

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SIMULAÇÃO, POR DINÂMICA MOLECULAR, DAS INTERAÇÕES  
ÁGUA-ETANOL-NaCl COM FOSFOLIPÍDEOS DE MEMBRANA**

GUILHERME NOBRE LIMA DO NASCIMENTO

Uberlândia – MG

2013

**GUILHERME NOBRE LIMA DO NASCIMENTO**

**SIMULAÇÃO, POR DINÂMICA MOLECULAR, DAS INTERAÇÕES  
ÁGUA-ETANOL-NaCl COM FOSFOLÍPÍDEOS DE MEMBRANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química.

**Orientador:**

Dr. Antonio Eduardo da Hora Machado.

**Co-orientadores:**

Dr. Eduardo de Faria Franca;

Dr. Tales Alexandre Aversi-Ferreira.

Uberlândia, MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,  
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 22/COPGQ.**

DATA: 12/04/2013

DISCENTE: Guilherme Nobre Lima do Nascimento

MATRÍCULA: 11023QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Simulação por dinâmica molecular das interações água-etanol-nacl com fosfolípidos de membrana.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Físico-Química de Macromoléculas e Coloides

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Síntese e caracterização de novos materiais.

Às oito horas do dia doze de abril do ano dois mil e treze, no Auditório F do Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Odonório Abrahão Júnior, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Freddy Fernandes Guimarães, da Universidade Federal de Goiás; Leonardo Tsuyoshi Ueno e Antonio Otavio de Toledo Patrocínio, do Instituto de Química da UFU e Antonio Eduardo da Hora Machado, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 02/2010/COPGQ. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

O MESMO

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 90 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 12 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Odonório Abrahão J.  
Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior – UFTM

Freddy Fernandes Guimarães  
Prof. Dr. Freddy Fernandes Guimarães – UFG

Leonardo T. Ueno  
Prof. Dr. Leonardo Tsuyoshi Ueno – FACIP/UFU

Antonio Otavio de Toledo Patrocínio  
Prof. Dr. Antonio Otavio de Toledo Patrocínio –  
IQUFU

Antonio Eduardo da Hora Machado  
Orientador : Prof. Dr. Antonio Eduardo da Hora Machado – IQUFU

A Deus, aos meus pais:  
José Nobre e  
Elizabeth Lima,  
meus irmãos Márcio e  
Jackeline, minha  
esposa Lúcia Helena.  
Obrigado por acreditarem!

## AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus pela vida e por todas as oportunidades de crescimento;
- ✓ Aos meus familiares, pelo carinho, amor, amizade e suporte;
- ✓ A minha esposa Lúcia Helena Almeida Gratão pela paciência, carinho e apoio;
- ✓ Ao professor e orientador Antonio Eduardo da Hora Machado pela confiança, ensinamentos, paciência e apoio;
- ✓ Ao professor e co-orientador Tales Alexandre Aversi-Ferreira, pelo incentivo, paciência, ensinamentos e amizade, e sua família, Roqueline e Emmanuel;
- ✓ Ao professor e co-orientador Eduardo de Faria Franca pela ajuda, ensinamentos e paciência;
- ✓ A todos os amigos e alunos do LABINECOP/LACIBS pelo carinho e apoio;
- ✓ Aos colegas do LCQC e LAFOT-CM, UFU;

**Obrigado a todos!**

Fui à floresta porque queria  
viver profundamente...  
... e sugar a essência da vida!  
Eliminar tudo que não era vida...  
E não, ao morrer, descobrir  
que não vivi.  
(H. D. Thoreau – D.P.S.)  
Scire, potere, audere, tacere

## RESUMO

Eritrócitos, hemácias ou células vermelhas do sangue, são células únicas dentre as células de mamíferos. São isentas de organelas e núcleo, contendo em seu interior hemoglobina, circundada por uma membrana celular. Responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos, e dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões, o que torna sua integridade importante para o bom funcionamento de todo o organismo. Uma das substâncias que podem gerar efeito sobre a membrana de eritrócitos é o etanol, encontrado em uma grande variedade de produtos. Neste trabalho, estudou-se o efeito das interações entre etanol, água e cloreto de sódio e fosfolipídeos de membrana, usando ensaios experimentais combinados a abordagem de dinâmica molecular. O sangue de dois ratos jovens foi utilizado nos ensaios de fragilidade osmótica de eritrócitos com concentrações crescentes de etanol, de 0 a 50% (v/v). Paralelamente, um estudo teórico envolvendo simulações por dinâmica molecular foi realizado, usando o pacote computacional GROMACS, onde se empregou dipalmitoilfosfatidilcolina – DPPC como modelo de membrana. Nas simulações, empregou-se o campo de força GROMOS 53a6, considerando um tempo de 60 ns para cada sistema com concentrações diferentes de etanol. Os resultados experimentais mostram que com o aumento da concentração de etanol há aumento da lise celular dos eritrócitos. No entanto, a partir de valores próximos a 35% (v/v), a lise é diminuída. Os dados teóricos ilustraram a afinidade do etanol pelos lipídeos de membrana, gerando alterações na orientação das cargas ao longo das bicamadas, formação de poros, alteração na permeabilidade pela mesma e deformações na maior concentração. Constata-se, com este estudo, que o efeito deletério do etanol sobre a membrana de eritrócitos não é dose-dependente e que o mesmo atua diretamente, por interações, com a estrutura da bicamada lipídica.

**Palavras-chave:** Etanol, lipídeos de membrana, álcool, simulação de dinâmica molecular.

## ABSTRACT

Erythrocytes or red blood cells are single cells among mammalian cells. They contain no organelles and nucleus, containing hemoglobin inside, surrounded by a membrane. They are responsible for transporting oxygen from the lungs to tissues and carbon dioxide from tissues to the lungs, which makes its integrity important for the proper functioning of the whole organism. One of the substances that may cause effects on erythrocyte membrane is ethanol, found in a wide variety of products. In this work, the interactions between ethanol, water and sodium chloride with membrane phospholipids was evaluated using experimental assays combined to molecular dynamics approach. The blood of two young rats was used to evaluate the effect of increasing concentrations of ethanol, 0-50% (v/v) on the osmotic fragility of the cells. In addition, a theoretical study involving molecular dynamics simulation was performed using the software package GROMACS, in which dipalmitoylphosphatidylcholine - DPPC was used as membrane model. GROMOS 53a6 force field was used in the computer simulations, considering a time of 60 ns for each system. The experimental results show that increasing ethanol concentration raises the lyse of the erythrocytes. However, for values higher or equal to 35% (v/v), the lysis is reduced. The theoretical data illustrated the affinity of ethanol by the membrane lipids, generating changes in the charge orientation along the bilayer, forming pores, changing the permeability and deforming the bilayer in high concentration of ethanol. It is noted, in this study, that the deleterious effect of ethanol on the erythrocyte membrane is non-dose dependent and that it acts, by interaction, with the structure of the lipid bilayer.

**Keywords:** Ethanol, lipid membrane, alcohol, molecular dynamics simulation.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Modelo de membrana celular, ilustrando o movimento horizontal, vertical e flip-flop dos lipídeos.....  | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Modelo mosaico fluido da estrutura de uma membrana celular evidenciando a bicamada lipídica e demais constituintes (MURADOR e DEFFUNE, 2007). ME = meio extracelular; MI = meio intracelular. ....   | 3  |
| <b>Figura 3.</b> Eletromicrografia de membrana celular de eritrócito humano (100.000X) (ROBERTSON, 1981). ....  | 4  |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura da membrana de um eritrócito evidenciando os domínios da bicamada e do citoesqueleto. (F – fosfatidilcolina; ES – esfingomielina; PI – proteína integral; CL – colesterol; FS – fosfatidilserina; FE – fosfatidiletanolamina). ....  | 6  |
| <b>Figura 5.</b> Eletromicrografia de diferentes formas de eritrócitos; discoide (D), estomatócito (S) e equinócito (E). (ELGSAETER et al., 1986). ....   | 7  |
| <b>Figura 6.</b> Estrutura molecular do etanol (bolas azuis: carbono; bolas brancas: hidrogênio e bola vermelha: oxigênio).....   | 8  |
| <b>Figura 7.</b> Representação esquemática das ações do etanol sobre eritrócitos em solução salina. Eritrócitos podem existir em estados morfológicos estomatócitos (S) ou um estado equinócitos (D). Cada estado morfológico pode representar um conjunto de formas diferentes. Baixas concentrações de etanol promovem a lise do estado S (rota 1). As concentrações de etanol intermediárias promovem a conversão dos eritrócitos do estado S para o estado D (rota 2) através do aumento da pressão osmótica. Altas concentrações de etanol promovem a lise do estado D (rota 3) (PENHA-SILVA et al., 2008). .... | 10 |
| <b>Figura 8.</b> Criança com síndrome alcoólica fetal (RIBEIRO et al., 1995). ....  | 11 |
| <b>Figura 9.</b> Representação de uma molécula em modelagem molecular (esferas: átomos; molas: ligações). ....  | 14 |
| <b>Figura 10.</b> A) Deformação no comprimento (estiramento) de ligação; B) deformação no ângulo de ligação; C) ângulo de torção; D) Interações de van der Waals. ....  | 15 |
| <b>Figura 11.</b> Estrutura de diferentes fosfolipídeos utilizados em simulações de dinâmica molecular. (A: DPPC - dipalmitoilfosfatidilcolina; B: DOPC - dioleoilfosfatidilcolina; C: DEPC - dielaidoilfosfatidilcolina; D: DPPG- dipalmitoilfosfatidilglicerol; E: DPPE-dipalmitoilfosfatidiletanolamina). ....   | 18 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 12.</b> Fita de DNA, ilustrando as interações de hidrogênio entre nucleotídeos (LEHNINGER et al., 2007). .....   | 19 |
| <b>Figura 13.</b> Representação do raio de corte esférico em um sistema com condições periódicas de contorno (EDUARDO, 2009). .....  | 21 |
| <b>Figura 14.</b> Representação de um sistema com condições periódicas de contorno para o método da soma de Ewald (EDUARDO, 2009). .....   | 22 |
| <b>Figura 15.</b> Caixa de simulação padrão visualizada pelo programa Molden, ilustrando suas dimensões (linha verde). .....   | 25 |
| <b>Figura 16.</b> (A) Imagem gerada pelo software VMD, para a estrutura química de um dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) utilizado nas simulações; e (B) definição do número dos átomos para o lipídeo DPPC com suas respectivas cargas (PATRA et al., 2004). .....  | 26 |
| <b>Figura 17.</b> Estrutura básica de simulação, com tamanhos aproximados de cada estrutura, contendo dupla bicamada lipídica (linhas azuis), e um meio interno (M.I.) com 2413 moléculas de água (estruturas vermelhas), 7 íons Na <sup>+</sup> (esferas verdes) e 7 íons Cl <sup>-</sup> (esferas amarelas), e um meio externo (M.E.). .....   | 27 |
| <b>Figura 18.</b> A) Leitura da absorvância a 540 nm do sangue exposto a concentrações crescente de etanol. B) Imagem do sobrenadante (Linha 1: A-etanol 5% (v/v); B-etanol 10%, C-etanol 15% (v/v), D-etanol 20% (v/v), E-etanol 25% (v/v), F-etanol 30%; Linha 2: A-etanol 35% (v/v); B-etanol 40% (v/v), C-etanol 45% (v/v), D-etanol 50% (v/v). .....  | 31 |
| <b>Figura 19.</b> Absorvância, a 540 nm, do sangue exposto a baixas concentrações de etanol, de forma crescente, em água e ausência de NaCl, demonstrando a lise celular desde as primeiras concentrações. ....  | 32 |
| <b>Figura 20.</b> Comportamento temporal da energia total do sistema em concentrações crescentes de etanol: A) DPPC+EtOH 0%; B) DPPC+EtOH 10%; C) DPPC+EtOH 20%; D) DPPC+EtOH 30%; E) DPPC+EtOH 35%; F) DPPC+EtOH 40%; G) DPPC+EtOH 50%. .....   | 34 |
| <b>Figura 21.</b> (A) Leitura da absorvância a 540 nm do sangue exposto a concentrações crescente de etanol, ilustrando a morfologia dos eritrócitos; (B) Média da energia total nos últimos 5 ns. de cada sistema simulado; (C) Média da área por lipídeo de cada sistema nos últimos 5 ns das simulações; (D) Número de moléculas de etanol que estavam no meio intracelular ao final dos 60 ns. de simulações em cada sistema. .... | 36 |

- Figura 22.** (A) Imagem da caixa de simulação com ausência de etanol no último frame da simulação (esferas verdes:  $\text{Na}^+$ ; esferas amarelas:  $\text{Cl}^-$ ); (B) Gráfico com perfil da densidade de massa do fosfolípídeo (DPPC) e solvente (SOL); e (C) dos íons Cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e Sódio ( $\text{Na}^+$ ), nitrogênio (DPPC-N) e fosfato (DPPC-P) do fosfolípídeo distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanosegundos de simulação.....38
- Figura 23.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com ausência de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns. de simulações.....39
- Figura 24.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com ausência de etanol. ....40
- Figura 25.** (A) Imagem da caixa de simulação com 20%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação (esferas negras: etanol; esferas verdes:  $\text{Na}^+$ ; esferas amarelas:  $\text{Cl}^-$ ); (B) Gráfico com perfil da densidade de massa do fosfolípídeo (DPPC), solvente (SOL) e etanol (EtOH); e (C) dos íons Cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e Sódio ( $\text{Na}^+$ ), nitrogênio (DPPC-N) e fosfato (DPPC-P) do fosfolípídeo e oxigênio do etanol (EtOH -O) distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanosegundos de simulação.....42
- Figura 26.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com 20%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns de simulações.....43
- Figura 27.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com 20%<sub>(v/v)</sub> de etanol.....44
- Figura 28.** (A) Imagem da caixa de simulação com 35%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação (esferas negras: etanol; esferas verdes:  $\text{Na}^+$ ; esferas amarelas:  $\text{Cl}^-$ ); (B) Gráfico com perfil da densidade de massa do fosfolípídeo (DPPC), solvente (SOL) e etanol (EtOH); e (C) dos íons Cloreto (CL) e Sódio (NA), nitrogênio (DPPC-N) e fosfato (DPPC-P) do fosfolípídeo e oxigênio do etanol (EtOH -O) distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanosegundos de simulação.....45
- Figura 29.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com 35%<sub>(v/v)</sub> de etanol.....46
- Figura 30.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com 35%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns de simulações.....47

- Figura 31.** (A) Imagem da caixa de simulação com 50%(v/v) de etanol no último frame da simulação (esferas negras: etanol; esferas verdes: Na<sup>+</sup>; esferas amarelas: Cl<sup>-</sup>); (B) Gráfico com perfil da densidade de massa do fosfolípídeo (DPPC), solvente (SOL) e etanol (EtOH); e (C) dos íons Cloreto (Cl<sup>-</sup>) e Sódio (Na<sup>+</sup>), nitrogênio (DPPC-N) e fósforo (DPPC-P) do fosfolípídeo e oxigênio do etanol (EtOH-O) distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanossegundos de simulação.....48
- Figura 32.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com 50%(v/v) de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns de simulações.....49
- Figura 33.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com 50%(v/v) de etanol.....50

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Número de espécies adicionadas em cada caixa de simulação de acordo com as concentrações crescentes de etanol.....   | 28 |
| <b>Tabela 2.</b> Número de moléculas de etanol que se difundiram pelas membranas no último frame das simulações e que estavam no espaço entre as duas bicamadas lipídicas. .... | 50 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

DL<sub>50</sub> – dose letal media

DPPC – dipalmitoilfosfatidilcolina

GABA –ácido gama aminobutírico (neurotransmissor)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

ME – meio extracelular

MI – meio intracelular

min. – minutos

rpm – rotações por minuto

TB – terabyte

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| RESUMO.....  | vi   |
| ABSTRACT .....   | vii  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | viii |
| LISTA DE TABELAS .....   | xii  |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....                                   | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 1    |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO BIOLÓGICA .....  | 2    |
| 2.1 Membrana celular .....   | 2    |
| 2.1.1 Constituição e funções.....                                      | 2    |
| 2.1.2 Estrutura e estabilidade de membranas – íons e água.....         | 4    |
| 2.2 Eritrócitos.....   | 5    |
| 2.2.1 Funções e estrutura.....   | 5    |
| 2.2.2 Morfologia e mudanças no formato da membrana de eritrócitos..... | 7    |
| 2.3 Etanol.....  | 8    |
| 2.3.1 Características .....  | 8    |
| 2.3.2 Efeitos biológicos.....  | 9    |
| 2.3.3 Efeitos do etanol sobre a membrana.....                          | 12   |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....   | 13   |
| 3.1 Estudos teóricos .....   | 13   |
| 3.1.1 Estudos de dinâmica molecular.....                               | 16   |
| 3.1.2 Modelos de membrana .....  | 17   |
| 3.1.3 Interações intermoleculares.....                                 | 19   |
| 4 OBJETIVOS .....  | 23   |
| 4.1 Objetivo geral.....  | 23   |
| 4.2 Objetivos específicos .....  | 23   |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 24   |
| 5.1 Teste in vitro do etanol sobre a membrana de eritrócitos .....     | 24   |
| 5.1.1 Obtenção do material biológico.....                              | 24   |
| 5.1.2 Soluções-teste.....  | 24   |
| 5.1.3 Teste de fragilidade osmótica.....                               | 24   |
| 5.1.4 Análise estatística.....   | 24   |
| 5.2 Estudo por dinâmica molecular .....                                | 25   |
| 5.2.1 Estrutura básica.....  | 25   |
| 5.2.1.1 Célula básica.....   | 25   |
| 5.2.1.2 Célula básica de etanol.....                                   | 27   |
| 5.2.2 Simulações de dinâmica molecular .....                           | 28   |

|  |    |
|--|----|
| 5.2.3 Detalhes computacionais .....                                | 29 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                      | 30 |
| 6.1 Teste in vitro do etanol sobre a membrana de eritrócitos ..... | 30 |
| 6.2 Simulações de dinâmica molecular .....                         | 32 |
| 6.2.1 Energia total dos sistemas simulados .....                   | 32 |
| 6.2.2 Visão geral dos sistemas estudados .....                     | 35 |
| 6.2.3 Sistema na ausência de etanol .....                          | 37 |
| 6.2.4 Sistema com etanol a 20% <sub>(v/v)</sub> .....              | 41 |
| 6.2.5 Sistema com etanol a 35% <sub>(v/v)</sub> .....              | 44 |
| 6.2.6 Sistema com etanol a 50% <sub>(v/v)</sub> .....              | 47 |
| 6.2.7 Análise geral dos resultados e discussões.....               | 51 |
| 7 CONCLUSÃO.....   | 54 |
| 8 PERSPECTIVAS.....  | 55 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                  | 56 |

## 1 INTRODUÇÃO

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ; PM: 46,07) é um álcool com características anfifílicas presente em bebidas alcoólicas, que são ingeridas em concentrações de 3 a 60%<sub>(v/v)</sub>. É absorvido rapidamente pelo estômago e intestino delgado (Caballería, 2003; Umulis et al., 2005), locais onde verifica-se efeitos danosos dessa substância (Bujanda, 2000; Swanson et al., 2010).

O etanol está relacionado com mais de 60 condições médicas diferentes (Room et al., 2005) tais como a síndrome alcoólica fetal (Aversi-Ferreira e Nascimento, 2008; Ikonomidou et al., 2000; Armstrong e Abel; 2000; Burd et al., 2003), má formação do sistema neural em fetos (Lopes et al., 2009; Aversi-Ferreira et al., 2004; Aversi-Ferreira et al., 2005; Aversi-Ferreira e Penha-Silva, 2005; Aversi-Ferreira et al., 2006), doenças cardiovasculares (Brien et al., 2011) e distúrbios cognitivos (Brust, 2010; Gonthier et al., 2004; Kim et al., 2012).

Alguns trabalhos de simulação de dinâmica molecular verificaram a afinidade do etanol por fosfolípídeos de membrana, com alterações das propriedades da membrana e destruição da estrutura em bicamada (Feller et al., 2002; Patra et al., 2006; Gurtovenko e Anwar; 2009). Penha-Silva e colaboradores (2008), em estudo *in vitro*, observaram lise de eritrócitos humanos frente à exposição ao etanol em diferentes concentrações.

O etanol causa efeito depressor no sistema neural central, possivelmente por mecanismo de ação semelhante ao observado com os barbitúricos ao inibir o sistema Gabaérgico. Vale ressaltar que este é o segundo tecido do organismo humano com maior concentração de lipídeos (Salvati et al., 2000).

Entretanto, o mecanismo de ação do etanol, local de ação e receptores, ainda não foi completamente elucidado (Carta et al., 2004). Neste contexto, torna-se estratégico a combinação do estado da arte de técnicas experimentais e teóricas para elucidar o mecanismo de interação de etanol com membranas celulares.

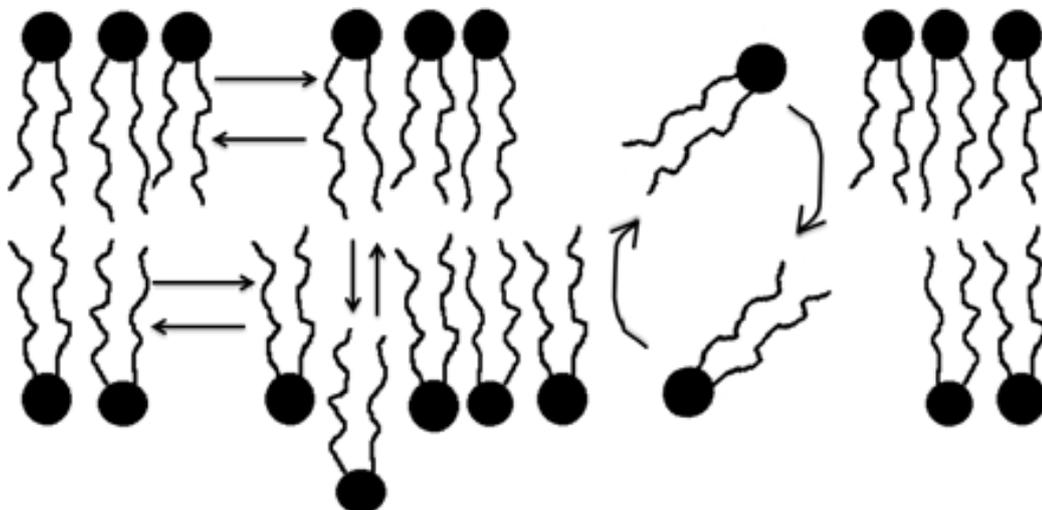
## 2 FUNDAMENTAÇÃO BIOLÓGICA

### 2.1 Membrana celular

#### 2.1.1 Constituição e funções

Membrana celular ou membrana plasmática é um sistema dinâmico e complexo que constitui a parte mais externa do citoplasma celular. É composta de lipídeos, proteínas e glicídios, em proporções que variam de acordo com o tipo de membrana (ENGELMAN, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; RODRIGUES et al., 2009). A razão em massa de lipídeos e proteínas varia de 0,25 a 4,00. Porém, na maioria das membranas, a espécie predominante são os lipídeos, que se apresentam heterogêneos quanto ao tamanho da cadeia carbônica, saturação e estrutura da cabeça polar (BOCKMANN et al., 2003).

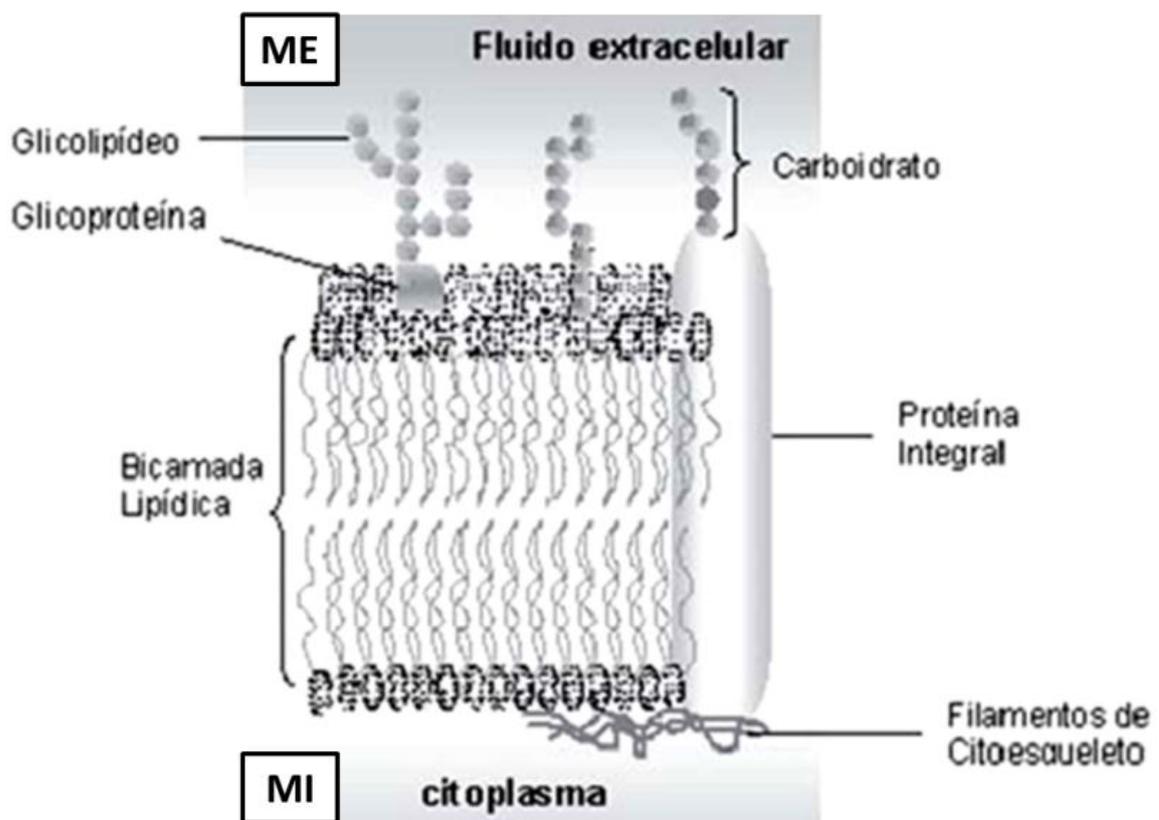
Dos lipídeos presentes nas membranas biológicas, há os fosfolipídeos, os esfingolipídeos e os esteróis (CASCIO, 2005). Na maioria das membranas, aproximadamente 10% dos lipídeos apresentam-se polarizados, o restante está na forma zwitterionica (BOCKMANN et al., 2003). Os lipídeos não se encontram em forma estática, fixados em um determinado ponto, eles apresentam movimentos nos sentidos horizontal e vertical da membrana, além de poder trocar de camada através em um movimento conhecido como *flip-flop* (translocação transmembrana) (Fig. 1) (GURTOVENKO e ILPO, 2007).



**Figura 1.** Modelo de membrana celular, ilustrando o movimento horizontal, vertical e flip-flop dos lipídeos.

O colesterol é um esteroide constituinte da membrana responsável por diferentes funções como: permeabilidade da membrana, organização lateral de lipídeos, transdução de sinais e passagem de substâncias através da membrana (MAXFIELD e TABAS, 2005; WUSTNER, 2007).

A organização das membranas desenvolve-se em uma arquitetura central em dupla camada de lipídeos (LEHNINGER et al., 2007). Singer e Nicholson (1972) propuseram um modelo conhecido como mosaico fluido (Fig. 2) para descrever a estrutura básica de uma membrana celular, onde se torna possível a movimentação de substâncias.

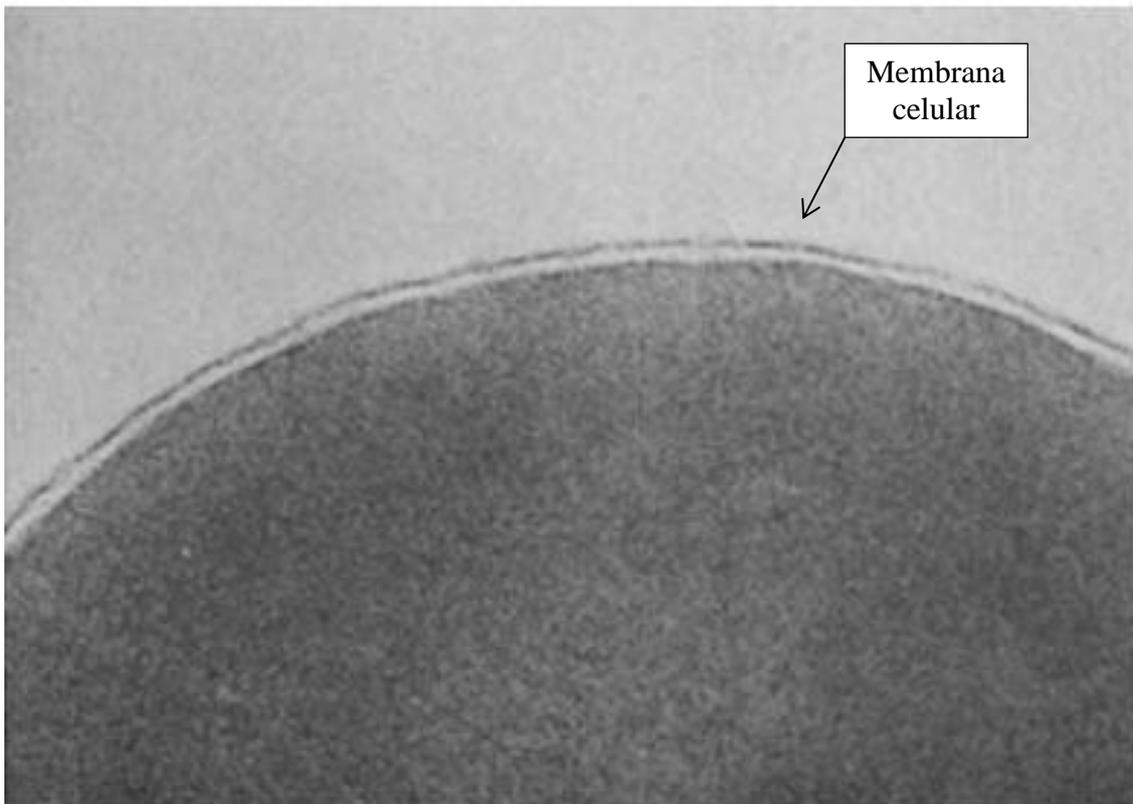


**Figura 2.** Modelo mosaico fluido da estrutura de uma membrana celular evidenciando a bicamada lipídica e demais constituintes (MURADOR e DEFFUNE, 2007). ME = meio extracelular; MI = meio intracelular.

A membrana celular divide a célula em meio intracelular (MI) e extracelular (ME). Apresenta-se semipermeável e controla a entrada e saída de substâncias, responsável por manter constante o MI, que é diferente do ME (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; LEHNINGER et al., 2007). Esta entrada de substâncias é necessária para o metabolismo celular, e a exteriorização é proveniente da excreta ou substâncias necessárias para a matriz extracelular ou mesmo para outras células (AVERSI-FERREIRA, 2008).

### 2.1.2 Estrutura e estabilidade de membranas – íons e água

As membranas biológicas têm cerca de 5 a 10 nm de espessura (PELTTARI e HELMINEN, 1979), o que a torna não visível à microscopia óptica, visualizada apenas em eletromicrografia, semelhante a duas linhas escuras separadas por uma linha central clara (Fig. 3).



**Figura 3.** Eletromicrografia de membrana celular de eritrócito humano (100.000X) (ROBERTSON, 1981).

As células são circundadas por solução aquosa tamponada, em pH diferentes de acordo com o compartimento em que se encontram, e com presença de diferentes íons,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ , com variadas concentrações tanto no MI quanto no ME. A estrutura da bicamada lipídica é mantida pela presença desta solução aquosa, que gera repulsão entre esta e os lipídeos, os quais aprisionam suas cadeias carbônicas no interior da bicamada onde se interagem por interações não-covalentes, como as interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (CAMPBELL, 2000). Mantendo, por outro lado, na porção externa da bicamada, as cabeças polares, que são capazes de interagir com a fase aquosa, por interações hidrofílicas (YEAGLE, 1989).

Esta solução aquosa, além de ditar função sobre a manutenção da estrutura, mencionada acima, exerce função sobre as transições de fase, ou de transporte através da membrana (YEAGLE, 1989).

A permeabilidade através da membrana se deve, entre outros fatores, a diferença na concentração de colesterol na mesma (TSUDA e NISHIO, 2003), à falta de ligações fortes entre as moléculas (ligações covalentes) e a presença de interações fracas que as mantêm. Fatores intrínsecos às moléculas, como o peso molecular e polaridade, também afetam a permeabilidade das mesmas pela bicamada, sendo esta impermeável aos íons, que dependem de canais iônicos para sua passagem ao meio intracelular. Apresenta ainda permeabilidade a água e aos gases oxigênio e carbônico (GOLDBERG et al., 2004; AGRE, 2006; WANG et al., 2007).

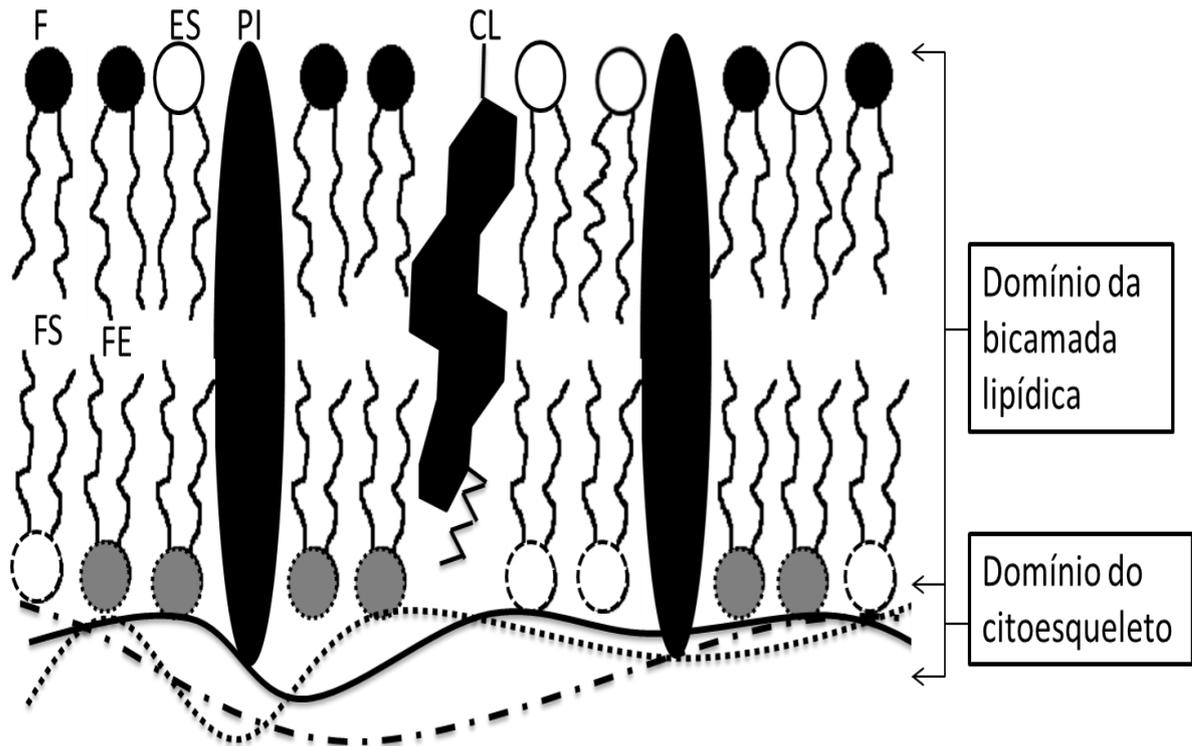
A integridade da estrutura das membranas pode ser afetada facilmente por uma série de eventos físicos, químicos e biológicos. Alterações de temperatura, concentrações iônicas, e substâncias como fármacos, drogas e nutrientes, por exemplo, o etanol, podem gerar danos às membranas, que por sua vez podem gerar alterações de função e, conseqüentemente, na função do órgão ou organismo afetado.

## **2.2 Eritrócitos**

### **2.2.1 Funções e estrutura**

Os eritrócitos, hemácias ou células vermelhas do sangue, são células únicas dentre as células de mamíferos. Viajam pelo sistema cardiovascular, por vasos de calibres diversos, como células individuais. Responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos, e dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões, o que torna sua integridade importante para o bom funcionamento de todo o organismo, visto que a baixa oxigenação pode gerar necroses entre outros danos teciduais.

Os eritrócitos são isentos de organelas e núcleo, contendo em seu interior hemoglobina, circundada pela membrana celular. A membrana celular é formada por dois domínios, um primeiro formado pela bicamada lipídica, e outra formada pelo citoesqueleto (SMITH, 1987; MURADOR e DEFFUNE, 2007; RODRIGUES et al., 2009) (Fig. 4).



**Figura 4.** Estrutura da membrana de um eritrócito evidenciando os domínios da bicamada e do citoesqueleto. (F – fosfatidilcolina; ES – esfingomiéline; PI – proteína integral; CL – colesterol; FS – fosfatidilserina; FE – fosfatidiletanolamina).

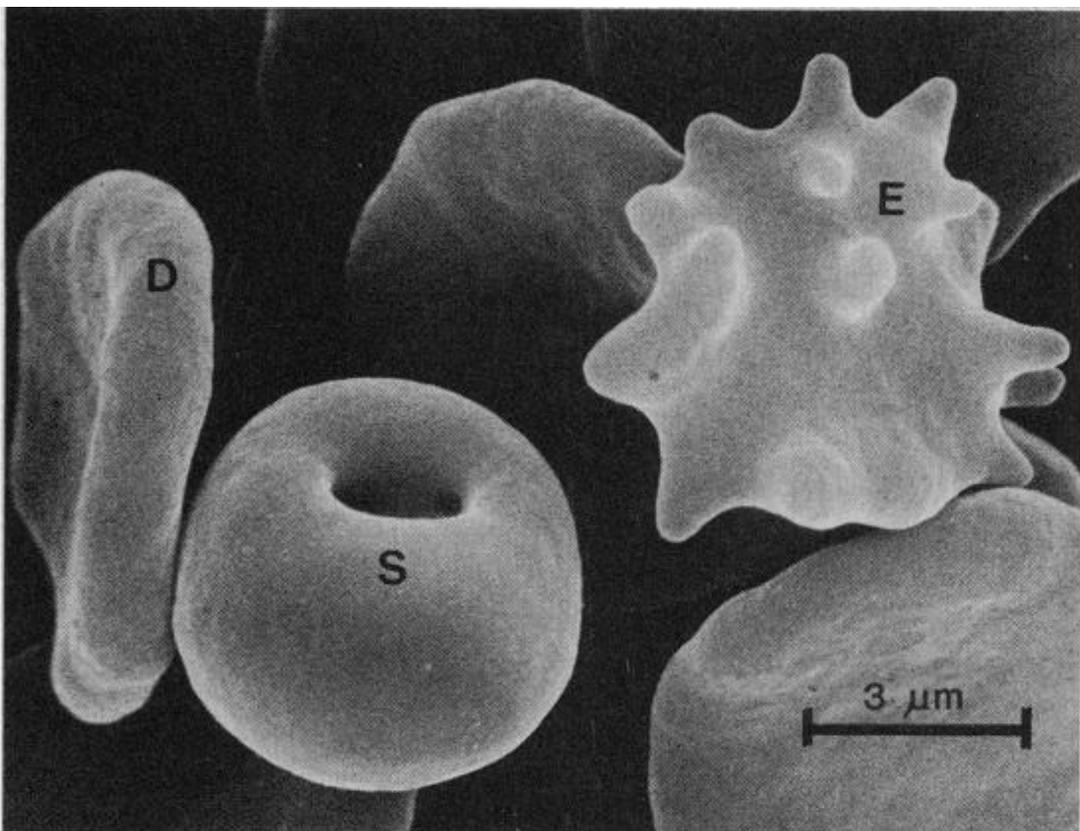
O domínio da bicamada de eritrócitos é formado por partes ligeiramente iguais de lipídeos e proteínas. Os lipídeos encontrados são o colesterol, igualmente distribuídos em ambas às faces da bicamada, e fosfolipídeos que tem suas constituições diferenciadas em cada lado da bicamada. Exemplos de alguns fosfolipídeos encontrados nas membranas são as fosfatidilcolinas; responsáveis por maior fluidez; e as esfingomiélinas responsáveis por maior rigidez. Permeando estes lipídeos encontram-se proteínas integrais que se estendem de dentro a fora do eritrócito (ELGSAETER et al., 1986; MURADOR e DEFFUNE, 2007).

O domínio do citoesqueleto difere do que é conhecido como citoesqueleto para as demais células, por este não ser formado por proteínas estruturais chamadas de tubulinas, e nem de participar da motilidade e fagocitose da célula ou no controle célula-célula ou célula-matriz (DIAKOWSKI et al., 2006). É formado por uma rede filamentar de proteínas, principalmente as espectrinas, entre outras como as anquirinas, actina e proteína 4.1. Localizada abaixo da bicamada lipídica, porém com contato direto com as proteínas integrais e os lipídeos, com função na integridade da membrana (ELGSAETER et al., 1986; SMITH, 1987).

### 2.2.2 Morfologia e mudanças no formato da membrana de eritrócitos

A morfologia normal dos eritrócitos é a forma de um disco bicôncavo conhecido como discoide (Fig. 5), mantida através de uma série de fatores, citados anteriormente, os quais em conjunto com os domínios da bicamada lipídica e do citoesqueleto assumem o menor nível de energia livre, obtendo a forma mais estável destas células (ELGSAETER et al., 1986).

Os eritrócitos podem assumir diferentes estruturas variando de formas com espículas ou contraídas conhecida como equinócitos e formas expandidas conhecidas como estomatócitos (ELGSAETER et al., 1986; SMITH, 1987; STOOKE et al., 1986) (Fig. 5).



**Figura 5.** Eletromicrografia de diferentes formas de eritrócitos; discoide (D), estomatócito (S) e equinócito (E). (ELGSAETER et al., 1986).

As alterações na morfologia dos eritrócitos se devem a alterações diretas sobre a membrana celular (GEDDE e HUESTIS, 1997), e fatores como substâncias exógenas, fármacos e intoxicantes podem alterar esta estrutura (NELSON et al., 1983), podendo gerar a lise celular (RODRIGUES et al., 2009).

Portanto, os eritrócitos constituem um importante modelo para testes de composição de membranas, comportamento e efeitos de substâncias sobre as

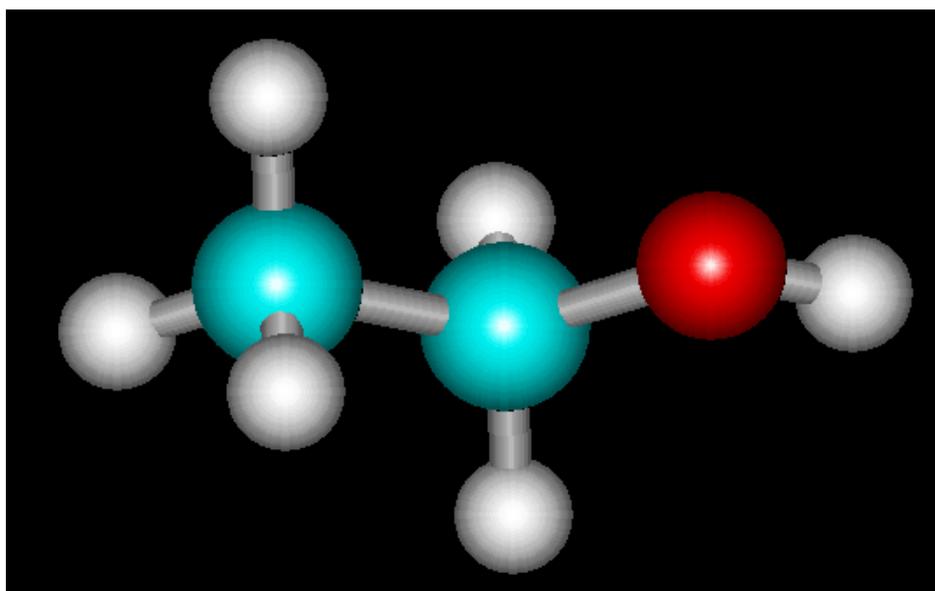
mesmas, pois aliado a todas as características mencionadas anteriormente adiciona-se a fácil disponibilidade e acessibilidade destas células (MURADOR e DEFFUNE, 2007; RODRIGUES et al., 2009).

Uma das substâncias que podem gerar efeito sobre a membrana de eritrócitos é o etanol.

## 2.3 Etanol

### 2.3.1 Características

O etanol está presente em uma grande variedade de bebidas tais como cerveja, vinho, uísque, cachaça dentre outras; em combustíveis, produtos de limpeza, perfumes, produtos cosméticos e produtos de uso terapêutico. O etanol (Fig. 6) é um álcool, líquido incolor a temperatura ambiente, volátil, inflamável e de odor característico (FILHO et al., 2001; LARINI, 2003). Apresenta massa molecular de 46,07 g/mol, fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , e constante dielétrica de 25,7 a 20°C. O grupo hidroxila confere polaridade à molécula e é responsável pelas interações intermoleculares com a água, sendo verificadas em testes de espectroscopia no infravermelho as ligações de hidrogênios (PEREIRA e ANDRADE, 1998). É uma molécula anfipática sendo miscível em água e gordura.



**Figura 6.** Estrutura molecular do etanol (bolas azuis: carbono; bolas brancas: hidrogênio e bola vermelha: oxigênio).

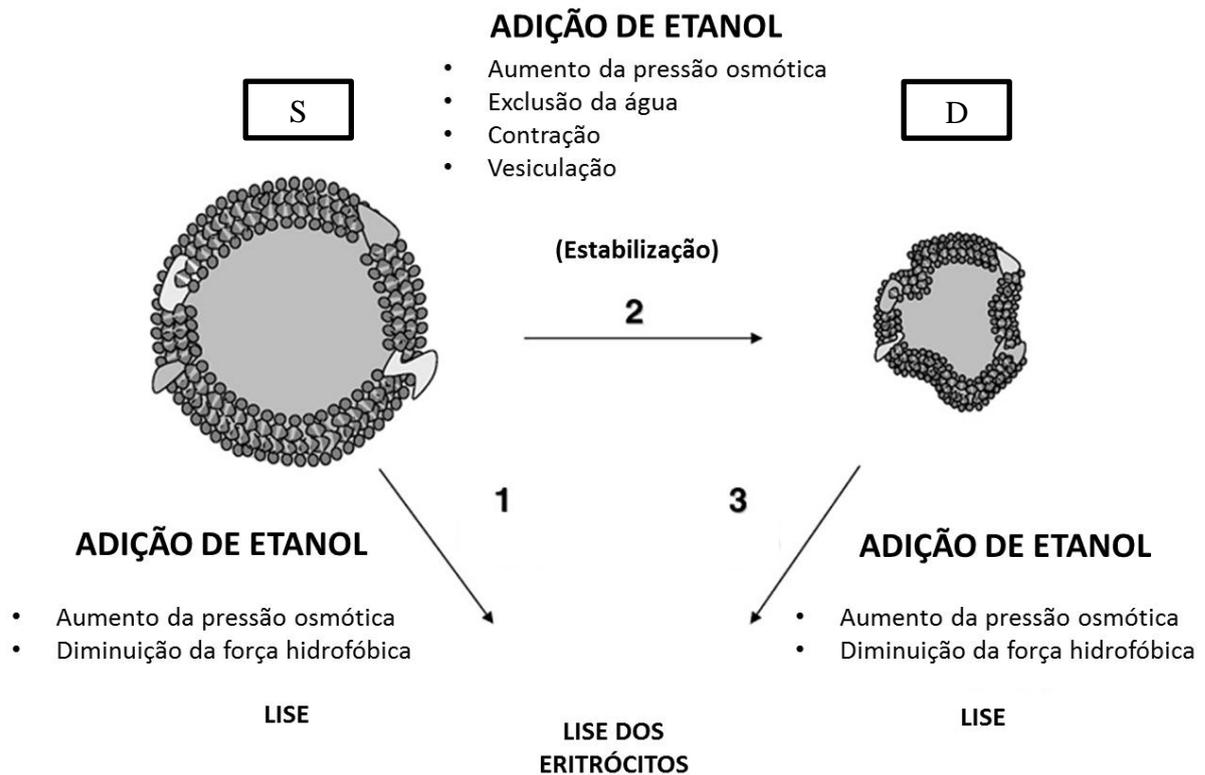
### **2.3.2 Efeitos biológicos**

O consumo de etanol através de bebidas alcoólicas gera dependência conhecida como alcoolismo, que é uma toxicomania considerada problema de saúde pública (ROOM et al., 2005) e que além de propiciar danos aos indivíduos, está relacionada a diversas fatalidades por acidentes de trânsito (LARINI, 2003).

O etanol é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal se distribuindo por todos os tecidos. A concentração plasmática máxima de etanol é verificada em um tempo médio de 30 a 60 minutos, com variação de gênero, as mulheres apresentam concentrações plasmáticas maiores que os homens em um consumo de mesma dose (FILHO et al., 2001). A dose letal média ( $DL_{50}$ ) de etanol para o homem é de 7,5 – 9,5 g/Kg, por via oral. Em uma concentração plasmáticas de 4 g/L de sangue já é capaz de induzir o coma (LARINI, 2003).

Os efeitos observados em indivíduos expostos a esta substância são delírios, alucinações, sensação de despersonalização, ação anestésica e depressora do sistema neural central, problemas relacionados ao crescimento em adolescentes e efeitos sobre a embriogênese, como a síndrome alcohólica fetal (RILEY, 1990; HOLMUHAMEDOV e LEMASTERS; 2009; AVERSI-FERREIRA e NASCIMENTO, 2008). O mecanismo de ação não está muito bem definido, e algumas hipóteses propõe o efeito anestésico do etanol devido à ação deste sobre as proteínas e/ou lipídeos de membrana, potencializando o influxo de cloretos, logo o efeito do neurotransmissor GABA, similar à ação dos benzodiazepínicos e barbitúricos (BRUST, 2010).

Penha-Silva e colaboradores (2008) verificaram um efeito anômalo do etanol sobre eritrócitos humanos, em que estes se apresentam em estados morfológicos estomatócitos (expandidos) e equinócitos (contraídos) conforme mostrado na figura 7. Este efeito não se mostrou dose dependente, gerando uma curva sigmoide. Os autores relataram um efeito deletério sobre os eritrócitos e com o aumento da concentração um efeito protetor, porém com o posterior aumento da concentração, foi evidenciada lise celular novamente. Estas alterações foram relacionadas ao aumento de pressão osmótica gerada pelo o etanol, e também devido a diferenças de temperatura (PENHA-SILVA et al., 2008).



**Figura 7.** Representação esquemática das ações do etanol sobre eritrócitos em solução salina. Eritrócitos podem existir em estados morfológicos estomatócitos (S) ou um estado equinócitos (D). Cada estado morfológico pode representar um conjunto de formas diferentes. Baixas concentrações de etanol promovem a lise do estado S (rota 1). As concentrações de etanol intermediárias promovem a conversão dos eritrócitos do estado S para o estado D (rota 2) através do aumento da pressão osmótica. Altas concentrações de etanol promovem a lise do estado D (rota 3) (PENHA-SILVA et al., 2008).

Este efeito anômalo do etanol provavelmente não está condicionado ao fator força iônica, mas sim à sua interação direta com os fosfolípidos de membrana, sendo este o questionamento deste trabalho.

É sabido que moléculas apolares em meio aquoso, diminuem a entropia do sistema em uma maior organização das moléculas de água para estabilização do mesmo, o que não é viável em termos termodinâmicos, logo não solubilizando as moléculas apolares em água (LEHNINGER et al. 2007). A associação do etanol com lípidos de membrana é realizada por interações tipo van der Waals entre a parte apolar do etanol e do lípido (GURTOVENKO e ANWAR, 2009). Por outro lado, ligações de hidrogênio entre o etanol e a água devem favorecer um aumento da entropia do sistema.

Além dos efeitos já mencionados, o etanol é também responsável por uma síndrome conhecida como síndrome alcoólica fetal. Durante o período gestacional,

mães que fazem uso de bebidas alcoólicas, podem afetar o desenvolvimento embrionário do feto, causando mal formações, pois esta substância afeta as células em diferenciação no tubo neural (AVERSI-FERREIRA et al., 2004). Este efeito é dependente não apenas da concentração do etanol, mas também do tempo de exposição ou mesmo o dia da exposição (AVERSI-FERREIRA e NASCIMENTO, 2008), onde o período inicial da gestação é o mais crítico. A criança exposta a esta substância, pode nascer com deficiências físicas e cognitivas (Fig.8).



**Figura 8.** Criança com síndrome alcoólica fetal (RIBEIRO et al., 1995).

Portanto, o estudo das interações do etanol com fosfolípidos de membrana, seu mecanismo de ação e estudos do efeito anômalo observado com o aumento das concentrações de etanol em presença de membranas de eritrócitos, possui grande importância na área biomédica.

### **2.3.3 Efeitos do etanol sobre a membrana**

O estudo e entendimento das alterações nas propriedades e funções das membranas celulares em presença de solventes anfifílicos apresentam interesses em diferentes áreas biomédicas, como anestesiologia (CASCALES et al., 1998; KOUBI et al., 2001), criopreservação e solubilidade de membranas (GURTOVENKO e ANWAR, 2009).

Hipóteses sobre o mecanismo de ação dos anestésicos são discutidas e investigadas a mais de um século (TU et al., 1998) podendo ser divididas em duas vertentes, a primeira prediz que os efeitos destes fármacos são efetivadas pela interação destas moléculas com os lipídeos de membrana, e a segunda pela interação dos mesmos com proteínas inseridas na bicamada lipídica (BERTACCINI, 2010). Para a molécula de interesse neste estudo, o etanol, ainda não foi encontrado nenhum receptor de membrana, proteína, com o qual este se interaja para exercer sua ação, portanto acreditamos que esta interação aconteça seguindo a primeira hipótese.

Estudos têm evidenciado (FELLER et al., 2002; FRANGOPOLO e MIHAILESCU, 2001) que a interação de etanol com lipídeos de membrana resultam em maior desordem, aumento de área por lipídeo e fluidez das membranas, até mesmo a deformação da estrutura bilipídica.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Estudos teóricos

Com o conhecimento de determinadas propriedades físico-químicas da matéria, e de suas previsões através das leis da física, foi possível criar modelos capazes, em certa extensão, de agrupar, prever e desenvolver novos materiais (SANTOS, 2001). Estes modelos utilizam aproximações impostas para simplificar os eventos da natureza, havendo aí uma diferença entre modelo e teoria. Teoria é o conjunto de leis capazes de fornecer resultados e conclusões a partir de um número de variáveis conhecidas, já os modelos descrevem aspectos específicos de certas propriedades da natureza (SANTOS, 2001). Uma importante ferramenta utilizada para este fim é a modelagem molecular.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a modelagem molecular “é a investigação de estruturas moleculares e propriedades usando química computacional e técnicas de visualização gráfica, a fim de fornecer uma representação tridimensional plausível sob um dado conjunto de circunstâncias”.

As aproximações utilizadas para os estudos de modelagem molecular são; a aproximação clássica, que inclui a mecânica molecular e a dinâmica molecular, e a aproximação quântica, que utiliza métodos *ab initio*, DFT e semi-empíricos (RODRIGUES, 2001).

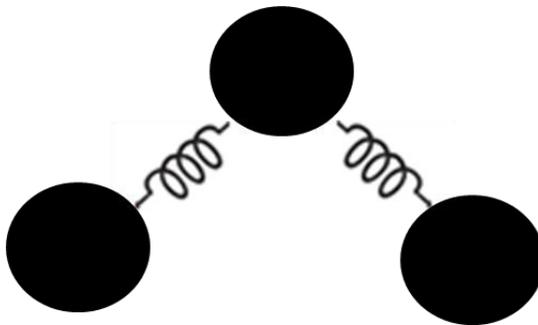
O método quântico leva em consideração a estrutura eletrônica dos átomos, fixando os núcleos em uma posição fixa  $R$ , e resolvendo a equação de Schrodinger para se alcançar um mínimo de energia do sistema, estudando a posição da “nuvem” eletrônica do átomo. A equação equivalente quanto-mecânica para resolução da energia total do sistema dá-se através da soma dos operadores de energia cinética e potencial operando sobre a função de onda  $\psi$ , que é parametricamente dependente das posições dos núcleos (1) (SANT’ANNA, 2009):

$$[\hat{T} + \hat{V}]\Psi(r, R) = E\Psi(r, R) \quad (1)$$

A resolução desta equação é complexa para sistemas com vários elétrons havendo a necessidade de aproximações, impossibilitando sua resolução para

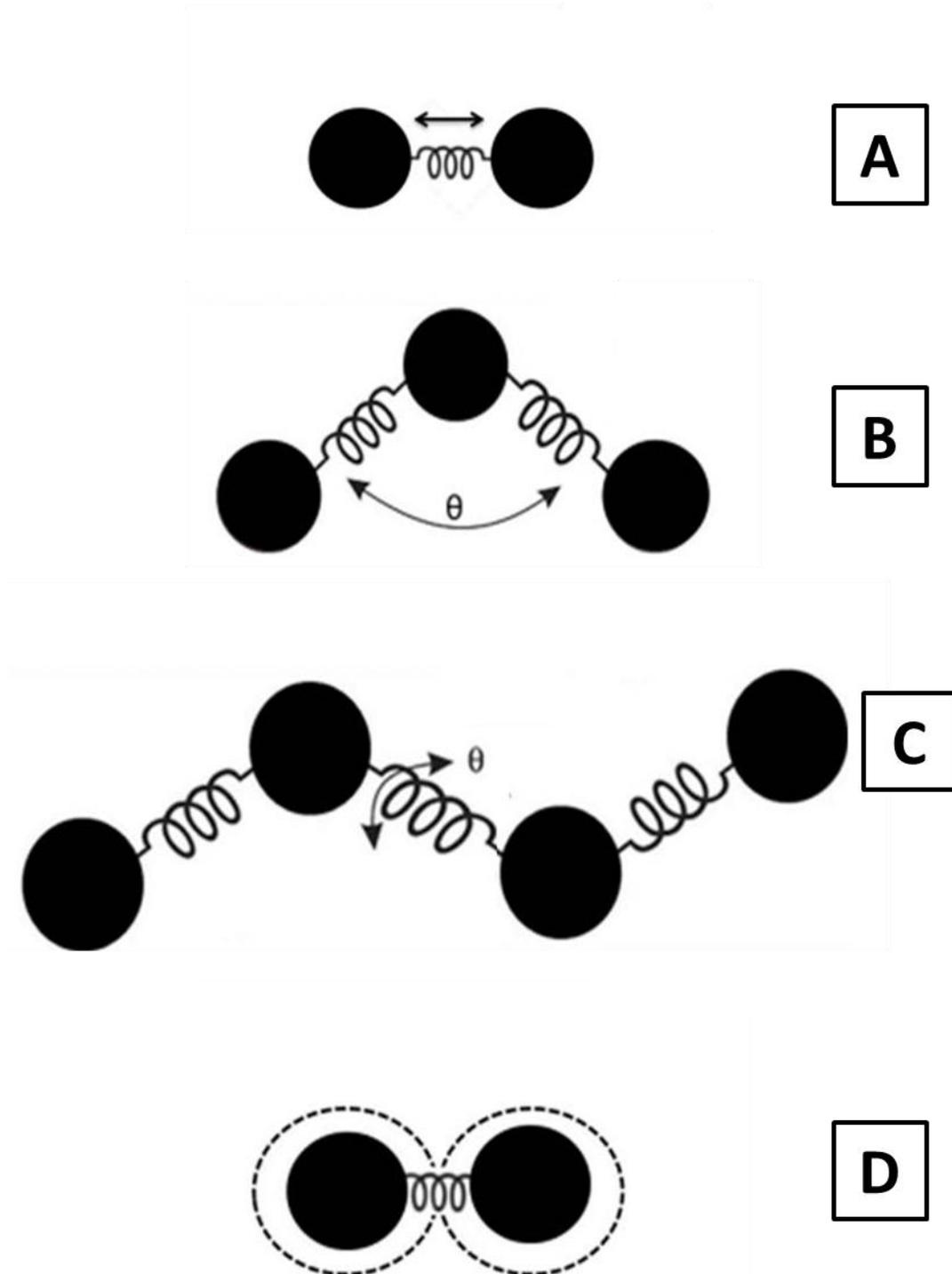
sistemas com milhares de átomos, como é o caso dos sistemas estudados neste trabalho.

A mecânica molecular é um método que é utilizado para calcular a estrutura e a energia de moléculas, desconsiderando para isso a presença explícita do elétron, baseado na aproximação de Born-Oppenheimer. Desta forma admite-se que os elétrons, que se “movem” de forma mais rápida que os núcleos, ajustam-se aos movimentos destes últimos. Didaticamente podemos dizer que a mecânica molecular trata uma molécula como um conjunto de esferas, que são os átomos, conectadas por molas, que são as ligações químicas (Fig.9) (RODRIGUES, 2001).



**Figura 9.** Representação de uma molécula em modelagem molecular (esferas: átomos; molas: ligações).

O que se faz de fato neste modelo é desenvolver o chamado campo de força. Este engloba diferentes tipos de átomos, ângulos de ligações, distâncias e equações, para cálculos de energia e geometria de moléculas. A energia total de uma molécula é dividida em várias equações de energia potencial como; deformação do comprimento ( $s$ ), ângulo de ligação ( $a$ ), ângulo de torção ( $t$ ) e interações de van der Waals (Fig. 10).



**Figura 10.** A) Deformação no comprimento (estiramento) de ligação; B) deformação no ângulo de ligação; C) ângulo de torsão; D) Interações de van der Waals.

Ao final a energia total da molécula é dada pelo somatório destas equações / energias potencias (2):

$$E_{\text{TOTAL}} = E_s + E_a + E_t + E_{\text{vdW}} \quad (2)$$

A minimização de energia é um processo no qual a energia do sistema é levada ao mínimo em conjunto através de algoritmo matemático adequado (SANT'ANNA, 2009).

O modelo de dinâmica molecular foi o escolhido para este trabalho por possibilitar a resposta das hipóteses levantadas, com custo computacional reduzido, portanto é a este modelo que daremos maior enfoque a partir deste ponto.

### 3.1.1 Estudos de dinâmica molecular

O primeiro artigo sobre simulações de dinâmica molecular foi publicado em 1977 (McCAMMON et al., 1977). As simulações nesta época não passavam de 10 ps., porém o número de publicações tem aumentado desde então chegando aos dias de hoje, com simulações extrapolando 150 ns.

Para este trabalho, analisamos a interação do etanol com fosfolipídeos de membrana, o que por si só é um sistema bastante complexo, com milhares de átomos. Com o intuito de chegar mais próximo da realidade, necessitamos da energia cinética das moléculas, uma vez que o movimento das moléculas permite as colisões intermoleculares gerando assim novas conformações (SANT'ANNA, 2009).

A resolução das equações de dinâmica molecular leva em consideração a evolução temporal das conformações alcançadas pelo sistema, conhecida como trajetória. Portanto, este modelo estuda propriedades dependentes do tempo, como o dobramento de uma cadeia peptídica ou de DNA, difusão ou movimento de solventes em torno do soluto (KARPLUS e McCAMMON, 2002).

Os cálculos na dinâmica molecular são clássicos, baseados na resolução da equação de movimento de Newton (3) para cada átomo:

$$F = m \cdot a \quad (3)$$

onde, (F) é a força que gera aceleração (a) em um átomo de massa (m). Embora este tratamento clássico permita resoluções de sistemas com apenas duas partículas, faz-se necessário um tratamento numérico como segue (4):

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{dr}{dt} \Delta t + \frac{d^2r}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (4)$$

Esta equação é conhecida como série de Taylor, e permite o cálculo para a posição de uma partícula após uma pequena variação de tempo. Para esta resolução é necessário o conhecimento prévio da posição  $r(t)$ , da velocidade  $dr/dt$  e da aceleração  $d^2r/dt^2$ , além de aproximações para os termos de maior ordem. O cálculo é realizado para um determinado intervalo de tempo  $\Delta t$ , que tem grande importância para a dinâmica molecular (SANT'ANNA, 2009). Este intervalo de tempo da trajetória deve ser pequeno o suficiente para que a aceleração se mantenha constante, sendo na prática da ordem de 0,5 a 1,0 fs (KARPLUS e McCAMMON, 2002).

Diferentes pacotes computacionais são disponíveis na internet de forma livre (MORGON, 2001), como o pacote GROMACS, para estudos de simulação de dinâmica molecular. O GROMACS é um programa bem conhecido e utilizado e a escolha do mesmo levou em consideração a grande quantidade de informações disponíveis e de trabalhos que o utilizam.

### **3.1.2 Modelos de membrana**

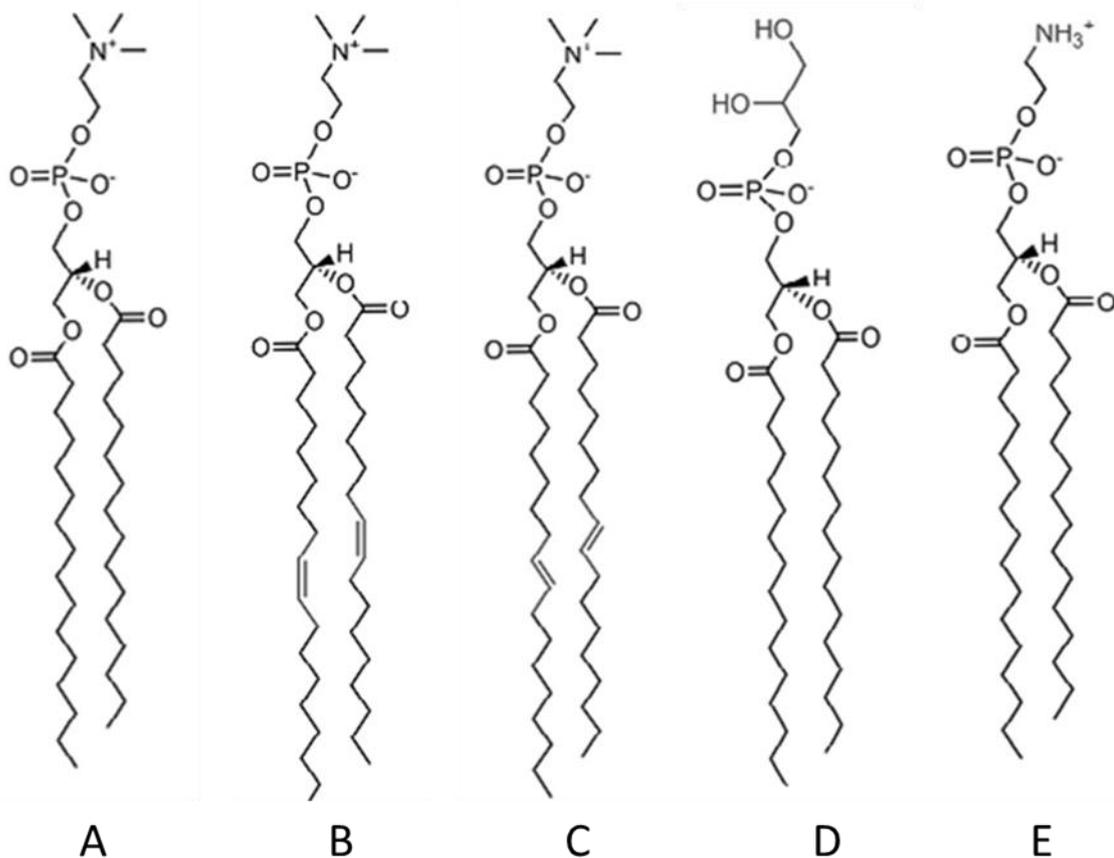
Dentre os estudos de dinâmica molecular de membranas biológicas, os modelos de bicamada são os mais comumente utilizados (SONNE et al., 2007). As simulações computacionais são uma ferramenta única para prever eventos a nível atômica e gerar correlações com efeitos macroscópicos (SAIZ et al., 2002) como por exemplo o efeito de anestésicos de fármacos sobre membranas.

A limitação da utilização destas simulações está no tamanho do sistema, a escala de tempo e a precisão do campo de força que descreva as interações (ANÉZO et al., 2003) que irão ocorrer durante a trajetória da simulação. Porém com o avanço da capacidade de armazenamento e processamento dos computadores, sistemas mais complexos podem ser modelados. Alguns trabalhos têm utilizado modelos de bicamadas com presença de esfingolipídios, fosfolipídios, colesterol e/ou proteínas, porém em nosso estudo o interesse é a ação do etanol sobre fosfolipídeos de membrana, pois acreditamos ser o local de ação desta substância.

Os fosfolipídeos representam a estrutura fundamental das membranas celulares (ANÉZO et al., 2003); portanto modelos que utilizam unicamente fosfolipídeos em suas bicamadas são um passo importante, e muitas vezes inicial,

para o estudo de processos celulares (CHIU et al., 1995) visto que a bicamada lipídica é um fator determinante para o controle do metabolismo celular.

Alguns dos campos de força conhecidos e utilizados são o AMBER, CHARMM, OPLS e GROMOS. Estes apresentam vários fosfolipídeos parametrizados que podem ser utilizados em simulações computacionais. Alguns deles são representados na figura 11.



**Figura 11.** Estrutura de diferentes fosfolipídeos utilizados em simulações de dinâmica molecular. (A: DPPC - dipalmitoilfosfatidilcolina; B: DOPC - dioleoilfosfatidilcolina; C: DEPC - dielaidoilfosfatidilcolina; D: DPPG-dipalmitoilfosfatidilglicerol; E: DPPE-dipalmitoilfosfatidiletanolamina).

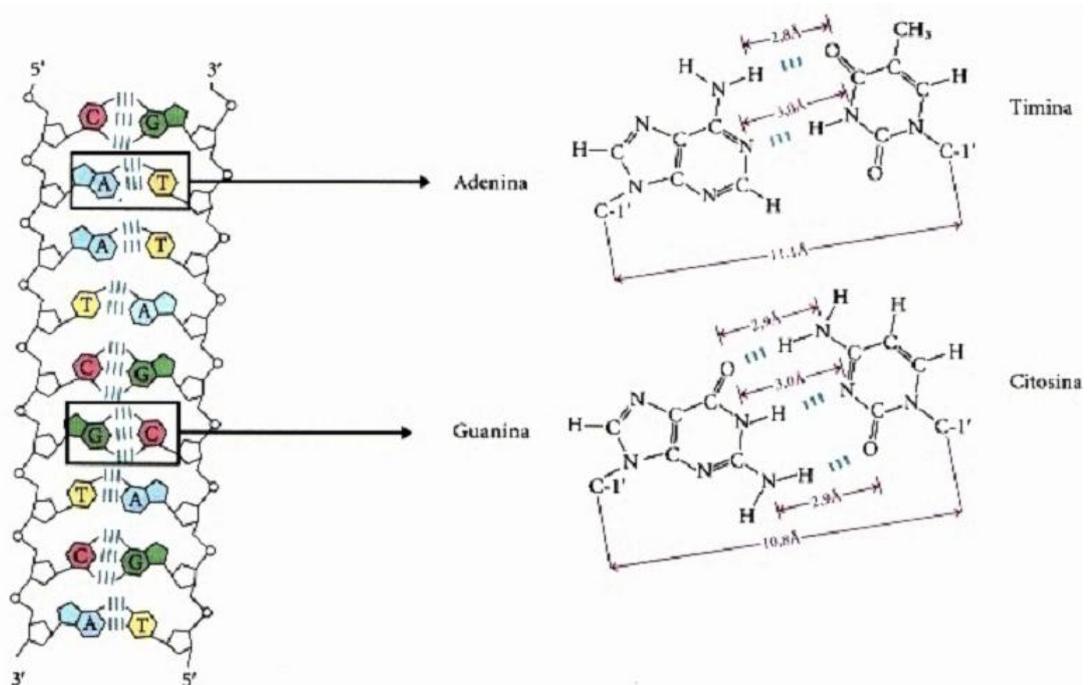
O fosfolipídeo DPPC é um modelo com campo de força all-atoms bem utilizado na literatura, e com boas correlações e precisão com os dados experimentais. Algumas adaptações para as cargas foram sugeridas por Kukol (2009), que encontrou relações de área por lipídeo, difusão lateral e parâmetro de ordem muito próximo a da literatura para os dados experimentais.

Portanto, a escolha do fosfolípídeo deste trabalho levou em consideração os dados da literatura que suportavam a utilização deste modelo para uma boa correlação entre os dados teóricos e os efeitos macroscópicos investigados.

### 3.1.3 Interações intermoleculares

Quando átomos, moléculas e íons aproximam-se, dois fenômenos podem ocorrer: reações e/ou interações. As reações requerem a quebra e/ou formação de ligações com variações de energia da ordem de 50 a 100 kcal·mol<sup>-1</sup>, as interações envolvem a atração ou a repulsão entre as espécies químicas, sem envolver quebra e/ou formação de ligações, com variações de energia da ordem de 0,5 a 10 kcal·mol<sup>-1</sup> (ROCHA, 2001). Portanto, as interações intermoleculares surgem do contato não reativo e são de natureza essencialmente elétrica dependentes da distância entre as espécies envolvidas.

As biomoléculas, como as proteínas, DNA e RNA tem sua estrutura tridimensional mantida pelas interações moleculares (LEHNINGER et al., 2007), assim como as membranas celulares (Fig. 12). As funções das biomoléculas e células estão intimamente ligadas a estas estruturas tridimensionais.



**Figura 12.** Fita de DNA, ilustrando as interações de hidrogênio entre nucleotídeos (LEHNINGER et al., 2007).

Alguns exemplos das forças que governam as interações intermoleculares são as forças eletrostáticas, forças de dispersão, hidrofóbicas entre outras.

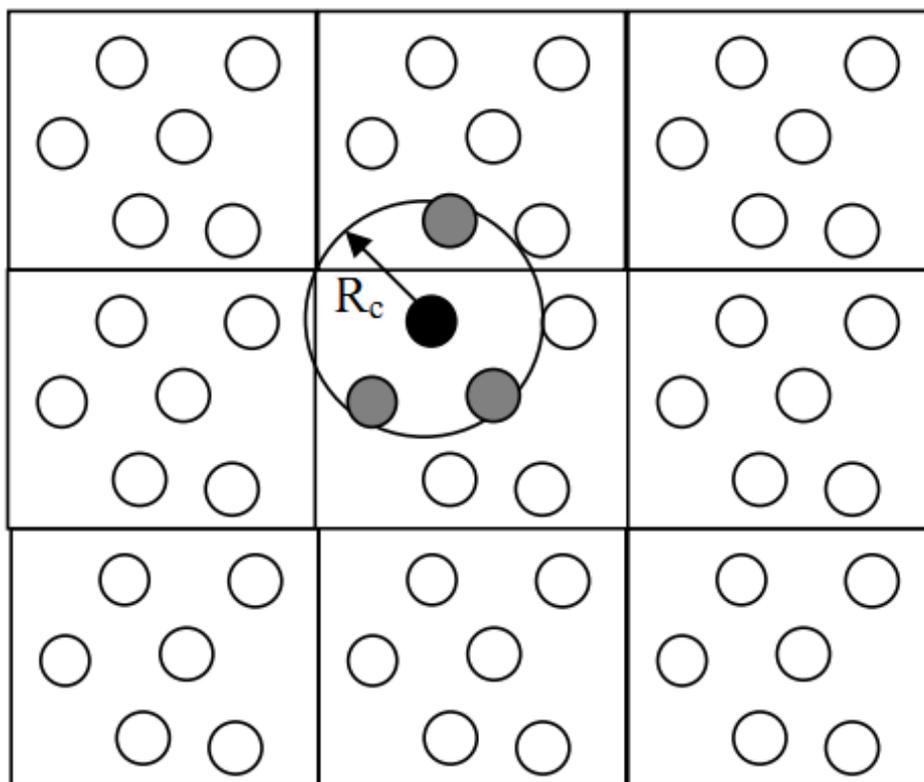
As interações eletrostáticas são aquelas que resultam da interação entre dipolos e/ou íons de cargas opostas, cuja magnitude é diretamente dependente da constante dielétrica do meio e da distância entre as cargas (FRAGA, 2001).

Interações de dispersão, interações de London ou de van der Waals ocorrem quando átomos apolares apresentam flutuação local da densidade eletrônica transiente. Este é um tipo de interação fraca que varia no inverso a sexta potência da distância ( $r^{-6}$ ), porém ocorre em grande número, e por isso contribui de maneira significativa para a estabilidade numa estrutura de macromolécula. As interações hidrofóbicas, assim como as de dispersão, são fracas e ocorrem em cadeias apolares em meio aquoso (BISSANTZ et al., 2010).

Outra força intermolecular importante é a interação de hidrogênio. Para esta interação é necessário a interação do hidrogênio com dois átomos eletronegativos. Um hidrogênio ligado a um primeiro átomo com alta eletronegatividade, passa a apresentar carga parcial positiva, o que facilita sua interação com o segundo átomo também eletronegativo (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1998). Esta interação apresenta força maior que a dipolo-dipolo e está diretamente relacionada à estrutura tridimensional das biomoléculas e conseqüentemente as suas funções

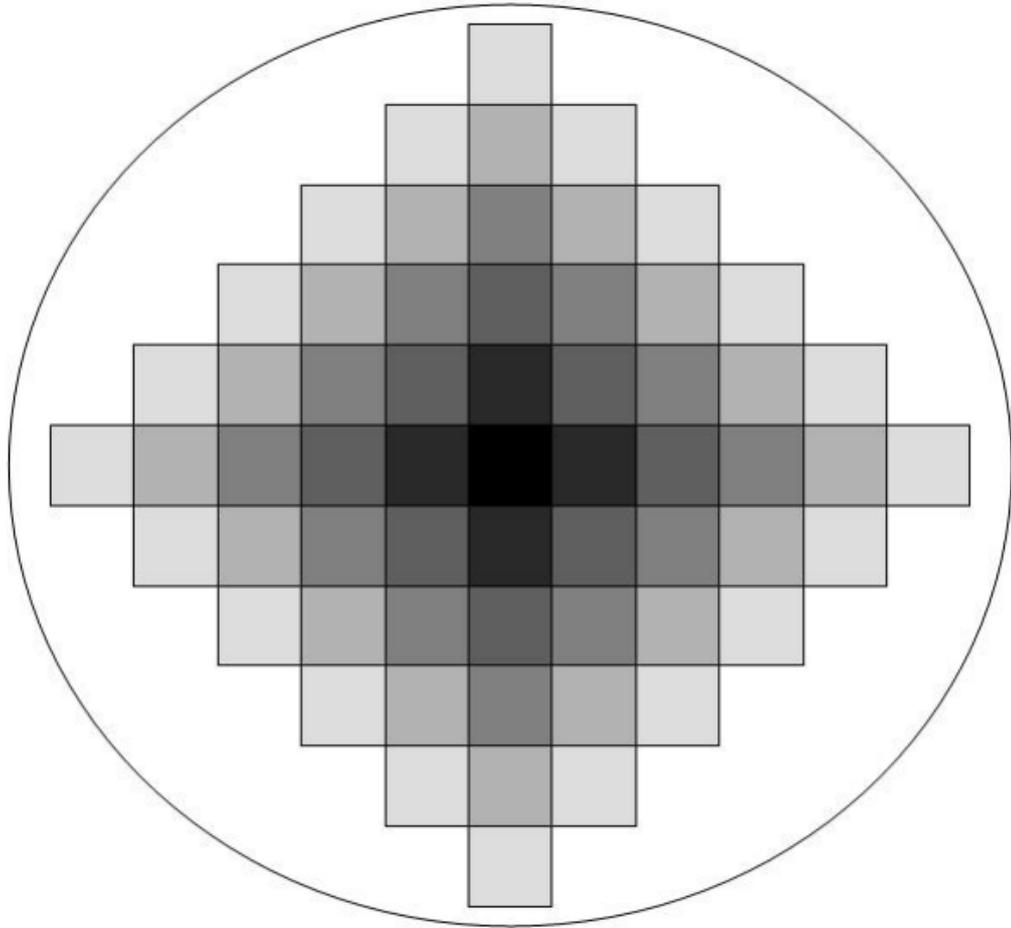
As interações resultantes das colisões dos átomos nas simulações de dinâmica molecular são governadas através dos campos de forças que são parametrizados através de cálculos mecânico quânticos ou dados espectroscópicos, contendo a somatória de termos de energia relacionados a posições de equilíbrio do sistema (distância, ângulo, diedros, distância de van der Waals, interações de hidrogênio e eletrostáticas, entre outras).

Os cálculos das interações no método de dinâmica molecular demandam boa parte do tempo computacional. Para evitar a interação de um átomo com sua imagem espelho, pelas condições periódicas de contorno, é necessário delimitar um raio de corte esférico para tratar das interações de curto alcance (potencial de Lennard Jones) (Fig.13) (EDUARDO, 2009). As interações de curto alcance são aquelas cujo potencial decaem na ordem de  $r^{-6}$ .



**Figura 13.** Representação do raio de corte esférico em um sistema com condições periódicas de contorno (EDUARDO, 2009).

As interações de longo alcance, aquelas cujo decaimento ocorre na ordem de  $r^{-1}$  entre cargas, apresentam alcance maior que a metade da caixa de simulação, com isso é necessário à utilização de cálculo específicos para se evitar erros significativos. Um método bem estabelecido é a soma de Ewald ou método PME. Neste método a célula de simulação central é replicada pelas condições periódicas, e todas as interações eletrostáticas neste sistema replicado periodicamente são somadas conforme a figura 14.



**Figura 14.** Representação de um sistema com condições periódicas de contorno para o método da soma de Ewald (EDUARDO, 2009).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo geral*

- ✓ Estudar as interações entre as espécies químicas etanol com fosfolípidos de membrana na presença de água e cloreto de sódio.

### 4.2 *Objetivos específicos*

- ✓ Avaliar os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de etanol (0 a 50%<sub>(v/v)</sub>) em solução aquosa contendo cloreto de sódio (0,9%<sub>(p/v)</sub>) sobre eritrócitos de ratos;
- ✓ Avaliar, pela aplicação de método da dinâmica molecular, os efeitos das interações entre as espécies químicas água, cloreto de sódio (0,9%<sub>(v/v)</sub>) e etanol em concentrações crescentes, de 0 a 50%<sub>(v/v)</sub>, com fosfolípidos de membrana.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Teste *in vitro* do etanol sobre a membrana de eritrócitos**

#### **5.1.1 Obtenção do material biológico**

Para a obtenção do material biológico, o sangue, foram utilizados dois ratos Wistar, machos, com peso entre 180 e 200 g, devidamente aclimatizados no biotério da Universidade de Toyama.

Os animais (n=2) foram previamente anestesiados com pentobarbital, por via intraperitoneal. Posteriormente, realizou-se punção cardíaca para retirada do sangue com seringa contendo heparina.

O sangue heparinizado foi mantido em tubo de ensaio em banho-maria a 37°C, até o momento do teste.

#### **5.1.2 Soluções-teste**

As soluções teste foram feitas utilizando água Mili-Q, NaCl (Sigma) e etanol P.A. (Sigma), ambos dentro do prazo de validade. Foram então preparadas soluções de etanol de concentrações de 0 a 50%<sub>(v/v)</sub>, variação de 5 em 5%, em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%<sub>(p/v)</sub>.

#### **5.1.3 Teste de fragilidade osmótica**

Em eppendorfs, foram acrescentados 1000 µL das soluções de etanol, em duplicata para cada material biológico, e um eppendorf de cada concentração (branco), para tara do equipamento. Todas as soluções foram previamente mantidas por 10 min. em banho-maria a 37°C, incluindo o material biológico, em seguida o sangue (40 µL) foi pipetado com uma micropipeta para cada um dos eppendorfs, exceto o tubo branco, deixando em incubação por mais 30 min. Logo após a incubação, o material foi centrifugado 2000rpm por 10 min. e então foram retirados os sobrenadantes e as leituras feitas em triplicata em espectrofotômetro a 540 nm.

#### **5.1.4 Análise estatística**

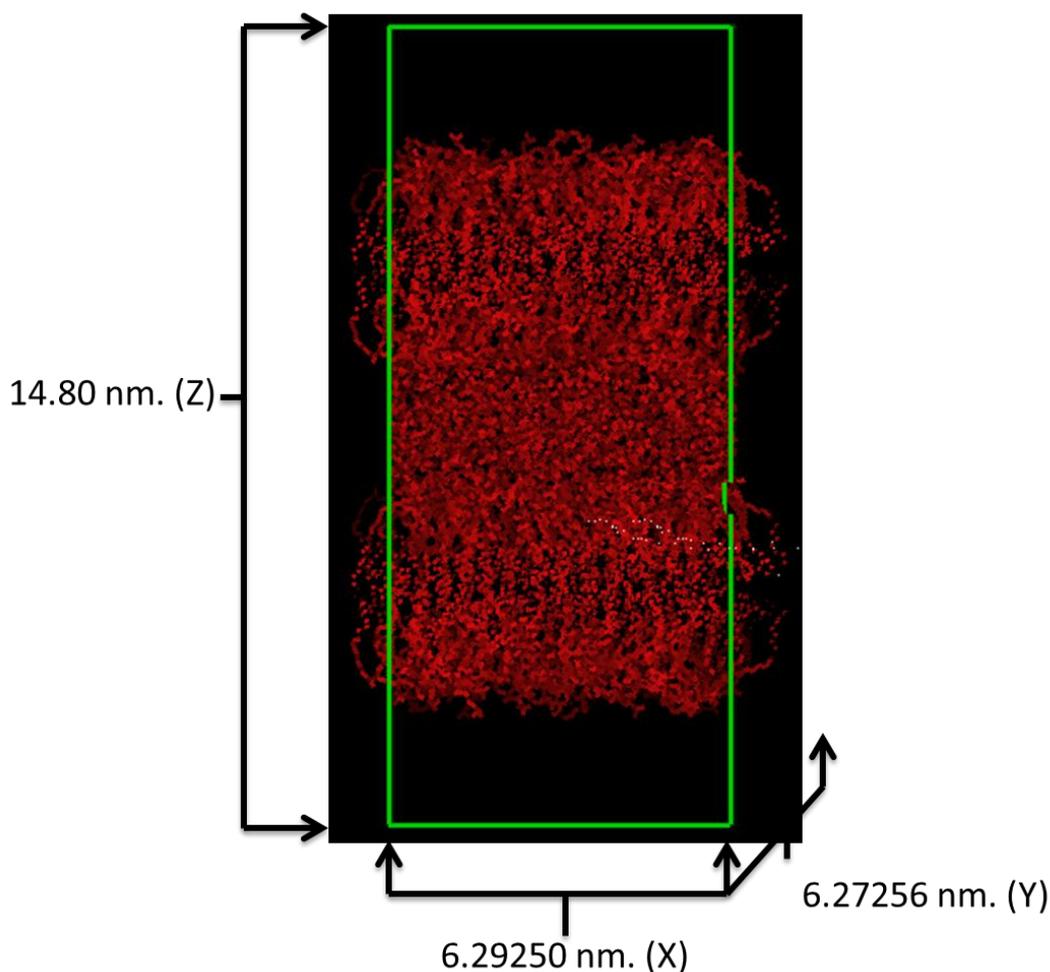
As comparações das médias foram feitas utilizando teste T de Student's com valor de significância de  $p < 0,001$ . As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prisma 5.0.

## 5.2 Estudo por dinâmica molecular

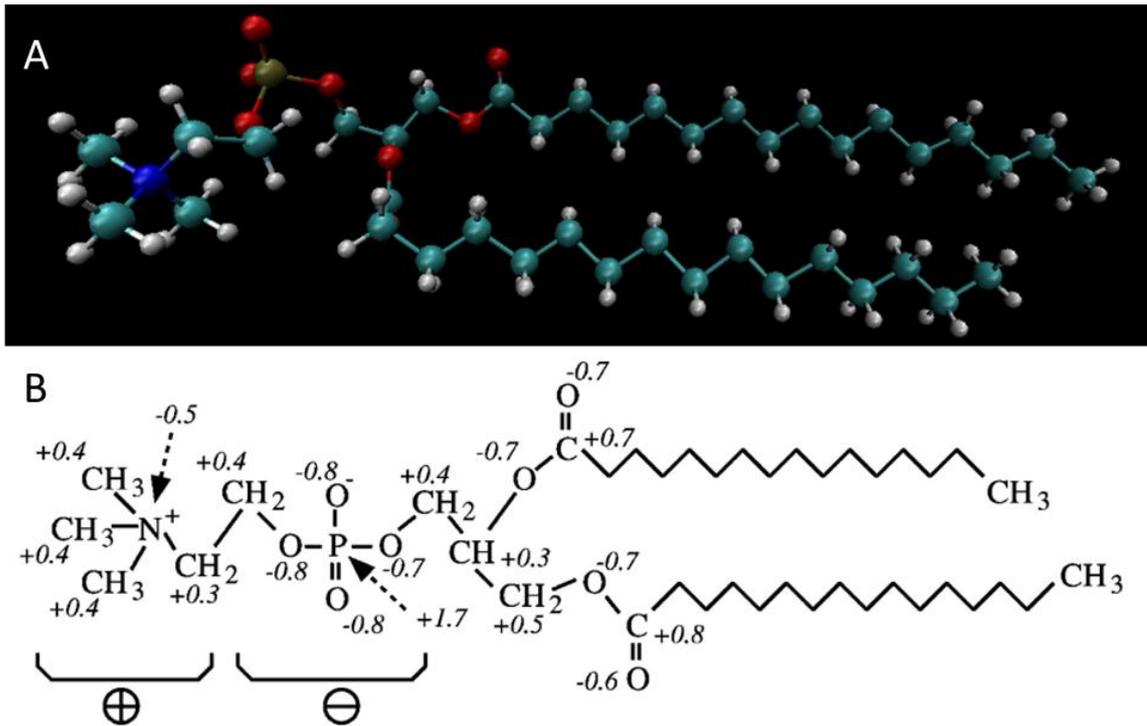
### 5.2.1 Estrutura básica

#### 5.2.1.1 Célula básica

Uma caixa padrão de dimensões  $X=6,27256$  nm,  $Y=6,29250$  nm, e  $Z=14,80$  nm, foi utilizada (Figura 15). O modelo para a bicamada lipídica foi gentilmente cedido por Andreas Kukol (KUKOL, 2009), já pré-equilibrada. O lipídeo utilizado foi o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Figura 16). A bicamada contém um total de 128 lipídeos, sendo 64 em cada lado da bicamada.

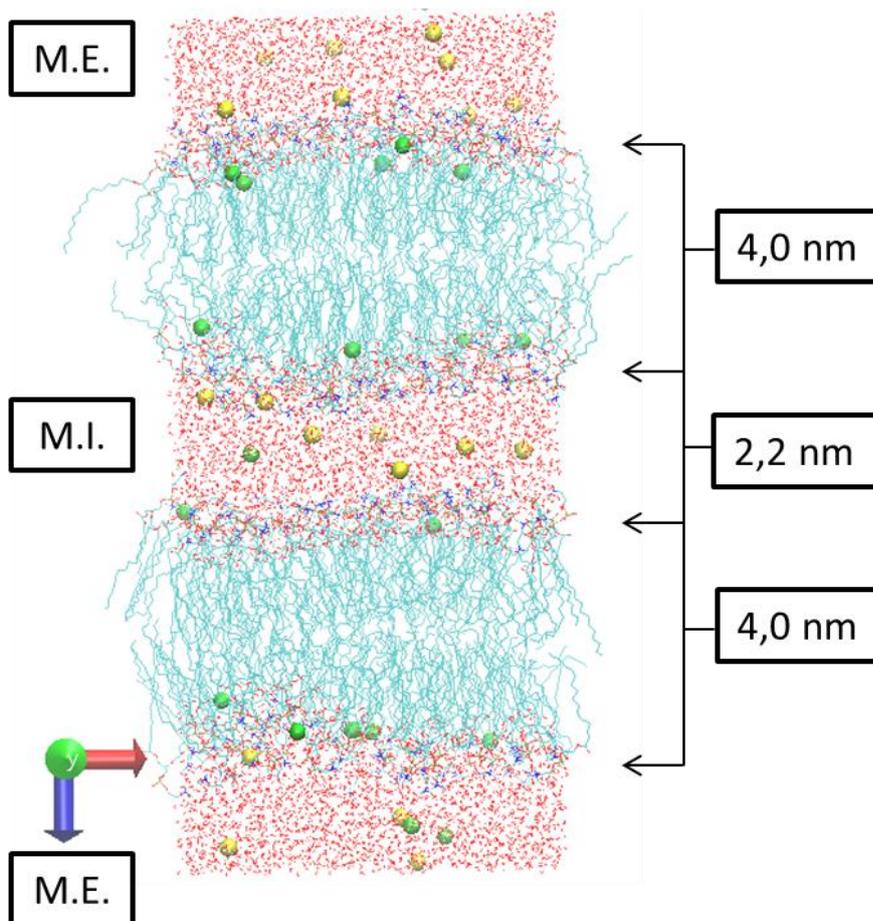


**Figura 15.** Caixa de simulação padrão visualizada pelo programa MolDen, ilustrando suas dimensões (linha verde).



**Figura 16.** (A) Imagem gerada pelo software VMD, para a estrutura química de um dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) utilizado nas simulações; e (B) definição do número dos átomos para o lipídeo DPPC com suas respectivas cargas (PATRA et al., 2004).

A estrutura básica do modelo empregado, tipo dupla bicamada lipídica, permite simular os meios intracelular e extracelular (Figura 17). No meio intracelular, semelhante para todas as simulações, foram adicionadas 2413 moléculas de água, 7 íons Na<sup>+</sup> e 7 íons Cl<sup>-</sup>, equivalente a uma concentração, em porcentagem, em torno de 0,9% (g/mL), que é a concentração que gera a força iônica ideal para um eritrócito. O total de átomos desta estrutura básica foi de 20053.



**Figura 17.** Estrutura básica de simulação, com tamanhos aproximados de cada estrutura, contendo dupla bicamada lipídica (linhas azuis), e um meio interno (M.I.) com 2413 moléculas de água (estruturas vermelhas), 7 íons  $\text{Na}^+$  (esferas verdes) e 7 íons  $\text{Cl}^-$  (esferas amarelas), e um meio externo (M.E.).

A água adicionada ao sistema foi previamente equilibrada em uma caixa de simulação contendo 2180 moléculas de água, em uma simulação de 2 ns, a  $37^\circ\text{C}$ .

### 5.2.1.2 Célula básica de etanol

Inicialmente criou-se uma caixa de simulação com moléculas de etanol, e iniciou uma simulação para equilíbrio. Com esta caixa pré-equilibrada partimos para a criação das caixas contendo concentrações de etanol crescente, de 0 a 50% (v/v). Estas caixas foram feitas com as seguintes dimensões:  $X=6,27256$  nm,  $Y=6,29250$  nm e  $Z=1,80$  nm. As moléculas adicionadas seguiram a tabela abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de espécies adicionadas em cada caixa de simulação de acordo com as concentrações crescentes de etanol.

| Solução<br>(% de etanol*) | Número de moléculas |      |                 |                 |
|---------------------------|---------------------|------|-----------------|-----------------|
|                           | Etanol              | Água | Na <sup>+</sup> | Cl <sup>-</sup> |
| 0                         |                     | 2251 | 6               | 6               |
| 10                        | 70                  | 2036 | 6               | 6               |
| 20                        | 156                 | 2012 | 7               | 7               |
| 30                        | 243                 | 1847 | 7               | 7               |
| 35                        | 272                 | 1632 | 7               | 7               |
| 40                        | 315                 | 1544 | 7               | 7               |
| 50                        | 391                 | 1250 | 7               | 7               |

\* %<sub>(v/v)</sub>

Com estas caixas prontas, duplicamos as mesmas e unimos com a célula básica de simulação, nas extremidades vazias, como exposto na figura 15, para então iniciarmos as simulações.

### 5.2.2 Simulações de dinâmica molecular

Após a finalização da modelagem dos sistemas de simulação, iniciamos uma minimização de energia com 10.000 passos, utilizando o algoritmo *steepest descent*, seguida de equilíbrio dos mesmos, com simulações de 0,1 ns com temperaturas crescentes de 0, 180 e 310 K, tendo fixadas as ligações.

As simulações então foram realizadas durante 60 ns em um ensemble isotérmico-isobárico (NPT), com tempo de integração de 2 fs.

A temperatura foi mantida a 310 K acoplando solventes e solutos paralelamente aos termostatos de Berendsen com um tempo de relaxação de 0,1 ps. A pressão foi mantida a um bar pelo acoplamento do barostato de Berendsen com um tratamento semiisotrópico e tempo de relaxação de 2 ps e com compressibilidade de  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ .

As interações eletrostáticas e de van der Waals de curto alcance foram descritas utilizando raio de corte de 0,9 e 1,4 nm respectivamente. Já as interações eletrostáticas de longa distância foram consideradas empregando-se o método PME (Particle Mesh Ewald).

Foi utilizado o campo de força Gromos96 53a6 com as adaptações das cargas sugeridas por Kukol (2009) conforme descrito na figura 16.

### **5.2.3 Detalhes computacionais**

As simulações dinâmicas foram realizadas utilizando pacote computacional Gromacs 4.5.4. Foram ainda utilizados os programas HyperChem 7, para modelagem do sistema; VMD 1.9 e Molden para visualização dos sistemas e vídeos das simulações.

Os computadores utilizados para as simulações foram: um computador Intel core i7, 3.41 GHz, com 8 GB de memória RAM DDR3 e 1 TB de HD e um computador Intel core i7 com uma GPU Tesla, 2TB de HD, e 24 GB de memória RAM DDR3.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **6.1 Teste *in vitro* do etanol sobre a membrana de eritrócitos**

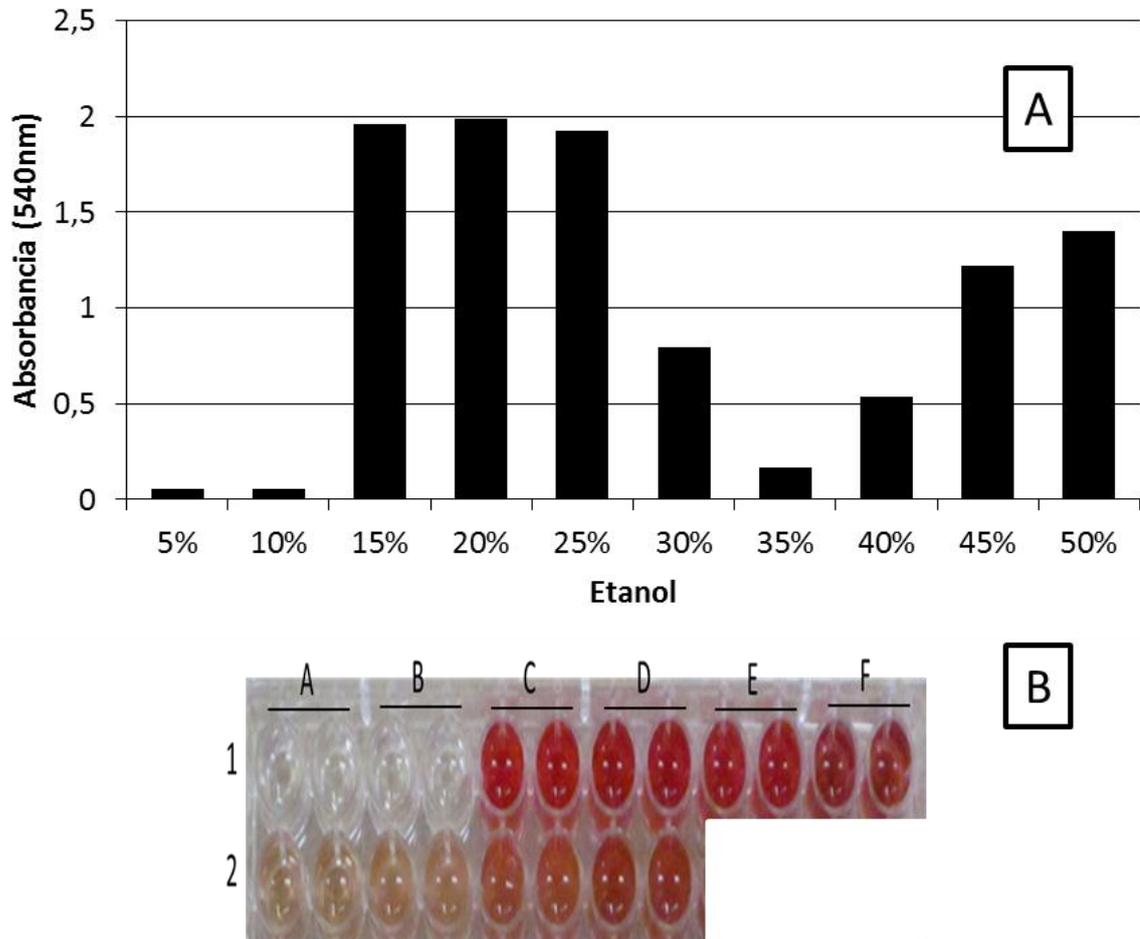
Etanol é uma substância com conhecidos efeitos deletérios para os organismos vivos. Dentre outros, pode-se citar o efeito deletério sobre neurônios de ratos, cuja mãe ingeriu bebida alcoólica durante o período gestacional (LOPES et al., 2009; AVERSI-FERREIRA et al., 2006; AVERSI-FERREIRA et al., 2004).

De acordo com a farmacologia, um fármaco para exercer seu efeito, depende de sua concentração no sítio de ação, e para que isto ocorra, o mesmo depende de sua absorção e distribuição pelo organismo através do sangue (KATZUNG, 2010). Baseado nesta informação, um dos primeiros tecidos que o etanol entra em contato é o sanguíneo, visto sua rápida absorção no trato gastrointestinal. Uma interação sobre os eritrócitos com efeitos tóxicos pode gerar diminuição no transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, e hipóxia tecidual.

A exposição dos eritrócitos de ratos em concentrações crescentes de etanol, de 0 a 50%<sub>(v/v)</sub>, revelou um efeito anômalo com o maior rompimento dos eritrócitos em concentrações próximas a 20%<sub>(v/v)</sub>, porém próximo a 35%<sub>(v/v)</sub> foi evidenciada uma diminuição desta lise, com aumento de lise somente a partir de 45%<sub>(v/v)</sub> de concentração de etanol (Fig. 18). A figura 18 ilustra este evento com aumento da concentração de etanol e a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro. As cores vermelhas intensas mostram a exteriorização da hemoglobina devido ao rompimento das hemácias, e as cores mais claras indicam um menor rompimento/lise celular.

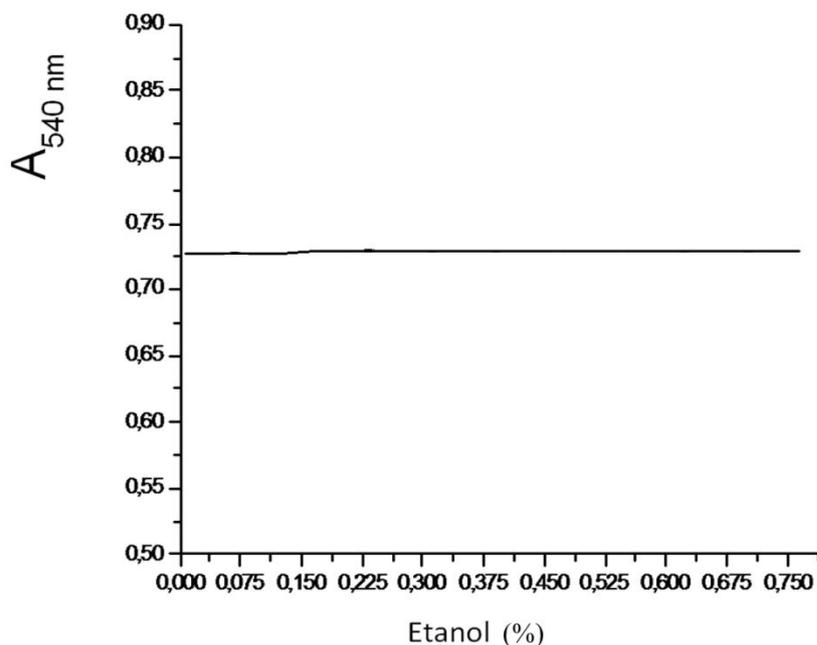
O efeito esperado para um fármaco é dose-resposta dependente, ou seja, com o aumento da dose há aumento da resposta, o que não foi observado neste estudo para o etanol, portanto sugerimos este ser um efeito anômalo.

Penha-Silva e colaboradores (2008) encontraram efeito semelhante quando testaram o sangue humano, porém com valores inferiores ao encontrados neste trabalho com sangue de ratos. A explicação fornecida pelo referido trabalho (Penha-Silva et al., 2008) baseia-se na alteração da força iônica do meio, porém nossa hipótese está no efeito desta substância diretamente sobre os lipídeos de membrana o que resulta em efeitos sobre a organização e a entropia do sistema.



**Figura 18.** A) Leitura da absorbância a 540 nm do sangue exposto a concentrações crescente de etanol. B) Imagem do sobrenadante (Linha 1: A-etanol 5% (v/v); B-etanol 10%, C-etanol 15% (v/v), D-etanol 20% (v/v), E-etanol 25% (v/v), F-etanol 30%; Linha 2: A-etanol 35% (v/v); B-etanol 40% (v/v), C-etanol 45% (v/v), D-etanol 50% (v/v).

Em concentrações muito baixas de etanol, abaixo de 1%<sub>(v/v)</sub>, mas na ausência de cloreto de sódio, ocorre hemólise dos eritrócitos (Figura 19). Inferimos que estes íons, sódio e cloreto, geram proteção e estabilidade na estrutura, logo o efeito osmótico protetor/mantenedor para a estrutura da bicamada é fornecida pela solução em que as membranas estão inseridas (CAMPBELL, 2000; LEHNINGER et al., 2007; YEAGLE, 1989). Com isto, podemos inferir que; primeiro, o etanol não atua sobre a força iônica, pois, caso este fosse o efeito, com o aumento da concentração o esperado seria a lise dos eritrócitos, e não teríamos a possibilidade de efeito protetor como verificados para o etanol (Fig. 18). Segundo, o efeito osmótico protetor é conferido aos eritrócitos pela solução aquosa com presença dos íons cloreto de sódio como visto nos resultados da figura 19.

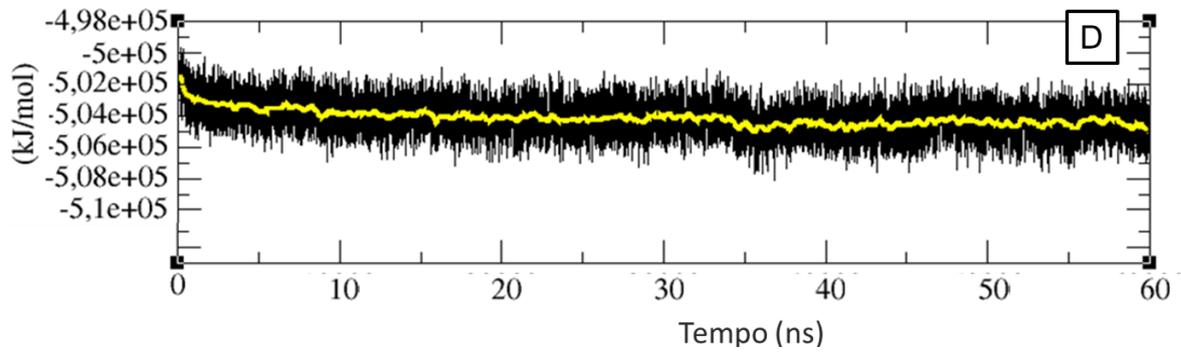
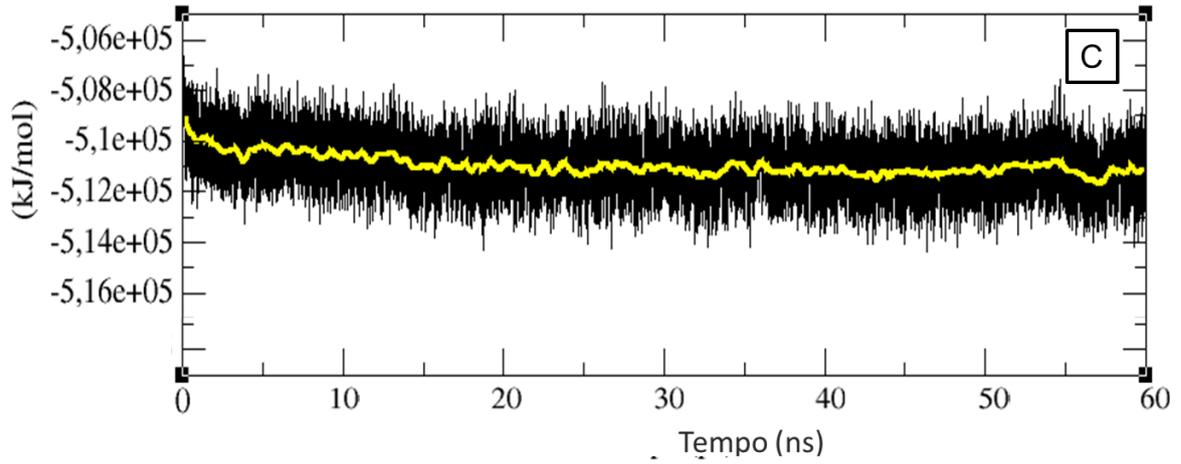
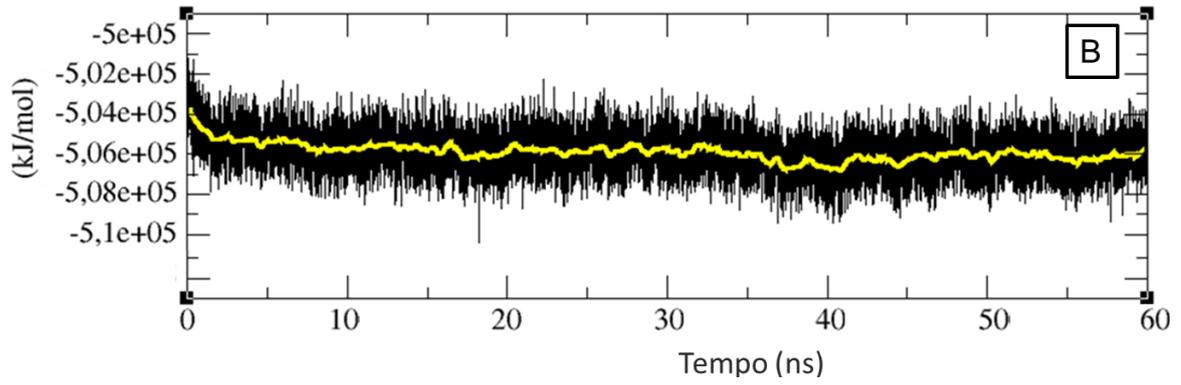
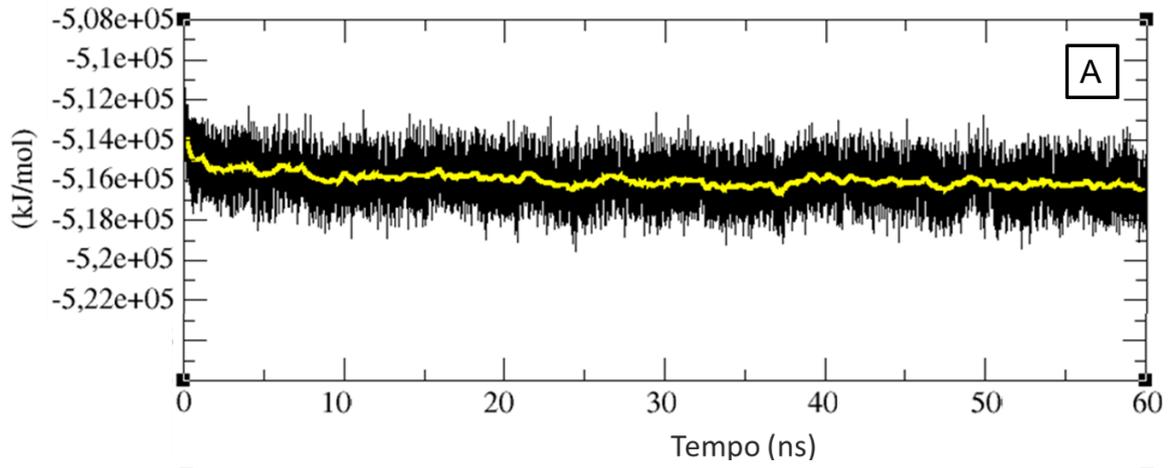


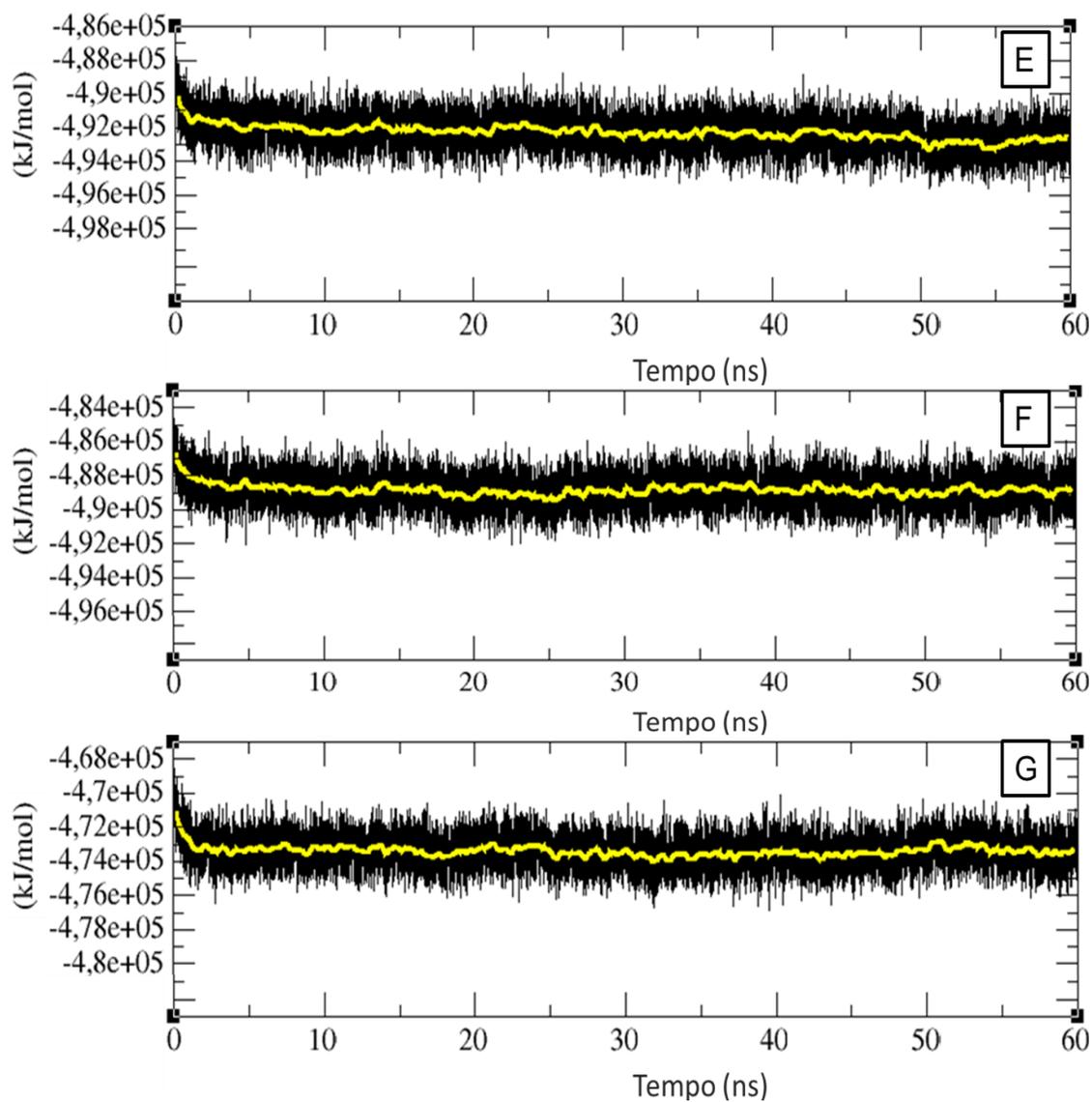
**Figura 19.** Absorvância, a 540 nm, do sangue exposto a baixas concentrações de etanol, de forma crescente, em água e ausência de NaCl, demonstrando a lise celular desde as primeiras concentrações.

## 6.2 Simulações de dinâmica molecular

### 6.2.1 Energia total dos sistemas simulados

Um parâmetro importante para analisarmos o equilíbrio dos sistemas é a análise da energia total do sistema, que normalmente tendem a um mínimo no início das simulações. Todos os sistemas estudados tenderam para um mínimo antes dos 10 ns. de simulações (Fig. 20), demonstrando assim que os mesmos encontram-se equilibrados. Porém pequenos picos de variação de energia aparecem durante toda a simulação para todos os sistemas, o que demonstra a constante tentativa de reorganização das moléculas e suas interações (Fig.20).





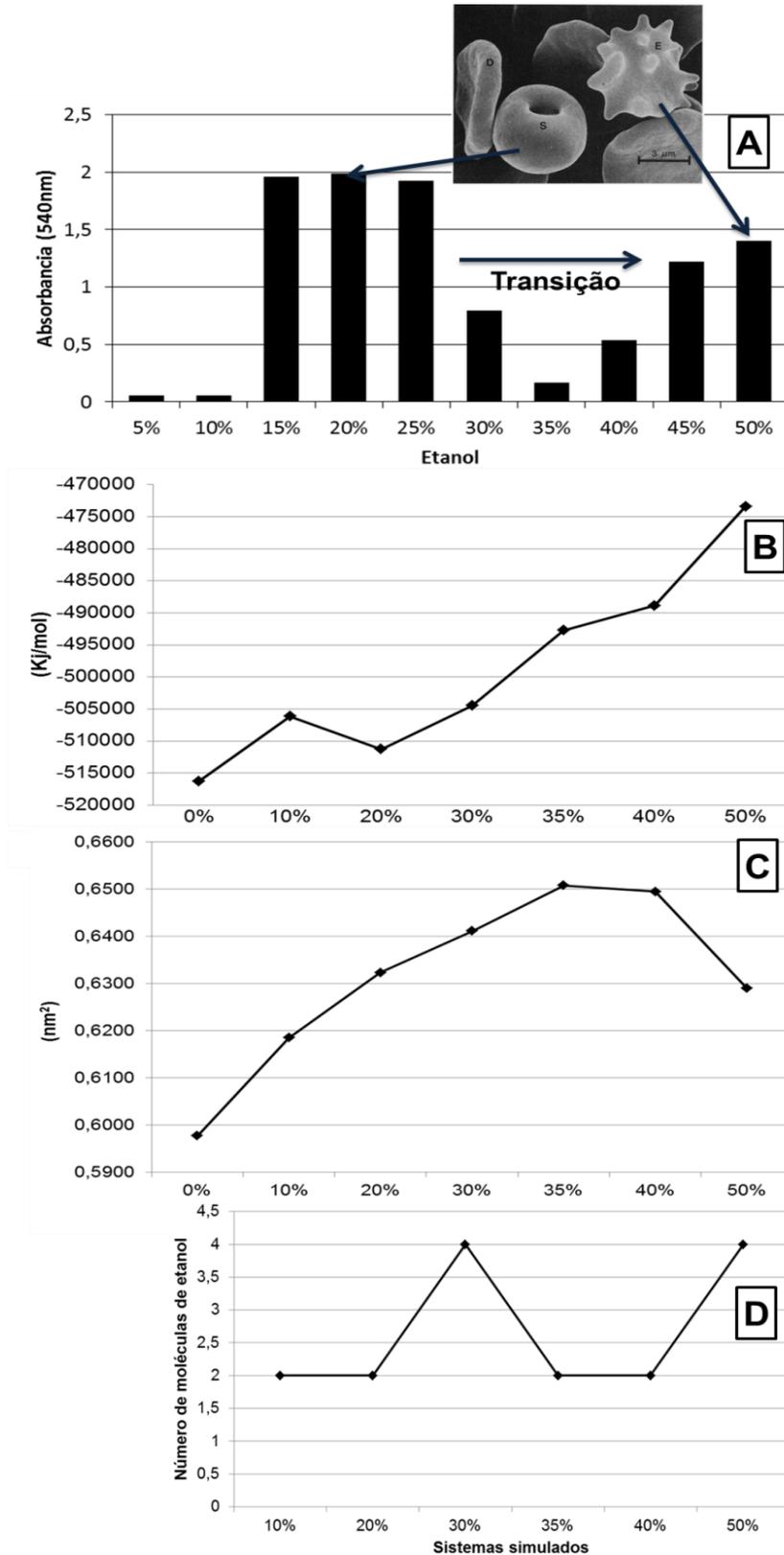
**Figura 20.** Comportamento temporal da energia total do sistema em concentrações crescentes de etanol: A) DPPC+EtOH 0%; B) DPPC+EtOH 10%; C) DPPC+EtOH 20%; D) DPPC+EtOH 30%; E) DPPC+EtOH 35%; F) DPPC+EtOH 40%; G) DPPC+EtOH 50%.

### **6.2.2 Visão geral dos sistemas estudados**

Ao comparar a média de energia total dos últimos 10 ns de cada sistema simulado (Fig. 21B), podemos observar uma tendência ao aumento da energia pelos sistemas, mas com um pico a 10%, e uma diminuição a 20% de etanol. Este dado pode sugerir uma maior instabilidade e estabilidade respectivamente, mas no geral o aumento da concentração do etanol tende a desestabilizar o meio.

Para a área por lipídeo (Fig. 21C), também observamos um aumento da mesma até 35%, quando a partir deste ponto, há um decréscimo em 40 e 50%. Esta redução final não está relacionada à maior organização dos lipídeos, pelo contrário, nestas concentrações os lipídeos encontram-se visualmente desordenados com tendências à perda da estrutura em bicamada como observado nas imagens dos sistemas ilustrada a frente neste trabalho (Fig. 32A).

Ao final de cada simulação, fizemos a contagem do número de moléculas de etanol que se encontravam no meio intracelular (Fig. 21D) e os sistemas que apresentavam maior difusão do etanol foram os de 30 e 50% de etanol.



**Figura 21.** (A) Leitura da absorbância a 540 nm do sangue exposto a concentrações crescente de etanol, ilustrando a morfologia dos eritrócitos; (B) Média da energia total nos últimos 5 ns. de cada sistema simulado; (C) Média da área por lipídeo de cada sistema nos últimos 5 ns das simulações; (D) Número de moléculas de etanol que estavam no meio intracelular ao final dos 60 ns. de simulações em cada sistema.

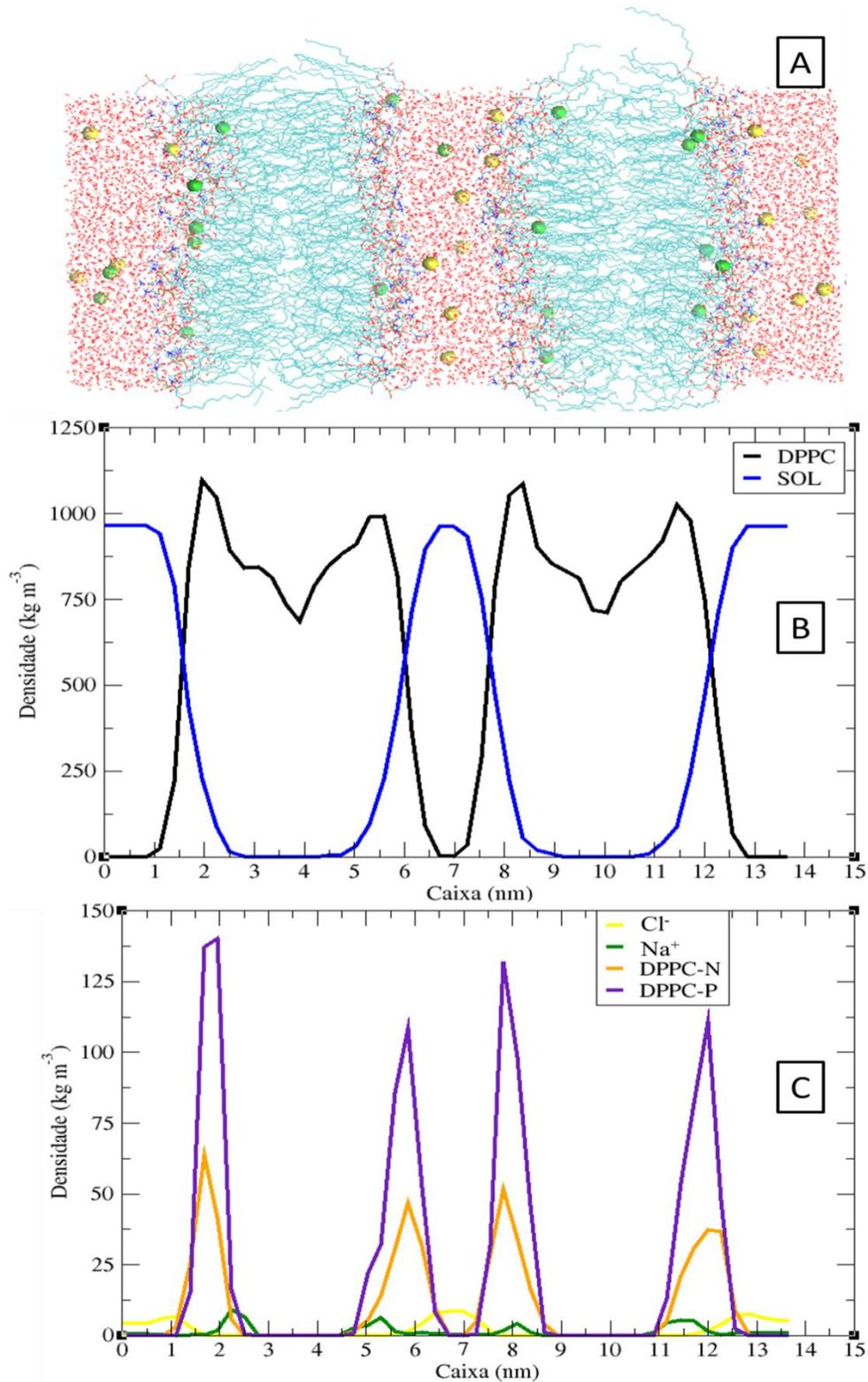
### **6.2.3 Sistema na ausência de etanol**

No último frame da simulação do sistema na ausência de etanol, a bicamada lipídica mostrou-se integrada e organizada (Fig.22A e Fig.23A) com densidades semelhantes na porção externa e interna de cada bicamada (Fig.22B), tendo ainda solvente nas porções polares dos DPPC's.

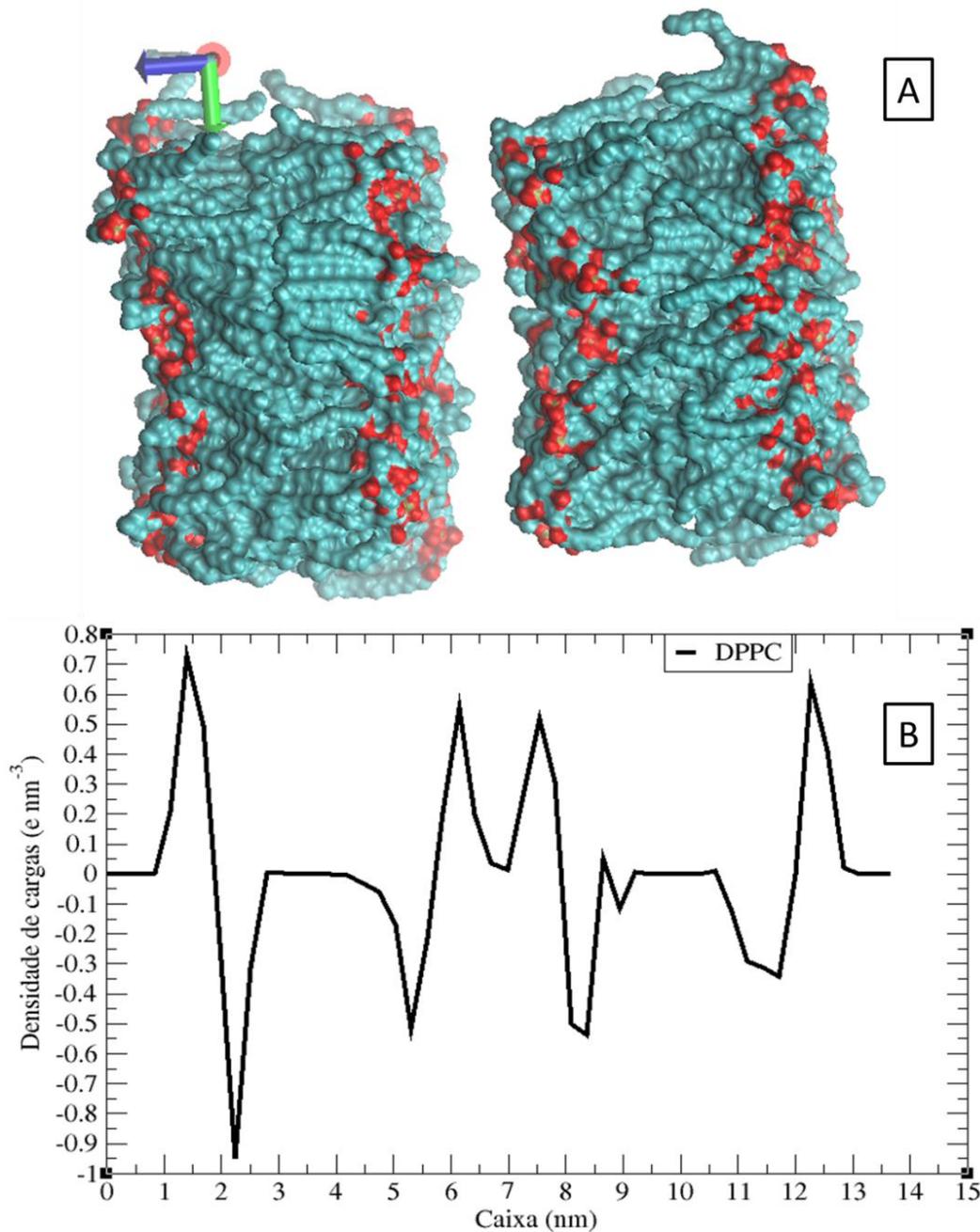
Os íons sódios tenderam a uma maior densidade pela caixa na região de maior densidade dos íons fosfato da membrana (Fig.22C). Isso se justifica pela atração entre as cargas, positiva do sódio (+1) e negativa do grupo fosfato (-1). Esta interação do sódio pela membrana, pode justificar ainda a presença de mais solvente na porção polar da bicamada, uma vez que o sódio necessita de uma capa de solvatação.

Os íons cloreto estavam localizados juntamente com a água (Fig.22A), com densidade elevada na região entre as bicamadas (Fig.22C). Este resultado indica a preferência de interação destes íons pela água. Uma outra explicação desta preferência dos íons sódio pela membrana e os íons cloreto pelo solvente, se dá pelo tamanho dos íons, pois o sódio sendo menor, tem maior capacidade de adentrar os lipídeos e interagir ao contrário do cloreto.

A densidade dos grupos colina (DPPC-N), com carga positiva e grupos fosfato (DPPC-P) com cargas negativas, se sobrepõem (Fig. 22C) devido à atração entre estes grupamentos gerando dobramento na estrutura. Porém é evidente a diferenciação das cargas como visto na imagem do último frame da simulação, onde a porção vermelha na bicamada ilustra a porção polar da mesma (Fig.23A), e a densidade na caixa (Fig.23B) evidencia os predomínios de cargas positivas e negativas.



**Figura 22.** (A) Imagem da caixa de simulação com ausência de etanol no último frame da simulação (esferas verdes:  $\text{Na}^+$ ; esferas amarelas:  $\text{Cl}^-$ ); (B) Gráfico com perfil da densidade de massa do fosfolípido (DPPC) e solvente (SOL); e (C) dos íons Cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e Sódio ( $\text{Na}^+$ ), nitrogênio (DPPC-N) e fosfato (DPPC-P) do fosfolípido distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanossegundos de simulação.

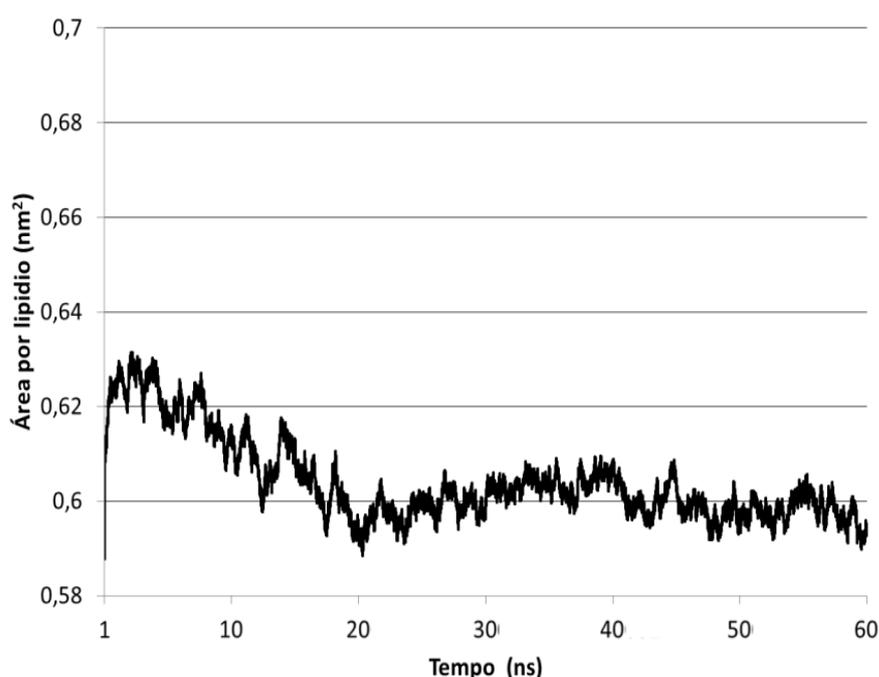


**Figura 23.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com ausência de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns. de simulações.

Bockmann e colaboradores (2003) estudaram a influência de diferentes concentrações de cloreto de sódio sobre bicamadas lipídicas (POPC) através de dinâmica molecular e por experimentos de espectroscopia de emissão resolvida no tempo (*Time Correlated*). Estes encontraram que a contribuição destes íons sobre o potencial eletrostático total do sistema é muito pequena. Por outro lado, a contribuição individual dos íons é significativa, principalmente na polarização da água.

Os íons  $\text{Na}^+$  tendem a estabilizar a carga negativa da membrana (BOCKMANN et al. 2003) como observado ao interagir com os grupos fosfato (Fig.22C). O conjunto das interações iônicas gera um aumento do momento dipolo dos lipídeos (SHINODA et al., 2007) com regiões bem definidas como observado no gráfico da figura 23B.

Shinoda e colaboradores (2007) citam ainda que os íons  $\text{Na}^+$  penetram as membranas lipídicas, ligando-se aos grupos fosfatos de dois ou três lipídeos vizinhos o que provoca uma redução na área por lipídeo, assim como o observado em nosso estudo (Fig. 24). Esta redução de área indica uma redução da fluidez da membrana e maior adesão entre os lipídeos.



**Figura 24.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com ausência de etanol.

Quanto aos íons cloreto presentes na porção aquosa, Bockmann e colaboradores (2003) mencionam que esta interação  $\text{Cl}^- - \text{H}_2\text{O}$  gera polarização desta última. Aliado à estabilização da carga negativa do grupo fosfato pelos íons sódio, há uma facilitação para a interação do solvente com a parte polar dos lipídeos uma vez que ainda apresentam o grupamento amina com carga positiva livre. Isto diminui a entropia do sistema, por não necessitar de uma maior reorganização das moléculas de água para propiciar tal interação (LEHNINGER et al., 2007).

Por outro lado, os lipídeos sem a presença de  $\text{Na}^+$ , aumentariam as interações entre as cargas na porção polar entre lipídeos adjacentes, o que reduziria a interação óleo/água e demandaria uma menor entropia do sistema, pois as moléculas de água demandariam uma maior organização para interagirem com as cabeças polares.

Substâncias apolares como os lipídeos, geram um decréscimo na entropia no sistema, portanto, uma reação desfavorável, como acontece com a estrutura das bicamadas lipídicas, porém estas tendem a dirimir estes efeitos sobre a entropia do sistema com as interações hidrofóbicas das cadeias apolares ordenadas no interior das bicamadas, expondo assim a cabeça polar para água adjacente.

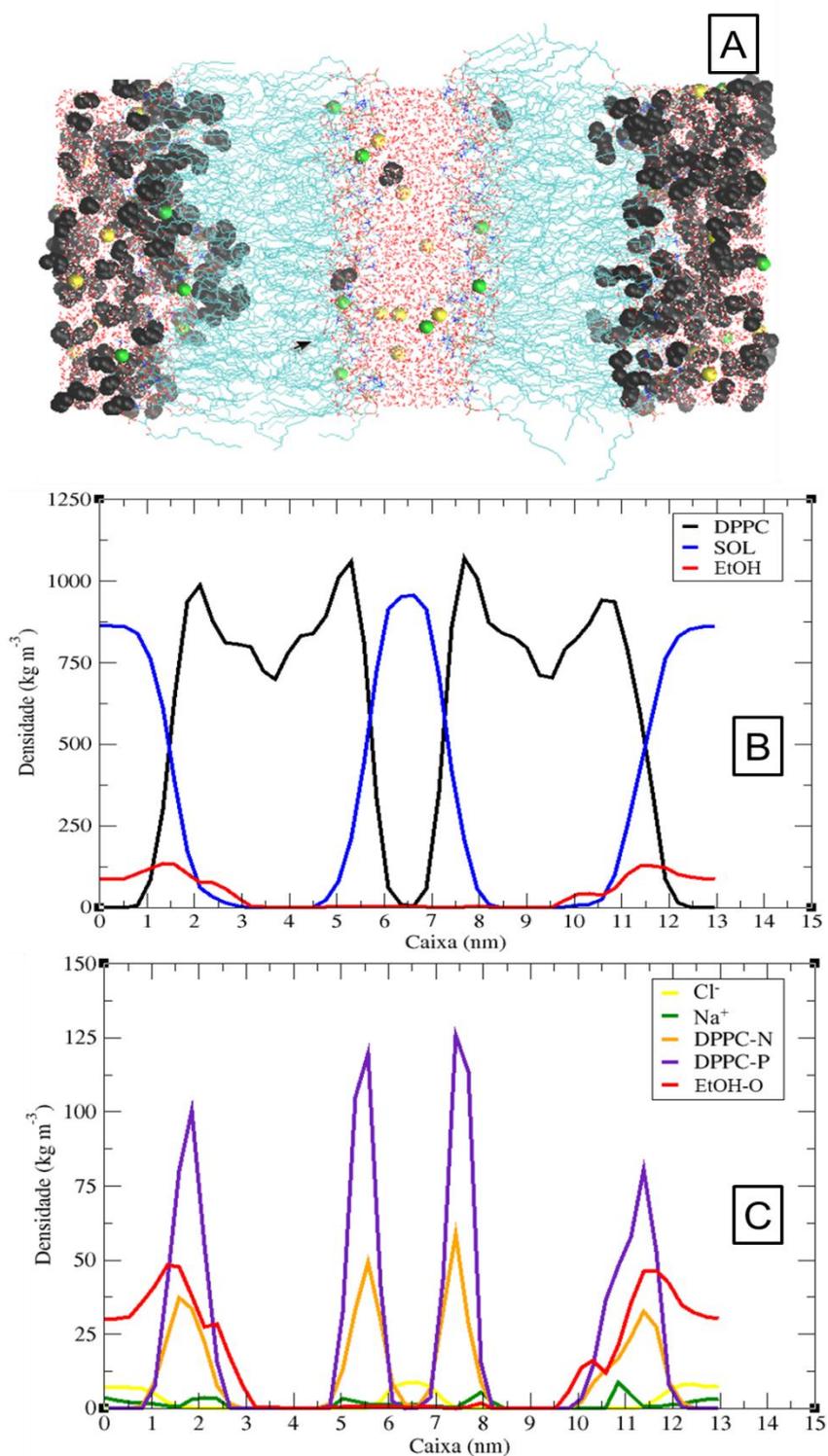
#### **6.2.4 Sistema com etanol a 20%<sub>(v/v)</sub>**

No sistema simulado com presença de etanol a 20%<sub>(v/v)</sub>, podemos observar que houve uma retração no tamanho da caixa em Z, que antes (Fig.22B) ultrapassava 13,5 nm e neste sistema está abaixo de 13 nm (Fig.25A). Esta retração pode ser explicada pela presença do etanol no sistema.

Verificamos também que o etanol interage com a porção polar da bicamada fosfolipídica, visualizado tanto no último frame da simulação (Fig.25A) quanto no gráfico de perfil das densidades de massas (Fig. 25B).

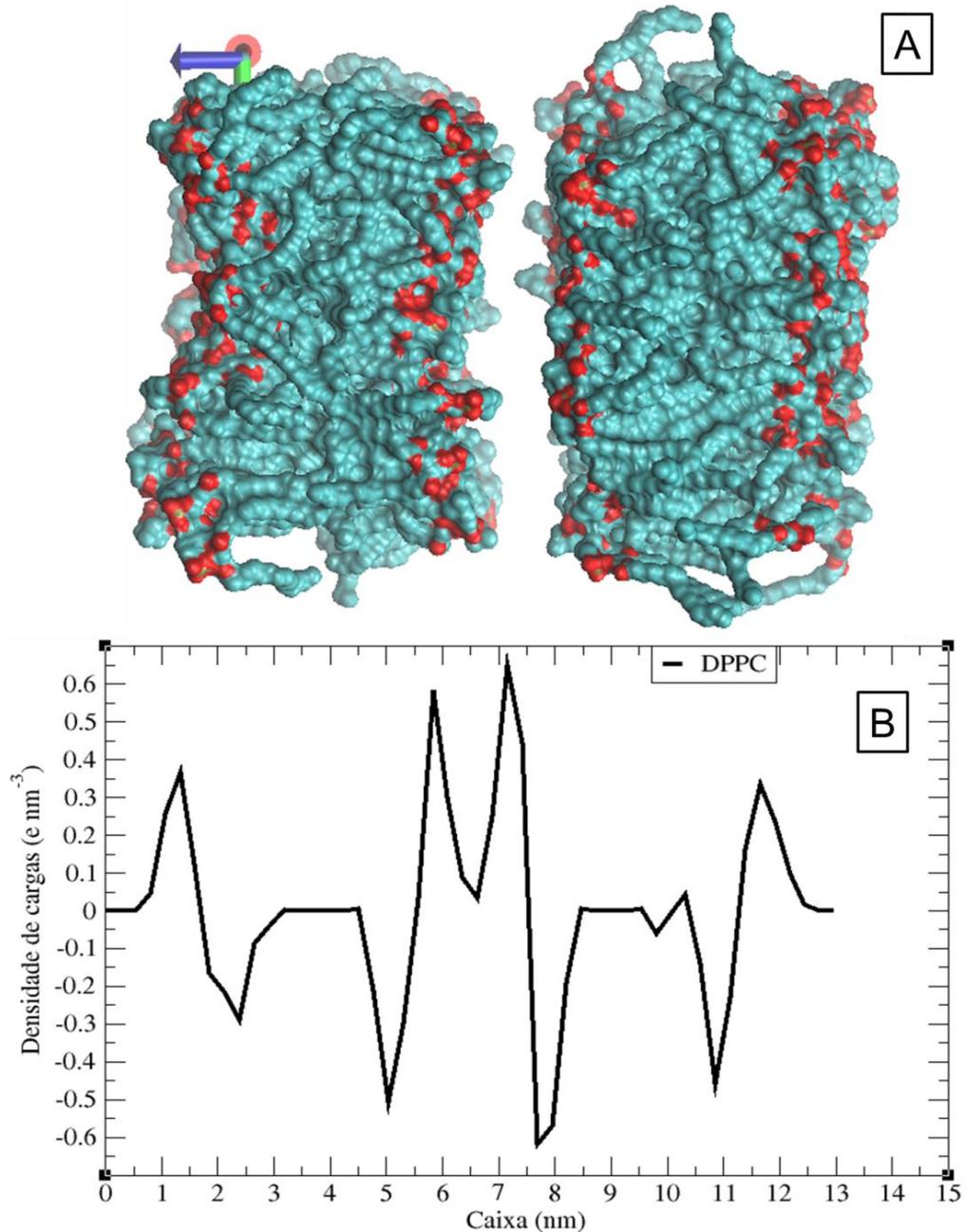
O oxigênio da hidroxila (EtOH-O) do etanol tem densidade aumentada na região próxima ao grupo fosfato dos lipídeos (Fig. 25C), o que gerou a diminuição na altura e o alargamento dos picos de densidade dos grupos fosfatos, bem evidente nas porções externas de cada bicamada.

Os íons  $\text{Na}^+$  apresentaram picos de densidades próximos aos grupos fosfatos, porém menores e mais dispersos que no sistema anterior (Fig.22C), o que indica um deslocamento de densidade devido à presença de etanol no sistema (Fig. 25C) inclusive na região entre as bicamadas (MI). Os picos de densidade de  $\text{Na}^+$  estão elevados na região em que há um decréscimo de densidade do etanol (Fig.25C), o que sugere, portanto, que o etanol compete com o sódio pela interação aos grupos fosfato.



**Figura 25.** (A) Imagem da caixa de simulação com 20%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação (esferas negras: etanol; esferas verdes: Na<sup>+</sup>; esferas amarelas: Cl<sup>-</sup>); (B) Gráfico com perfil da densidade de massa do fosfolípido (DPPC), solvente (SOL) e etanol (EtOH); e (C) dos íons Cloreto (Cl<sup>-</sup>) e Sódio (Na<sup>+</sup>), nitrogênio (DPPC-N) e fosfato (DPPC-P) do fosfolípido e oxigênio do etanol (EtOH -O) distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanosegundos de simulação.

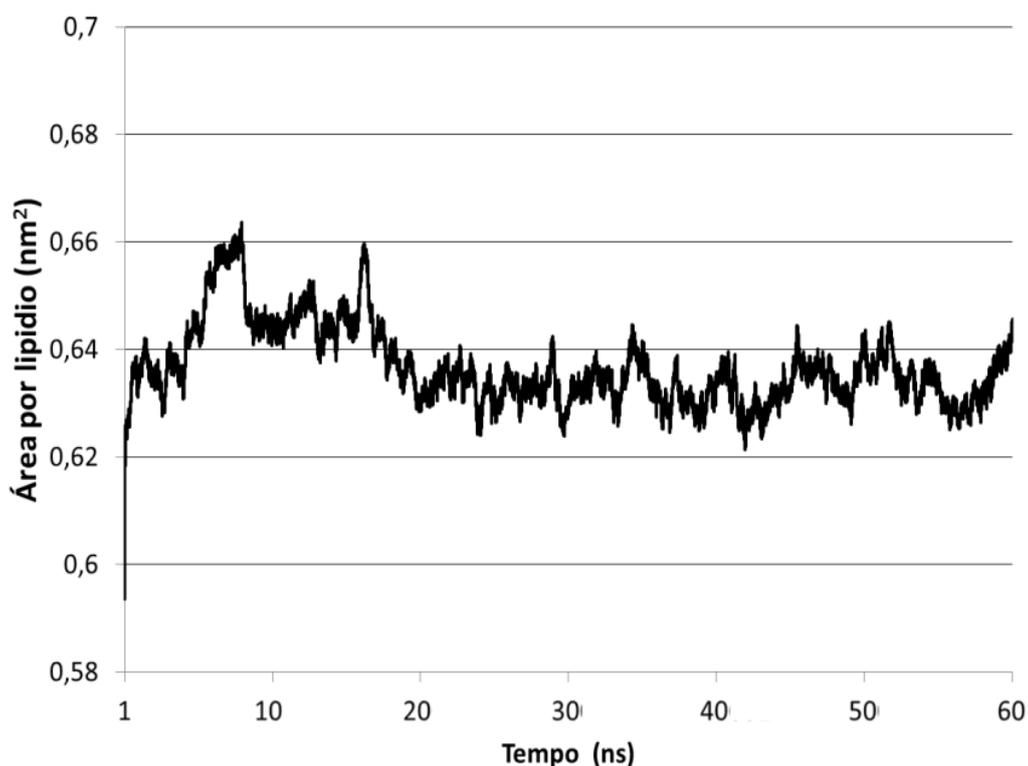
Desta interação do etanol com a bicamada e o descolamento dos íons  $\text{NA}^+$ , observamos uma desorganização dos lipídeos (Fig. 26A). Para a densidade de cargas nas porções externas de cada bicamada é evidente uma redução de tamanho e aumento da base neste sistema (Fig. 26B), porém isto foi pouco alterado para a porção interna. Este resultado nas cargas coincide com a variação observada nos picos de densidade dos grupos fosfato (Fig.25C).



**Figura 26.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com 20%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns de simulações.

A área por lipídeo também sofreu alteração (Fig. 27). Inicialmente observou-se um aumento, provavelmente pela interação do etanol e inicial deslocamento dos íons sódio, porém com a reorganização do sistema em presença de etanol, a área por lipídeo volta a diminuir, mas permanecendo em valores maiores ao observado no sistema anterior (Fig.24).

Este aumento da área entre os lipídeos pode ser resultado da deposição do etanol na bicamada, o que resultou em desorganização dos lipídeos e putativamente pode ser suficiente para diminuir as interações hidrofóbicas.

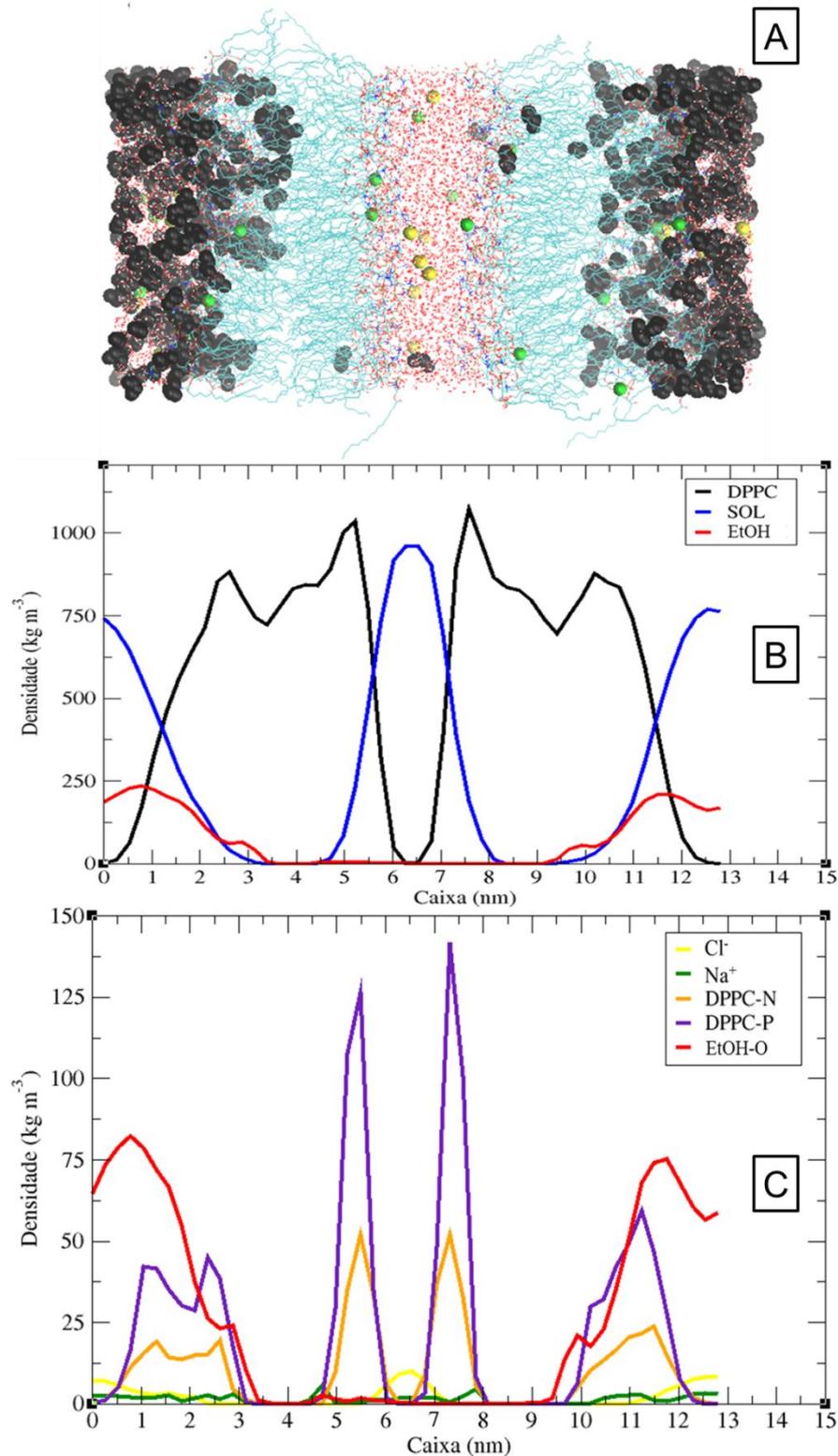


**Figura 27.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com 20%<sub>(v/v)</sub> de etanol.

### **6.2.5 Sistema com etanol a 35%<sub>(v/v)</sub>**

Na concentração de 35%<sub>(v/v)</sub> de etanol, o sistema se assemelha com o sistema anterior quanto a deposição de etanol na porção externa da bicamada lipídica (Fig.28A) e a retração no tamanho da caixa. Este efeito leva a uma maior dispersão dos lipídeos, observado pelo alargamento das bases da curva de densidade do DPPC (Fig. 28B), além de uma maior solvatação na camada externa das bicamadas, verificado através da densidade de solvente nesta porção (Fig.28B).

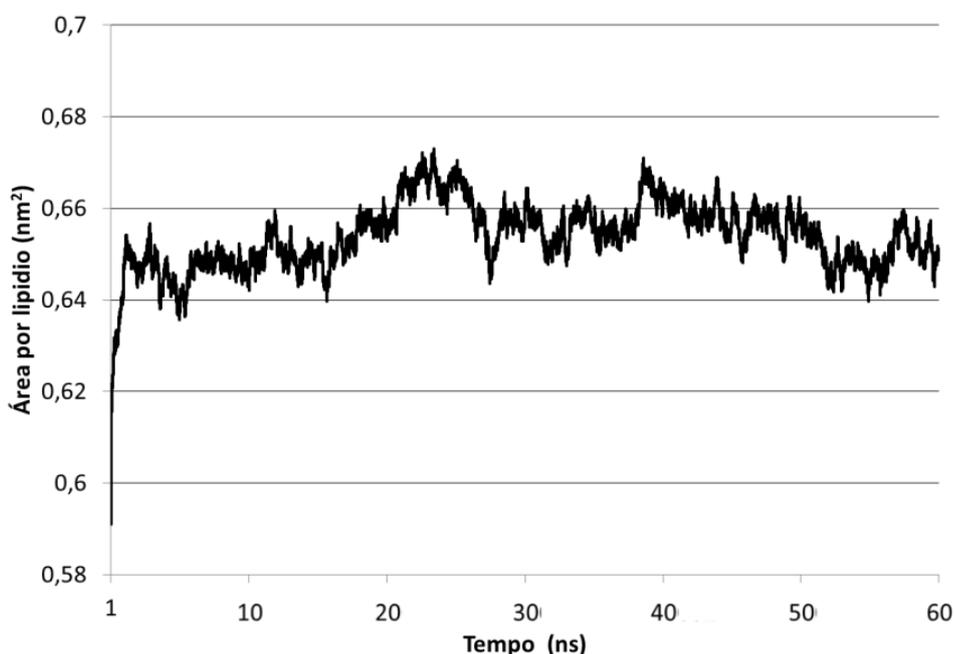
Os picos de densidade na porção interna das bicamadas (Fig.28C) tendem a seguir o padrão observado no sistema em ausência do etanol, porém na porção externa, é nítido a dispersão dos íons  $\text{Na}^+$ , DPPC-P e DPPC-N (Fig.28C).



**Figura 28.** (A) Imagem da caixa de simulação com 35%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação (esferas negras: etanol; esferas verdes:  $\text{Na}^+$ ; esferas amarelas:  $\text{Cl}^-$ ); (B) Gráfico

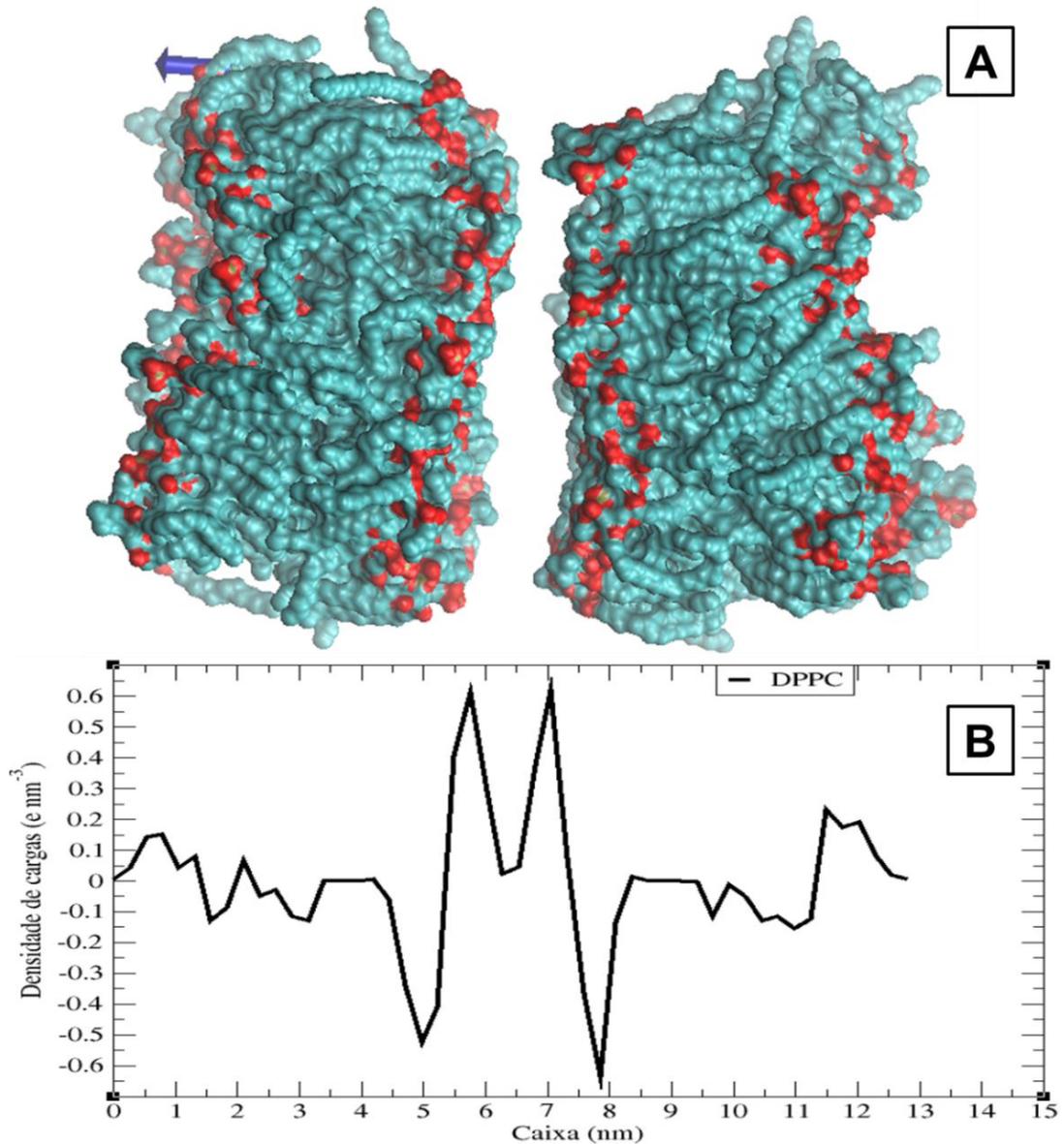
com perfil da densidade de massa do fosfolípido (DPPC), solvente (SOL) e etanol (EtOH); e (C) dos íons Cloreto (CL) e Sódio (NA), nitrogênio (DPPC-N) e fosfato (DPPC-P) do fosfolípido e oxigênio do etanol (ETOH -O) distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanosegundos de simulação.

A maior densidade de etanol e água na porção externa das bicamadas reflete na área por lipídeo (Fig.29) que teve aumento quando comparado com os sistemas anteriores, com valores superiores a  $0,66 \text{ nm}^2$  em alguns momentos da simulação.



**Figura 29.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com 35%(v/v) de etanol.

Neste sistema, podemos observar uma curvatura na membrana (Fig.30A) e uma desorganização nos lipídeos. Para as cargas, na porção interna, ainda podemos perceber os picos de cargas negativas e positivas, porém na porção externa, temos uma completa dispersão de cargas pela caixa (Fig.30B).

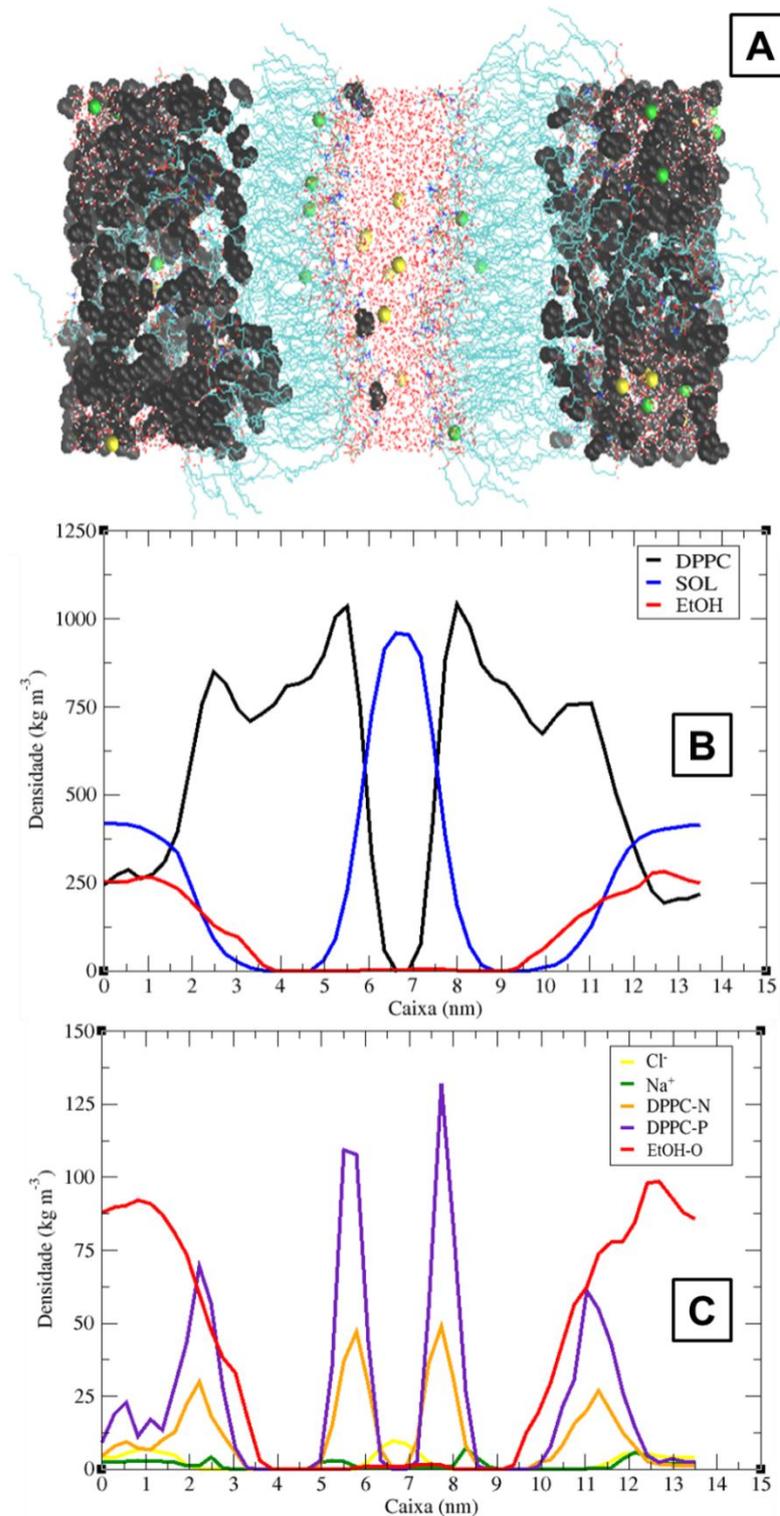


**Figura 30.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com 35%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns de simulações.

### 6.2.6 Sistema com etanol a 50%<sub>(v/v)</sub>

Nesta concentração, também é observado a aderência do etanol à porção externa da bicamada lipídica (Fig. 31A), porém com o etanol presente na maior profundidade que os sistemas anteriores. É evidente a maior deposição de etanol e água (Fig.31B). Com a maior quantidade de etanol, estes começam a gerar danos significativos a estrutura em bicamada com visual tendência à perda da estrutura da porção externa (Fig. 31A e B) por desprendimento dos lipídeos desta.

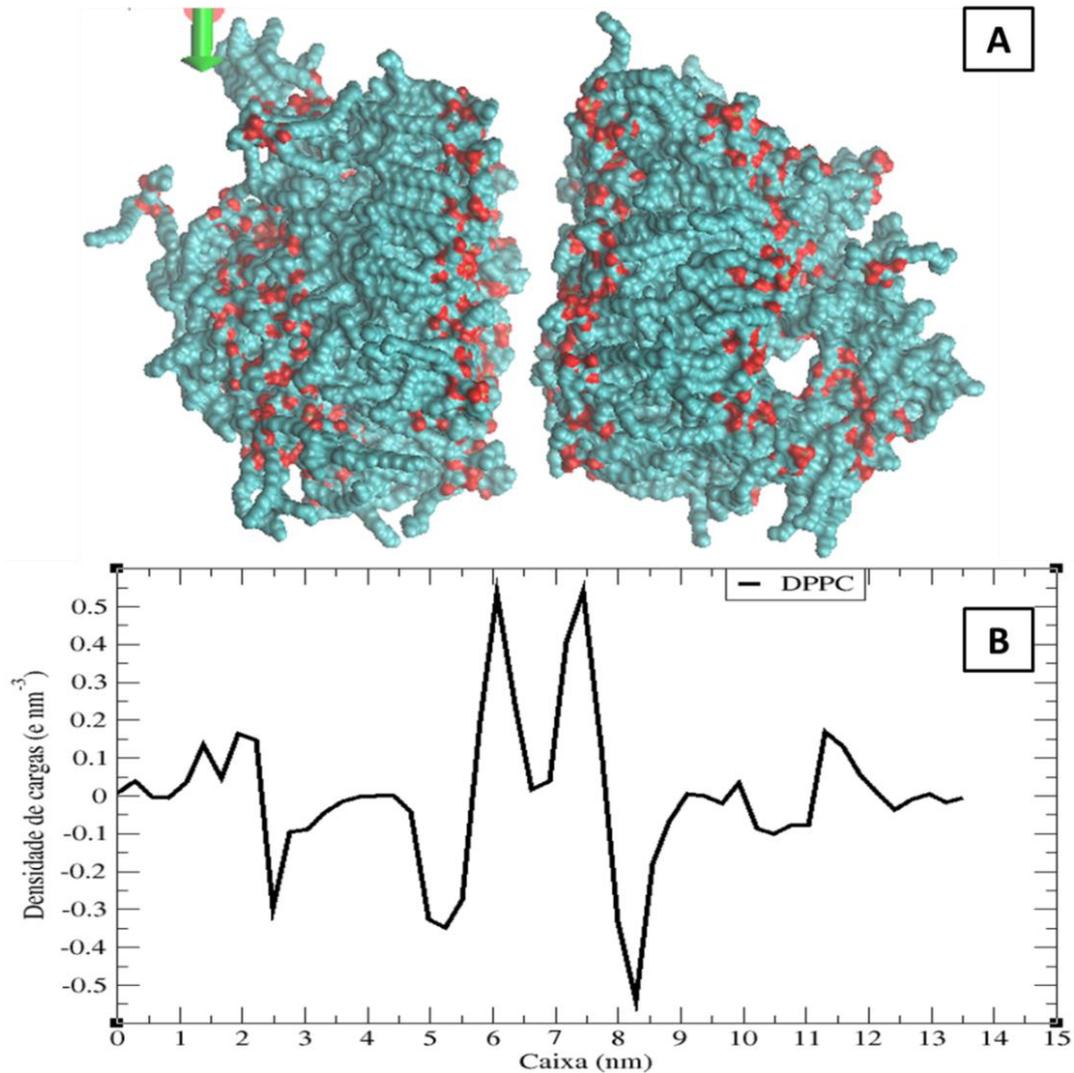
Os picos de densidade dos íons e grupos dos lipídeos e etanol seguem o mesmo padrão observado no sistema anterior.



**Figura 31.** (A) Imagem da caixa de simulação com 50%(v/v) de etanol no último frame da simulação (esferas negras: etanol; esferas verdes: Na<sup>+</sup>; esferas amarelas: Cl<sup>-</sup>); (B) Gráfico com perfil da densidade de massa do fosfolípideo (DPPC), solvente (SOL) e etanol (EtOH); e (C) dos íons Cloreto (Cl<sup>-</sup>) e Sódio (Na<sup>+</sup>), nitrogênio (DPPC-N) e fosfato (DPPC-P) do

fosfolípido e oxigênio do etanol (ETOH-O) distribuídos pela caixa de simulação, média dos últimos cinco nanosegundos de simulação.

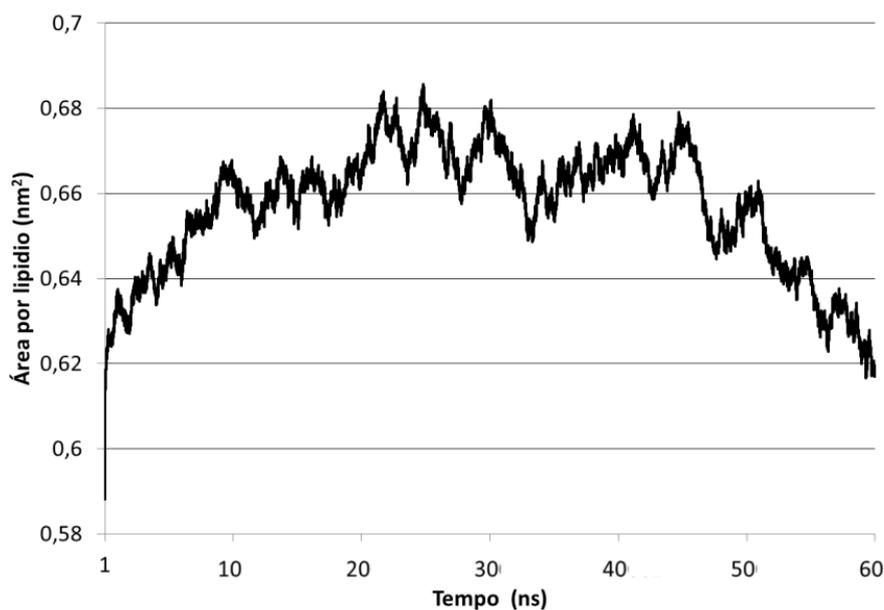
Na figura 32A, observamos um desprendimento de lipídeos da membrana na porção externa e dispersão das cargas (Fig.32B), massa estrutura e as cargas tende a se manter na porção interna.



**Figura 32.** (A) Imagem da bicamada, plano lateral, da simulação com 50%<sub>(v/v)</sub> de etanol no último frame da simulação; (B) Gráfico com perfil da densidade de cargas das bicamadas (DPPC), média dos últimos 5 ns de simulações.

Assim como no sistema anterior, observamos um aumento da área por lipídeo, a valores superiores a  $0,68\text{nm}^2$ , porém ao final da simulação estes valores caem para áreas menores que  $0,62\text{nm}^2$  (Fig.33). Isto se deve a inicial deposição de

etanol e água na bicamada lipídica, porém com a perda da estrutura em bicamada, isto reflete em diminuição de área por lipídeo.



**Figura 33.** Comportamento temporal da área por lipídeo de uma monocamada de DPPC no sistema com 50%<sub>(v/v)</sub> de etanol.

Mesmo com todas as alterações observadas na área por lipídeo dos sistemas estudados, o número de moléculas de etanol que se encontravam presentes no meio interno das bicamadas foi pequeno (Tabela 2), o que demonstra a preferência de interação do etanol pelos lipídeos de membrana.

**Tabela 2.** Número de moléculas de etanol que se difundiram pelas membranas no último frame das simulações e que estavam no espaço entre as duas bicamadas lipídicas.

| Sistema | Nº de moléculas de etanol |
|---------|---------------------------|
| 10%     | 2                         |
| 20%     | 2                         |
| 30%     | 4                         |
| 35%     | 2                         |
| 40%     | 2                         |
| 50%     | 4                         |

### **6.2.7 Análise geral dos resultados e discussões**

De acordo com Campbell (2000) a estrutura em bicamada dos lipídeos é dependente unicamente da repulsão entre os lipídeos e a solução adjacente, e não a atração intrínseca entre porções não-polares, interações hidrofóbicas, que são dependentes da distância entre as moléculas. Os íons sódio ao neutralizarem as cargas negativas dos lipídeos e os íons cloretos ao polarizarem a solução aquosa (SHINODA et al., 2007; BOCKMANN et al., 2003), propicia um aumento de entropia e facilita esta interação óleo/água. O sistema busca por um estado termodinâmico mais estável, o que gera um número menor de moléculas de água ordenadas na periferia das bicamadas (LEHNINGER et al., 2007). Com as cabeças polares solvatadas e com presenças dos íons sódio, há um aumento na repulsão entre as cabeças polares e porção apolar dos lipídeos permitindo o aprisionamento destes últimos no interior da bicamada, onde interagem por interações hidrofóbicas.

Estes eventos foram evidenciados no sistema simulado em ausência de etanol, onde ficaram evidentes as interações e a densidade de cargas bem definidas pela caixa de simulação.

Com a presença do etanol no meio, o mesmo tende a se interagir com as porções polares das bicamadas lipídicas, mesmo com o aumento da área por lipídeo, e conseqüentemente a maior solubilidade da membrana, o etanol não teve uma maior entrada de etanol pela mesma, com maiores difusões a 35 e 50% nos sistemas simulados.

Para Frangopol e Mihailescu (2001) a partição álcool e membrana lipídica são governadas majoritariamente por três forças: i) repulsão entre álcool e água, que favorece a partição do primeiro nos lipídeos; ii) atração entre o grupo polar álcool e da cabeça polar dos lipídeos; e iii) atração entre a porção acil do álcool e a cadeia carbônica da membrana.

No teste de fragilidade osmótica de eritrócitos de ratos foi verificado que, com o aumento da concentração até 20%, temos um aumento na lise destas células e a morfologia encontrada é a estomatócito. Já na faixa próxima a 50% a morfologia encontrada foi a equinócito, com presença também de lise celular. Porém um efeito anômalo foi observado nas concentrações 30, 35 e 40%<sub>(v/v)</sub> de etanol. A esta região foi identificado como a região de transição entre os estados estomatócitos e equinócitos dos eritrócitos.

As alterações observadas pela ação do etanol, tanto no teste experimental como nos sistemas simulados não foram dose dependente, ou seja, para cada concentração de etanol tivemos respostas diferentes. Isto reforça o indício de que a ação do etanol está relacionada à organização do sistema, e não a força iônica.

No primeiro ponto de lise dos eritrócitos, ou seja, a 20% no teste experimental, os resultados da simulação de dinâmica molecular evidenciaram um deslocamento dos íons sódio e aumento de densidade do etanol e água na porção externa da bicamada, o que resultou em aumento da área por lipídeo, que gera aumento da solubilidade da membrana. Todos estes eventos aliados à diminuição da tensão superficial da água (FRANGOPOL e MIHAILESCU, 2001), podem explicar a lise celular evidenciada nesta concentração no teste experimental, pela entrada de água, que modifica a morfologia dos eritrócitos para estomatócitos e posterior rompimento das membranas.

Com o aumento da concentração de etanol até 35%, foi verificada a redução na lise dos eritrócitos no teste *in vitro*. Na simulação observamos novamente a deposição de mais moléculas de etanol na porção polar das bicamadas lipídicas, aumento da área por lipídeo, porém as porções externas das bicamadas apresentaram uma dispersão de cargas, não se mostrando bem definidas. Ainda é possível verificar que o sódio está novamente presente em maior concentração na bicamada independente do pico de concentração do etanol.

Com este resultado podemos inferir que o efeito anômalo observado no teste *in vitro* deve-se ao fato das moléculas de etanol se aderirem à membrana, inicialmente, na porção externa, como nas concentrações abaixo deste valor, porém o sistema se estabiliza com a maior quantidade de moléculas de etanol, que passam a realizar ligações etanol-etanol, em detrimento da ligação etanol-lipídeo, formando clusters de etanol e água como citado no trabalho de Liu e colaboradores (2006).

Esta interação lipídeo-etanol-etanol anula a porção polar entre as moléculas de etanol, o que diminui a possibilidade de entrada de água para o interior da célula e sua lise por aumentarem novamente as interações hidrofóbicas na bicamada, e pelo etanol que interage em média a duas moléculas de água (LIU et al., 2006), ocasionando uma retração do sistema. Isto pode ser a transição do estado estomatócito para o estado equinócito verificado no estudo experimental.

No teste *in vitro* com a maior concentração (50%), o etanol volta a exercer ação deletéria sobre a membrana. Na simulação desta concentração, os lipídeos da

porção externa tendem a sair da estrutura em bicamada. Este evento pode estar relacionado ao aumento das moléculas de etanol que, além de interagirem etanol-etanol como no sistema anterior, passam a interagir etanol-lipídeo.

O aumento destas moléculas não foi suficiente para exercer uma expressiva difusão de etanol pela membrana, mas o que se percebe é o aumento da densidade do etanol na membrana, reforçando a ideia de que o etanol apresenta preferência de interação pelos lipídeos de membrana.

Neste sistema simulado a concentração de etanol e água e a profundidade destes na bicamada, podem ter induzido a uma maior repulsão entre o meio etanol/água e lipídeo, forçando assim os lipídeos a assumirem um novo grau de organização para que o sistema assumira novamente uma menor entropia. De acordo com Gurtovenko e Anwar (2009) esta nova organização é dada pela desestruturação da bicamada lipídica e formação de micelas. Logo o que temos na imagem do último frame da simulação é a tendência de perda de lipídeos da bicamada.

Logo, os resultados das simulações de dinâmica molecular corroboram nossa hipótese de ação do etanol sobre a entropia do sistema.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos com o estudo que o efeito *in vitro* do etanol sobre eritrócitos de ratos não segue um padrão dose-resposta dependente. Os eritrócitos necessitam da presença de cloreto de sódio para estabilizarem a estrutura da bicamada lipídica, pois sem esta solução, a mínima concentração de etanol já gera efeitos deletérios sobre os mesmos. Este efeito não está diretamente relacionado ao efeito osmótico e sim a interação do etanol com a membrana lipídica e com o sistema que a mantém.

Com o estudo teórico podemos observar a afinidade do etanol pelos fosfolipídeos de membrana gerando alterações na polaridade da bicamada e em sua permeabilidade. Ao aumentarmos a concentração do etanol não observamos alterações evidentes sobre a polaridade da membrana, porém a permeabilidade mostrou-se elevada até a concentração de 30%(v/v) do etanol o que sugere que o etanol se liga a membrana, diminui sua agregação e permite sua ruptura como observado no teste experimental.

Já com o aumento da concentração para entre 30 e 40% (v/v) observamos um efeito protetor, observado como diminuição da lise dos eritrócitos *in vitro*. Nestas concentrações os dados teóricos evidenciaram também uma elevada solubilidade com o cálculo da área por lipídeo, porém o mesmo não foi corroborado pela quantidade diminuída de etanol que permearam a membrana. Há um deslocamento das cargas na membrana, que podemos inferir nestas concentrações o etanol se adere a membrana, gera uma estabilização através da presença destas moléculas inseridas na bicamada, aumenta sua área, o que não significa aumento de solubilidade, e não gera lise como o observado no teste experimental.

Na maior concentração observa-se deformação da estrutura da bicamada, com bastante etanol inserido na mesma. A área por lipídeo inicialmente se aumenta, devido ao início da ação das moléculas de etanol na mesma, porém devido ao aumento da quantidade de moléculas inseridas na bicamada, uma grande distribuição das cargas pelos lipídeos, deformação das mesmas, o que sugere a perda desta estrutura, o que é corroborado na parte experimental com a lise dos eritrócitos.

## 8 PERSPECTIVAS

Este trabalho apresenta diferentes perspectivas para futuros estudos:

- O mecanismo de ação do etanol ainda não está completamente elucidado, portanto mais estudos sobre este efeito deverão ser realizados;
- Estudos dos efeitos dos fármacos anestésicos ainda permanecem não concluídos, sendo o etanol um destes representantes;
- Refinamentos na metodologia poderão ser realizados futuramente nestes estudos como o aumento da escala de tempo, estudos com diferentes modelos de fosfolipídeos e outros íons como o potássio, magnésio e cálcio;
- Estudos envolvendo cálculos mecânico-quânticos para estudar as interações etanol-fosfolipídeos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, P. The aquaporin water channels. **Proc. Am. Thorac. Soc.** v. 3, n. 1, p. 5-13, 2006.

ANÉZO, C.; VRIES, A. H.; HOLTJE, H. D.; TIELEMAN, D. P.; MARRINK, S. J. Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations. **J. Phys. Chem. B.** v. 107, p. 9424-9433, 2003.

AVERSI-FERREIRA, T. A. **Biologia Celular e Molecular.** 1 ed. Campinas: Editora Átomo, 2008.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; FERREIRA, N. R.; MORAIS, J. O. R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in wistar rats. **Braz. J. Morphol. Sci.** v. 21, n. 2, p. 99-103, 2004.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; NASCIMENTO, G. N. L. The effect of acute and chronic exposure to ethanol on the developing encephalon: a review. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.** v. 8, n. 3, p. 241-249, 2008.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; RODRIGUES, H. G.; NERES, A. C.; FONSECA, L. C.; PENHA-SILVA, N. Estudo imunohistoquímico do bulbo olfatório de ratos Wistar submetidos à exposição pré-natal aguda com etanol. **Biosc. J.** v.22, n.1, p. 99-105, 2006.

BERTACCINI, E. J. The molecular mechanisms of anesthetic action: updates and cutting edge developments from the field of molecular modeling. **Pharmaceuticals.** v. 3, p. 2178-2196, 2010.

BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. **J. Med. Chem.** v.53, n.14, p.5061–5084, 2010.

BOCKMANN, R. A.; HAC, A.; HEIMBURG, T.; GRUBMULLER, H. Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. **Biophys. J.** v. 85, p. 1647-1655, 2003.

BRUST, J. C. M. Ethanol and Cognition: Indirect Effects, Neurotoxicity and Neuroprotection: A Review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 7, p. 1540-1557, 2010.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed., Porto Alegre: Editora Artmed, p. 752, 2000.

CASCALES, J. J. L.; CIFRE, J. G. H.; TORRE, J. G. Anaesthetic mechanism on a model biological membrane: a molecular dynamics simulation study. **J. Phys. Chem. B**. v. 102, n. 3, p. 625-631, 1998.

CASCIO, M. Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1711, n. 2, p. 142-153, 2005.

CHIU, S. W.; CLARK, M.; BALAJI, V.; SUBRAMANIAM, S.; SCOTT, H. L.; JAKOBSSON, E. Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: a fluid phase lipid bilayer membrane. **Biophys. J.**, v.69, p. 1230-1245, 1995.

DIAKOWSKI, W.; GRZYBEK, M.; SIKORSKI, A. F. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. **Folia Histochem. Cytobiol.** v. 44, n. 4, p. 231-248, 2006.

EDUARDO, F. F. Caracterização molecular de biopolímeros em solução utilizando simulação computacional. 2009, p.181. Tese de doutorado – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 17 de fevereiro de 2009.

ENGELMAN, D. M. Membranes are more mosaic than fluid. **Nature**. v. 438, 2005.

ELGSAETER, A.; STOKKE, B. T; MIKKELSEN, A.; BRANTON D. The Molecular Basis of Erythrocyte Shape. **Science**. v. 234, p. 1217-1223 1986.

FELLER, S. E.; BROWN, C. A.; NIZZA, D. T.; GAWRISCH, K. Nuclear overhauser enhancement spectroscopy cross-relaxation rates and ethanol distribution across membranes. **Biophys. J.** v.82, p.1396–1404, 2002.

FILHO, A. A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica.** Belo Horizonte: Editora Folium, p. 368, 2001.

FRAGA, C. A. M. Razões da atividade biológica: interações micro e biomacromoléculas. **Química Nova.** v.3, p.33-42, 2001.

FRANGOPOL, P. T.; MIHAILESCU, D. Interactions of some local anesthetics and alcohols with membranes. **Colloid Surf. B.** v.22; p. 3–22, 2001.

GEDDE, M. M.; HUESTIS, W. H. Membrane potential and human erythrocyte shape. **Biophys. J.** v. 72, p. 1220-1233, 1997.

GOLDBERG, G. S.; VALIUNAS, V.; BRINK, P. R. Selective permeability of gap junction channels. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1662, n. 1-2, p. 96-101, 2004.

GURTOVENKO, A. A.; ILPO VATTULAINEN, I. Molecular Mechanism for Lipid Flip-Flops. **J. Phys. Chem. B.** v. 111, p. 13554-13559, 2007.

GURTOVENKO, A. A.; ANWAR, J. Interaction of ethanol with biological membranes: the formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance. **J. Phys. Chem. B.** v.113, n.7, p.1983–1992, 2009.

HOLMUHAMEDOV, E.; LEMASTERS, J. J. Ethanol exposure decreases mitochondrial outer membrane permeability in cultured rat hepatocytes. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 481, p. 226–233, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas.** 11 ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2008.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10 ed. São Paulo: Editora Mcgraw-Hill, 2010.

KARPLUS, M.; McCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Struct. Biol.** v. 9, n. 9, p. 646-652, 2002.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, p.783, 1998.

KOUBI, L.; TAREK, M.; BANDYOPADHYAY,S.; KLEIN, M.L.; SCHARF, D. Membrane structural perturbations caused by anesthetics and nonimmobilizers: a molecular dynamics investigation. **Biophys. J.** v.81, p.3339–3345, 2001.

KUKOL, A. Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. **J. Chem. Theory Comput.** v.5, p. 615–626, 2009.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Editora Manole, p. 301, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Editora Sarvier, p. 1232, 2007.

LOPES, D. B.; NASCIMENTO, G. N. L.; CARVALHO, A. A. V.; NETO, A. C. S.; LIMA, N. E.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Immunohistochemical study of acute effects of ethanol on midbrain of Wistar rats associated with the date of birth of neurons in encephalon. **Int. J. Morphol.** v. 27, n. 3, p. 677-682, 2009.

McCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**. v. 267, p. 285-290, 1977.

MAXFIELD, F. R; TABAS, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature**. v. 438, n. 1, 2005.

MORGON, N. H. Computação em química teórica: informações técnica. **Quim. Nova**. v. 24, n. 5, p. 676-682, 2001.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 29, n.2, p.168-178, 2007.

NELSON, G. A.; ANDREWS, M. L.; KARNOVSKY, M. J. Control of erythrocyte shape by calmodulin. **J. Cell. Biol.** v. 96, p. 730-735, 1983.

PATRA M.; KARTTUNEN, M.; HYVONEN, M. T.; FALCK, E.; VATTULAINEN, I. Lipid Bilayers Driven to a Wrong Lane in Molecular Dynamics Simulations by Subtle Changes in Long-Range Electrostatic Interactions. **J. Phys. Chem. B.** v. 108, p. 4485-4494, 2004.

PELTTARI A.; HELMINEN, H. J. The relative thickness of intracellular membranes in epithelial cells of the ventral lobe of the rat prostate. **Histochem. J.** v. 11, p. 613-624, 1979.

PENHA-SILVA N.; ARVELOS, L. R.; CUNHA, C. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A.; GOUVÊA-E-SILVA, L. F.; GARROTE-FILHO, M. S.; FINOTTI, C. J.; BERNARDINO-NETO, M.; FREITAS REIS, F. G.; Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochem.** v.73, p. 23–29, 2008.

PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Quim. Nova.** v. 21, n.6, p.744-754, 1998.

RIBEIRO, E. M.; SUGAYAMA, S. M. M.; KIM, C. A.; GONZALEZ, C. H. Síndrome alcoólica fetal: relato de três irmãos afetados. **Pediatria.** v.17, n.2, p.91-94, 1995.

RILEY, E. P. The long-term behavioral effects of prenatal alcohol exposure in rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 14, n. 5, p. 670-673, 1990.

ROBERTSON, J. D. Membrane Structure. **J. Cell. Biol.** v.91, n.3, p.189s-204s, 1981.

ROCHA, W. R. Interações intermoleculares. **Química Nova.** v.4, p.31-36, 2001.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. **Quim. Nova Esc.** n. 3, 2001.

ROOM, R.; BABOR, T.; REHM, J. Alcohol and public health. **Lancet.** v. 365, p. 519-530, 2005.

RODRIGUES, H. G.; BATISTA, M. T. A.; FONSECA, L. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas** v.22, n.1, p. 7-16, 2009.

SAIZ, L.; BANDYOPADHYAY, S.; KLEIN, M. L. Towards an understanding of complex biological membranes from atomistic molecular dynamics simulations. **Biosc. Rep.** v.22, n.2, p.151-173, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual Quim.** v.1, n.1, p. 49-57, 2009.

SANTOS, H. F. O conceito da modelagem molecular. **Quim. Nova Esc.** n. 4, 2001.

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. **Science.** v. 175, p. 720-731, 1972.

SHINODA, K.; SHINODA, W.; MIKAMI, M. Molecular dynamics simulation of an archeal lipid bilayer with sodium chloride. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v.9, p. 643-650, 2007.

SMITH, J. E. Erythrocyte Membrane: Structure, Function, and Pathophysiology. **Vet. Pathol.** v. 24, p.471-476, 1987.

SONNE, J.; JENSEN, M. O.; HANSEN, F. Y.; HEMMINGSEN, L.; PETERS, G. H. Reparameterization of all-atom dipalmitoylphosphatidylcholine lipid parameters enables simulation of fluid bilayers at zero tension. **Biophys. J.** v.92, p. 4157–4167, 2007.

STOKKE, B. T.; MIKKELSEN, A.; ELGSAETER, A. Spectrin, human erythrocyte shapes, and mechanochemical properties. **Biophys. J.** v. 49, p. 319-327, 1986.

TSUDA, K.; NISHIO, I. Membrane fluidity and hypertension. **Am. J. Hypertens.** v. 16, n. 3, p. 259-261, 2003.

TU, K.; TAREK, M.; KLEIN, M. L.; SCHAR, D. Effects of anesthetics on the structure of a phospholipid bilayer: molecular dynamics investigation of halothane in the hydrated liquid crystal phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. **Biophys. J.** v.75, p. 2123–2134, 1998.

YEAGLE, P. L. Lipid regulation of cell membrane structure and function. **FASEB J.**, v.3, p. 1833-1842, 1989.

WANG, Y.; COHEN, J.; BORON, W. F.; SCHULTEN, K.; TAJKHORSHID, E. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. **J. Struct. Biol.** v. 157, p. 534-544, 2007.

WUSTNER, D. Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. **Chem. Phys. Lipids.** v. 146, p. 1-25, 2007.