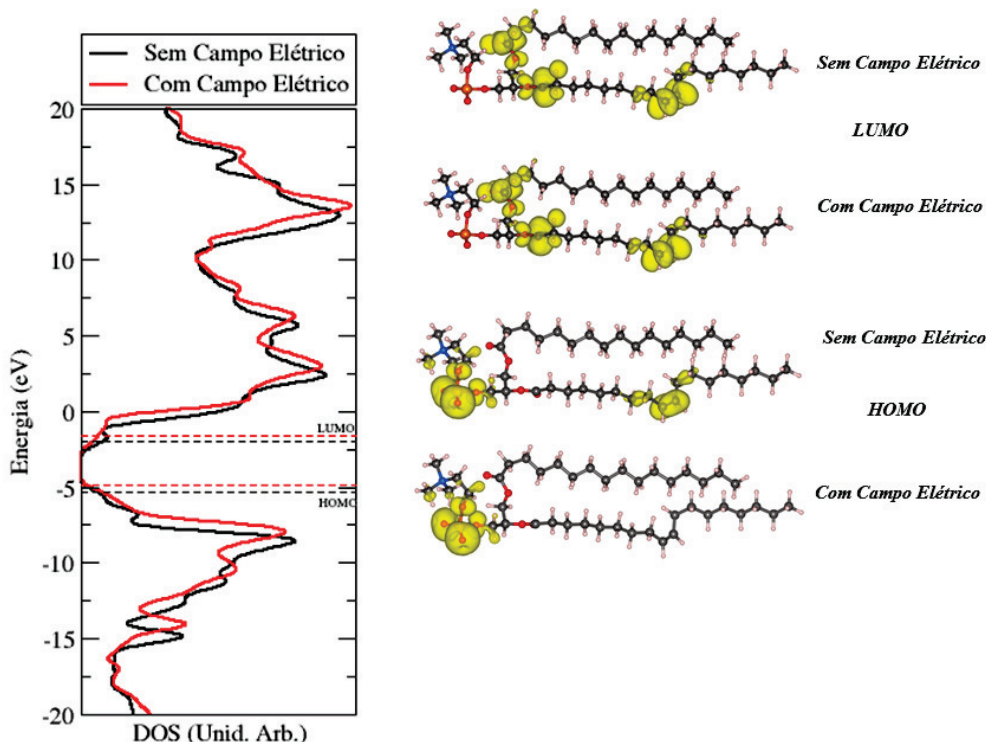
Distância de Ligação	POPC (Å)	Valor Experimental (Å)	Erro %
C-N	1,50	1,51 ($\pm 0,02$)	0,6
C-C	1,52	1,50 ($\pm 0,04$)	1,3
C-O	1,43	1,48 ($\pm 0,04$)	3,4
P-O	1,51	1,47 ($\pm 0,02$)	3,4
C=O	1,23	1,19 ($\pm 0,04$)	3,3

Os resultados apresentados na Tabela 4.1 demonstram que cálculos empregando a DFT (Teoria do Funcional da Densidade), são eficazes para esse tipo de sistema, pois as diferenças encontradas em relação ao valor experimental estão coerentes em resultados prévios da literatura.

Para compreender o que ocorre com as propriedades eletrônicas do sistema devido a aplicação de um campo elétrico externo, utilizamos um campo elétrico de 0,5 V/nm perpendicular ao eixo x, que foi aplicado em diferentes configurações das moléculas fosfolipídicas. Inicialmente apresentaremos os resultados da aplicação do campo elétrico em uma molécula isolada.

Na figura 4.2 podemos observar a densidade de estados total (DOS) onde pode-se avaliar a contribuição dos orbitais HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) e seus respectivos plots da densidade de carga eletrônica antes (linha preta) e após aplicação de um campo elétrico (linha vermelha). A diferença de energia entre os estados HOMO-LUMO (ΔHL), sem aplicação do campo elétrico, foi de 3,40 eV.

Figura 4.2 – Densidade de estados total (DOS) e plots da densidade de carga eletrônica para os orbitais HOMO e LUMO do fosfolípideo POPC (Isosuperfície $4 \times 10^{-3} e/\text{Å}^3$).

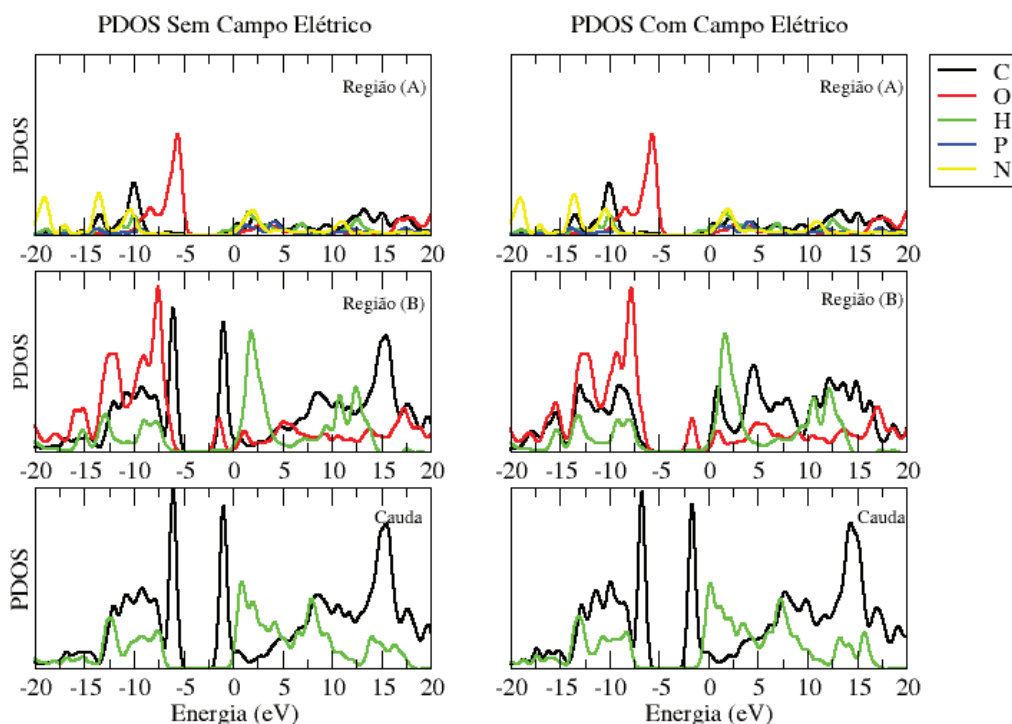


Do ponto de vista da estrutura eletrônica, observa-se que o orbital HOMO está distribuído sobre os grupos fosfato e colina (Região (A)), enquanto o LUMO está mais localizado no grupo glicerol e na carboxila da cauda do fosfolípido (Região (B)). Tanto para o orbital HOMO quanto para o LUMO houve uma pequena concentração de carga na região da cauda do fosfolípido na região onde forma-se a ligação dupla C=C.

Após a aplicação do campo elétrico no fosfolípido observamos uma redução na diferença HOMO-LUMO de aproximadamente 0,15 eV. Através dos plots de densidade de carga, pode-se perceber que devido ao campo elétrico o orbital HOMO fica distribuído somente nos grupos fosfato e colina da cabeça do fosfolípido, e para o orbital LUMO a mudança na distribuição de cargas é pouco significativa em comparação ao anterior.

Na figura 4.3 mostramos a densidade de estados projetada (PDOS) para cada um dos átomos que constituem os grupamentos que colaboram para formação dos orbitais HOMO e LUMO. Para isso utilizaremos as regiões especificadas na figura 4.1. Nos gráficos da esquerda estão dispostas as PDOS antes aplicação do campo elétrico e nos gráficos da direita as PDOS após aplicação do campo elétrico.

Figura 4.3 – Densidade de estados projetada (PDOS) dos fosfolipídios antes e após aplicação do campo elétrico.



Por meio da figura 4.3, vemos que o oxigênio da região (A) do fosfolipídio apresenta a maior contribuição para o orbital HOMO e que a ação do campo elétrico nesta região não afetou de maneira significativa as contribuições dos átomos para esse orbital. Já na região (B) do fosfolipídio, carbono e oxigênio apresentaram os níveis mais acentuados correspondente ao orbitais HOMO e para o orbital LUMO carbono e hidrogênio. Nesta região, devido a aplicação do campo elétrico, o hidrogênio passa a ter uma maior contribuição no nível LUMO. As contribuições dos átomos que formam o nível HOMO não são afetadas pelo campo elétrico. Na região da cauda o carbono possui uma maior contribuição para ambos os níveis a a ação do campo elétrico não ocasionou mudanças significativas.

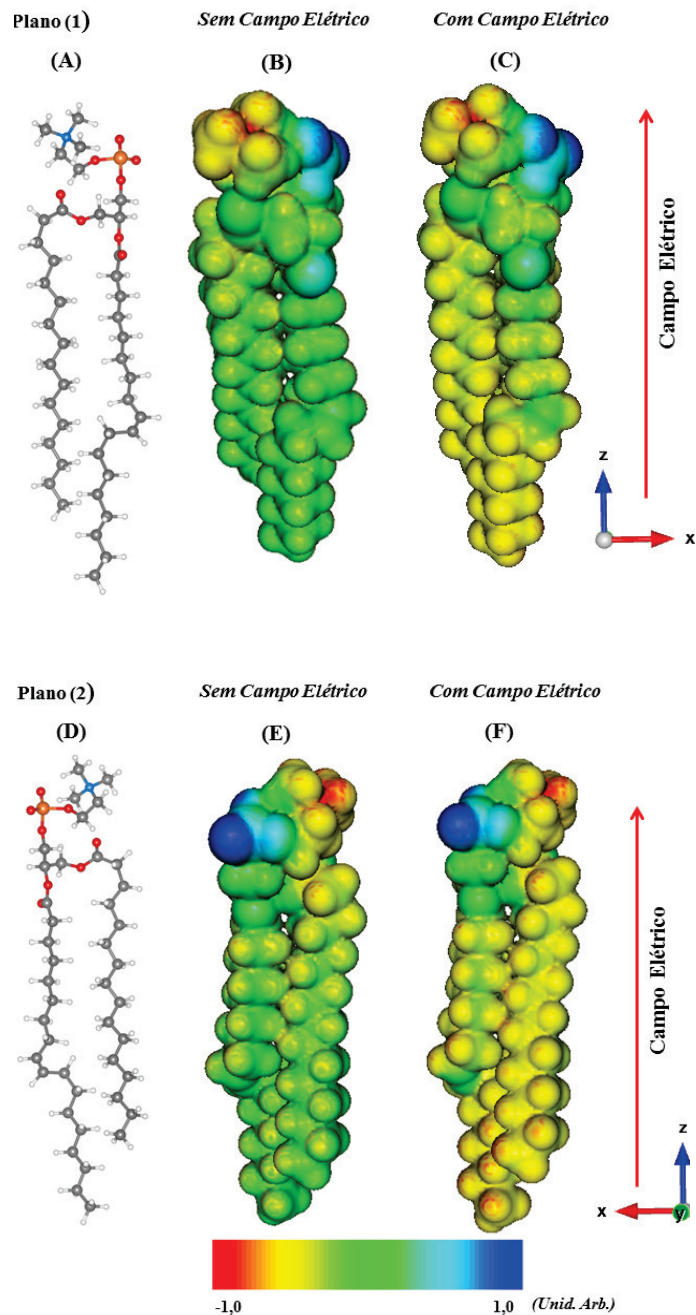
De maneira geral as análises realizadas utilizando as PDOS confirmam que não há um grande deslocamento dos níveis após a aplicação do campo elétrico, o que reflete diretamente ΔHL que não possui uma grande redução.

Em seguida, abordamos a relação entre a estrutura e suas propriedades elétricas. Calculamos as propriedades elétricas da estrutura do fosfolipídio POPC em sua configuração de mínima energia antes e após a aplicação do campo elétrico externo - figura 4.4. Para isso utilizamos mapas de potencial eletrostático, que exibem o valor

do potencial eletrostático nas diferentes regiões do fosfolipídio.

Utilizamos cortes no plano zx , consideraremos plano (1) o corte realizado para y negativo com o grupamento colina do fosfolipídio a esquerda e plano (2) o corte realizado para y positivo com grupamento colina a direita. Em (A) e (D) temos a estrutura do fosfolipídeo em (B) e (E) o mapa do potencial eletrostático antes da aplicação do campo elétrico e em (C) e (F) após a aplicação do campo elétrico.

Figura 4.4 – Mapas do potencial eletrostático do fosfolipídio isolado antes e após aplicação do campo elétrico.



Analisando os mapas do potencial eletrostático da figura 4.4 observamos duas

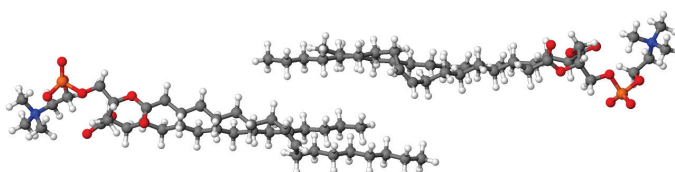
regiões com cargas distintas na cabeça do fosfolipídio. A região vermelha (negativa) deve-se ao grupamento glicerol e a região (azul) positiva é devido ao grupamento fosfato. A ação do campo elétrico nesta região da molécula fosfolipídica não causou nenhum efeito nas propriedades elétricas. Notamos, entretanto, uma mudança no perfil do potencial nas regiões (B) e cauda, com uma tendência de redução no potencial eletrostático em ambos.

4.2 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E ESTRUTURAIS DE MOLÉCULAS FOSFOLIPÍDICAS NA CONFIGURAÇÃO DE BICAMADA

Após o estudo das propriedades eletrônicas da molécula fosfolipídica isolada, utilizamos dois fosfolipídios voltados um para o outro, dessa maneira conseguiremos reproduzir a configuração destes em uma bicamada lipídica.

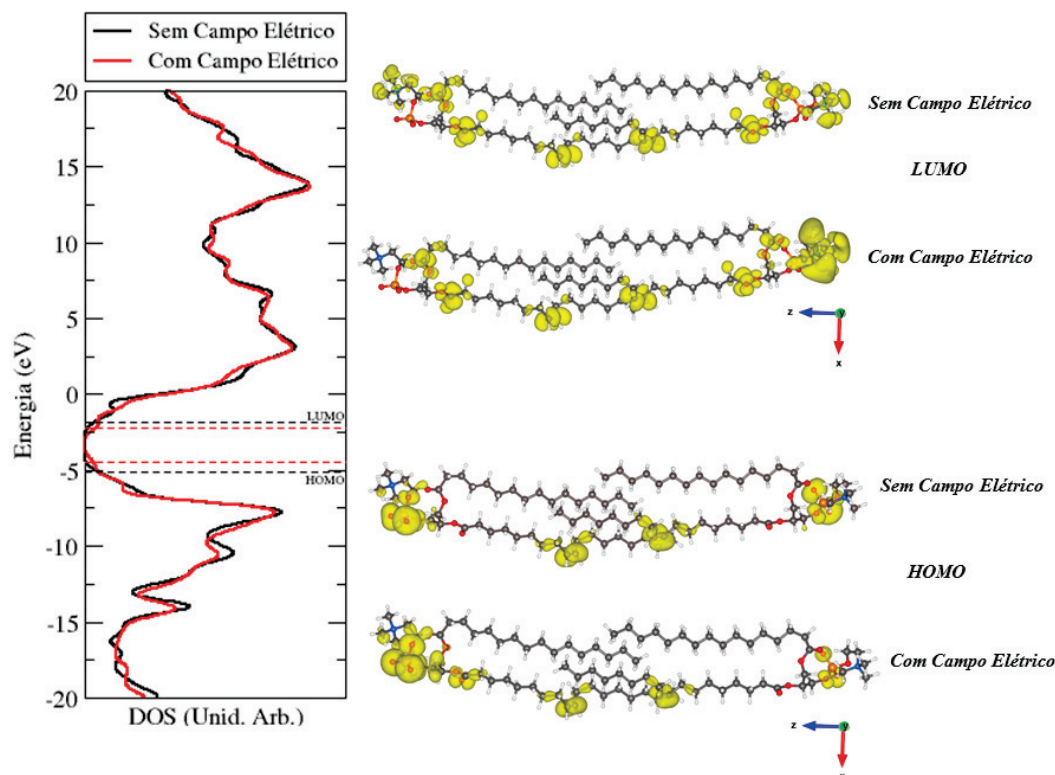
A figura 4.5 apresenta a estrutura otimizada dos fosfolipídios que foi utilizada como base para realização dos cálculos posteriores.

Figura 4.5 – Estrutura otimizada dos fosfolipídios na configuração bicamada.



Para essa configuração, foram realizadas as mesmas análises anteriores. Inicialmente avaliamos a densidade de estados total (DOS) e também os plots da densidade de carga dos orbitais HOMO e LUMO, eletrônica antes (linha preta) e após a aplicação do campo elétrico externo (linha vermelha). Os resultados podem ser visualizados na figura 4.6.

Figura 4.6 – Densidade de estados total (DOS) e plots da densidade de carga eletrônica para os orbitais HOMO e LUMO para os fosfolipídios POPC na configuração bicamada antes e após aplicação do campo elétrico. (Isosuperfície $4 \times 10^{-3} \text{ e}/\text{\AA}^3$);



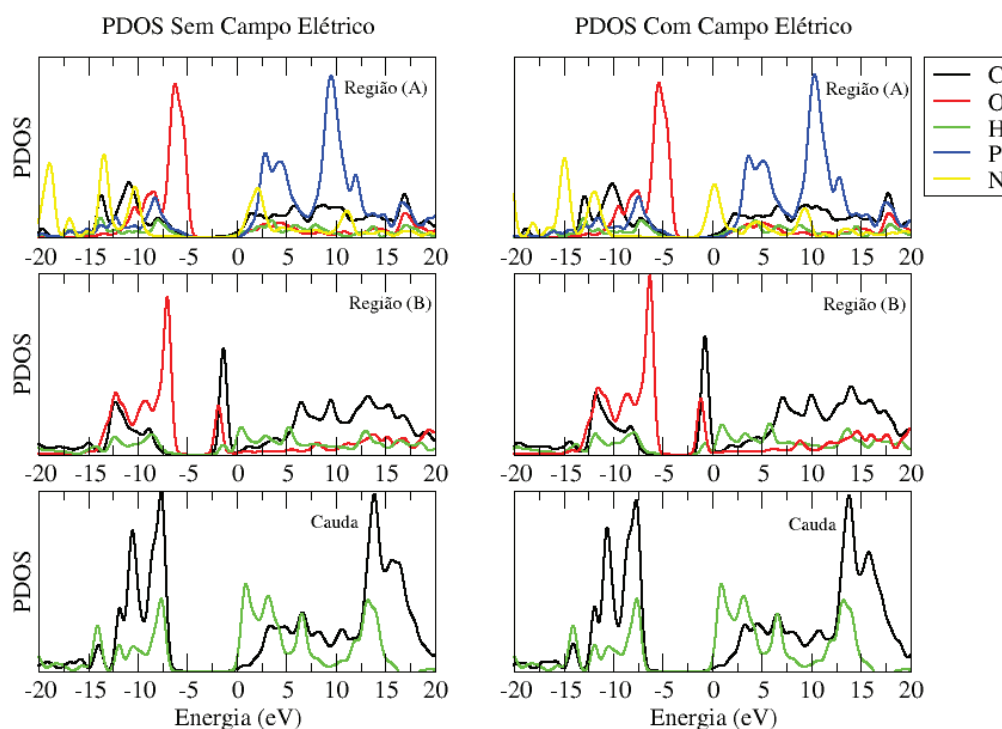
Pode-se observar, através dos plots de densidade de carga eletrônica, da figura 4.6, que os grupos que contribuem para formação do orbital HOMO não se alteram quando comparadas a estrutura do fosfolipídio isolado. Assim, a contribuição para o HOMO permanece distribuído no grupamento colina e fosfato (região (A)) de ambas moléculas. E o mesmo ocorre com orbital LUMO, permanece com uma contribuição grupamento glicerol da cabeça do fosfolipídio e na carboxila da cauda, porém agora também nos carbonos do grupamento colina. Essa mudança é ocasionada devido a presença da outra molécula fosfolipídica. A diferença de energia dos estados HOMO-LUMO (ΔHL) para esta configuração foi de 3,30 eV.

Ainda na figura 4.6, podemos analisar a densidade de estados total juntamente com os plots de densidade de carga dos níveis HOMO e LUMO para esta configuração após aplicação do campo elétrico. Diferente do que foi observado no fosfolipídio isolado o campo elétrico modifica a distribuição dos orbitais HOMO e LUMO quando estes estão na configuração de bicamada. Percebemos que após aplicação do campo elétrico o HOMO passa a ter uma maior concentração de carga no grupo fosfato de apenas uma das moléculas. O mesmo ocorre para o orbital LUMO que passa ter

uma maior concentração de carga no grupamento colina de apenas um dos fosfolipídios. Isso ocorre devido a pequenas alterações estruturais no conjunto de moléculas fosfolipídicas, juntamente com o aumento da interação entre as moléculas devido a presença do campo elétrico. Além disso, a aplicação de um campo elétrico ocasiona uma separação de cargas, afetando o momento de dipólo da molécula.

Para melhor avaliar a contribuição de cada átomo na formação dos orbitais HOMO e LUMO, foram calculadas as densidades de estados projetadas. Na figura 4.7 podemos analisar as densidades de estado projetadas, antes e após aplicação do campo elétrico, sobre os átomos das regiões já especificadas nos fosfolipídios.

Figura 4.7 – Densidade de estados projetada (PDOS) dos fosfolipídios na configuração de bicamada antes e após aplicação do campo elétrico.



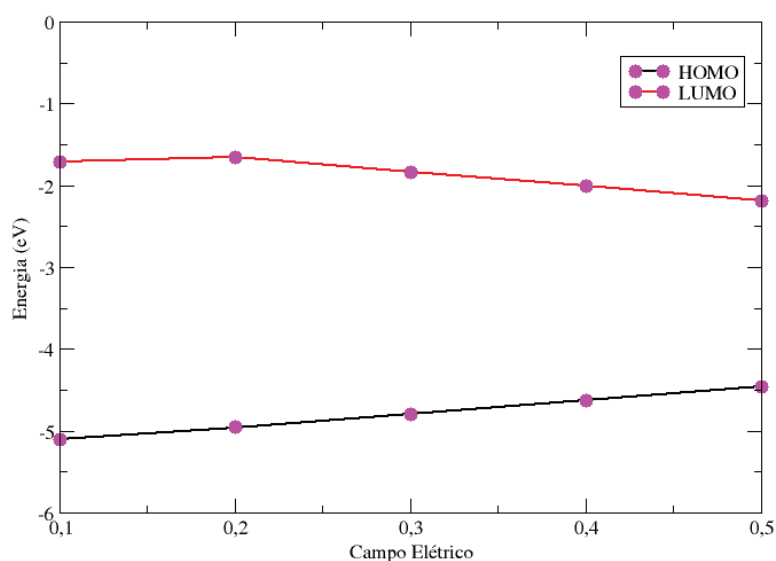
Conforme a PDOS da figura 4.7 percebe-se que para a região (A) temos uma nível mais acentuado para o oxigênio, o que demonstra que este possui uma maior contribuição para o orbital HOMO já o LUMO recebe uma maior colaboração do átomo de fósforo e nitrogênio. A ação do campo elétrico para esta região modifica os valores de energia correspondentes a a ambos os orbitais. Para a região (B) os níveis do oxigênio e o carbono possuem maior contribuição para orbitais HOMO e LUMO, respectivamente. Nesta região, o efeito do campo elétrico é o mesmo observado para

região (A). Por fim, na cauda observamos níveis mais elevados para os átomos de carbono e hidrogênio nas regiões dos orbitais HOMO e LUMO, respectivamente, e o campo elétrico, não possui efeito significativo nestes orbitais.

Ao observar as PDOS para este arranjo fosfolipídico representando a bicamada lipídica, verificamos que o comportamento dos orbitais frente a aplicação do campo elétrico é completamente diferente do fosfolipídio isolado. Principalmente para as PDOS realizadas para as regiões A e B do fosfolipídio, é possível visualizar um fechamento do ΔHL decorrente do deslocamento dos níveis. Na região (A), esse fechamento deve-se ao deslocamento do nível referente ao átomo de nitrogênio, no sentido negativo do eixo das energias, e do oxigênio que desloca-se no sentido positivo deste. Na região (B), ocorre efeito semelhante, porém, com o deslocamentos dos níveis em sentidos opostos ao observado anteriormente. O resultado é uma redução de aproximadamente 1 eV no ΔHL após a aplicação do campo elétrico. Estas alterações são reflexos dos extensos rearranjos dos orbitais atômicos como consequência da ação do campo elétrico.

Em seguida, com o intuito de avaliar a influência do campo elétrico nas propriedades eletrônicas dos fosfolipídios no arranjo de bicamada, diferentes intensidades de campo elétrico foram aplicados. O gráfico 4.8, demonstra a influência do campo elétrico nos níveis de energia dos orbitais HOMO e LUMO.

Figura 4.8 – Influência do campo elétrico nos níveis de energia HOMO e LUMO dos fosfolipídios POPC na configuração bicamada.

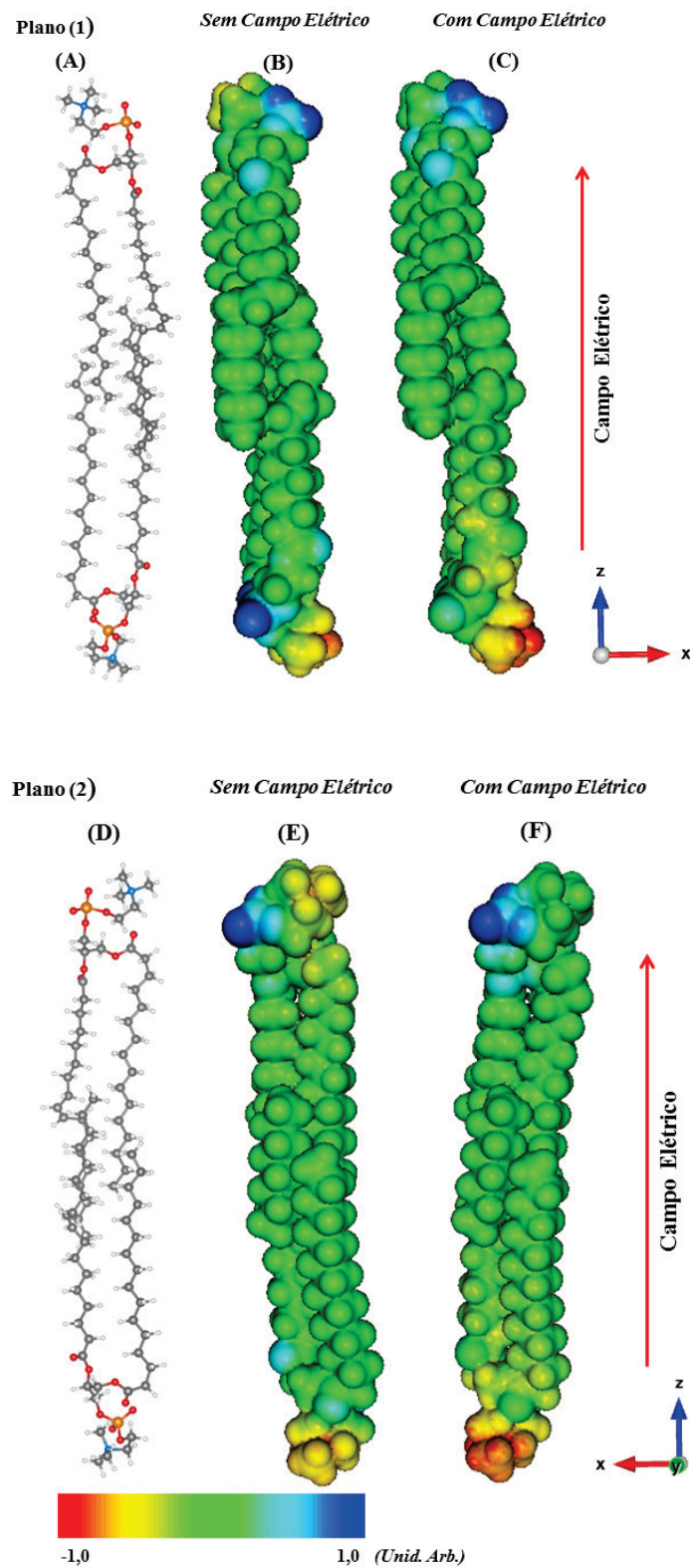


Verificamos que a diferença de energia entre os estados HOMO-LUMO tende

a diminuir com o aumento da intensidade do campo elétrico. Efeito esperado e já discutido no estudo do fosfolípido isolado.

Ainda para esta configuração foram feitas análises do potencial eletrostático. A técnica utilizada foi a mesma que a anterior (fosfolípido isolado), através de mapas do potencial eletrostático. A figura 4.9 ilustra os mapas do potencial eletrostático antes e após aplicação do campo elétrico.

Figura 4.9 – Mapas do potencial eletrostático dos fosfolipídios no arranjo de bicamada antes e após aplicação do campo elétrico.



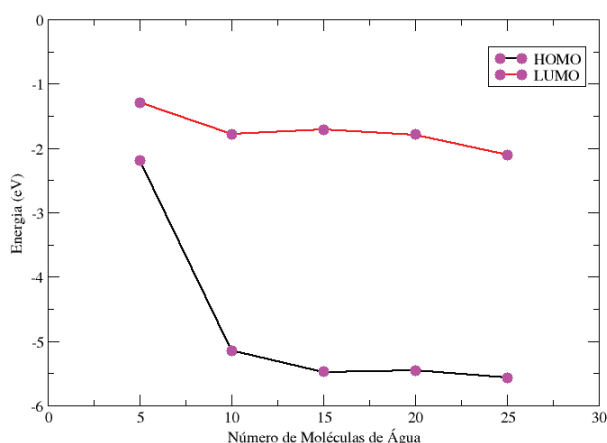
Nos mapas da figura 4.9 é possível visualizar regiões de cargas opostas em ambas cabeças dos fosfolipídios, da mesma forma que havíamos observado para o

fosfolipídio isolado antes da aplicação do campo elétrico. Porém, após aplicação do campo elétrico, quando os fosfolipídios se encontram no arranjo de bicamada, uma cabeça torna-se positiva e a outra negativa indicando uma polarização do sistema.

Até o momento estudamos as propriedades eletrônicas dos fosfolipídios isolados e na configuração de bicamada, porém para compreender o processo de eletroporação, é necessário ir além do efeito do campo elétrico sobre os fosfolipídios. A presença da água, é essencial para abertura de poros na membrana lipídica, devido a este fato, algumas análises dos fosfolipídios hidratados foram realizadas.

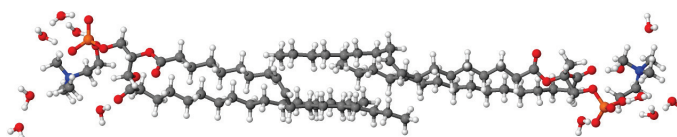
Inicialmente consideramos um sistema composto pelo fosfolipídio e algumas moléculas de água próximas a cabeça do mesmo e verificamos a variação das energias dos orbitais HOMO e LUMO para diferentes concentrações. Estes resultados aparecem na figura 4.10.

Figura 4.10 – Influência do número de moléculas de água nos níveis de energia HOMO e LUMO dos fosfolipídios POPC.



Conforme o gráfico da figura 4.10 a diferença HOMO-LUMO (*gap*) permanece praticamente constante para mais de 10 moléculas de água. Devido a isso, o número de moléculas adotadas nos cálculos que foram realizados posteriormente foi de 6 moléculas por fosfolipídio e 12 moléculas de água por célula unitária, como pode ser visualizado na figura 4.11.

Figura 4.11 – Estrutura otimizada dos fosfolipídios na configuração bicamada na presença das moléculas de água.

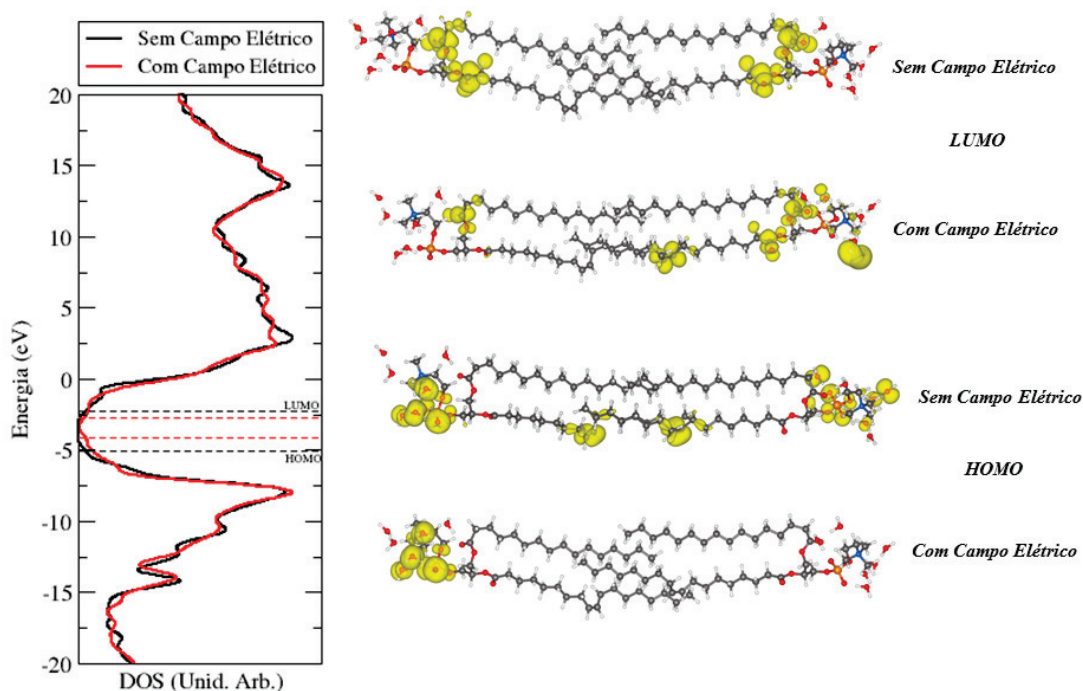


Com o objetivo de avaliar a influência da água e do campo elétrico na forma-

ção as os orbitais moleculares HOMO e LUMO, também foram realizadas análises da densidade total de estados.

Através da figura 4.12, podemos analisar a DOS e os plots de densidade de carga eletrônica dos fosfolipídios na presença da água antes (linha preta) e após a aplicação de um campo elétrico externo (linha vermelha).

Figura 4.12 – Densidade de estados total (DOS) e plots da densidade de carga eletrônica para os orbitais HOMO e LUMO para os fosfolipídios POPC na configuração bicamada hidratada antes e após aplicação do campo elétrico. (Isosuperfície $4 \times 10^{-3} e/\text{\AA}^3$);



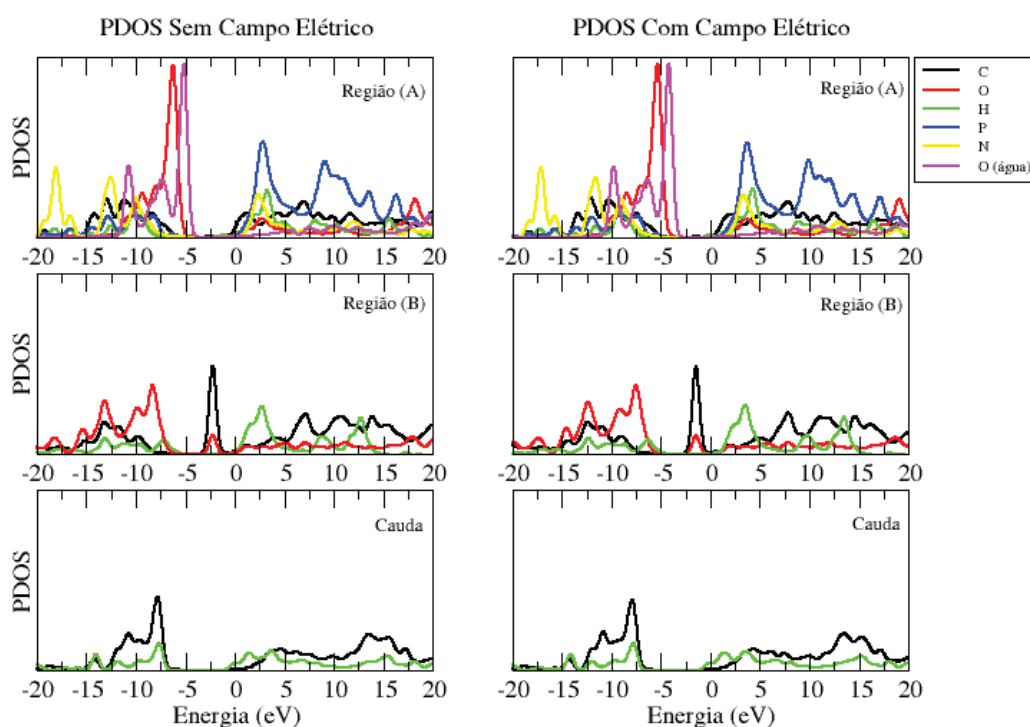
Analisando os resultados da DOS e dos plots da densidade de carga eletrônica, figura 4.12, percebemos que a diferença de energia dos estados HOMO-LUMO (ΔHLL) devido a presença da água teve uma pequena redução, quando comparada a configuração anterior (não hidratada), passando a ser 2,85 eV. O orbital HOMO ficou distribuído na região (A) do fosfolipídio bem como na região onde localiza-se a ligação dupla C=C situada na cauda e também em alguns oxigênios das moléculas de água. O orbital LUMO, por sua vez, ficou localizado somente na região (B) de ambos fosfolipídios.

Em seguida, realizamos a aplicação do campo elétrico, o resultado da DOS e juntamente com os plots da densidade de carga eletrônica também estão dispostos na

figura 4.12. Pela figura, pode-se observar, que a ação do campo elétrico nas estruturas hidratadas ocasionou mudanças tanto na diferença HOMO-LUMO, que apresentou uma redução de 1,45 eV, quanto na distribuição das densidades eletrônicas. Devido a ação do campo elétrico o orbital HOMO agora aparece localizado na região (A) de somente um dos fosfolipídios. Semelhante ao que acontece com o orbital LUMO que passa agora a ter contribuição somente de região (B) de apenas uma das moléculas. Novamente essas redistribuições dos orbitais são ocasionadas a pequenas mudanças estruturais, associadas com a separação de cargas em decorrência do campo elétrico.

Para um melhor entendimento das colaborações dos átomos pertencentes aos grupos dos fosfolipídios na formação dos orbitais, uma análise mais detalhada foi realizada através do estudo da PDOS conforme figura 4.13.

Figura 4.13 – Densidade de estados projetada (PDOS) dos fosfolipídios na configuração de bicamada hidratada antes e após aplicação do campo elétrico.



Verifica-se que na região (A) do fosfolipídio houve mudanças na PDOS somente nos níveis do fósforo e nitrogênio que estão associados ao orbital LUMO. No entanto, o nível do átomo de oxigênio, que possui a maior contribuição para o orbital HOMO, permanece sem grandes alterações. Verificamos ainda, que ação do campo elétrico causa um deslocamento dos níveis, observa-se um avanço considerável nos níveis

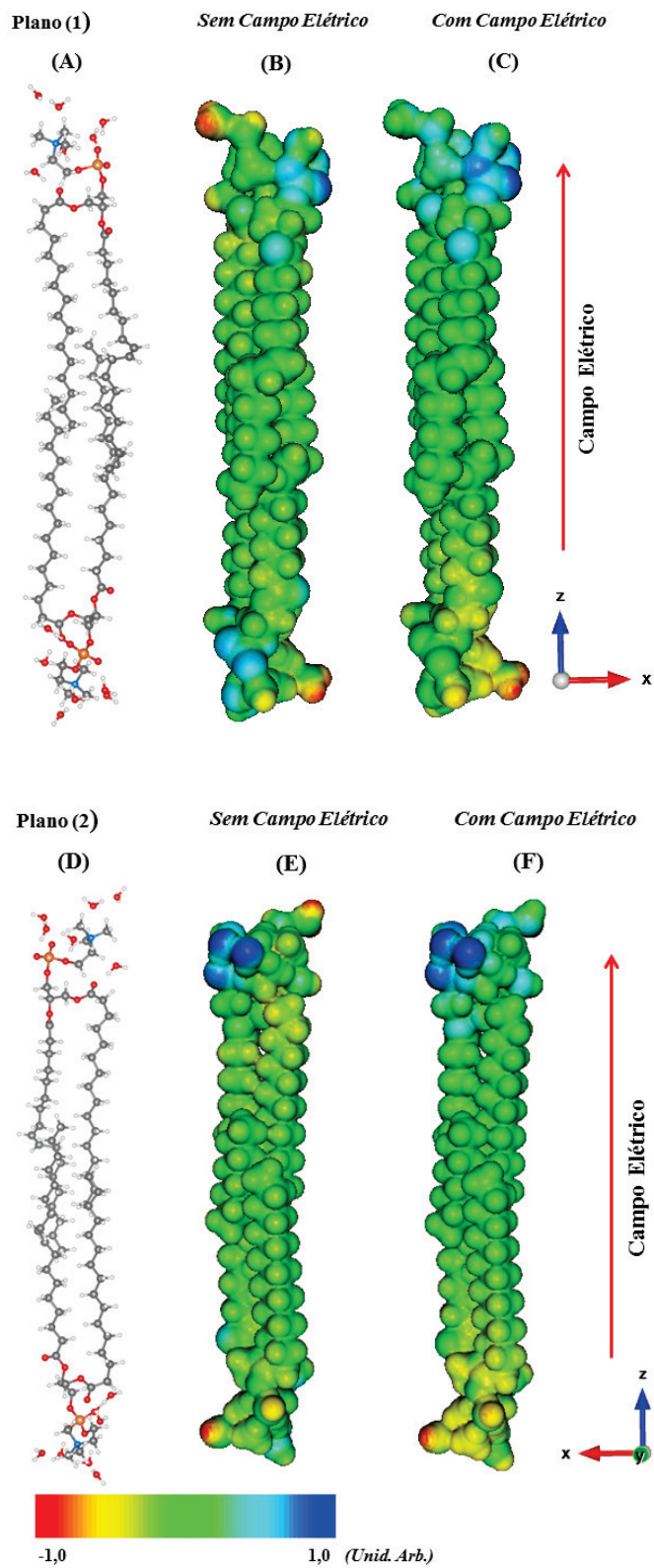
dos átomos de oxigênio tanto do fosfolípido quanto da molécula de água na direção positiva do eixo das energias.

Na região (B), não houve nenhuma mudança significativa quanto a contribuição dos átomos para formação dos orbitais, o oxigênio continua portanto, sendo o nível associado ao orbital HOMO e o carbono para com o nível LUMO. E o mesmo ocorre com o deslocamento dos níveis, onde visualizamos o deslocamento do nível referente ao átomo de oxigênio no sentido positivo do eixo.

Dessa forma, e assim como para configuração anterior, o deslocamento dos níveis ocasionado pela aplicação do campo elétrico leva uma redução no ΔHL . Além disso, a presença das moléculas de água é um dos fatores que contribui neste decréscimo, já que na configuração de bicamada hidratada, observamos uma maior redução do ΔHL .

As propriedades elétricas deste arranjo de moléculas fosfolípicas hidratadas também foram estudadas, a figura 4.14 mostra o mapa do potencial eletrostático para esta configuração.

Figura 4.14 – Mapas do potencial eletrostático dos fosfolipídios no arranjo de bicamada antes e após aplicação do campo elétrico.

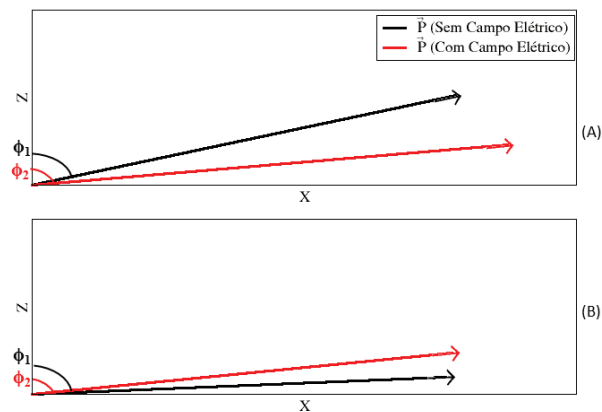


A presença das moléculas de água junto ao fosfolipídio modifica suas propriedades elétricas, isso fica claro ao observarmos o mapa do potencial eletrostático

antes da aplicação do campo elétrico. Na configuração anterior, sem a presença da água e mesmo para o fosfolípido isolado, haviam regiões de cargas positivas e negativas muito bem definidas. Na presença da água, contudo o mapa da distribuição do potencial eletrostático se torna mais difusa, indicando uma maior perturbação no potencial de toda bicamada, como pode ser visto na figura 4.14. Após a aplicação do campo ocorre o mesmo efeito que tínhamos anteriormente uma cabeça fica carregada positivamente e outra negativamente indicando a polarização do sistema.

Verificamos ainda que a presença da água modifica o momento de dipolo elétrico das moléculas fosfolipídicas. No gráfico da figura 4.15 (A) podemos visualizar os vetores \vec{P} , momento de dipolo elétrico para a configuração bicamada não hidratada antes e após a aplicação do campo elétrico. Os ângulos ϕ_1 e ϕ_2 apresentados nos gráficos representam o ângulo formado por \vec{P} com o eixo Z. Os valores de ϕ_1 e ϕ_2 no gráfico (A) são respectivamente $56,8^\circ$ e $75,8^\circ$. Já na figura 4.15 (B), apresentamos os vetores momento de dipolo elétrico antes e após aplicação do campo elétrico para bicamada hidratada, os ângulos representados ϕ_1 e ϕ_2 são respectivamente $80,9^\circ$ e $69,5^\circ$. Comparando os dois gráficos percebemos que a água, assim como o campo elétrico modificam a polarização do fosfolipídios, de maneira que somente a presença de água nas proximidades da cabeça do fosfolípido gera modificações em \vec{P} .

Figura 4.15 – (A) Vetores Momento Dipólo Elétrico bicamada não hidratada; (B) Vetores Momento Dipólo Elétrico bicamada hidratada.



4.3 DISCUSSÕES E RESULTADOS PARCIAIS

Mostramos que o campo elétrico ocasiona uma polarização induzida nos fosfolipídios devido à sua interação eletrostática com as cargas presentes nos grupamentos da região da cabeça. Isso gera um torque, uma curvatura das moléculas fosfolipídicas.

Ao se curvar, a membrana se deforma e se reorganiza, o resultado é que a região da cabeça de cada camada possuirá potenciais com sinais distintos, o que origina uma diferença de potencial.

O torque dos momentos de dipolo elétrico devido a ação do campo elétrico é responsável pelo surgimento de um estresse na membrana. Esse resultado foi recentemente apresentado por Bruhn e colaboradores (BRUHN; LOMHOLT; KHANDELIA, 2016) e nossos cálculos são coerentes com os encontrados. Observamos, contudo, que o estresse induzido pelo campo elétrico externo, na bicamada lipídica, não é suficiente para o seu rompimento, conforme mostrado na seção 3.3. A presença da água é fundamental e como já discutimos, o efeito do campo elétrico sobre ela resulta em uma estrutura no formato de um cone de *O.T.* que é o principal elemento para a formação dos poros. A rigidez da estrutura do cone de *O.T.*, devido as ligações de hidrogênio já demonstrados em trabalhos anteriores (OKUNO; CALDAS; CHOW, 1982; BAI et al., 2015), associado ao enfraquecimento da membrana em razão do estresse causado pela rotação dos momentos de dipolo elétrico são a origem do processo de eletroporação.

5 CONCLUSÃO

Mostramos, por meio de nossos cálculos de dinâmica molecular, que há formação de poros para temperatura de 300 K em torno de 1 ns após a aplicação de um campo elétrico de 0,5 V/nm. Observamos que, para temperaturas superiores como 310 e 318 K, a formação do poro se dá com aproximadamente 0,9 e 0,8 ns respectivamente. Já para as temperaturas de 330 e 340 K a formação do fio de água ocorre com menos da metade do tempo, aproximadamente 0,4 ns. Com isso, percebemos que existe uma relação da temperatura com o tempo de abertura do poro. Já para uma temperatura fixa, o aumento da intensidade do campo leva à redução no tempo de formação do mesmo. Observamos que, para temperatura de 300 K, ocorre a reconstrução da membrana, com fechamento do poro após 1 ns da interrupção do campo elétrico.

Os resultados obtidos tanto para o sistema dos dois blocos de água separados pelo vácuo, quanto para a bicamada lipídica mostram a formação dos cones de *O.T.* Este rearranjo das moléculas de água, ocasionado pela aplicação do campo elétrico, é o principal fator da abertura de poros nas membranas. O que foi comprovado, quando removemos as moléculas de água e aplicamos o campo elétrico durante 17 ns e não observamos abertura de canais na bicamada. Além disso, verificamos que as moléculas de água que participam da formação do cone de *O.T.* apresentam o número máximo de ligações de hidrogênio, relativo ao alinhamento criado nas moléculas devido à ação do campo elétrico, tornando as interações entre as moléculas muito mais fortes.

Verificamos com o uso de um solvente apolar que a ação do campo elétrico não possui influência na entrada das moléculas na membrana e nem ocasionou mudanças no ordenamento das mesmas.

Nos cálculos utilizando a DFT, mostramos que a aplicação do campo elétrico modifica as propriedades eletrônicas dos fosfolipídios. Observamos uma redução no ΔHL de 0,15 eV para o fosfolipídeo isolado após a aplicação do campo elétrico. Ainda nesta configuração, mostramos através dos plots de densidade de carga eletrônica que o orbital LUMO está localizado no grupo glicerol e o orbital HOMO nos grupos fosfato e colina do fosfolipídeo. A ação do campo elétrico nesta configuração não afetou de maneira significativa o posicionamento dos níveis correspondentes aos orbitais.

Verificamos que os fosfolipídeos na configuração de bicamada possuem propriedades eletrônicas distintas de quando isolados após a ação do campo elétrico. Observamos uma redução no ΔHL 1,0 eV quando comparamos as estruturas antes e após aplicação desse. Nos plots de densidade eletrônica, o orbital HOMO passa a ter uma maior concentração de carga no grupo fosfato de apenas uma das moléculas.

las. O mesmo ocorre para o orbital LUMO que passa ter uma maior concentração de carga em apenas um dos fosfolipídeos no grupamento colina. Os mapas do potencial eletrostático indicam uma possível polarização do sistema após a ação do campo elétrico.

Observamos que a presença da água junto ao arranjo de bicamada, também possui influência nas propriedades eletrônicas, pois houve uma redução no ΔHL de 0,45 eV quando comparada ao arranjo anterior. Os plots de densidade de carga sofreram alterações somente devido à ação do campo elétrico o orbital HOMO agora aparece localizado na região (A) de somente um dos fosfolipídeos. Isso é semelhante ao que acontece com o orbital LUMO que então passa a ter contribuição somente de região (B) de apenas uma das moléculas. Todas essas alterações já citadas são ocasionadas perante pequenas mudanças estruturais, associadas com a separação de cargas em decorrência do campo elétrico. Da mesma forma que, para as configurações anteriores, observamos redução no ΔHL de 1,45 eV. Através dos mapas do potencial eletrostático, mostramos que a presença da água modifica as propriedades elétricas dos fosfolipídeos e a ação do campo elétrico gera polarização do sistema.

Vale destacar que a rotação dos momentos de dipolo elétrico, induzida pela polarização do sistema, ocasiona estresse na bicamada lipídica, que isoladamente não é suficiente para seu rompimento. Assim, a presença das moléculas de água é imprescindível porque a ação do campo elétrico sobre elas causa seu reordenamento resultando em uma rígida estrutura sob formato de cone. Isso associado ao enfraquecimento da membrana lipídica, é a origem do processo de eletroporação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMAN, S.; DOLL, J. Generalized langevin equation approach for atom solid surface scattering: General formulation for classical scattering off harmonic solids. **J. Chem. Phys.**, v. 64, p. 2375–2388, 1976.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 1994. 1352 p.

_____. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2007. 1392 p.

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation of Liquids**. Oxford: Oxford University Press Inc., 1997.

ANDRE, F.; MIR, L. M. Dna electrotransfer: Its principles and an updated review of its therapeutic applications. **Gene Ther**, v. 11, p. 33–42, 2004.

AUNE, T. E. V.; AACHMANN, F. L. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1301–1313.

BACHELET, G. B.; HAMANN, D. R.; SCHLUTER, M. Pseudopotentials that work: From h to pu. **Physical Review B**, v. 26, p. 4199, 1982.

BAI, Y. et al. Electric field effects on the intermolecular interactions in water whiskers: insight from structures, energetics, and properties. **J Phys Chem A**, v. 119, n. 10, p. 2083–2090, 2015.

BOCKMANN, R. et al. Kinetics, statistics and energetics of lipid membrane electro-poration studie by molecular dynamics simulations. **Biophysical Journal**, v. 95, p. 1837–1850, 2008.

BRETON, M. et al. Transport of sirna through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: An experimental and computational study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 13938–13941, 2012.

BRUHN, D.; LOMHOLT, M. A.; KHANDELIA, H. Quantyfing the relationship between curvature and electrical potential in lipid bilayers. **JPhys. Chem.**, n. 120, p. 4812, 2016.

BYLANDER, D. M.; KLEIMAN, L. Ab initio (gaas)₃(alas)₃ (001) superlattice calculations: Band offsets and formation enthalpy. **Physical Review B**, v. 36, p. 3229–3236, 1987.

CAMP, J. T. et al. Cell death induced by subnanosecond pulsed electric fields at elevated temperatures. v. 40, n. 10, p. 2334–2346, 2012.

CHANDAR, N.; S., V. **Biologia Celular e Molecular**. USA: Wolters Kulwer, 2010. 248 p.

CHANG, D. C. **Guide to Electroporation and Electrofusion**. San Diego, California: Academic Press, 1992. 600 p.

CHEN, C. et al. Membrane electroporation theories: a review. **Med. Biol. Eng. Comp.**, v. 44, p. 5–14, 2006.

CHRISTEN, M. et al. The gromos software for biomolecular simulation: Gromos05. **J. Comput. Chem.**, v. 26, n. 16, p. 1719–1751, 2005.

COLE, K. S. A chapter of classical biophysics. in membrane, ions and impulses. **University of California Press**, p. 12–18, 1968.

CORNELL, W. D. et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, n. 19, p. 5179–5197, 1995.

CORREIA, A. **Livro da Célula**. Laboratório Didático de Multimídia, 2013. Acesso em 14 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.livrodacelula.org/>>.

CUNNINGHAM, J. N. et al. Resting transmembrane potential difference of skeletal muscle in normal subjects and severely ill patients. **J. Clin. Invest.**, v. 50, n. 1, p. 49–59, 1971.

DA SILVA, L. B. Structural and dynamical properties of water confined in carbon nanotubes. **J Nanostruct Chem**, v. 104, n. 4, p. 100–104, 2014.

DEBRUIN, K.; W., K. Modeling electroporation in a single cell. ii. effects of ionic concentrations. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 3, p. 1225–1233, 1999.

DELEMOTTE, L.; DEHEZ, F.; W., T. Modeling membranes under a transmembrane potential. **The journal Physical Chemistry**, v. 112, n. 18, p. 5547–5550, 2008.

DELEMOTTE, L.; TAREK, M. Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation. **J Membrane Biol**, v. 543, p. 245–531, 2012.

ELDER, M. et al. A refinement analysis of the crystallography of the phospholipid, 1,2-dilauroyl-dl-phosphatidylethanolamine, and some remarks on lipid-lipid and lipid-protein interactions. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 354, p. 157–170, 1977.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 8593, p. 103–8577, 1975.

FERNANDEZ, M. L. et al. Size controlled nanopores in lipid membranes with stabilizing electric fields. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 423, p. 325–330, 2012.

FIGUEIREDO, J. E. de. **Estudo da Interação da Ciclodextrina com Fármacos via Simulação de Primeiros Princípios**. 2010. 83 p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Nanociências) — Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2010.

FOLOPPE, N.; MACKERELL, A. D. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. **J. Comput. Chem.**, v. 21, n. 2, p. 86–104, 2000.

FRENKEL; D.SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation - From Algorithms to Applications**. San Diego: Academic Press, 2002.

GENG, T.; LU, C. Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery. **The Royal Society of Chemistry**, v. 13, p. 3803–3821, 2013.

HO, M. et al. Molecular dynamics simulations of ion conductance in field-stabilized nanoscale lipid electropores. **Physical Chemistry**, 2013.

HOCKNEY, R. W.; GOEL, S. P.; EASTWOOD, J. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **J. Comp. Phys.**, v. 14, p. 148–158, 1974.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Phys. Rev. B**, v. 136, p. 864, 1964.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. Vmd - Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33–38, 1996.

JEON, K.; SURESH, A.; KIM, Y. Highly efficient molecular delivery into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. **J. Chem. Eng.**, v. 30, n. 8, p. 1626–1630, 2013.

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. **J. Phys. Chem.**, v. 105, n. 28, p. 6474–6487, 2001.

KOTNIK, T. et al. Electroporation-based applications in biotechnology. **Cell Press**, v. 33, n. 8, p. 480–488, 2015.

_____. Cell membrane electroporation — part 1: The phenomenon. **Electrical Insulation Magazine**, v. 28, p. 14–23, 2012.

KOZLIKOVA, B. et al. Caver viewer-new tool enhancing computation and visualization of channels in proteins. **IADIS Press**, p. 111–118, 2007.

KRAMAR, P.; MIKLAVCIC, A.; LEBAR, M. Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 1, p. 23–27, 2007.

MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **J. Phys. Chem. B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998.

MAHNIČ-KALAMIZA, S.; VOROBIEV, E.; MIKLAVČIČ, D. Electroporation in food processing and biorefinery. **Journal Membrane Biology**, v. 247, p. 1279–1304, 2014.

MAJHI, A. K. et al. Estimation of activation energy for electroporation and pore growth rate in liquid crystalline and gel phases of lipid bilayers using molecular dynamics simulations. **Soft Matter**, v. 11, p. 8632–8640, 2015.

MARK, P.; NILSSON, L. Structure and dynamics of the tip3p, spc, and spc/e water models at 298 K. **J. Phys. Chem. A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 2001.

MASHAGHI, A. et al. Hydration strongly affects the molecular and electronic structure of membrane phospholipids. **J. Chem. Phys.**, v. 136, n. 11, p. 114709, 2012.

MILLER, J. Bacterial transformation by electroporation. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 375–385, 1994.

MORALES, M.; ELEZ, M. P.; MARTIN-BELLOSO, O. Food preservation by pulsed electric fields: An engineering perspective. **Food Eng. Rev**, v. 3, p. 94–207, 2011.

NEUMANN, E.; ROSENHECK, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. **J. Membrane Biol.**, v. 10, p. 279–290, 1972.

NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields. **EMBO J.**, v. 1, p. 841–845, 1982.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**. São Paulo: Harper e Row Brasil Ltda, 1982. 489 p.

OKUNO, Y. et al. Simulation study on the influence of an electric field on water evaporation. **J. Molec. Struct**, v. 904, p. 83–90, 2009.

PERDEW, J. P.; ZUNGER, A. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. **Phys. Rev. B**, v. 23, n. 10, p. 5048, 1981.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with namd. **J. of Comp. Chem.**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005.

POLAK, A. et al. Electroporation of archeal lipid membranes using md simulations. **Bioelectrochemistry**, 2014.

PORTEL, T. et al. Insights into the mechanisms of electromediated gene delivery and application to the loading of giant vesicles with negatively charged macromolecules. **Soft Matter**, v. 7, p. 3872–3881, 2011.

POURMOUSA, M. et al. Molecular dynamic studies of transportan interacting with a dppc lipid bilayer. **J. Phys. Chem.**, v. 117, p. 230–241, 2012.

PRAUSNITZ, M.; BOSE, V.; LANGER R. WEAVER, J. C. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance trans-dermal drug delivery. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90, p. 10504–10508, 1993.

PUÉRTOLAS, E. et al. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from cabernet sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1063–1070, 2010.

REIGADA, R. Influence of chloroform in liquid-ordered and liquid-disordered phases in lipid membranes. **The J. Phys. Chem. B**, v. 115, p. 2527–2535, 2011.

RIEDER, A. A. et al. Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. **Journal Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 2035–2045, 2008.

SACK, M. et al. Research on industrial-scale electroporation devices fostering the extraction of substances from biological tissue. **Food Engineering Reviews**, v. 2, n. 2, p. 147–156, 2010.

_____. Research on industrial-scale electroporation devices fostering the extraction of substances from biological tissue. **Food Eng. Rev**, v. 2, p. 147–156, 2010.

SAGUI, C.; T., D. P3m and pme: A comparison of the two methods. **AIP Publishing**, v. 492, n. 104, 1999.

SALE, A. J. H.; HAMILTON, W. A.; KAPER, J. M. Effects of high electric fields on microorganisms iii. lysis of erythrocytes and protoplasts. **Biochimica et biophysica acta**, v. 163, p. 37–43, 1968.

SERSA, G. et al. Electrochemotherapy in treatment of tumours. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 34, p. 232–240, 2008.

SOLER, J. M. et al. The siesta method for ab initio order-n materials simulation. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 14, n. 11, p. 2745, 2002.

SOZER, E. B. et al. Dose-dependent atp depletion and cancer cell death following calcium electroporation, relative effect of calcium concentration and electric field strength. **PLoS ONE**, p. 1–12, 2015.

STAMPFLI, R. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a ranvier node. **An. Acad. Brasil. Cien.**, v. 30, p. 57–63, 1958.

SUZUKI, T. et al. Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. **FEBS Lett**, v. 425, p. 436–440, 1998.

TAKAHASHI, M.; KIKKAWA, T.; N., O. Gene transfer into cultured mammalian embryos by electroporation. **Springer New York**, v. 102, p. 141–157, 2015.

TAREK, M. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. **Biophys Journal**, v. 88, n. 6, p. 4045–4053, 2005.

TEISSIE, J.; GOLZIO, M.; ROLS, M. Mechanisms of cell membrane electropermeabilisation: a minireview of our present (lack of?) knowledge. **Biochim Biophys Acta**, v. 1724, n. 3, p. 270–280, 2005.

TEKLE, E. et al. Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 1, p. 274–284, 2005.

TOKMAN, M. et al. Electric field-driven water dipoles: Nanoscale architecture of electroporation. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–9, 2013.

TROULLIER, N.; MARTINS, J. L. Efficient pseudopotentials for plane-wave calculation. **Phys. Rev. B**, v. 43, n. 3, p. 1993–2003, 1991.

TSONG, T. Y. Electric modification of membrane permeability for drug loading into living cells. **Methods Enzymol**, v. 149, p. 248–259, 1987.

TURKYILMAZ, S. et al. Loosening and reorganization of fluid phospholipid bilayers by chloroform. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, n. 14, p. 5068–5069, 2009.

VALERO, A. et al. Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device. **The Royal Society of Chemistry**, v. 8, p. 62–67, 2008.

VERLET, L. Computer experiments on classical fluids. **Phys. Rev**, v. 159, p. 98–103, 1967.

VERNIER, T.; LEVINE, Z.; M., G. Water bridges in eletropermeabilized phospholipid bilayers. **Proceedings of the IEEE**, v. 101, n. 2, p. 495–504, 2013.

WEAVER, J.; CHIZMADZHEV, Y. Theory of electroporation: a review. **Bioelectrochem Bioenerg**, v. 41, p. 135–160, 1996.

WEAVER, J. C. Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales. **Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 10, n. 5, p. 754–768, 2003.

ZAHA, A. et al. **Biologia Molecular**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. 424 p.

ZHAN, Y. et al. Realese of intracellular proteins by eletroporation with preserved cell viability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, p. 8102–8105, 2012.