

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Departamento de Farmacociências

Curso de Bacharelado em Química Medicinal

Camila Steffani Caovilla

Investigação In Silico de Anti-inflamatórios Não Esteroidais em
Biomembranas: Uma Abordagem de Dinâmica Molecular *all-atom*

Porto Alegre

2024

Camila Steffani Caovilla

**Investigação In Silico de Anti-inflamatórios Não Esteroidais em
Biomembranas: Uma Abordagem de Dinâmica Molecular *all-atom***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Química Medicinal da Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, como requisito para obtenção
do grau de Bacharel em Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Espinosa de Oliveira

Porto Alegre

2024

Agradecimentos

Escrever meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi, sem dúvida, um dos maiores desafios que enfrentei em minha trajetória acadêmica. Acredito eu, que nenhum se comparou à complexidade e dedicação exigidas para completar esse projeto. Minha introdução à química computacional ocorreu em 2021, no auge da pandemia, e, naquele período, cheia de inseguranças, eu ainda não compreendia o quanto me identificaria com essa área. O processo de aprendizado foi longo e, em vários momentos, parecia que jamais conseguiria entender completamente. Entretanto, chegar ao término dessa jornada traz uma imensa sensação de gratidão por cada etapa vivida.

O ato de agradecer, embora possa parecer trivial, carrega uma profundidade muitas vezes subestimada. Ao expressar gratidão, reconhecemos as experiências vividas, as oportunidades que nos foram concedidas, as pessoas que nos acompanharam e todo o conhecimento acumulado ao longo de nosso caminho. Ao concluir esta jornada, não posso esquecer de agradecer a todos que me trouxeram até aqui e que, em cada momento, me estenderam a mão.

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, Cláudia e Paulo, que, com imenso esforço e dedicação, lutaram para que eu chegasse até aqui, concluindo essa etapa e escrevendo este trabalho. Sem o amor incondicional de vocês, este momento não seria possível. Não menos importantes, aos meus irmãos, Lucas e Bruno, que, com suas piadas e histórias, trouxeram risadas e sorrisos aos meus dias, especialmente nos momentos mais difíceis. Sou eternamente grata a esses quatro que são a minha base e meus guias, me sinto muito feliz por poder chamá-los de família.

Agradeço também aos meus avós, seu Elias e dona Maria Beatriz, que sempre estiveram presentes com um abraço acolhedor e palavras de carinho, demonstrando o quanto me amam e apoiam em cada passo da minha caminhada. Agradeço a minha amiga Ana Paula, que sempre foi meu ombro amigo e minha parceira de aventuras, estando comigo em todas etapas.

Às minhas amigas Magali, Maria Eduarda e Gabriela, agradeço profundamente por tornarem meus dias na faculdade únicos e especiais, sempre dispostas a me apoiar com conselhos, risadas ou abraços, tornando os momentos difíceis mais leves e cheios de amor. Agradeço também às minhas amigas do colégio, Nina, Mahara e Michelle, que, mesmo não estando sempre por perto, continuam sendo minhas confidentes e meu porto seguro.

Por último, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Espinosa de Oliveira, cuja orientação e atenção me trouxeram até este momento. Agradeço pelo incentivo constante, pelas orientações, pelos ensinamentos e por sempre acreditar em meu potencial, mesmo quando eu não acreditava conseguir.

Resumo

As interações entre fármacos e biomembranas em nível microscópico contribuem para o esclarecimento das ações de uma ampla variedade de medicamentos e para o desenvolvimento e aprimoramento da liberação controlada de fármacos. Pesquisas recentes destacam o impacto de certos medicamentos sobre as membranas, as quais são essenciais para o corpo humano ao separarem o ambiente intra e extracelular, funcionando como barreira seletiva para as células. Fármacos como aspirina (ASP), ibuprofeno (IBU) e indometacina (IND), classificados como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm sido estudados por sua capacidade de alterar as propriedades das membranas lipídicas. Ao interagirem com a bicamada, esses compostos podem modificar as propriedades da membrana, influenciando diretamente na sua fluidez e na sua capacidade de interagir com outros medicamentos. Além disso, traz à tona uma outra possibilidade para explicar os efeitos colaterais dos AINEs. Sendo assim, busca-se elucidar as interações entre as membranas modelo de DMPC e os AINEs através de uma abordagem computacional via dinâmica molecular (DM) all-atom. Os estudos de DM foram conduzidos utilizando o programa GROMACS, onde realizou-se uma série de simulações, utilizando sistemas de membranas modelo compostas por lipídios DMPC na presença de água, de colesterol e de AINEs (aspirina, ibuprofeno e indometacina). Foram realizadas 5 simulações diferentes, tendo em vista diferentes sistemas: (a) DMPC, (b) DMPC + ASP, (c) DMPC + IBU, (d) DMPC + IND e (e) DMPC + CHL, sob a mesma temperatura. Observando as interações em função da composição da membrana, após as simulações, verificou-se uma diminuição da espessura das bicamadas, aumento da área por lipídio, uma maior desorganização dos lipídios e consequentemente uma diminuição no módulo da elasticidade da membrana, apresentando uma membrana mais fluida na presença dos AINEs.

Palavras-chave: Membranas, anti-inflamatórios, DMPC e dinâmica molecular.

Abstract

The interactions between drugs and biomembranes at the microscopic level help clarify the actions of a wide variety of medications and contribute to the development and enhancement of controlled drug release. Recent research highlights the impact of certain drugs on membranes, which are essential for the human body as they separate the intra- and extracellular environments, acting as selective barriers for cells. Drugs such as aspirin (ASP), ibuprofen (IBU), and indomethacin (IND), classified as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), have been studied for their ability to alter lipid membrane properties. By interacting with the bilayer, these compounds can modify membrane properties, directly influencing its fluidity and its capacity to interact with other drugs. Furthermore, this interaction brings forth a potential explanation for the side effects of NSAIDs. Therefore, this study aims to elucidate the interactions between DMPC model membranes and NSAIDs through a computational approach using all-atom molecular dynamics (MD). MD studies were conducted using the GROMACS program, performing a series of simulations with model membrane systems composed of DMPC lipids in the presence of water, cholesterol, and NSAIDs (aspirin, ibuprofen, and indomethacin). Five different simulations were performed, considering different systems: (a) DMPC, (b) DMPC + ASP, (c) DMPC + IBU, (d) DMPC + IND, and (e) DMPC + CHL, all at the same temperature. Observing the interactions as a function of membrane composition, the simulations showed a decrease in bilayer thickness, an increase in the area per lipid, greater lipid disorder, and consequently a decrease in membrane elasticity modulus, resulting in a more fluid membrane in the presence of NSAIDs.

Key-words: Membrane, anti-inflammatory, DMPC, molecular dynamic.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Diagrama de fase para o DMPC em função da fração volumétrica de lipídio (ϕ). EW denota excesso de água e "C" o ponto triplo.	10
Figura 2 – Estrutura dos AINEs.	10
Figura 3 – Estrutura de fosfolipídio.	12
Figura 4 – Estrutura da bicamada lipídica.	14
Figura 5 – Estrutura da bicama lipídica em diferentes fases.	14
Figura 6 – Estrutura DMPC.	15
Figura 7 – Cascata do processo inflamatório.	17
Figura 8 – Sistema de dinâmica molecular mostrando fármacos (moléculas em roxo) acopladas a uma bicamada lipídica.	19
Figura 9 – Descrição atômica.	22
Figura 10 – Configuração inicial da simulação de DM de uma membrana. A região central da bicamada representa as cadeias dos lipídios, enquanto as moléculas de fármaco e do colesterol se encontram próximas à interface da membrana.	25
Figura 11 – Análise das ligações de hidrogênio (H-bonds) entre possíveis doadores(D) e receptores(A).	27
Figura 12 – <i>Snapshots</i> dos sistemas na simulação de DM de uma membrana. A região central da bicamada representa as cadeias dos lipídios, enquanto as moléculas de fármaco e do colesterol se encontram próximas à interface da membrana.	28
Figura 13 – Perfil de densidade das membranas de DMPC em água e com a presença do Colesterol e de fármacos como a Aspirina, Ibuprofeno e Indometacina.	30
Figura 14 – Gráfico de espessura dos lipídios.	31
Figura 15 – Variação da espessura da membrana em todas a superfície das cabeças polares dos fosfolipídios.	33
Figura 16 – Gráfico de curvatura da membrana.	34
Figura 17 – Snapshot da curvatura da membrana, representada em rosa, sob a influência dos AINEs e do colesterol.	35
Figura 18 – Parâmetro de ordem das caudas dos fosfolipídios.	36

Lista de abreviaturas e siglas

AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ASP	Aspirina
CHL	Colesterol
CHARMM36	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
CG	<i>Coarse-grained</i>
DM	Dinâmica Molecular
DMPC	<i>1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
HBOND	Ligação de Hidrogênio
IBU	Ibuprofeno
IND	Indometacina
SuaVE	<i>Surface Assessment via Grid Evaluation</i>
TIP3P	<i>Transferable intermolecular potential with three points</i>

Lista de tabelas

Tabela 1	–	Temperatura de transição de diferentes fosfolipídios.	15
Tabela 2	–	Descrição de possíveis sistemas de DM.	22
Tabela 3	–	Composição dos sistemas simulados.	24
Tabela 4	–	Valores de espessura e área por lipídio calculado pelo SuaVE e pelo GROMACS. Para ^a SuaVE, ^b GROMACS e para ^c dados experimentais obtidos por Sharma et al.	32
Tabela 5	–	Número de ligações de hidrogênio (HBOND) entre os pares AINES - DMPC e DMPC - SOL; Número de coordenação (NC) entre os grupos AINES - P e AINES - CAUDA.	37
Tabela 6	–	Valores obtidos para módulo de elasticidade (K_a) e módulo de flexão (k).	38

Sumário

1	Introdução	9
2	Revisão Bibliográfica	12
2.1	Membranas	12
2.2	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais	15
2.3	Interação membrana e AINEs	18
2.4	Simulações	19
2.4.1	Dinâmica Molecular	19
2.4.1.1	Campo de Forças	21
3	Objetivos	23
3.1	Objetivos Gerais	23
3.1.1	Objetivos Específicos	23
4	Metodologia	24
5	Resultados e Discussão	28
5.1	Perfil de densidade	29
5.2	Análise estrutural	30
5.3	Hidratação dos lipídios	36
5.4	Propriedades Mecânicas	37
6	Conclusão	40
7	Perspectivas	41
	Referências	42

1 Introdução

As interações entre fármacos e biomembranas em nível microscópico são fundamentais no avanço da farmacologia moderna, contribuindo com o esclarecimento das ações de uma ampla variedade de medicamentos além do desenvolvimento e aprimoramento da liberação controlada de fármacos. [1,2] Entender o papel dessas interações nas propriedades de um fármaco é fundamental para a compreensão de suas atividades fisiológicas e de sua citotoxicidade, desenvolvendo assim medicamentos mais eficazes. As membranas são essenciais para as células do corpo humano, atuam como barreira e promovem proteção às organelas. Sua estrutura formada por uma bicamada lipídica, separa o meio extracelular e intracelular garantindo a homeostase das células. [2–4]

As membranas celulares são principalmente formadas por moléculas de fosfolipídios, os quais asseguram a estruturação e a funcionalidade celular. [5] Além disso, em conjunto com os lipídios estão presentes proteínas e esteróis. As proteínas associadas à membrana têm um papel multifuncional, que abrange tanto o transporte de substâncias pela membrana quanto a atuação como receptores para sinais químicos. [5–7] Enquanto os esteróis, como o colesterol, ajudam a regular a fluidez da membrana, conferindo-lhe estabilidade e resistência. Juntos, fosfolipídios, proteínas e esteróis corroboram para a integridade e funcionalidade das membranas, sendo assim a primeira barreira para os fármacos ao entrar em uma célula. [8]

Uma propriedade básica da membrana consiste na capacidade de subsistir em diferentes fases, incluindo a fase líquida (L_α) e a fase sólida (L_β), podendo essa ser cristalina ou em gel. A transição entre essas fases é resultado direto da variação da temperatura, onde em temperaturas mais baixas a fase gel é favorecida e em temperaturas mais altas a fase líquida, como podemos observar na Figura 1. A heterogeneidade composicional da membrana impacta diretamente a sua temperatura de transição. Regiões com alta concentração de lipídios saturados apresentam temperaturas de transição mais elevadas, enquanto áreas ricas em lipídios insaturados exibem temperaturas de transição mais baixas. [9].

O funcionamento ideal da bicamada lipídica e de suas proteínas é essencial para preservar as propriedades fundamentais da membrana, como fluidez, permeabilidade seletiva e capacidade de interação com outras moléculas, assegurando assim o correto funcionamento dos sistemas biológicos. Qualquer alteração substancial nessas propriedades pode ter impactos adversos em suas funções e, em última análise, pode resultar em disfunções ou doenças. [11]

Vários estudos experimentais recentes têm destacado que certos fármacos podem exercer um impacto sobre as membranas. Exemplos como a aspirina, a indometacina, a ni-

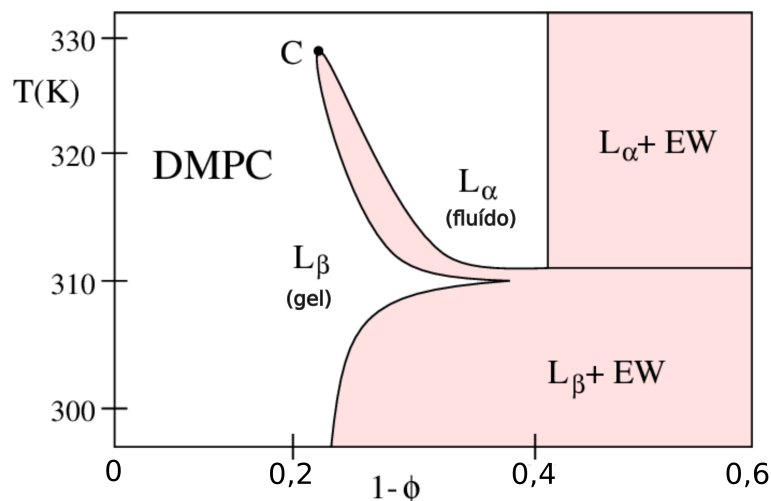


Figura 1 – Diagrama de fase para o DMPC em função da fração volumétrica de lipídio (ϕ). EW denota excesso de água e "C" o ponto triplo.

Adaptado da Ref. [10]

mesulida, entre outros, têm sido notados por influenciarem a temperatura de transição das membranas. [12,13] Esses fármacos ao penetrar as bicamadas, induzem alterações na temperatura de transição dos lipídios e assim levam a alteração de sua fluidez. [11] Alterar a fluidez de uma membrana, afeta diretamente sua permeabilidade e suas interações com outros fármacos, sendo assim é crucial avançar no desenvolvimento de abordagens experimentais e computacionais para aprofundar a compreensão das interações entre fármacos e membranas. [14]

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são uma classe de fármacos conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. [15] Os AINEs são comumente utilizados como agentes terapêuticos, não apenas por prescrição médica, mas muitos deles também estão disponíveis para compra sem necessidade de receita médica, o que facilita a automedicação. Fármacos como aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, indometacina e muitos outros estão entre os AINEs mais amplamente utilizados em todo o mundo. [14–16] Essa classe de fármacos, além de seu uso usual, têm demonstrado grande potencial para serem utilizados como terapia principal em patologias crônicas, como artrite [17,18], câncer [19] e doença de Alzheimer. [20,21]

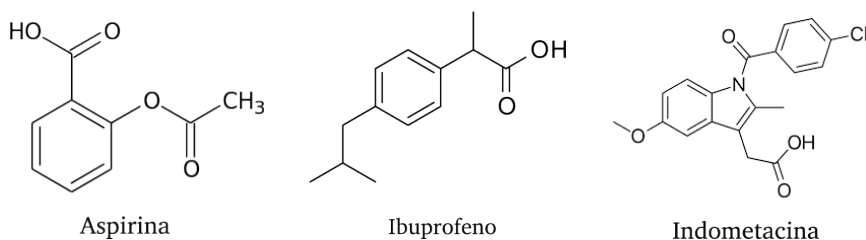


Figura 2 – Estrutura dos AINEs.

O mecanismo central de ação dessa classe de fármacos baseia-se na inibição da via das ciclooxygenases (COX), a qual a ser inibida barra a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. [14, 16, 22, 23] A COX apresenta-se em duas isoformas principais sendo a COX-1 expressa no trato gastrointestinal, para proteção, enquanto a COX-2 é ativada por processos inflamatórios, como citocinas e fatores de crescimento. Logo, os efeitos terapêuticos dos AINEs são atribuídos à inibição seletiva da enzima COX-2. [24]

As prostaglandinas, geradas a partir da conversão do ácido araquidônico pelas COX, são fundamentais nas respostas inflamatórias, cuja produção é aumentada nos tecidos inflamados. [25] Portanto, os AINEs, ao agirem sobre as enzimas COX, resultam automaticamente no bloqueio da produção das prostaglandinas, e consequentemente, inibem as inflamações. Quando utilizados em excesso, muito fala-se sobre seus possíveis efeitos colaterais, e como os mesmos a saúde do corpo.

Trabalhos recentes têm investigado como essa classe de fármacos pode afetar diretamente as propriedades da membrana, demonstrando que a interação entre ambos pode induzir a uma diminuição da espessura da bicamada, e até causar alterações na elasticidade ou na curvatura da mesma. [7, 26, 27] Essas interações entre fármacos e membranas dependem de diversos parâmetros, como a estrutura química tanto do fármaco quanto dos lipídios, o estado de agregação da bicamada e a concentração do fármaco. Entretanto, mesmo com vários estudos acerca dessas interações, uma visão microscópica da ligação dos AINEs com as membranas celulares nos permite ampliar a compreensão dos mecanismos de interação entre ambos relacionando suas ações terapêuticas e seus efeitos colaterais.

A partir da necessidade deste entendimento, as simulações de dinâmica molecular (DM) como uma complexa ferramenta, permite a compreensão dos processos biofísico-químicos e confere uma dimensão dinâmica aos dados estruturais tanto de um ponto de vista macroscópico quanto microscópico. [28, 29] Sendo assim, as simulações corroboram para o entendimento amplo dessas interações descrevendo o comportamento das mesmas a nível molecular (e.g. ligações de hidrogênio), a dinâmica das moléculas do sistema (e.g. difusão lateral dos lipídios), as alterações estruturais da bicamada (e.g. parâmetro de ordem), propriedades mecânicas (e.g. módulo de elasticidade e de flexão) e aspectos termodinâmicos do sistema.

Através dessa perspectiva computacional, o presente trabalho busca realizar diferentes simulações em sistemas de bicamada lipídica. Sobre a presença de AINEs, como a aspirina, o ibuprofeno e a indometacina procuramos compreender como ocorre essas interações entre fármaco-membrana e como os AINEs afetam as propriedades da membrana.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Membranas

Originado pela integração de átomos e de moléculas, as células do corpo humano são fundamentais para a estrutura e a função de um ser vivo. [30] Definem-se pelas suas individualidade e pelas suas capacidades de serem identificáveis, devido às suas características únicas em termos de estrutura, função e tamanho. Cada célula atua em determinada parte do organismo garantindo o perfeito funcionamento e sobrevivência das formas de vida. [31] Entender a fisiologia celular é entender sua composição estrutural e suas estruturas internas e externas para por fim compreender os processos biológicos e químicos da mesma. As células são constituídas por várias estruturas, destacando-se três em particular: as membranas celulares, que envolve a célula; o núcleo, onde está o material genético; e o citoplasma, localizado no interior celular. [30]

As membranas em torno das células revelam-se como barreiras seletivas, assegurando a homeostase interna celular. Seu papel de barreira mecânica, regula a entrada de nutrientes e saída de resíduos, auxiliando no equilíbrio e separando o meio intra e extracelular. Portanto, as membranas apresentam permeabilidade seletiva, permitindo a passagem controlada de certas substâncias enquanto restringem outras. [32,33] Os principais constituintes das membranas são lipídios, proteínas e carboidratos, com a composição variando significativamente entre diferentes tipos de células. [34]

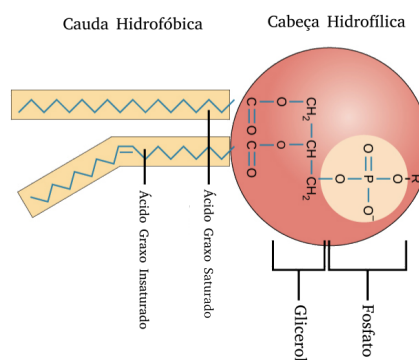


Figura 3 – Estrutura de fosfolípido.
Adaptado da Ref [35]

Os fosfolipídios, seguidos pelos esfingolipídios, são os lipídios mais abundantes presentes nas biomembranas. Esses lipídios são compostos por um grupo fosfato ligado a uma molécula de glicerol e duas caudas de ácidos graxos. O grupo fosfato, devido à sua carga

negativa, confere caráter polar à cabeça da molécula, caracterizando-a como hidrossolúvel (hidrofílica). Enquanto os ácidos graxos, que são neutros, apresentam caráter apolar, caracterizando como lipossolúvel (hidrofóbico) como mostra a Figura 3. [36]

A partir desse comportamento, os lipídios formam uma bicamada lipídica quando autoassociam-se em soluções aquosas. [5] As caudas hidrofóbicas orientam-se para o centro da bicamada, afastando-se da água que circunda. Enquanto as cabeças hidrofílicas se posicionam na superfície externa e interna da célula, mantendo contato direto com o meio externo e interno, permitindo assim a segregação dos ambientes como mostra a Figura 4 [35]. Além dos lipídios, as membranas podem conter também moléculas como o colesterol, os quais se intercalam entre os fosfolipídios e atuam como separadores das cadeias de ácidos graxos. Ao se alinhar aos lipídios, devido a seu caráter anfipático, o colesterol reduz o movimento das cadeias de carbono, aumentando a ordem e estabilidade da membrana. Sendo assim, a presença de moléculas de colesterol influencia diretamente nas propriedades das membranas e principalmente em sua fluidez. [30, 37, 38]

Outro componente fundamental da bicamada são as proteínas que atuam tanto no transporte de substâncias quanto na atividade enzimática, encontrando-se inseridas ou acopladas à membrana. [39] As proteínas acopladas são conhecidas como proteínas periféricas, localizando-se na superfície da bicamada. Enquanto as proteínas inseridas, chamadas de proteínas integrais, atravessam toda a membrana devido às suas propriedades anfipáticas. [40, 41] A internalização das proteínas influencia diretamente no seu papel perante a membrana, auxiliando assim na funcionalidade celular.

Por fim, há a presença também de carboidratos que podem estar ligados às proteínas e aos lipídios na superfície externa da membrana. Esses carboidratos atuam de diversas maneiras: como ajudantes de adesão, receptores de sinais e até auxiliando na proteção. Nas membranas, os mesmos estendem-se para fora da célula, podendo ser divididos em duas classes: as glicoproteínas, quando associados a proteínas e os glicolipídios, quando associados a lipídios. Juntos formam uma espécie de revestimento intitulado glicocálix, situando-se na parte externa. [36]

A explicação desse comportamento de bicamada da membrana foi apresentada pela primeira vez por Singer e Nicholson, em 1971 e 1972. Intitulado Modelo de Mosaico Fluido (F-MMM), retratou as membranas biológicas como uma matriz composta principalmente por uma bicamada fluida de fosfolipídios com proteínas integrais globulares e glicoproteínas intercaladas na bicamada lipídica fluida. [42] Essa descrição de modelo destaca-se até hoje, visto que aproxima ao conhecimento atual do que se é membrana e define como uma estrutura dinâmica onde tanto lipídios quanto proteínas podem mover-se lateralmente e interagir entre si, [43]

Nas propriedades das membranas celulares, é importante destacar também sua característica polimórfica, que lhe permite formar diferentes tipos de estruturas organizadas. Tal comportamento pode ser regulado por diversas condições, como seu grau de hidra-

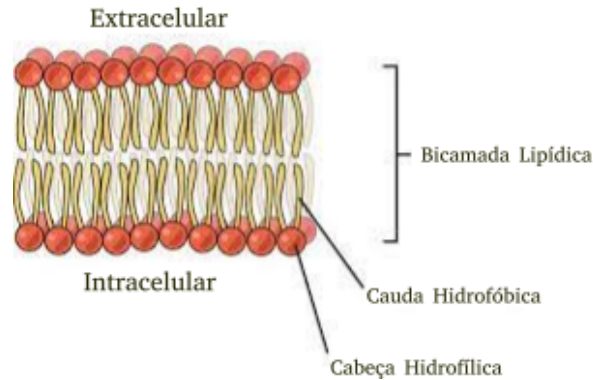


Figura 4 – Estrutura da bicamada lipídica.
Adaptado da Ref. [35]

tação, a composição lipídica, temperatura, pressão, força iônica e pH. [44]. Um dos comportamentos importantes das biomembranas é sua capacidade de existir em quatro estados diferentes: sólido, com fase cristalina (L_c) e fase gel (L_β), fase ripple (P_β) e fase líquida (L_α). [9]

A distinção dessas fases é caracterizada pela conformação dos lipídios, onde na fase gel os lipídios estão organizados de maneira ordenada, ocasionando uma rigidez das cadeias. Já na fase líquida, os lipídios encontram-se desordenados, levando ao aumento do volume total e na diminuição da tensão da membrana [45] como ilustrado na Figura 5. A espessura da membrana também altera nas diferentes fases, sendo na fase gel aumentada e na fase líquida diminuída. A diferenciação das fases pode provir de diferentes impactos sob a membrana, como a temperatura do meio e a composição dos componentes presentes.

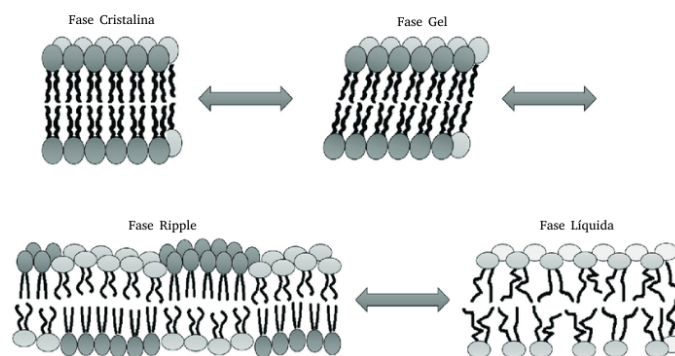


Figura 5 – Estrutura da bicama lipídica em diferentes fases.
Adaptado da Ref. [46]

Em temperaturas mais baixas, as membranas tendem a assumir predominantemente a fase sólida. Em contrapartida, à medida que a temperatura aumenta, as membranas tornam-se mais desordenadas, entrando na fase líquida. A organização dos lipídios, afeta diretamente a fluidez da membrana: membranas desordenadas são mais fluidas do que

Tabela 1 – Temperatura de transição de diferentes fosfolipídios.

Grupo Lipídico	Temperatura de transição T_m (K)
Dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC)	297
Distearoyl PC (DSPC)	328
Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE)	336
Dipalmitoyl PC (DPPC)	314

Adaptado da Ref. [48]

aquelas com lipídios ordenados. [9,47] Em muitos sistemas biológicos, a fase líquida predomina devido às condições fisiológicas de temperatura [9,47]

A temperatura de transição (T_m) necessária para que ocorra essa mudança de fase é influenciada pela composição da membrana. Os fosfolipídios demonstram grande heterogeneidade em suas cadeias, a qual é determinante para a temperatura de transição. Os fosfolipídios que possuem cadeias mais curtas geralmente apresentam temperaturas de transição menores em comparação com aqueles que possuem cadeias mais longas, como mostrado na Tabela 1. [48,49]

Os principais lipídios estruturais das membranas eucarióticas são os glicerofosfolipídios, entre os quais a fosfatidilcolina zwitteriônica representa mais de 50% dos fosfolipídios de membrana. [20,50] As fosfatidilcolinas na sua estrutura, apresentam uma cabeça polar incluído de uma molécula de colina ou etanolamina ligada a um grupo fosfato. Derivado desse grupo, o DMPC, ou 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, é um fosfolipídio com uma temperatura de transição de aproximadamente 297 K, com uma pré-transição ocorrendo entre 287 K e 289 K. (ver Figura 6) [51]

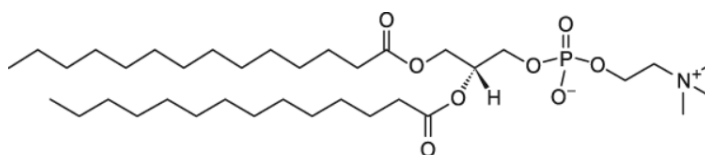


Figura 6 – Estrutura DMPC.

2.2 Anti-Inflamatórios Não Esteroidais

Descoberto em 1897, o ácido acetilsalicílico, conhecido como aspirina foi o primeiro anti-inflamatório a ser comercializado no mundo, inovando a indústria farmacêutica e mercado global. [52] Atualmente, os Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) estão entre as classes de fármacos mais consumidos no mundo, devido aos seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos. Suas três principais ações ajudam o corpo humano

a modular as respostas inflamatórias, aliviar certos tipos de dor e reduzir a temperatura elevada, tornando-os funcionais para uma variedade de condições clínicas. [53]

Em função desses fatores, podem apresentar grande eficácia no alívio de dores associadas a patologias crônicas, como artrite, osteoartrite e artrite reumatoide. [17, 18, 22]. Estudos clínicos e epidemiológicos demonstram os possíveis efeitos também frente ao tratamento de câncer [19], doença de Alzheimer [20, 21] e doenças cardiovasculares [26]. Logo, esses medicamentos possuem uma ampla gama de aplicações terapêuticas, que variam conforme suas classes e seus principais alvos biológicos.

Vale ressaltar que o uso indiscriminado de AINEs pode acarretar em uma série de complicações para o corpo como: no trato gastrointestinal, ocorrendo o desenvolvimento de esofagite, gastrite e duodenite, úlcera gástrica ou duodenal [54, 55]; e no sangue, distúrbios hematológicos graves, como trombocitopenia, agranulocitose, anemia aplástica e anemia hemolítica. [56] Outros distúrbios são também mencionados na literatura; no entanto, optou-se por citar esses devido à sua maior prevalência.

O primeiro mecanismo de ação dos AINEs, foi proposto por John Vane em 1971, onde demonstrou que essa classe de fármacos produzia seus efeitos a partir da inibição da síntese de prostaglandinas. [57] Anos depois, foi identificada duas isoformas da enzima envolvida nesse processo, a ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), responsáveis pela produção das prostaglandinas. [58]

As prostaglandinas são reconhecidas por envolverem-se em processos fisiológicos e patológicos, atuando como mediadoras nos processos inflamatórios. A cascata de síntese desses compostos inicia na liberação de ácido araquidônico pelas membranas celulares. Os fosfolípidios presentes na bicamada, sofrem ação da enzima fosfolipase (A_2) gerando a liberação desse ácido. [59, 60] O ácido araquidônico liberado serve como substrato para duas possíveis vias distintas: a via das ciclooxigenases, e a via das lipoxigenases. A via das ciclooxigenases é de particular interesse devido à sua função na produção de prostaglandinas. [61]

Dentro da via das ciclooxigenases podemos encontrar atualmente três isoformas da enzima: a COX-1, a COX-2 e a COX-3. A ciclooxigenase-1 (COX-1) foi a primeira enzima a ser caracterizada e está presente nas células em condições fisiológicas, sendo sua principal característica ser uma enzima constitutiva essencial para a modulação das funções gastrointestinais, renais e a homeostase vascular. [57] A ciclooxigenase-2 (COX-2) já é responsável pelos processos inflamatórios e produção das prostaglandinas. [57] A terceira e última ciclooxigenase, a (COX-3) é a COX mais recente descoberta e estima-se que esteja ligada a síntese da lipoxina, podendo estar presente no SNC. [60]

Seguindo a via do processo inflamatório, a COX-2 catalisa a oxigenação do ácido araquidônico convertendo-o em prostaglandinas e tromboxanos, dando origem aos principais prostanóides mediadores de inflamação. [25] Os Anti-Inflamatórios não esteroidais (AINEs) tem sua ação decorrida da inibição das ciclooxigenases, resultando diretamente

no bloqueio da produção das prostaglandinas e tromboxanos como demonstra a Figura 7. O bloqueio da ação da produção desses prostanóides resulta direto no controle da inflamação, por isso essa classe intitula-se anti-inflamatórios. Sabe-se também que os efeitos anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos resultam da inibição da COX-2, enquanto os efeitos colaterais indesejados são decorrentes da inibição da COX-1. [62]

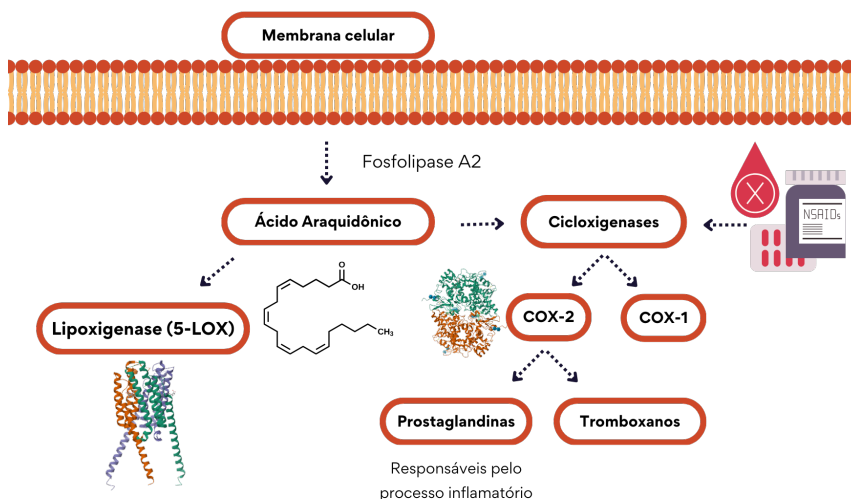


Figura 7 – Cascata do processo inflamatório.
Adaptado da Ref [63]

Com base em sua estrutura química, os AINEs formam um grupo heterogêneo de ácidos orgânicos fracos, estruturados pela combinação de uma parte ácida (como ácido carboxílico ou enóis) com um grupo funcional aromático plano. (Figura 2) São divididos internamente em classes, de acordo com sua seletividade para inibir as enzimas ciclo-oxigenase, com base em suas estruturas e com base na sua meia-vida. [58] Dividem-se principalmente em inibidores não seletivos e inibidores seletivos de COX, inibindo tanto a COX-1 como a COX-2. Os AINEs seletivos de COX-2, são constituídos de um grupo sulfonamida (celecoxibe, valdecoxibe) ou um grupo metilsulfona (rofecoxibe, etoricoxibe), tendo uso preferencial pelos inibidores da COX-2 visto que essa enzima é a responsável pelas inflamações. Já os AINEs não seletivos, inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2 e são parte desse grupo o ibuprofeno, diclofenaco, aspirina, indometacina, nimesulida, naproxeno e muitos outros. Dentro dos inibidores não seletivos temos ainda a classificação de qual ácido cada AINEs é derivado.

2.3 Interação membrana e AINEs

Os fármacos e as membranas celulares possuem uma relação direta, visto que a grande maioria dos fármacos tem como alvo as proteínas das células. Estudar essa interação permite o desenvolvimento de medicamentos mais potentes e eficazes. A correta interação dos fármacos com as proteínas da membrana garante o funcionamento do medicamento e sua permeabilidade na célula. Assim, as características físico-químicas do fármaco, como solubilidade e lipofilicidade, influenciam sua capacidade de atravessar a membrana e alcançar seu alvo. [64]

Estudos recentes têm demonstrado como os anti-inflamatórios podem afetar as membranas celulares. Ao interagirem com essas membranas, esses medicamentos acabam influenciando tanto a estrutura quanto a função das células. No que diz respeito à estrutura, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) podem alterar a fluidez e a permeabilidade das membranas celulares. Essas alterações estruturais podem, automaticamente, acarretar consequências nas funções das células.

A principal alteração causada pelos AINEs nas membranas celulares é a modificação da fluidez e, conseqüentemente, da permeabilidade. [2] Essas mudanças ocorrem porque muitos AINEs são anfipáticos, possuindo regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Essas propriedades permitem que os AINEs se integrem nas bicamadas lipídicas das membranas celulares, perturbando sua organização e dinâmica. Diversas pesquisas buscam entender como ocorre essa interação e demonstram que a presença de AINEs acelera o movimento lateral e interno das membranas, intensificando as perturbações na organização e dinâmica das bicamadas lipídicas. [20]

Outro efeito fundamental dos AINEs é o amolecimento das membranas na presença desses anti-inflamatórios, sendo que a magnitude desse efeito depende fortemente da estrutura química do AINE e do estado físico da membrana. [20]. A modificação da membrana pode resultar em mudanças significativas em suas propriedades biofísicas, como comportamento de fase, espessura, módulo de flexão e permeabilidade. Portanto, a elucidação desses resultados possibilita a compreensão dos potenciais efeitos no corpo que os anti-inflamatórios possam a vir a ter, tanto benéficos quanto maléficos. [65]

Diversas pesquisa, vem buscando demonstrar como os anti-inflamatórios não esteroidais podem afetar a membrana. De acordo com Sharma [20] os AINEs ao interagir com as bicamadas lipídicas afetam a temperatura de transição de fase. Em algumas circunstâncias, os AINEs podem baixar a temperatura de transição de fase, tornando a membrana mais fluida a temperaturas mais baixas do que o normal. Esta maior fluidez pode aumentar a permeabilidade da membrana, permitindo uma maior passagem de moléculas através dela, o que pode ser benéfico para a distribuição do próprio fármaco, mas também pode comprometer a função de barreira da membrana e afetar processos celulares críticos. [14]

Por outro lado, há casos em que os AINEs podem estabilizar certas fases da membrana,

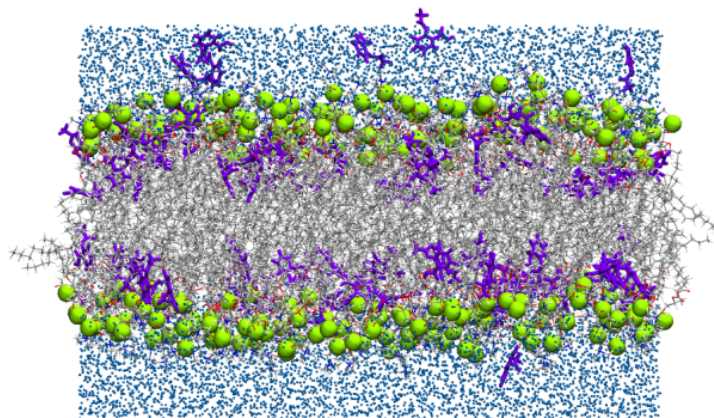


Figura 8 – Sistema de dinâmica molecular mostrando fármacos (moléculas em roxo) aco-
pladas a uma bicamada lipídica.

impedindo a transição de gel para líquido-cristalino e, portanto, tornando a membrana mais rígida. Esta rigidez aumentada pode afetar negativamente a função das proteínas de membrana, que dependem da fluidez lipídica para se moverem e funcionarem adequadamente. Estes efeitos sobre a temperatura de transição de fase não são uniformes para todos os AINEs e podem depender da estrutura química específica do fármaco e da composição lipídica da membrana.

A dinâmica molecular permite, por meio de simulações, inserir esses fármacos em biomembranas e determinar seu efeito sobre as propriedades termodinâmicas e mecânicas. Esses resultados nos fornecem uma compreensão sobre esses processos e suas interações, oferecendo insights valiosos para a formulação de medicamentos futuros.

2.4 Simulações

2.4.1 Dinâmica Molecular

Definido pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) a dinâmica molecular (DM) é um procedimento de simulação que consiste no cálculo do movimento dos átomos em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de Newton. [66, 67] Sendo assim, as simulações de DM predizem como cada átomo presente em um sistema molecular se moverá ao longo do tempo. Para isso, baseia-se na segunda lei de Newton, que afirma que a força atuando sobre uma partícula é igual à massa dessa partícula multiplicada pela aceleração ($F_{x_i} = a_i \cdot m_i$), onde F_{x_i} é a força aplicada ao átomo i na posição x , t é o tempo, v a velocidade e a_i a aceleração do átomo i como demonstra a equação 2.1.

$$F_{x_i} = \frac{d^2 x_i}{dt^2} \cdot m_i = \frac{\Delta v_i}{\Delta t} \cdot m_i = a_i \cdot m_i \quad (2.1)$$

A partir dessa equação previu-se que as simulações permitem capturar as trajetórias atômicas, incluindo as mudanças conformacionais, interações com ligantes e dobramento de proteínas, revelando as posições de todos os átomos. [68] . Sendo assim, estima-se que dadas as posições de todos os átomos em um sistema biomolecular (por exemplo, uma proteína cercada por água e talvez uma bicamada lipídica), poderia-se calcular a força exercida em cada átomo capturando cada posição e movimento dos átomos para cada ponto no tempo.

Historicamente, as primeiras simulações de DM de gases simples foram realizadas no final da década de 1950 dando início a um novo passo dentro da química teórica e experimental. Os primeiros estudos de DM focaram em sistemas simples, como gases ideais e líquidos homogêneos. [29] Passados os anos, com os avanços tecnológicos e o aumento da capacidade computacional, a DM foi estendida para sistemas mais complexos. No final de década de 1970, realizou-se a primeira simulação de DM de uma proteína, o inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI), a qual desencadeou em um Prêmio Nobel de Química em 2013. [69]

Atualmente, conforme previsto pela Lei de Moore, as simulações utilizando potenciais mais refinados e tempos de execução mais longos estão se tornando viáveis para sistemas complexos, graças ao contínuo aumento de velocidade dos computadores. [29] Porém ainda existem limitações nos métodos de simulação, uma vez que os mesmos apresentam resultados aproximados.

Sendo assim, o experimento prático desempenha um papel essencial na validação das simulações; comparações com dados experimentais servem para testar a precisão dos resultados calculados e fornecem critérios para melhorar a metodologia. [70] Quando as comparações experimentais indicam que as simulações são significativas, sua capacidade de fornecer resultados detalhados frequentemente torna possível examinar aspectos específicos dos movimentos atômicos de maneira muito mais fácil do que fazendo medições experimentais.

Para montar um sistema para simulações de dinâmica molecular, é necessário considerar diversos fatores, como o campo de força, a estabilidade numérica em nanossegundos, o tamanho do sistema e o hardware de computação. Juntamente com os algoritmos e softwares utilizados, esses fatores permitem realizar simulações mais longas, baratas e complexas. Cada escolha deve levar em conta as diferentes condições do sistema para identificar os efeitos de uma ampla variedade de perturbações moleculares [68]

2.4.1.1 Campo de Forças

Um campo de forças de uma simulação de dinâmica molecular, define-se como um conjunto de funções e dados usados para descrever os parâmetros ligados e não ligados das moléculas. [71] Os átomos presentes na DM não estão isolados, mas sim ligados a outros átomos formando moléculas que, por sua vez, interagem com outras moléculas podendo agir sob forças interatômicas e intermoleculares. O cálculo dessas forças é realizado por essa função matemática conhecida como campo de forças. [66] Esses contituem um conjunto de funções de potencial que determinam as energias associadas ao alongamento das ligações e à distorção dos ângulos de ligação (tanto de valência quanto de diedro) em uma molécula. Essas energias são avaliadas comparando a molécula em sua conformação não tensionada, caracterizada pelos valores padrão dos comprimentos e ângulos de ligação. [71]

Cada campo de força define um conjunto de equações matemáticas para descrever aspectos específicos do comportamento molecular como o alongamento de ligações químicas, a deformação de ângulos de ligação e a torção de ângulos diedros, fenômenos observáveis em técnicas experimentais (e.g. espectroscopia de infravermelho). [66] Essas equações são calibradas, ou seja, parametrizadas, para reproduzir o comportamento dos compostos de interesse e podem ser aplicadas de diversas formas, resultando em diferentes campos de forças. Para cada sistema, podemos selecionar o campo de força específico que melhor se adequa às características particulares do sistema como um todo. Assim, a escolha do campo de força apropriado permite uma modelagem mais precisa das interações interatômicas e intermoleculares, garantindo uma representação aproximada das propriedades moleculares do sistema estudado.

Outro aspecto importante consiste na descrição do sistema de simulações de DM, as quais podem ser descritas e simplificadas da seguinte maneira: *all-atom*, *united atom* e *coarse-grained (CG)*. A descrição *all-atom*, reproduz todos componentes presente no sistema, onde cada átomo é definido explicitamente como uma esfera, abordando todas as ligações na simulação e levando a um maior custo computacional dificultando sistemas maiores. Na simplificação *united atom*, temos os átomos unidos de maneira que os átomos de hidrogênio apolares, ligados a átomos de carbono, são incorporados em um pseudoátomo representando grupos com carbono. Por último temos o terceiro nível de simplificação, o modelo *coarse-grained (CG)*, o qual múltiplos átomos são agregados em uma única partícula e simplificando o sistema e permitindo simulações maiores. (ver Figura 9). [66]

Assim, a escolha do modelo, seja *all-atom*, *united-atom* ou *coarse-grained* depende de um balanço entre as características específicas e o objetivo do estudo. É importante entender que não há necessariamente um único campo ideal; mais de um pode se adequar ao sistema.

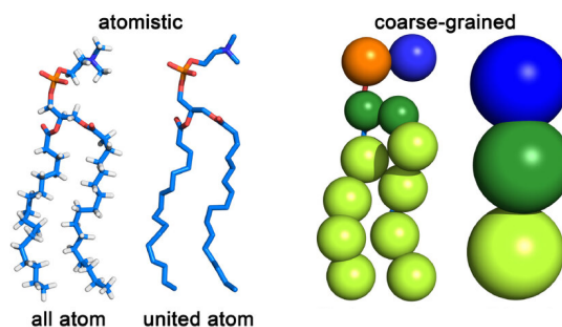


Figura 9 – Descrição atômica.
Adaptado da Ref. [72]

Tabela 2 – Descrição de possíveis sistemas de DM.

Campo de Forças	Resolução	Modelo de Água	Aplicações
AMBER	All-atom	TIP3P	Proteínas e DNA
GROMOS	United-Atom	SPC, SPC/E	Proteínas, líquidos e polímeros.
CHARMM	All-atom	TIP3P	Proteínas, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas e íons metálicos
OPLS	All-atom	TIP4P	Proteínas, RNA e líquidos
MARTINI	Coarse-Grained	MARTINI	Proteínas, lipídios, e biomoléculas maiores
SIRAH	Coarse-Grained	SIRAH	Proteínas e interações proteína-membrana.

Além dessas abordagens, é importante escolher o tipo de modelo de água adequado para a solvatação do seu sistema no campo de força. Nas simulações, assim como acontece com os campos de força, existem diversos modelos para a descrição de moléculas de água, muitas vezes com mais de uma opção disponível para um mesmo campo de força. Os modelos de água mais conhecidos para simulações, incluem SPC, SPC/E, TIP3P, TIP4P, TIP5P e Martini, adequando-se às necessidades específicas de simulação. Cada modelo de água possui sua aplicação específica em relação ao campo de força, portanto, ambos devem estar bem integrados para garantir a eficiência da simulação. [66]

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Elucidar, a partir de um ponto de vista microscópico, as interações entre as membranas plasmáticas e os AINEs através de uma abordagem computacional via dinâmica molecular all-atom buscando entender seu comportamento a partir do mecanismo de interação fármaco-membrana e assim compreender seus efeitos colaterais e auxiliar no desenvolvimento de futuros fármacos.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver diferentes simulações de dinâmica molecular all-atom das membranas lipídicas puras sem AINEs e de membranas com colesterol.
- Realizar simulações com diferentes AINEs, como aspirina, ibuprofeno e indometacina.
- Avaliar as interações e diferenças estruturais causadas na bicamada pela presença de AINEs.
- Analisar como as alterações nas propriedades estruturais, dinâmicas, mecânicas e termodinâmicas das membranas são alteradas pela presença dos fármacos, assim como, relacionar tais fenômenos com os efeitos colaterais e a ação terapêutica dos anti-inflamatórios estudados.

4 Metodologia

Afim do desenvolvimento da pesquisa, foram realizadas simulações de dinâmica molecular (DM) *all-atom*. Através dessa simulação computacional conseguimos determinar a evolução ao longo tempo dos movimentos realizados pelas partículas presente nos sistemas. [73] Sendo assim, a partir da influência de potenciais intermoleculares, pode-se prever a sequência de posições e velocidades, gerando a trajetória molecular para todo sistema. A visão dessas interações futuras auxiliou a identificar possíveis alterações de propriedades do sistema.

As simulações de dinâmica molecular foram conduzidas no software GROMACS 2023.2 com suporte a GPU. [74] Os parâmetros ligados e não-ligados das simulações *all-atom* para as membranas basearam-se no campo de força CHARMM36 (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics). [75–78] Os sistemas foram preparados na plataforma CHARMM-GUI, [79–81] onde foram equilibrados seguindo o protocolo do programa. O mesmo incluiu uma etapa de minimização e vários pequenos passos (NVT e NPT) com restrições de posição, os quais foram gradualmente aliviados até a execução da produção sem restrições, ajudando assim a membrana a se equilibrar adequadamente. [82]

As membranas presentes nos sistemas foram constituídas por lipídios DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), de acordo com os dados experimentais de Sharma et al. [20, 65]. Para cada membrana utilizou-se 256 lipídios em sua totalidade, divididos em 128 por monocamada. Os sistemas foram solvatados com 40 moléculas de água por lipídio, utilizando o modelo de água TIP3P (Transferable intermolecular potential with three points) [83]. Para a formação completa dos sistemas, os fármacos (aspirina (ASP), ibuprofeno (IBU), indometacina (IND)) e o colesterol (CHL) foram adicionadas durante a etapa de construção da bicamada, utilizando 85 moléculas de cada composto por membrana, os dados sobre a composição total dos sistemas estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição dos sistemas simulados.

Fosfolipídios		Nº de solvente	AINES		T (K)	t (ns)	Outros
Tipo	Nº de moléculas		Tipo	Nº de moléculas			
DMPC	256	10240	-	-	323,15	250	-
DMPC	256	10240	ASP	85	323,15	250	-
DMPC	256	10240	IBU	85	323,15	250	-
DMPC	256	10240	IND	85	323,15	250	-
DPMC	256	10240	-	-	323,15	250	CHL

As configurações iniciais dos sistemas estão apresentadas na Figura 10. Nela as moléculas de água, representando o meio aquoso, estão representadas em azul. As cabeças de fosfato dos fosfolipídios aparecem em verde, enquanto as cadeias de ácidos graxos ocu-

pam a região central em cinza. Os AINEs (aspirina, ibuprofeno e indometacina) estão destacados em roxo, e o colesterol é mostrado em magenta.

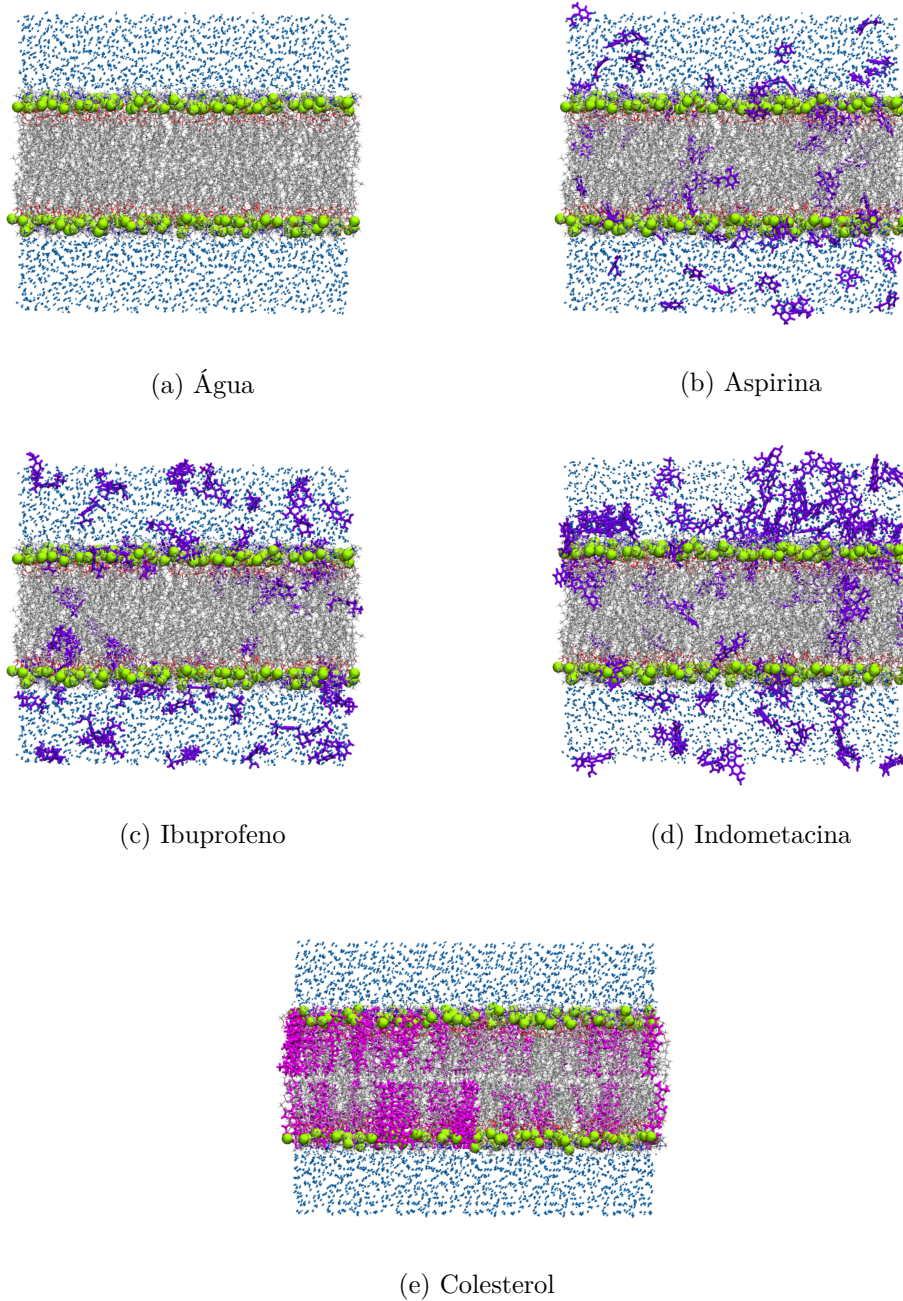


Figura 10 – Configuração inicial da simulação de DM de uma membrana. A região central da bicamada representa as cadeias dos lipídios, enquanto as moléculas de fármaco e do colesterol se encontram próximas à interface da membrana.

Devido a temperatura de transição do DMPC aproximar-se da temperatura corporal, as simulações foram realizadas a uma temperatura de 323,15 K, garantindo nessas condições a membrana em fase líquida (L_α). [9] Além disso, foram conduzidas por 250 ns em um conjunto NPT, com a temperatura controlada por um termostato V-rescale [84]. A pressão

foi ajustada para 1 bar por meio de um barostato semi-isotrópico de Parrinello-Rahman, o qual permitiu a variação do tamanho e da simetria da caixa de simulação [85, 86].

A partir dos resultados das simulações de DM, foi possível determinar os aspectos estruturais e mecânicos dos sistemas de biomembranas utilizando alguns softwares como o GROMACS e o SuAVE (Surface Assessment via Grid Evaluation). Através do SuAVE, que realiza uma interpolação radial das posições e coordenadas dos átomos, calculou-se determinadas propriedades de curvatura das membranas como área por lipídio, espessura e parâmetros de ordem. [87]. Para calcular a área por lipídio ($A_{lipidio}$), o SuAVE determina a área superficial total da membrana ocupada por um único lipídio, o que pode ser feito utilizando a seguinte fórmula. (4.1):

$$A_{lipidio} = \frac{A_{superficie}}{n_{lipidios}} \quad (4.1)$$

Para o cálculo da área de superfície ($A_{superficie}$), a área total (Eq. 4.2) foi segmentada em seções triangulares, nas quais o programa utilizou a fórmula de Heron [88] para calcular a área de cada triângulo ($A_{triangulo}$). Com base nesses cálculos a $A_{superficie}$ foi obtida pelas soma da área de cada triângulo seccionado, conforme a relação abaixo:

$$A_{superficie} = \sum A_{triangulo} \quad (4.2)$$

Na sequência o programa realizou a medida de espessura ($E_{membrana}$) da membrana, que permitiu mensurar a distância entre a superfície externa e interna, além de auxiliar no entendimento do comportamento da estrutura da bicamada sob a influência de outras moléculas. Para realizar essa medida, pode-se calcular média da soma das diferenças entre as distâncias radiais da superfície externa (r_{ext}) e interna (r_{int}) da membrana levando em conta o número de medidas temporais das simulações (NF): (Eq. 4.3)

$$E_{membrana} = \frac{\sum_{frames} (r_{ext} - r_{int})}{NF} \quad (4.3)$$

Outra análise possível foi a estimativa das interações de ligação de hidrogênio entre as diversas espécies presentes no sistema, como por exemplo, entre fármacos e lipídios, entre fármacos e água, e entre lipídios e água. As ligações de hidrogênio foram calculadas usando os critérios geométricos padrão do GROMACS, que incluem uma distância doador-aceptor de 0,35 nm e um ângulo aceptor-doador-hidrogênio menor ou igual a 30, como mostra a Figura 11 [89]

As propriedades mecânicas da bicamada são obtidas a partir das flutuações na área derivadas do acoplamento semi-isotrópico do sistema submetido ao barostato de Parrinello-Rahman. Sendo assim, o módulo de elasticidade de alongamento isotérmico (K_a) de acordo com a relação: [90]

$$K_A = k_b T \frac{\langle A \rangle}{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2} \quad (4.4)$$

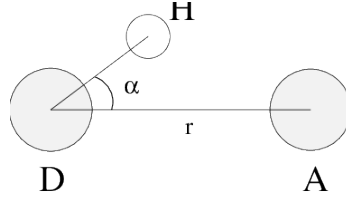


Figura 11 – Análise das ligações de hidrogênio (H-bonds) entre possíveis doadores(D) e receptores(A).

Adaptado da Ref. [74]

Na Eq. 4.4, $\langle A \rangle$ e $\langle A^2 \rangle$ são o valor médio e a flutuação quadrática média (variância) da área de uma monocamada ($A = L_x L_y$), respectivamente, k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura. O módulo de flexão (k) pode ser obtido, de forma aproximada, a partir do K_a : (Eq. 4.5) [20]

$$K_A = 24 \frac{k}{d_t^2} \quad (4.5)$$

Sendo d_t a espessura da região da bicamada composta pelas caudas alquílicas.

5 Resultados e Discussão

Após realizar os passos de minimização de energia e equilibração dos cinco sistemas simulados, obtivemos resultados que demonstram o comportamento de cada sistema em resposta à presença dos fármacos e do colesterol. Com base nesses resultados, foram capturados snapshots das configurações dos sistemas para observar as interações e organização no interior da bicama lipídica. (Figura 12)

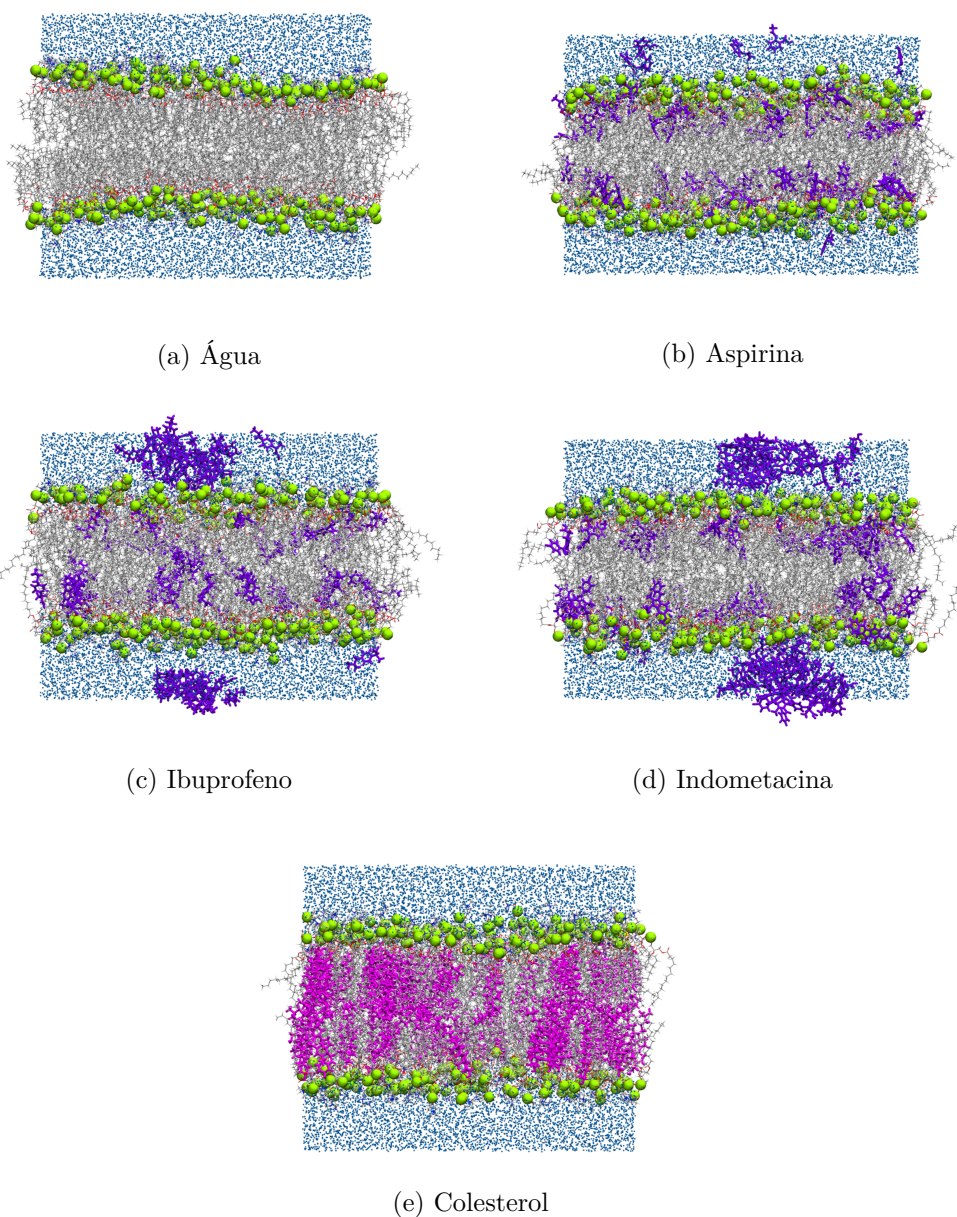


Figura 12 – *Snapshots* dos sistemas na simulação de DM de uma membrana. A região central da bicamada representa as cadeias dos lipídios, enquanto as moléculas de fármaco e do colesterol se encontram próximas à interface da membrana.

Comparando os resultados da Figura 12b, 12c, 12d, 12e com a membrana pura apresentada na Figura 12a, percebemos que tanto os fármacos quanto o colesterol interagiram com a membrana de maneiras distintas. Observamos que a aspirina (12b) foi o fármaco que mais se depositou no interior das membranas, enquanto o ibuprofeno (12c) e a indometacina (12d) posicionaram-se no interior mas também na solução aquosa ao redor da membrana.

Contrastando ambos sistemas com a configuração inicial na Figura 10, podemos observar que as moléculas de aspirina em grande maioria adentraram na membrana, diferente do ibuprofeno (12c) e da indometacina (12d) que localizaram-se no interior mas aglomeraram-se nas regiões externas da bicama. Ambos resultados demonstram uma interação entre os AINEs e os lipídios, tendo em determinados pontos maior recorrência e consequentemente influenciado nas propriedades estruturais. Na sequência percebe-se no sistema 12e que a molécula do colesterol, devido ao seu caráter anfipático, posicionou-se no interior da membrana intercalando com os fosfolipídios e assim tornando a membrana mais ordenada em relação aos outros sistemas.

5.1 Perfil de densidade

Para compreender melhor como esses fármacos interagem e se posicionam na membrana, foi realizada a análise dos perfis de densidade ao longo do eixo normal à bicamada lipídica (eixo-z). Essa análise permitiu observar a distribuição espacial de diferentes componentes da membrana, dos fármacos (aspirina, ibuprofeno, indometacina) e do colesterol dentro do sistema simulado. Além disso, os perfis revelaram como cada molécula se posicionou em relação à membrana e ao meio aquoso.

Analisando os resultados demonstrados na Figura 13, podemos observar que a membrana pura (13a) e a membrana com colesterol (13e) apresentam maior densidade quando comparada as membranas com outras moléculas. Revelando assim, um possível efeito da presença tanto da aspirina (13b) quanto do ibuprofeno (13c) e da indometacina (13d). No caso da membrana pura de DMPC (13a), observa-se uma distribuição padrão em que os lipídios se concentram na região central, enquanto a densidade da água aumenta nas bordas, representando a interface da membrana com o ambiente aquoso, refletindo assim a estrutura básica da bicamada em ausência de moléculas adicionais.

Com a adição de aspirina (13b), o perfil mostra um pico de densidade próximo ao interior da membrana, indicando que a aspirina se acumula no meio interno dos lipídios, afetando a organização da membrana. O ibuprofeno (13c) e a indometacina (13d), por sua vez, apresentam uma distribuição que se estende tanto na região aquosa quanto na região central da membrana. Isso reflete seus caráter anfipático, permitindo interações com ambas as regiões da bicamada e possivelmente causando leve alteração na densidade e fluidez na interface. Por fim, o colesterol (13e) se posicionou claramente na região central

da membrana, onde sua presença afeta o ordenamentos dos fosfolipídios, uma vez que o mesmo apresenta caráter estabilizador na estrutura, tornando a membrana mais rígida e espessa.

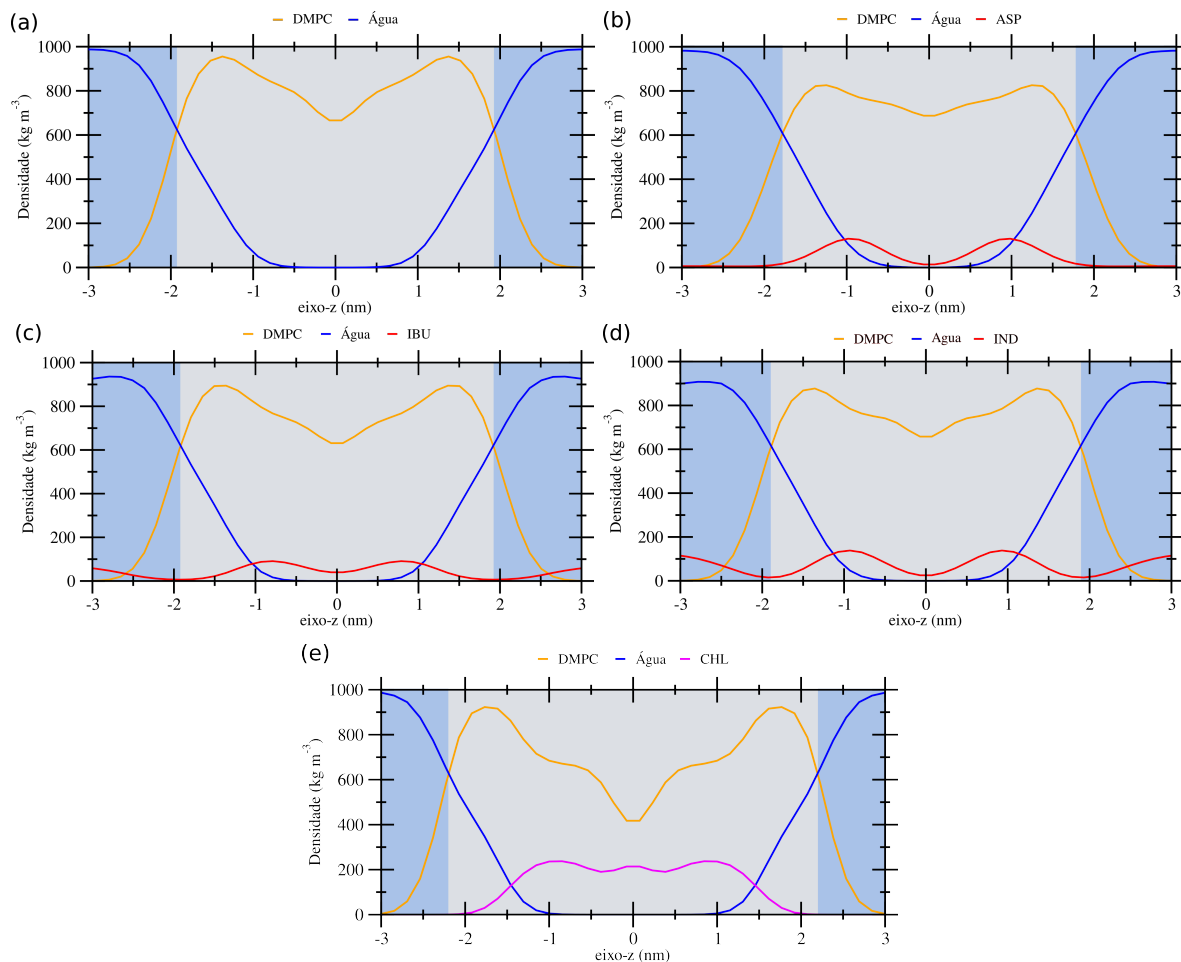


Figura 13 – Perfil de densidade das membranas de DMPC em água e com a presença do Colesterol e de fármacos como a Aspirina, Ibuprofeno e Indometacina.

5.2 Análise estrutural

A análise estrutural das membranas de DMPC, em presença de AINEs e do colesterol, revelou mudanças nas propriedades físicas e organizacionais das bicamadas lipídicas. Iniciando pela espessura das membranas, podemos observar pelo Figura 14 que a presença dos fármacos e do colesterol acarretaram em mudança de espessura.

Interpretando o gráfico vemos que a presença de aspirina (representada em roxo) na membrana de DMPC causou uma redução considerável na espessura da bicamada lipídica, sugerindo uma interação direta entre a aspirina e os lipídios. Essa interação promoveu uma reorganização das cadeias de ácidos graxos, resultando em um aumento da fluidez da membrana. Uma das principais consequências dessa redução na espessura

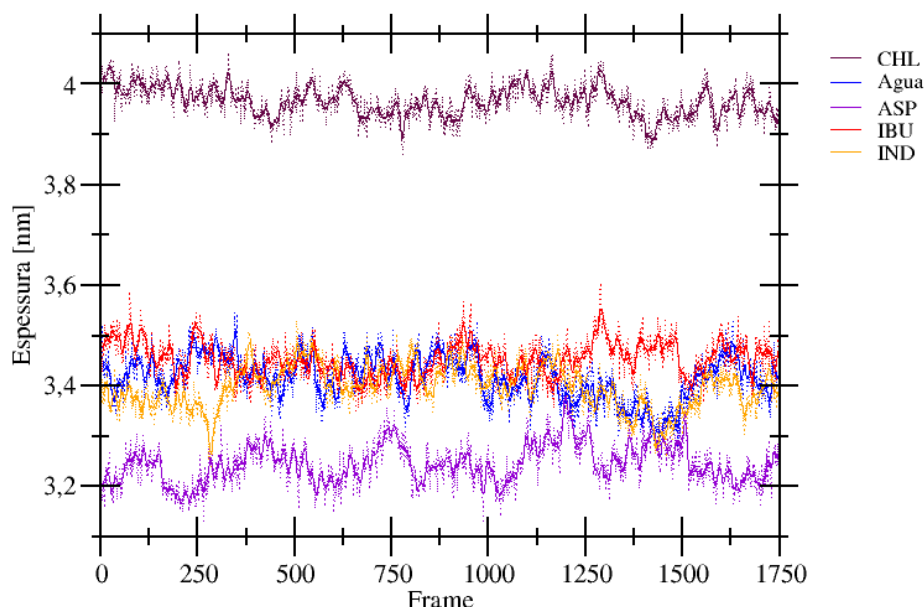


Figura 14 – Gráfico de espessura dos lipídios.

é a facilitação do movimento de moléculas através da bicamada, o que pode influenciar tanto a permeabilidade quanto a funcionalidade da membrana.

Por outro lado, o ibuprofeno (representado em vermelho) não apresentou uma mudança significativa na espessura; em algumas áreas, inclusive, observou-se um leve aumento na espessura. A indometacina (representada em laranja) exerceu um efeito intermediário entre a aspirina e o ibuprofeno: onde reduziu a espessura da membrana, mas de forma menos pronunciada que a aspirina. Por fim, o colesterol (representado em bordo), ao se intercalar entre os fosfolipídios, causou um aumento significativo na espessura da membrana em comparação tanto com a membrana pura quanto com aquelas contendo os AINEs, tornando assim a membrana mais rígida.

Para uma análise mais aprofundada dessa relação, calculamos as médias dos valores de espessura utilizando o SuaVE e o GROMACS. [74,87] Os resultados dessas medidas estruturais são apresentados nas Tabelas 4.

Através das médias obtidas no programa SuaVE [87], podemos reafirmar o percebido no gráfico acima. A presença dos AINEs afetou a espessura da membrana, tanto para valores menores como para a aspirina e para a indometacina, quanto para valores maiores como o ibuprofeno e o colesterol. Tanto para o ibuprofeno quanto para a indometacina, a ausência de uma redução abrupta na espessura da membrana pode ser relacionada à forma como essas moléculas se inserem no sistema. Diferentemente da aspirina, que se incorpora de maneira mais completa e uniforme à bicamada lipídica, o ibuprofeno e a

Tabela 4 – Valores de espessura e área por lipídio calculado pelo SuaVE e pelo GROMACS. Para ^aSuaVE, ^bGROMACS e para ^cdados experimentais obtidos por Sharma et al.

Parâmetro	DMPC	DMPC + ASP	DMPC + IBU	DMPC + IND	DMPC + CHL
<i>Espessura</i> ^a (nm)	3,42	3,25	3,45	3,39	3,95
<i>Espessura</i> ^b (nm)	3,27	3,28	3,60	3,57	4,15
<i>Espessura</i> ^c (nm)	4,71	4,36	4,43	4,61	-
<i>A_{lipidio}</i> ^a (nm ²)	0,69	0,79	0,73	0,74	0,69
<i>A_{lipidio}</i> ^b (nm ²)	0,63	0,72	0,68	0,69	0,65

indometacina não penetram totalmente na membrana. Essa inserção parcial resulta em uma interação menos intensa com as cadeias lipídicas, o que limita o impacto desses fármacos na espessura e fluidez da membrana. Assim, enquanto a aspirina promove uma reorganização significativa, o ibuprofeno e a indometacina exercem efeitos mais sutis, refletindo sua distribuição mais superficial no sistema.

Essa tendência de comportamento se assemelha com os valores experimentais, que também mostram uma alteração moderada na espessura da membrana na presença dos mesmos fármacos. De acordo com Sharma [20] os AINEs ao interagir com as bicamadas lipídicas causam um efeito na estrutura influenciando na medida de espessura. Vale ressaltar que os resultados de Sharma [20] foram obtidos para membranas a 310,15 K, enquanto nossas simulações foram realizadas a 323,15 K. Devido a essa diferença de temperatura é esperado que nossos dados apresentem diferenças em relação aos resultados experimentais, dado que temperaturas mais elevadas tendem a aumentar a fluidez da membrana e, potencialmente, reduzir sua espessura em comparação com membranas analisadas em temperaturas fisiológicas.

Para os valores obtidos pelo GROMACS, podemos notar uma discrepância em relação ao experimental. Essa discrepância se dá devido a maneira de medida realizada pelo programa, que não leva em conta as ondulações das membranas e faz uma média para cada superfície da bicamada. Ao realizar essa média não leva em conta as diferentes espessuras de toda a membrana, tornando a medida superficial e não específica como realizado pelo programa SuaVE.

Além dos valores médios, podemos observar na Figura 15 abaixo a variação da espessura da membrana em toda a superfície do sistema. As áreas em tons de azul escuro indicam maiores espessuras, enquanto os tons mais claros representam espessuras menores. Essa representação visual destaca as diferenças na organização estrutural em uma mesma membrana, refletindo a influência da curvatura sobre a espessura. Dessa forma, ao confrontar os tons na figura com os valores médios obtidos para a espessura, observa-se que a membrana na presença de aspirina e indometacina tende a exibir áreas com tons mais claros. O ibuprofeno, como mencionado anteriormente, mantém-se próximo aos tons da membrana composta apenas por água. Em contrapartida, a membrana com colesterol apresenta, em média, valores mais altos de espessura, correspondendo a tons mais escuros

vistos na imagem.

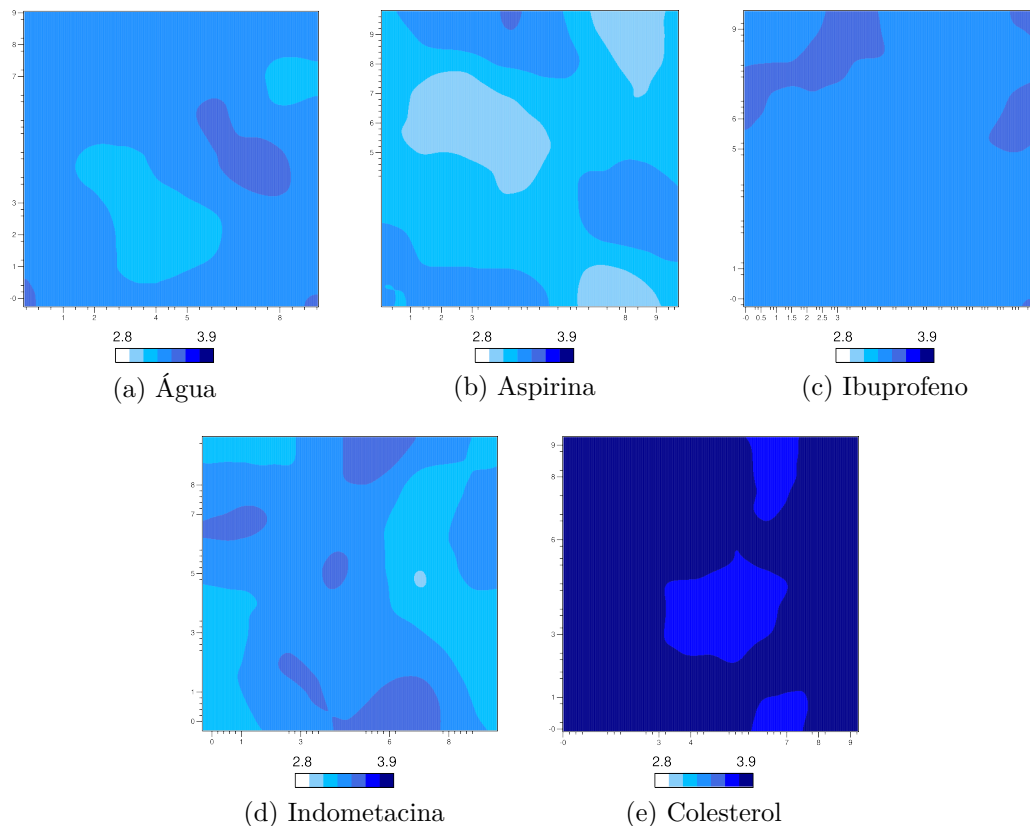


Figura 15 – Variação da espessura da membrana em todas a superfície das cabeças polares dos fosfolípidios.

Outro fator que demonstra a influência dos AINEs e do colesterol sobre os lipídios é a medida da área por lipídio ($A_{\text{lipídio}}$). Esse parâmetro permite observar o estado de organização dos lipídios presentes nas membranas, sendo quanto maior a área por lipídio, mais desordenada se encontra a organização dos mesmos. Valores maiores de área indicam um maior espaçamento entre as moléculas lipídicas, associando à transição para uma fase mais fluida. Dessa forma, a presença de AINEs aumentou a desordem e a fluidez da membrana, como mostrado nos valores da Tabela 4.

Além dos fatores estruturais de espessura e área por lipídio, podemos considerar a influência da curvatura da membrana. Membranas mais rígidas, compostas por lipídios mais ordenados, tendem a apresentar menor curvatura do que membranas mais fluidas e desordenadas. A rigidez das membranas está frequentemente associada à presença de colesterol e a uma alta organização dos lipídios, que estabiliza a bicamada e limita a mobilidade dos componentes lipídicos.

Por outro lado, membranas mais fluidas, que contêm lipídios dispostos de maneira mais desordenada, apresentam maior curvatura e, conseqüentemente, uma estrutura mais flexível. Essa flexibilidade permite que as membranas se adaptem melhor a diferentes condições e interações. Analisando o resultado abaixo, podemos observar que a presença

dos AINEs influenciou na curvatura da membrana, indicando que a indução de curvatura decresce com o aumento do ângulo. Portanto observa-se que, para a aspirina, obtivemos valores de ângulo maiores do que a membrana sem AINES, demonstrando que essas substâncias tendem a promover uma maior curvatura na membrana. Por outro lado, para o ibuprofeno e indometacina, os ângulos de curvatura foram muito semelhantes ao da membrana em água pura. Na presença de 20% de colesterol, o comportamento é oposto, na qual a membrana apresenta um menor ângulo de curvatura, indicando que a membrana está mais rígida, como observa-se na Figura 16.

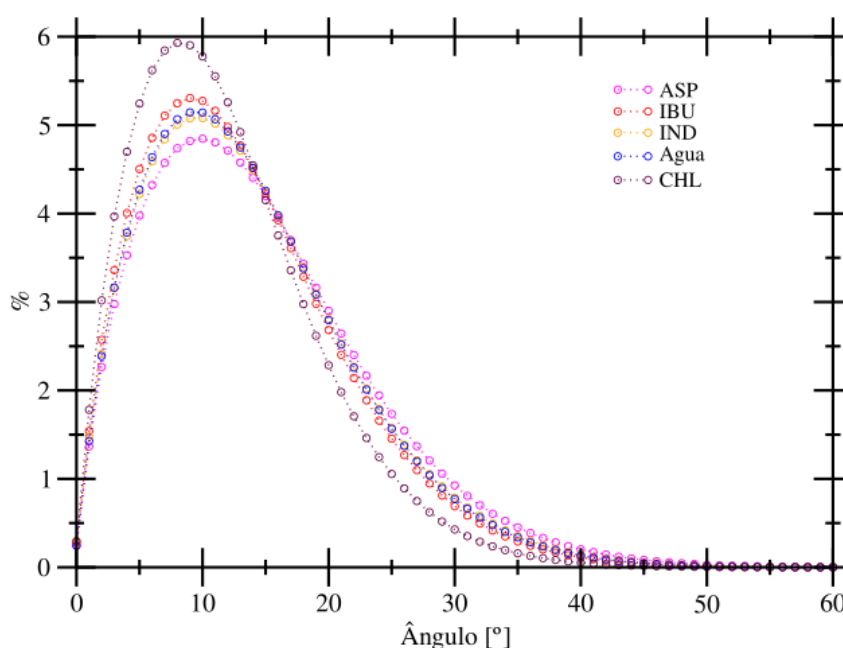
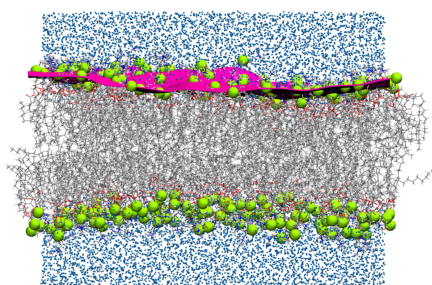


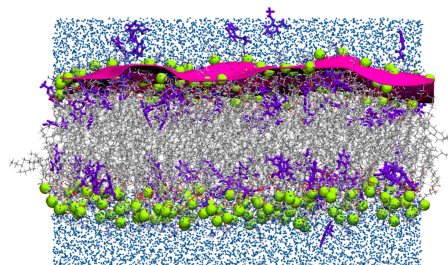
Figura 16 – Gráfico de curvatura da membrana.

Com base na diferenciação de curvatura pelos ângulos das membranas, conseguimos modular as superfícies das membranas por meio do programa SuaVE. Na Figura 17, é possível observar visualmente a influência direta das moléculas na curvatura da bicamada (representado em rosa). Nas regiões com maior presença de fármacos temos uma redução na espessura. Em compensação nas partes dos fosfolipídios em que não encontramos fármacos, temos maior espessura. O mesmo princípio porém inverso foi válido para o colesterol, o qual nas partes que temos a presença dessas moléculas a espessura aumenta.

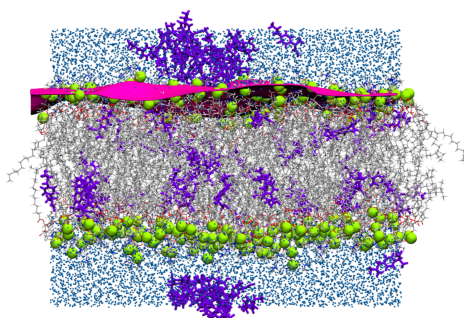
Relacionado a curvatura dos sistemas, o parâmetro de ordem das caudas reforça todas as análises mencionadas anteriormente. Na Figura 18, é possível observar a organização e a rigidez das caudas dos fosfolipídios presentes nos sistemas estudados. No eixo x, está representado o número de carbonos nas caudas, enquanto no eixo y, está o parâmetro de ordem. Valores desse parâmetro mais elevados, indicam uma maior ordem nas caudas



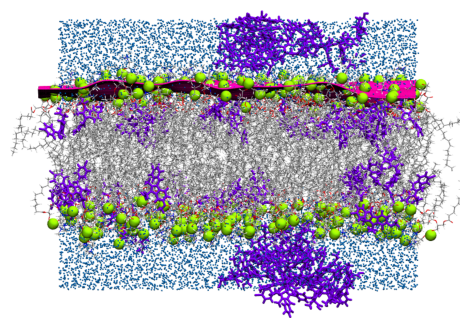
(a) Água



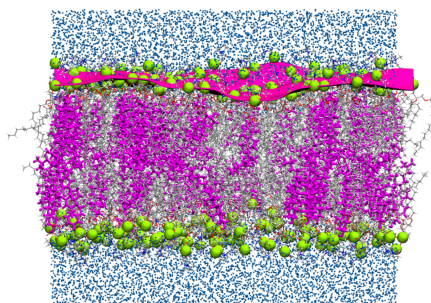
(b) Aspirina



(c) Ibuprofeno



(d) Indometacina



(e) Colesterol

Figura 17 – Snapshot da curvatura da membrana, representada em rosa, sob a influência dos AINEs e do colesterol.

dos lipídios. Dessa forma, nota-se que a membrana contendo colesterol apresenta caudas mais rígidas e organizadas, em contraste com as caudas sob a presença dos AINEs, que exibem menor rigidez, resultando em valores significativamente menores.

A observação de que tanto a aspirina quanto a indometacina reduziram a espessura das membranas em comparação com as membranas em água sugere que esses AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) estão desestabilizando a organização lipídica. Quando a espessura da membrana diminuiu, indicou que as moléculas de lipídios estão mais espaçadas e desordenadas, resultando em uma área por lipídio maior. Esse efeito também implica em uma menor rigidez da membrana e em curvaturas mais acentuadas, uma vez

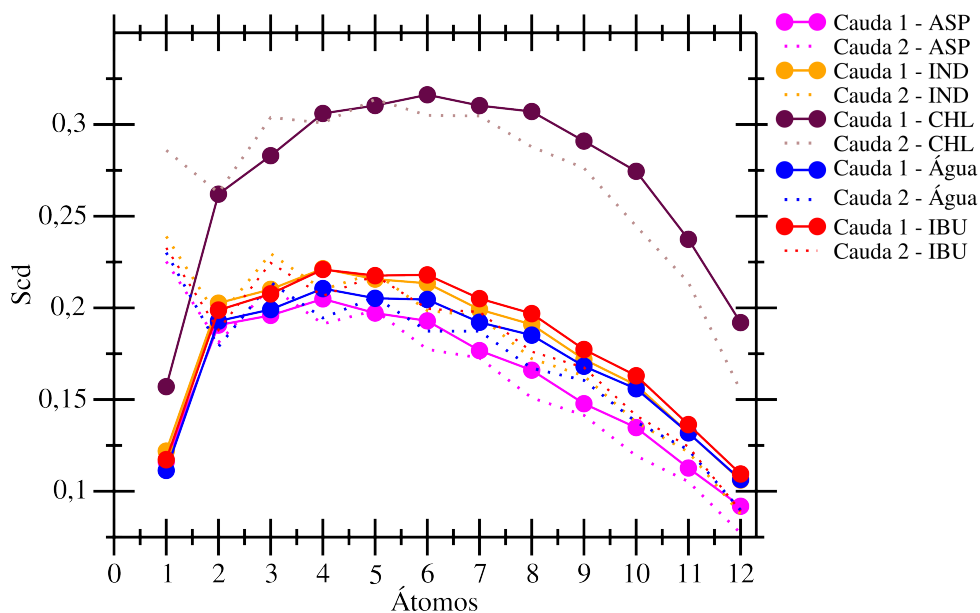


Figura 18 – Parâmetro de ordem das caudas dos fosfolípidios.

que o arranjo lipídico menos estruturado permite maior flexibilidade e menor tensão nas camadas lipídicas. Essas características podem estar associadas aos efeitos colaterais dos anti-inflamatórios e até na ação aumentada de outros medicamentos com uso concomitante.

Em relação ao ibuprofeno, observa-se uma tendência consistente de reduzir a rigidez da membrana, mesmo quando os valores de algumas propriedades, como a espessura da membrana ou a área por lipídio, não alteraram drasticamente em comparação com as condições em água. Isso indicou que o ibuprofeno impactou principalmente o comportamento dinâmico e nas propriedades elásticas da membrana, explicada nos próximos tópicos. Por fim, falando sobre o colesterol vemos que o mesmo torna a membrana mais rígida e assim lipídios mais organizados ocasionando maior espessura e área por lipídios menores.

5.3 Hidratação dos lipídios

Através da análise das ligações de hidrogênio (HBOND) dos sistemas simulados, podemos entender a organização dos lipídios nas membranas. As ligações de hidrogênio entre os AINEs e as moléculas de DMPC indicam a intensidade da interação entre o fármaco e a membrana. Portanto, através da Tabela 5, nota-se que aspirina apresenta o maior número de ligações de hidrogênio com o DMPC (29,1443), sugerindo uma influência maior em comparação com o ibuprofeno (11,177) e a indometacina (21,5058). Essa alta capacidade de formar ligações de hidrogênio pode afetar a estabilidade da membrana e sua estrutura, pois uma forte interação entre os AINEs e o DMPC acarreta na alteração da disposição das moléculas de lipídio ao redor.

Na relação entre o DMPC e as moléculas de água (SOL), os valores obtidos mostram que os sistemas contendo fármacos apresentam mais ligações de hidrogênio em comparação ao DMPC puro. Isso pode ser relacionado com o fato de que a presença de AINEs impacta a organização dos lipídios na membrana, tornando-os mais desordenados. Com os lipídios mais desorganizados, há um aumento na área por lipídio ($A_{lipidio}$), o que resulta em um maior contato com o meio aquoso e, conseqüentemente, em mais ligações de hidrogênio.

Tabela 5 – Número de ligações de hidrogênio (HBOND) entre os pares AINES - DMPC e DMPC - SOL; Número de coordenação (NC) entre os grupos AINES - P e AINES - CAUDA.

Sistema	HBOND		NC	
	AINES - DMPC	DMPC - SOL	AINES - P	AINES - CAUDA
DMPC	-	1810,51	-	-
DMPC + ASP	29,1443	1851,59	6,833	9,007
DMPC + IBU	11,1770	1837,48	4,582	6,548
DMPC + IND	21,5058	1807,82	4,881	5,069

Os valores de NC permitem analisar as interações próximas entre as moléculas dos AINEs e diferentes regiões dos lipídios de DMPC, indicando o grau de proximidade e frequência dessas interações. Conforme observado na Tabela 5, o NC entre os AINEs aspirina, ibuprofeno e indometacina é maior nas interações com as caudas hidrofóbicas dos lipídios em comparação com as cabeças polares. Isso sugere que os fármacos tendem a se posicionar mais para o interior da bicamada, conforme também é reforçado pelo perfil de densidade exibido na Figura 13.

Essa penetração na região das caudas pode aumentar a fluidez da membrana, pois a interação com as cadeias acila promove desorganização nas interações lipídicas. Esse efeito é particularmente relevante para os AINEs, pois o aumento da fluidez e da desorganização pode estar associado a potenciais efeitos adversos desta classe de fármacos.

5.4 Propriedades Mecânicas

Através das análises estruturais, foi possível observar a influência direta dos AINEs e do colesterol nas propriedades físicas da membrana. O colesterol atuou aumentando a espessura e a rigidez da membrana, criando um ambiente mais ordenado e menos suscetível a deformações e a passagem de solutos. Por outro lado, a presença dos AINEs como aspirina, ibuprofeno e indometacina exerceu um efeito contrário, especialmente no caso da aspirina, que reduziu a espessura da bicamada e aumentou a fluidez da membrana.

A partir dessas análises previamente realizadas, podemos aprofundar nossa compreensão sobre as propriedades mecânicas da membrana e como elas são moduladas pela presença do colesterol e dos AINEs (aspirina, ibuprofeno e indometacina). Os parâmetros mecânicos de análise foram o módulo de flexão (k) e o módulo de elasticidade (K_a), ambos essenciais para caracterizar a rigidez e a resistência da membrana a deformações.

Tabela 6 – Valores obtidos para módulo de elasticidade (K_a) e módulo de flexão (k).

Sistema	K_a^a	k^a	K_a^b	k^b
DMPC	190	23,18	292	15.2
DMPC + ASP	139	15,39	116	9,2
DMPC + IBU	179	22,20	166	10.2
DMPC + IND	170	20,36	243	12.3
DMPC + CHOL	260	41,69	-	-
^a simulação ^b experimental				

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos tanto para o módulo de elasticidade (K_a) quanto para o módulo de flexão (k) em diferentes sistemas de membranas. Inicialmente através do módulo de elasticidade (K_a), podemos prever o quão fluida ou rígida a membrana tornou-se nas simulações. Observa-se que o valor de K_a obtido na simulação para o sistema DMPC puro foi de 190 mN/m e que ao adicionarmos os AINEs tivemos uma redução nesses valores.

Diminuir o valor de K_a representa que as moléculas de fármacos afetaram as membranas em relação às propriedades mecânicas, levando a uma diminuição na rigidez da membrana e tornando a mesma mais elástica. Especificamente, a aspirina apresenta o menor valor de K_a (139 mN/m), seguida pela indometacina (170 mN/m) e pelo ibuprofeno (179 mN/m), mostrando que a aspirina afeta mais significativamente a elasticidade da membrana. Esses valores demonstram a ação dessas moléculas sobre membrana tornando-a mais elástica e mais suscetível a deformações. Em contraste, o aumento substancial do valor de K_a (260 mN/m), reforça que temos maior rigidez da membrana.

Portanto podemos notar pelos valores que ao diminuir a constante K_a , as membranas tornam-se mais elásticas e flexíveis apresentando assim relação com as propriedades estruturais observadas nos tópicos anteriores. O contrário dessa relação é confirmado para o colesterol que como visto anteriormente induz a uma organização mais rígida da membrana e a uma menor elasticidade. Além disso, podemos comparar os valores obtidos nas simulações com os valores obtidos experimentalmente por Sharma [20], que reafirmam os resultados obtidos nas simulações e as influências dos AINEs nas membranas.

Para os valores de k , que refletem uma membrana mais ondulada, obteve-se novamente a variação conforme a composição. A membrana de DMPC pura simulada apresentou maior k quando comparada as membranas com os fármacos. Sendo assim, podemos afirmar que a presença dos AINEs reduziu os valores, tornando a membrana mais flexível e mais suscetível a deformações do que pura ou do que com o colesterol. A aspirina foi o AINEs de menor valor (15,39), indicando que a presença do fármaco aumentou a flexibilidade e a curvatura da membrana. Essa medida reafirma a observação da Figura 16 onde a aspirina apresentou um ângulo de curvatura superior do que da membrana pura confirmando a deformação da superfície da bicamada. A mesma análise pode ser obtida para os sistemas com o ibuprofeno e com a indometacina que tiveram um aumento de flexibilidade. Para o colesterol, observou-se um valor muito alto de k (41,69), o que condiz

com uma membrana menos flexível e com menor ângulo de curvatura.

Compactando os resultados para as propriedades mecânicas, vemos que ambos dados indicam que os AINEs e o colesterol têm efeitos opostos nas propriedades mecânicas da membrana: enquanto os AINEs tendem a suavizar a membrana (aumentando a flexibilidade e a curvatura), o colesterol aumenta a rigidez e a estabilidade estrutural.

6 Conclusão

O presente estudo explorou como diferentes substâncias incluindo o colesterol e os AINEs (aspirina, ibuprofeno e indometacina) afetaram as propriedades estruturais, dinâmicas e mecânicas de membranas modelo de DMPC. Ao longo da análise, observou-se que o colesterol atuou como um estabilizador, aumentando a espessura da bicamada e promovendo maior organização e rigidez dos lipídios. Devido a rigidez dos lipídios, tivemos tanto o módulo de elasticidade (K_a) quanto o módulo de flexão (k) apresentando valores maiores do que quando comparados a membrana pura com DMPC. Esses efeitos podem ser explicados devido ao caráter anfifílico do colesterol, o qual se intercala entre os lipídios aumentando a estabilidade e a resistência da membrana a deformações, tornando-a assim menos permeável a moléculas externas.

Os AINEs exerceram efeitos variados. A aspirina, por exemplo, reduziu a espessura e induziu uma desordem na organização lipídica, resultando em uma maior fluidez. Além disso para as propriedades mecânicas tivemos maior flexibilidade e elasticidade observada na presença de aspirina, sugerindo uma bicamada mais propensa a curvaturas e com maior permeabilidade, o que pode afetar processos biológicos e até mesmo correlacionar com possíveis efeitos colaterais dos fármacos. Para o ibuprofeno e para indometacina tivemos efeitos intermediários: embora os mesmos também promovam mudanças na organização e na fluidez, seus impactos sobre a espessura e rigidez da membrana foram menos pronunciados em comparação com a aspirina. Vale ressaltar, que mesmo com o efeito não tão acentuado ainda tivemos alterações nas propriedades das membranas revelando assim a influências dos mesmos nas membranas.

Outro ponto relevante foi a análise do parâmetro de ordem de curvatura, que revelou uma relação entre a organização dos lipídios e a flexibilidade da membrana. Observamos que membranas mais ordenadas, como as com colesterol, apresentam menor curvatura e maior resistência a deformações, enquanto membranas com AINEs, especialmente aspirina, tendem a apresentar maior curvatura devido à flexibilidade aumentada e ao efeito desorganizacional. A partir dessas observações, conclui-se que substâncias exógenas, como fármacos e componentes lipídicos, podem modular significativamente as propriedades físico-químicas das membranas. Tais modificações impactam diretamente sua funcionalidade, incluindo permeabilidade e capacidade de responder a estímulos externos. Esse conhecimento pode ser fundamental para entender como diferentes compostos influenciam a dinâmica e estabilidade de membranas biológicas, explicar possíveis efeitos colaterais e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem entender as interações das membranas com moléculas,

7 Perspectivas

Após desenvolvido o Trabalho de Conclusão de Curso, podemos pensar em passos futuros a ser seguidos dentro da pesquisa.

- Desenvolver simulações de dinâmica molecular all-atom mais complexas, abrangendo outros componentes presentes nas membranas celulares.
- Realizar simulações com Anti-Inflamatórios Não Esteroides Seletivos.
- Formular outras maneiras de inserção dos fármacos na membrana.

Referências

- [1] J. K. Seydel and M. Wiese, *Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution, modeling*. John Wiley & Sons, 2009.
- [2] M. Lucio, J. Lima, and S. Reis, “Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry,” *Current medicinal chemistry*, vol. 17, no. 17, pp. 1795–1809, 2010.
- [3] C. Pereira-Leite, C. Carneiro, J. X. Soares, C. Afonso, C. Nunes, M. Lúcio, and S. Reis, “Biophysical characterization of the drugmembrane interactions: The case of propranolol and acebutolol,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 84, no. 1, pp. 183–191, 2013.
- [4] C. Peetla, A. Stine, and V. Labhasetwar, “Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery,” *Molecular pharmaceutics*, vol. 6, no. 5, pp. 1264–1276, 2009.
- [5] Y. Wang, I. S. Krull, C. Liu, and J. D. Orr, “Derivatization of phospholipids,” *Journal of Chromatography B*, vol. 793, no. 1, pp. 3–14, 2003. Derivatization of Large Biomolecules.
- [6] A.-I. Bunea, S. Harloff-Helleberg, R. Taboryski, and H. M. Nielsen, “Membrane interactions in drug delivery: Model cell membranes and orthogonal techniques,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 281, p. 102177, 2020.
- [7] M. Stepniewski, “Computational studies on membrane proteins and membrane-drug interactions,” 2016.
- [8] M. S. Bretscher, “Membrane structure: Some general principles,” *Science*, vol. 181, no. 4100, pp. 622–629, 1973.
- [9] D. Drabik, G. Chodaczek, S. Kraszewski, and M. Langner, “Mechanical properties determination of dmpe, dppc, dspc, and hspc solid-ordered bilayers,” *Langmuir*, vol. 36, no. 14, pp. 3826–3835, 2020.
- [10] R. Holzlöhner, *Mesosopic and statistical properties of fluctuating membranes*. PhD thesis, MSc thesis, Technische Universität, Berlin, 1998.
- [11] S. Eletr, M. Williams, T. Watkins, and A. Keith, “Perturbations of the dynamics of lipid alkyl chains in membrane systems: Effect on the activity of membrane-bound enzymes,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 339, no. 2, pp. 190–201, 1974.

- [12] M. Lúcio, F. Bringezu, S. Reis, J. L. F. C. Lima, and G. Brezesinski, “Binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to dppc: structure and thermodynamic aspects,” *Langmuir*, vol. 24, no. 8, pp. 4132–4139, 2008. PMID: 18336047.
- [13] C. Nunes, G. Brezesinski, C. Pereira-Leite, J. L. F. C. Lima, S. Reis, and M. Lúcio, “Nsaids interactions with membranes: A biophysical approach,” *Langmuir*, vol. 27, no. 17, pp. 10847–10858, 2011. PMID: 21790169.
- [14] M. Manrique-Moreno, L. Heinbockel, M. Suwalsky, P. Garidel, and K. Brandenburg, “Biophysical study of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaid) ibuprofen, naproxen and diclofenac with phosphatidylserine bilayer membranes,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1858, no. 9, pp. 2123–2131, 2016.
- [15] L. M. Lichtenberger, Y. Zhou, V. Jayaraman, J. R. Doyen, R. G. O’Neil, E. J. Dial, D. E. Volk, D. G. Gorenstein, M. B. Boggara, and R. Krishnamoorti, “Insight into nsaid-induced membrane alterations, pathogenesis and therapeutics: Characterization of interaction of nsaids with phosphatidylcholine,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1821, no. 7, pp. 994–1002, 2012.
- [16] J. R. Vane and R. M. Botting, “Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action,” *Inflammation Research*, vol. 47, pp. 78–87, 1998.
- [17] M. van Laar, J. V. Pergolizzi Jr, H.-U. Mellinshoff, I. M. Merchante, S. Nalamachu, J. O’Brien, S. Perrot, and R. B. Raffa, “Pain treatment in arthritis-related pain: beyond nsaids,” *The open rheumatology journal*, vol. 6, p. 320, 2012.
- [18] S. T. Mathew, G. Devi S, V. Prasanth, and B. Vinod, “Efficacy and safety of cox-2 inhibitors in the clinical management of arthritis: Mini review,” *International Scholarly Research Notices*, vol. 2011, no. 1, p. 480291, 2011.
- [19] C. Pereira-Leite, M. Figueiredo, K. Burdach, C. Nunes, and S. Reis, “Unraveling the role of drug-lipid interactions in nsaids-induced cardiotoxicity,” *Membranes*, vol. 11, no. 1, p. 24, 2020.
- [20] V. Sharma, M. Nagao, D. K. Rai, and E. Mamontov, “Membrane softening by nonsteroidal anti-inflammatory drugs investigated by neutron spin echo,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 21, no. 36, pp. 20211–20218, 2019.
- [21] M. Sastre and S. M. Gentleman, “Nsaids: how they work and their prospects as therapeutics in alzheimer’s disease,” *FRONTIERS IN AGING NEUROSCIENCE*, vol. 2, MAY 18 2010.

- [22] A. Gupta and M. Bah, “Nsaid in the treatment of postoperative pain,” *Current pain and headache reports*, vol. 20, pp. 1–14, 2016.
- [23] A. Zarghi and S. Arfaei, “Selective cox-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships,” *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, vol. 10, no. 4, p. 655, 2011.
- [24] J. R. Vane and J. H. Botting, *Selective COX-2 inhibitors: Pharmacology, clinical effects and therapeutic potential*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [25] E. Ricciotti and G. A. FitzGerald, “Prostaglandins and inflammation,” *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 31, no. 5, pp. 986–1000, 2011.
- [26] P. Dubey, V. Sharma, H. Srinivasan, S. Mitra, V. G. Sakai, and R. Mukhopadhyay, “Effects of nsaid on the dynamics and phase behavior of lipid bilayers,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 122, no. 43, pp. 9962–9972, 2018.
- [27] C. Pereira-Leite, C. Nunes, and S. Reis, “Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: in vitro assessment and relevance for their biological actions,” *Progress in lipid research*, vol. 52, no. 4, pp. 571–584, 2013.
- [28] T. Hansson, C. Oostenbrink, and W. van Gunsteren, “Molecular dynamics simulations,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, no. 2, pp. 190–196, 2002.
- [29] M. Karplus and J. A. McCammon *Nature Structural Biology*, vol. 9, no. 9, pp. 646–652, 2002.
- [30] L. Sherwood, R. T. Kell, and C. Ward, “Human physiology: from cells to systems,” 2004.
- [31] E. Bianconi, A. Piovesan, F. Facchin, A. Beraudi, R. Casadei, F. Frabetti, L. Vitale, M. C. Pelleri, S. Tassani, F. Piva, *et al.*, “An estimation of the number of cells in the human body,” *Annals of human biology*, vol. 40, no. 6, pp. 463–471, 2013.
- [32] D. M. Engelman, “Membranes are more mosaic than fluid,” *Nature*, vol. 438, no. 7068, 2005.
- [33] P. Murador and E. Deffune, “Aspectos estruturais da membrana eritrocitária,” *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 29, pp. 168–178, 2007.
- [34] L. Vigh, P. V. Escribá, A. Sonnleitner, M. Sonnleitner, S. Piotto, B. Maresca, I. Horváth, and J. L. Harwood, “The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function,” *Progress in lipid research*, vol. 44, no. 5, pp. 303–344, 2005.

- [35] C. Anamourlis, “The cell membrane,” *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*, pp. S1–S7, 11 2020.
- [36] M. E. G. . H. HALL, John E.; HALL, “Fundamentos de fisiologia,” *Grupo GEN*, 2023.
- [37] C. M. MacDermaid, H. K. Kashyap, R. H. DeVane, W. Shinoda, J. B. Klauda, M. L. Klein, and G. Fiorin, “Molecular dynamics simulations of cholesterol-rich membranes using a coarse-grained force field for cyclic alkanes,” *The Journal of chemical physics*, vol. 143, no. 24, 2015.
- [38] H. Palsdottir and C. Hunte, “Lipids in membrane protein structures,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1666, no. 1, pp. 2–18, 2004. Lipid-Protein Interactions.
- [39] M. Bogdanov and W. Dowhan, “Lipid-assisted protein folding,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 52, pp. 36827–36830, 1999.
- [40] W. Stillwell, *An introduction to biological membranes: composition, structure and function*. Elsevier, 2016.
- [41] A.-I. Bunea, S. Harloff-Helleberg, R. Taboryski, and H. M. Nielsen, “Membrane interactions in drug delivery: Model cell membranes and orthogonal techniques,” *Advances in colloid and interface science*, vol. 281, p. 102177, 2020.
- [42] G. L. Nicolson, “The fluidmosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1838, no. 6, pp. 1451–1466, 2014. Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell’s Physiology, Pathology and Therapy.
- [43] H. N. Jaramillo and P. J. Patiño, “Estructura de la membrana celular.,” *Fondo Editorial Biogénesis*, pp. 37–49, 2006.
- [44] R. Lewis and R. N. McElhaney, “The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers,” *The structure of biological membranes*, vol. 2, 1992.
- [45] R. N. Lewis and R. N. McElhaney, “Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by fourier transform infrared spectroscopy,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1828, no. 10, pp. 2347–2358, 2013.
- [46] J. Startek, B. Boonen, K. Talavera Perez, and V. Meseguer, “Trp channels as sensors of chemically-induced changes in cell membrane mechanical properties,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, p. 371, 01 2019.

- [47] G. van Meer and Q. Lisman, “Sphingolipid transport: rafts and translocators,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 29, pp. 25855–25858, 2002.
- [48] D. Chapman, “Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes,” *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 8, no. 2, pp. 185–235, 1975.
- [49] R. Koynova and B. Tenchov, *Phase Transitions and Phase Behavior of Lipids*, pp. 1841–1854. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [50] M. Eeman and M. Deleu, “From biological membranes to biomimetic model membranes,” *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol. 14, 01 2010.
- [51] D. Nelson and M. Cox, “Lehninger principios de bioquímica,” 01 2001.
- [52] M. Ugurlucan, I. M Caglar, F. N Turhan Caglar, S. Ziyade, O. Karatepe, Y. Yildiz, E. Zencirci, F. Gungor Ugurlucan, A. H Arslan, S. Korkmaz, *et al.*, “Aspirin: from a historical perspective,” *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery (Discontinued)*, vol. 7, no. 1, pp. 71–76, 2012.
- [53] D. I. BRAGHIROLI *et al.*, “Farmacologia aplicada,” *Grupo A*, 2018.
- [54] J. M. da Silva, P. P. Mendonça, and A. K. Partata, “Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais,” *Rev Cient ITPAC [Internet]*, vol. 7, no. 4, pp. 5–12, 2014.
- [55] L. Laine, “Gastrointestinal effects of nsoids and coxibs,” *Journal of Pain and Symptom Management*, vol. 25, no. 2, Supplement, pp. 32–40, 2003.
- [56] R. O. Day and G. G. Graham, “Non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsoids),” *Bmj*, vol. 346, 2013.
- [57] J. Frölich, “A classification of nsoids according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 18, no. 1, pp. 30–34, 1997.
- [58] S. Bindu, S. Mazumder, and U. Bandyopadhyay, “Non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsoids) and organ damage: A current perspective,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 180, p. 114147, 2020.
- [59] H. R. Herschman and W. Hall, “Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 13, pp. 241–256, 1994.
- [60] B. L. d. Rosa *et al.*, “Uso de aines associados à antileucotrienos em pacientes asmáticos: seus riscos e alternativas,” 2016.
- [61] A. Terapêuticos, “Analgésicos inibidores específicos da ciclooxygenase-2,” *Revista Brasileira de Anestesiologia*, vol. 54, no. 3, pp. 448–464, 2004.

- [62] W. Carvalho, “Anti-inflamatórios não esteroides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota,” *SILVA, Penildo. Farmacologia*, vol. 8, pp. 439–466, 2012.
- [63] N. K. Panchal and E. Prince Sabina, “Non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids): A current insight into its molecular mechanism eliciting organ toxicities,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 172, p. 113598, 2023.
- [64] J. Knobloch, D. K. Suhendro, J. L. Zieleniecki, J. G. Shapter, and I. Köper, “Membrane–drug interactions studied using model membrane systems,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 22, no. 6, pp. 714–718, 2015.
- [65] V. Sharma, E. Mamontov, and M. Tyagi, “Effects of nsaids on the nanoscopic dynamics of lipid membrane,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1862, no. 2, p. 183100, 2020.
- [66] H. Verli, “Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular,” *Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 2014.
- [67] “molecular dynamics,” 2019.
- [68] S. A. Hollingsworth and R. O. Dror, “Molecular dynamics simulation for all,” *Neuron*, vol. 99, no. 6, pp. 1129–1143, 2018.
- [69] M. Karplus, M. Levitt, and A. Warshel, “The nobel prize in chemistry 2013,” *Nobel Media AB 2014*, 2013.
- [70] M. P. Allen *et al.*, “Introduction to molecular dynamics simulation,” *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, vol. 23, no. 1, pp. 1–28, 2004.
- [71] C. Sant’Anna, “Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da iupac para 1997),” *Química Nova*, vol. 25, 05 2002.
- [72] K. Pluhackova and R. Böckmann, “Biomembranes in atomistic and coarse-grained simulations,” *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal*, vol. 27, p. 323103, 07 2015.
- [73] N. H. Morgon and K. R. Coutinho, “Métodos de química teórica e modelagem molecular,” 2007.
- [74] M. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS development team, *GROMACS User Manual version 2023*.
- [75] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. de Groot, H. Grubmüller, and A. D. MacKerell *Nature Methods*, vol. 14, no. 1, pp. 71–73, 2017.

- [76] A. D. J. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. J. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczero, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, “All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, no. 18, pp. 3586–3616, 1998. PMID: 24889800.
- [77] K. Vanommeslaeghe and A. MacKerell Jr, “Charmm additive and polarizable force fields for biophysics and computer-aided drug design,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1850, no. 5, pp. 861–871, 2015.
- [78] K. Pluhackova, S. A. Kirsch, J. Han, L. Sun, Z. Jiang, T. Unruh, and R. A. Bockmann, “A critical comparison of biomembrane force fields: structure and dynamics of model dmpc, popc, and pope bilayers,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, no. 16, pp. 3888–3903, 2016.
- [79] E. L. Wu, X. Cheng, S. Jo, H. Rui, K. C. Song, E. M. Dávila-Contreras, Y. Qi, J. Lee, V. Monje-Galvan, R. M. Venable, *et al.*, “Charmm-gui membrane builder toward realistic biological membrane simulations,” 2014.
- [80] J. Lee, D. S. Patel, J. Ståhle, S.-J. Park, N. R. Kern, S. Kim, J. Lee, X. Cheng, M. A. Valvano, O. Holst, Y. A. Knirel, Y. Qi, S. Jo, J. B. Klauda, G. Widmalm, and W. Im, “Charmm-gui membrane builder for complex biological membrane simulations with glycolipids and lipoglycans,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 15, no. 1, pp. 775–786, 2019.
- [81] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im, “Charmm-gui: A web-based graphical user interface for charmm,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 29, no. 11, pp. 1859–1865, 2008.
- [82] J. Lee, X. Cheng, J. M. Swails, M. S. Yeom, P. K. Eastman, J. A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J. C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V. S. Pande, D. A. Case, C. L. I. Brooks, A. D. J. MacKerell, J. B. Klauda, and W. Im, “Charmm-gui input generator for namd, gromacs, amber, openmm, and charmm/openmm simulations using the charmm36 additive force field,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 12, no. 1, pp. 405–413, 2016. PMID: 26631602.
- [83] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water,” *The Journal of chemical physics*, vol. 79, no. 2, pp. 926–935, 1983.

- [84] G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, “Canonical sampling through velocity rescaling,” *The Journal of chemical physics*, vol. 126, no. 1, 2007.
- [85] M. Parrinello and A. Rahman, “Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method,” *Journal of Applied physics*, vol. 52, no. 12, pp. 7182–7190, 1981.
- [86] M. Parrinello and A. Rahman, “Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 45, pp. 1196–1199, Oct 1980.
- [87] D. E. S. Santos, K. Coutinho, and T. A. Soares, “Surface assessment via grid evaluation (suave) for every surface curvature and cavity shape,” *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 62, no. 19, pp. 4690–4701, 2022. PMID: 35946873.
- [88] D. E. S. Santos, F. J. S. Pontes, R. D. Lins, K. Coutinho, and T. A. Soares, “Suave: A tool for analyzing curvature-dependent properties in chemical interfaces,” *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 60, no. 2, pp. 473–484, 2020. PMID: 31508962.
- [89] H. M. Baumann, *Going on Adventures With Binding Free Energy Calculations: About Pitfalls and Flashlights, Shackles and Broken Chains*. PhD thesis, University of California, Irvine, 2023.
- [90] T. E. de Oliveira, F. Leonforte, L. Nicolas-Morgantini, A.-L. Fameau, B. Querleux, F. Thalmann, and C. M. Marques, “Fluid bilayer phase in aqueous mixtures of fatty alcohol and cationic surfactant,” *Physical Review Research*, vol. 2, no. 1, p. 013075, 2020.