

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Química

Bruna Luana Marcial

ESTUDO DA ESTRUTURA E REATIVIDADE DE HÍBRIDOS MOLECULARES
DE PLATINA(II) COM POTENCIAL ANTITUMORAL

Juiz de Fora
2009

BRUNA LUANA MARCIAL

**Estudo da estrutura e reatividade de híbridos moleculares
de platina(II) com potencial antitumoral**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Ferreira dos Santos

Juiz de Fora
2009

Dedico esta dissertação àqueles que indiscutivelmente foram, são e sempre serão meus maiores mestres, se não na ciência certamente na vida, meus pais Elza e Geraldo.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por estar sempre à frente dos meus caminhos.
- Ao meu orientador Prof. Hélio pela orientação dinâmica e precisa, sobretudo, agradeço pela confiança e paciência que teve comigo ao longo desses anos de convivência. Não posso deixar de ressaltar o meu agradecimento pelos seis meses de financiamento do meu mestrado.
- Aos professores do departamento de química que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica.
- A Prof.^a Geórgia e ao Prof. Luiz pela efetiva contribuição no desenvolvimento do meu trabalho.
- A todos os meus amigos dos laboratórios de química em especial aqueles do NEQC: Cléber, Eduardo, Wesley, Artur, Diego, Lucas e Maikel pela amizade na ciência e fora dela.
- Aos meus quase irmãos Léo e Antônio pelos altos papos, desde ciência até “filosofia de boteco” que rolam nos caminhos de volta para casa.
- As minhas amigas Tati e Elgte pela amizade fiel e sincera que sempre tivemos. Quantos desabafos, não?!
- Ao meu amigo Valdiley pela ajuda nos problemas com os cálculos, e ainda mais pela nossa amizade.
- Ao meu namorado Wesley pelo carinho, incentivo, sugestões e uma dose grande de paciência que teve comigo nos últimos um ano e meio. Obrigada por acreditar tanto em mim, a recíproca é verdadeira.
- A minha amiga de república Adriana pelas risadas que tantas vezes aliviaram o stress do trabalho.
- Um agradecimento mais que especial aos meus pais Elza e Geraldo, que mesmo na ausência de um diploma souberam ser meus maiores mestres e incentivadores. Obrigada pela confiança, e, sobretudo, pelo exemplo de vida que sempre representaram para mim, saibam que tudo que sou e tudo que conquistei devo a vocês.
- Aos meus irmãos, o físico Mateus e o matemático Marcos que são meus melhores amigos, inclusive na ciência (isso mesmo, viva ciências exatas!). Obrigada por estarem sempre do meu lado nos momentos mais tristes e felizes da minha caminhada.
- Por fim agradeço a agência de fomento à pesquisa CAPES pela bolsa concedida durante a realização desse trabalho.

“Para ser um bom observador é preciso ser um bom teórico”

(Charles Darwin)

RESUMO

Neste trabalho, foram utilizadas metodologias teóricas para avaliar propriedades estruturais, termodinâmicas e cinéticas de compostos análogos da cisplatina, considerados “híbridos moleculares”, por apresentarem um centro metálico de platina(II) e um ligante da família das tetraciclinas. Todas as propriedades foram calculadas em fase gasosa e em solução aquosa usando Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Primeiramente foi avaliado a reatividade do complexo AHTC-Pt(II) monoáquo com diferentes nucleófilos de importância biológica, as bases nitrogenadas representativas do DNA (Guanina e Adenina) e os aminoácidos (Cisteína e Metionina). Essas reações seguem o mecanismo padrão da cisplatina no meio biológico, portanto, foram comparados os resultados obtidos para o complexo AHTC-Pt(II) com dados da literatura para cisplatina, mostrando que as reações possuem velocidades similares, sugerindo que o complexo AHTC-Pt(II) pode representar um potencial análogo da cisplatina enquanto atumoral. Foram estudados também a termodinâmica de formação de um novo complexo de platina(II), tendo como ligante uma tetraciclina quimicamente modificada (CMT-3). Seguindo os estudos experimentais para o derivado tetraciclina, nós investigamos a coordenação da Pt(II) com a CMT-3, tendo sido propostos 18 sítios distintos de coordenação, considerando todos os possíveis estados ionizados para o ligante livre, chamados LH_2 , LH^- e L^{2-} . Foram calculados os espectros de RMN de ^{13}C e UV/Vis para o ligante e para os complexos. Os modos mais estáveis de coordenação estão no anel A, sendo o sítio O12-O1 (ligante LH_2) e O3-Oam (ligantes LH^- e L^{2-}) mais favoráveis. Nós acreditamos que a análise descrita neste trabalho pode auxiliar fortemente os experimentalistas na atribuição dos modos de coordenação para Pt(II) e outros metais com CMT-3 e outras tetraciclinas quimicamente modificadas. De uma forma geral, os resultados obtidos nessa dissertação mostram o potencial da química computacional como técnica auxiliar de avaliação da estrutura e reatividade de sistemas complexos.

Palavras-chave: Platina(II).Tetraciclina. Cálculos *ab initio*.

ABSTRACT

In this work, theoretical methods were applied to evaluate the structural, thermodynamic and kinetic properties of compounds analog to cisplatin, named “molecular hybrids”, because they present a platinum metal center linked to a molecule of the tetracycline family. All the properties were calculated using the Density Functional Theory (DFT) in gas phase and aqueous phase. Firstly, it was analyzed the reactivity of the monoquo complex AHTC-Pt(II) with different nucleophiles of biological importance, the DNA bases (Guanine and Adenine) and the aminoacids (Cysteine and Metionine). These reactions followed the standard mechanism of the cisplatin in biological medium, and therefore, the results obtained for the AHTC-Pt(II) complex were compared with literature data for cisplatin, showing that these reactions have similar rates, suggesting that the AHTC-Pt(II) complex may be a potential analog to cisplatin as an antitumor drug. The thermodynamic of the formation of a new platinum complex (II) with the chemically modified tetracycline (CMT-3) was studied. According to experimental observations for the tetracycline analog, we investigated the Pt(II) coordination with CMT-3 molecule, having been proposed 18 distinct coordination sites, considering all ionized forms for the free ligand, called LH_2 , LH^- and L^{2-} . As a result, the ^{13}C NMR and the UV/Vis spectra for the ligand and the complexes were calculated. The most stable coordination modes are in the ring A, being the site O12-O1 (ligand LH_2) and O3-Oam (ligand LH^- and L^{2-}) the most favorable. We believe that the analysis presented in this work can be useful for experimentalists at the assignment of complexation mode for Pt(II) (and other metals) with CMT-3 and other chemically modified tetracycline. We believe that in general, the results obtained in this work show the importance of computational chemistry as auxiliary technique for determination of structure and reactivity of complex systems.

Key-words: Platinum(II). Tetracycline. *Ab initio calculations*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Câncer.....	9
1.2 Cisplatina.....	12
1.3 Cisplatina e Seu Mecanismo de Ação.....	16
1.4 Complexos de Platina(IV) e Complexos Multinucleares de Platina(II).....	19
1.5 Complexos Híbridos.....	20
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	22
2.1 Aproximação de Hartree-Fock (HF).....	24
2.2 Correlação Eletrônica.....	28
2.3 A Teoria do Funcional de Densidade.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Termodinâmica de Formação de Compostos de Platina(II) Com Análogos da Tetraciclina.....	31
3.2 Estrutura e Propriedades do Complexo de Platina(II) com o Análogo 5a,6-Anidrotetraciclina (AHTC-PT).....	32
3.3 Cinética de Interação de Bionucleófilos com o Complexo AHTC-PT(II).....	34
3.3.1 Metodologia de cálculo.....	34
3.3.2 Análise estrutural.....	41
3.3.3 Análise cinética.....	53
3.4 Estrutura e Propriedade de um Novo Complexo de Platina(II) com a Tetraciclina Quimicamente Modificada Denominada CMT-3.....	57
3.4.1 Metodologia de cálculo.....	59
3.4.2 Análise estrutural dos ligantes livres.....	62
3.4.3 Análise energética e estrutural dos complexos.....	70
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
4.1 Considerações Gerais e Perspectivas.....	85
4.2 Trabalhos Apresentados em Eventos.....	88
4.3 Artigos Publicados.....	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A	96

1 INTRODUÇÃO

A química inorgânica ocupa atualmente lugar de destaque no cenário biocientífico, sobretudo na utilização de compostos inorgânicos no tratamento de doenças como o câncer (Hambley, 2007). Entretanto, o uso desses compostos, principalmente aqueles contendo metais de transição, só alavancou a partir da descoberta das propriedades antitumorais do *cis*-diaminodicloroplatina(II), *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], também chamado de cisplatina, que é hoje um dos compostos mais usados no tratamento do câncer em todo mundo. Embora tal descoberta tenha ocorrido a mais de quatro décadas, a cisplatina e seus diversos análogos, propostos posteriormente, ainda têm sido alvo de intensa pesquisa no meio científico. Além de abranger diversas áreas do conhecimento químico, a elucidação do modo de ação desses compostos tem tido contribuições de muitas ferramentas modernas, com destaque para o uso da química computacional na previsão de propriedades relevantes para compreensão e proposição de compostos bioativos. No presente texto serão abordados os principais fatores relacionados à química da cisplatina, sendo que discutiremos brevemente a grande motivação dos estudos, o câncer; apresentaremos um histórico da cisplatina e seus análogos e ainda as perspectivas atuais relacionadas, com ênfase em propostas recentes de novas classes de compostos a base de platina.

1.1 Câncer

A palavra câncer vem do latim (*cancer*) e significa: “caranguejo”, em analogia ao modo de crescimento infiltrante dos vasos do tumor que é semelhante às pernas do crustáceo (De Almeida *et al.*, 2005). Atualmente câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (**maligno**) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (**metástase**) para outras regiões do corpo. Todos os cânceres originam-se de células normais, após sofrerem cancinogênese ou oncogênese (Figura 1.1) (INCA, 2009). A maioria dos cânceres é classificada de acordo com o órgão ou tipo de célula no qual ele começou, podem ser agrupados por categorias, sendo que as principais incluem:

- **Carcinomas:** São os tipos mais comuns de câncer, originado de células que revestem o corpo, incluindo a pele (ectodermis) e uma série de revestimentos internos (endodermis), como os da boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero e ovários, e os revestimentos dos dutos mamários, próstata e pâncreas.

- **Sarcomas:** Originam-se de tecidos de suporte em vez dos de revestimento, tais como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço, encontrados na maior parte do corpo.
- **Leucemia:** Este câncer origina-se de células da medula óssea que produzem as células sanguíneas brancas. Na leucemia ocorre uma concentração muito elevada de glóbulos brancos (de cerca de $7,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ para 10^5 - $10^6/\text{mm}^3$) causando problemas nos quais as células anormais não funcionam apropriadamente, além de restringirem o espaço da medula óssea para que novas células sejam produzidas.
- **Linfomas e Mielomas:** são cânceres que se originam das células do sistema imunológico.
- **Gliomas:** Originam-se a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal. Raramente ocorre metástase.

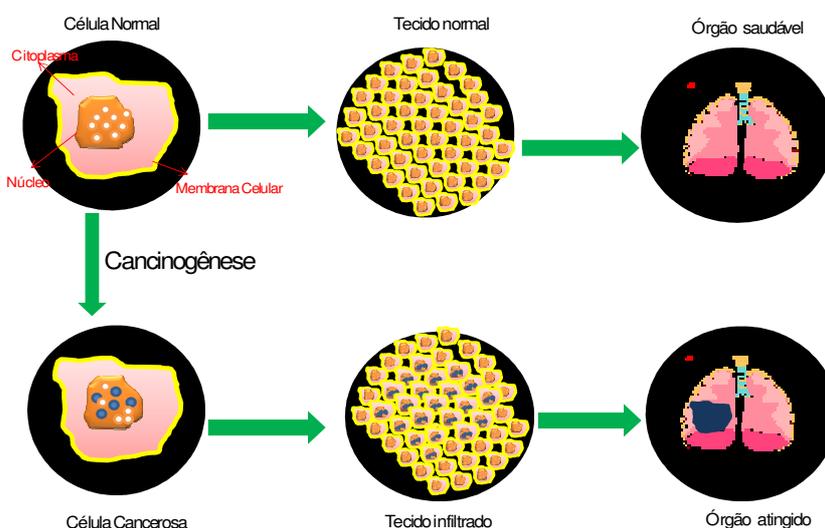
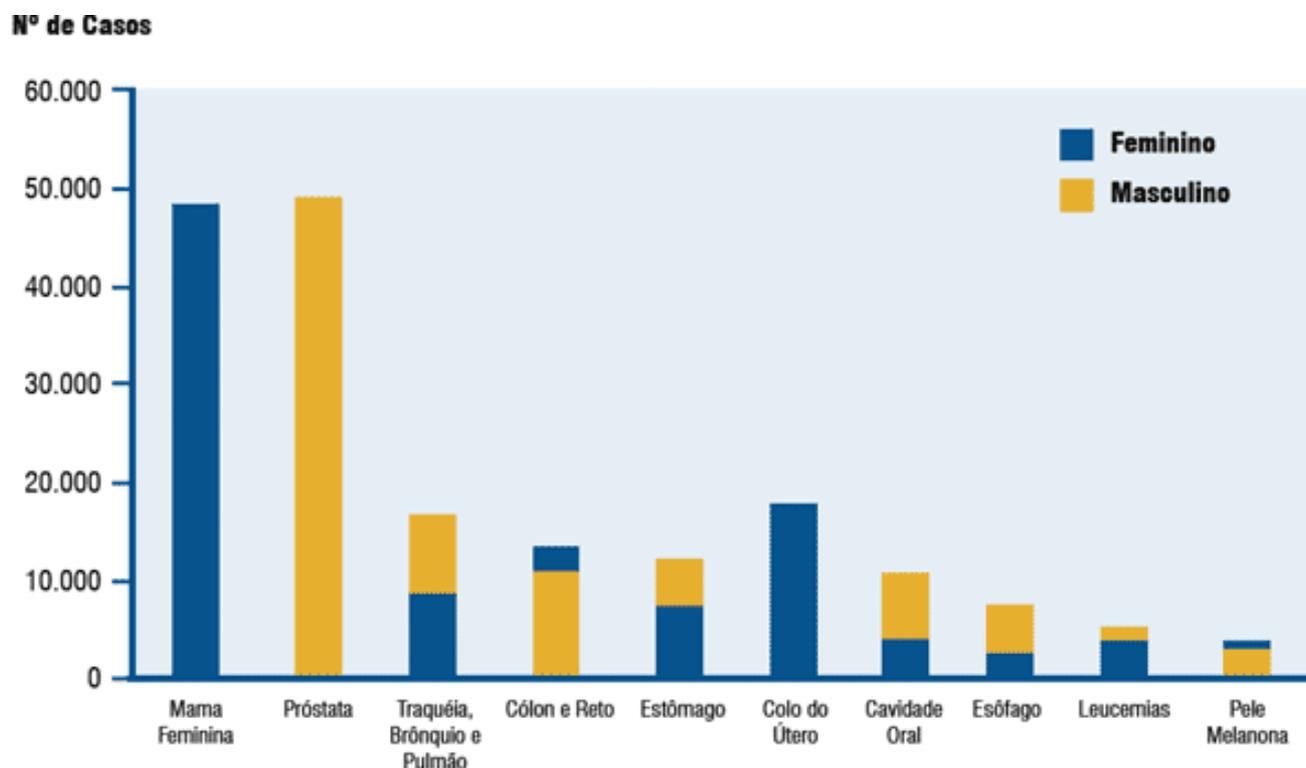


Figura 1.1 Transformação de uma célula normal em célula cancerígena(INCA, 2009).

Segundo o INCA, em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão (1,3 milhão); estômago (cerca de 1 milhão); fígado (662 mil); cólon (655 mil); mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda. Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de

mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (Figura 1.2).



Fonte : MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Figura 1.2 Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2008 e 2009, na população brasileira (INCA, 2009).

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento (De Almeida *et al.*, 2005; INCA, 2009; NCI, 2009). Quimioterapia é um tipo de tratamento, em que se utilizam medicamentos para combater o câncer. Hoje em dia há diferentes tipos de quimioterapia, uma vez que ela pode ser usada para destruir as células cancerígenas, parar a metástase ou ainda retardar o crescimento das células cancerígenas. A quimioterapia pode ser aplicada sozinha ou associada a outros tipos de tratamento. Os medicamentos são administrados, em sua maioria, nas veias, podendo também ser dados por via oral, intramuscular, subcutânea e tópica. O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do

sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia. Por isso o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável.

Os agentes quimioterápicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos entre outros. Desde a década de 1940 vários compostos, principalmente moléculas orgânicas, vêm sendo aprovados pela FDA (Food and Drug Administration)(FDA, 2009), órgão americano responsável por verificar se a nova droga é saudável e eficaz antes de entrar no mercado. Novas drogas estão sendo permanentemente isoladas e aplicadas experimentalmente em modelos animais antes de serem usadas no homem.

Há algumas décadas atrás somente moléculas orgânicas eram usadas no tratamento do câncer, entretanto hoje em dia drogas inorgânicas como o trióxido de arsênio (Trisenox®), usado no tratamento da leucemia, já estão disponíveis no mercado(FDA, 2009). Mas os compostos inorgânicos mais conhecidos são sem dúvida a cisplatina e alguns de seus análogos. A cisplatina é uma das drogas mais usadas no tratamento de diversos tumores desde que foi aprovada pela FDA em 1978 com o nome comercial Platinol®(FDA, 2009).

1.2 Cisplatina

O complexo diaminodicloroplatina(II) foi descrito primeiramente por Reiset em 1844 e logo depois, em 1845, Peyrone também descreveu outro composto de mesma fórmula molecular. Posteriormente, em 1893, já com o estabelecimento das bases da química de coordenação, Alfred Werner propôs tais compostos serem isômeros: O complexo de Reiset é o isômero *cis* (Figura 1.3a) e o de Peyrone o isômero *trans* (Figura 1.3b)(Alderden, Hall e Hambley, 2006).



Figura 1.3 (a) *cis*-diaminodicloroplatina(II), (b) *trans*-diaminodicloroplatina(II).

Apesar da molécula de cisplatina ter sido proposta no século XIX, somente em meados do século XX a atividade antitumoral do complexo foi descoberta. Em 1961 o físico Barnett Rosenberg e outros pesquisadores da Universidade de Michigan, nos Estados Unidos estudaram os efeitos do campo elétrico em uma cultura de bactérias *Escherichia coli*. Rosenberg *et al* (Rosenber.B *et al.*, 1969) observaram que a divisão celular era inibida, mas não o crescimento dos filamentos de células da *E. coli* (Smith, 2009), a partir daí começou então a identificar os possíveis agentes responsáveis pelo fenômeno. As pesquisas mostraram que a platina, presente no eletrodo, a princípio inerte em meio biológico, se dissolvia no meio da cultura, que continha sais de amônio, e formavam espécies complexas do metal. Rosenberg concluiu se tratar de dois compostos neutros que se apresentavam como isômeros, o *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₄] e o *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₄], ambos complexos octaédricos de Pt(IV). Foi verificado depois de muitos testes que o complexo *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] também contribuía para o crescimento dos filamentos bacterianos(Smith, 2009). A partir desses resultados, em 1968 começou a ser investigado a atividade antitumoral dos complexos de platina. Os vários complexos foram submetidos a testes em camundongos portadores de sarcoma-180, um modelo de tumor usado para ensaios farmacológicos. Dentre os compostos com atividade, a cisplatina foi a mais potente, enquanto que a espécie transplatina se mostrou inativa (Rosenber.B *et al.*, 1969).

Foi em 1978 que a cisplatina teve seu uso aprovado nos EUA, para o tratamento do câncer de testículos(Fda, 2009). Desde então o fármaco vem sendo usado extensivamente na quimioterapia do câncer em todo mundo. Entretanto as pesquisas não pararam na cisplatina, e o principal motivo foram os severos efeitos colaterais relacionados à droga, sobretudo nefrotoxicidade (rins), náuseas, vômitos, neurotoxicidade (sistema nervoso) entre outros. A cisplatina tem seu uso terapêutico limitado pelos efeitos colaterais mencionadas, além da resistência adquirida à droga que também limita a sua utilidade. Durante os últimos anos, intensas pesquisas têm sido desenvolvidas focando a diminuição desses efeitos sem afetar o potencial citotóxico da droga, e nesse sentido novos compostos de platina foram propostos. Segundo o artigo de revisão de Lippard e colaborador (Jung e Lippard, 2007), publicado em 2006, mais de 3000 compostos de platina já foram sintetizados e tiveram sua atividade biológica testada. Entretanto, menos de 30 compostos passaram para a fase de testes clínicos. Atualmente quatro compostos de platina são registrados e vendidos no mercado, a própria cisplatina e os chamados de drogas de segunda geração, como a diamino(ciclobutanodicarboxilato)platina(II) mais conhecida como carboplatina; nedaplatina e oxaloplatina (Figura 1.4). A nedaplatina ainda não foi aprovada pela FDA, e sua

comercialização é restrita ao Japão. Todos os compostos são usados para diversos tumores sólidos, sendo a cisplatina particularmente efetiva no tratamento do câncer de testículo apresentando eficácia de mais de 90%, podendo chegar a 100% quando o tumor é tratado no início. Outros análogos chegaram à fase de testes clínicos (Figura 1.5), mas muitos foram abandonados na sua maioria por apresentarem altíssima toxicidade.

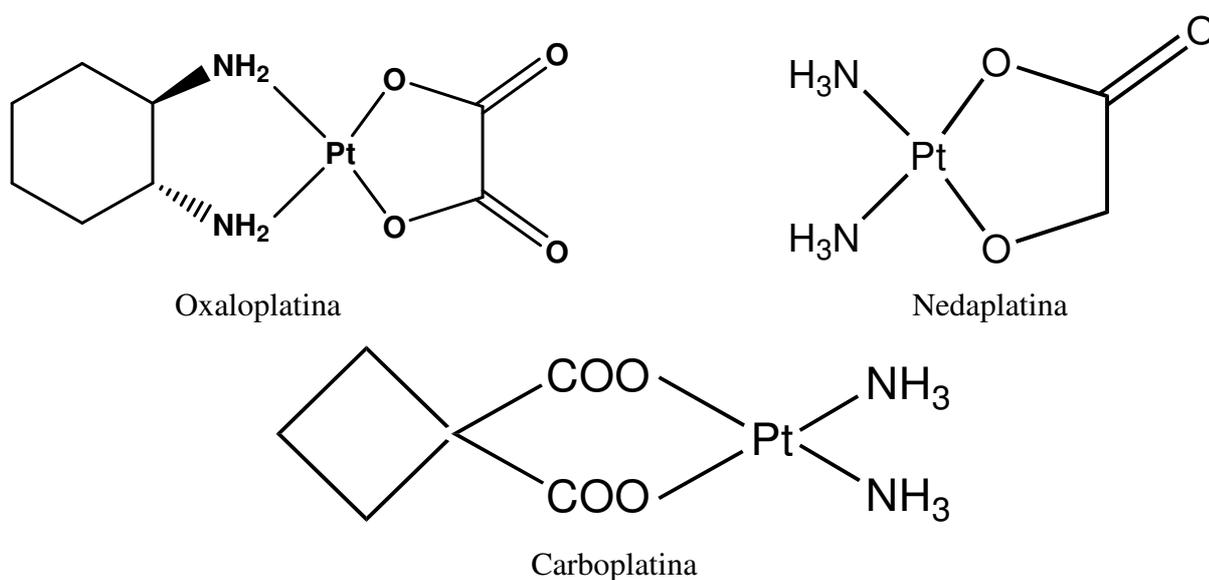
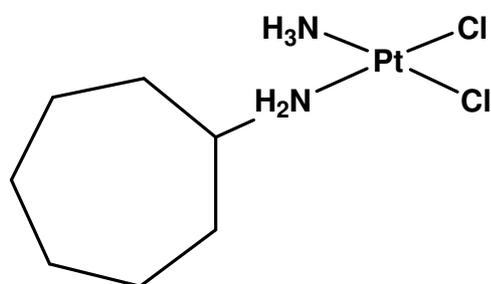
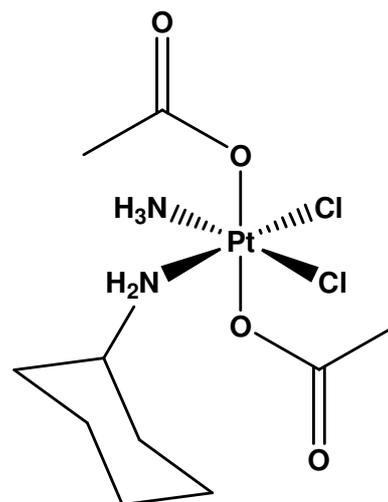
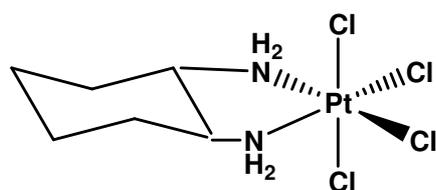


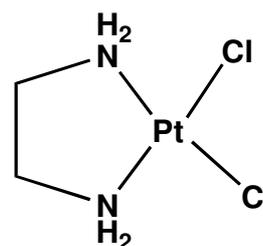
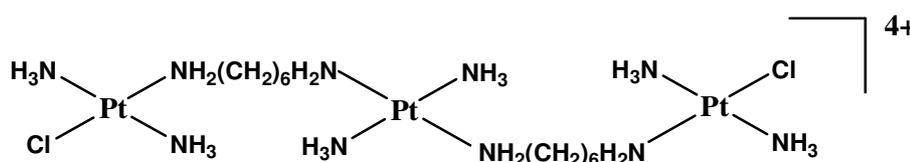
Figura 1.4 Análogos da cisplatina presentes no mercado.

cis-[Pt(NH₃)₂(Cy)Cl₂]

JM216, Satraplatina



Tetraplatina

[Pt(en)Cl₂]

BBR3464

Figura 1.5 Alguns análogos da cisplatina.

A cisplatina e seus análogos têm sido alvo de diversas publicações em diferentes áreas da ciência. Diferentes estudos abordam os diversos aspectos relacionados ao modo de ação, propriedades estruturais e eletrônicas, propriedades físico-químicas e a farmacocinética, entre outros (Bancroft, Lepre e Lippard, 1990; Bernges e Holler, 1991; Zamble e Lippard, 1996; Bose, Ghosh e Moghaddas, 1997; Kozelka *et al.*, 1999; Legendre *et al.*, 2000; Bulluss, Waller e Hambley, 2003; Costa *et al.*, 2003; , 2004; Burda, Zeizinger e Leszczynski, 2005; Costa *et al.*, 2006; Jung e Lippard, 2007; Bradac,

Zimmermann e Burda, 2008; Da Silva, Costa e Dos Santos, 2008; Lopes *et al.*, 2008). Na seção seguinte faremos uma descrição do mecanismo de ação da cisplatina.

1.3 Cisplatina e Seu Mecanismo de Ação

Acredita-se que a cisplatina exerça seu efeito antitumoral pela interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA), induzindo a morte programada da célula (apoptose, Figura 1.6) (Alderden, Hall e Hambley, 2006). A cisplatina é um composto sintético, de coloração amarela (Sólido cristalino) ou incolor (solução), neutro, com geometria quadrática plana. Possui dois grupos cloreto lábeis e dois grupos amina relativamente inertes (Figura 1.3a). Uma das propriedades físico-químicas da cisplatina que limitam seu uso é a baixa solubilidade em água (2,53 mg/ml a 25°C), e por isso a cisplatina é administrada por via intravenosa. A droga é administrada na sua forma neutra e assim se mantém antes de entrar na célula, devido à alta concentração de íons cloreto (~100 mM) no meio extracelular. A forma neutra facilita a entrada na célula, uma vez que moléculas catiônicas raramente estão aptas para difusão através da camada bilipídica que constitui a membrana celular (Jung e Lippard, 2007). Entretanto, a cisplatina é alvo do ataque de proteínas encontradas no plasma sanguíneo, particularmente as que contêm grupos tiol e resíduos de aminoácidos sulfurados como cisteína e metionina. Estudos mostram que um dia depois da administração da cisplatina, 65-98% da platina no plasma sanguíneo está coordenada a proteínas. Essas proteínas são, normalmente, consideradas responsáveis pela desativação da droga e ainda por alguns dos efeitos colaterais do tratamento com cisplatina (Alderden, Hall e Hambley, 2006).

A cisplatina pode penetrar a membrana celular, principalmente, por difusão passiva, entretanto alguns estudos sugerem que a cisplatina pode ser transportada através da membrana por proteínas Cu-transportadoras (Ctr) (Alderden, Hall e Hambley, 2006). Dentro da célula há uma menor concentração de íons cloreto (~4-12 mM) o que facilita a troca destes por moléculas de água ou reação de hidrólise para formar a espécie catiônica do complexo (em inglês *aquation*). Análises termodinâmicas realizadas para o análogo da cisplatina [Pt(en)Cl₂] (Figura 1.5), sugerem que aproximadamente 42% da droga realiza a troca de apenas um grupo cloreto formando a espécie reativa monoaquo. Estudos *in vitro* mostram que esta espécie monoaquo é responsável por quase 98% das ligações com o DNA dentro do núcleo celular (Alderden, Hall e Hambley, 2006).

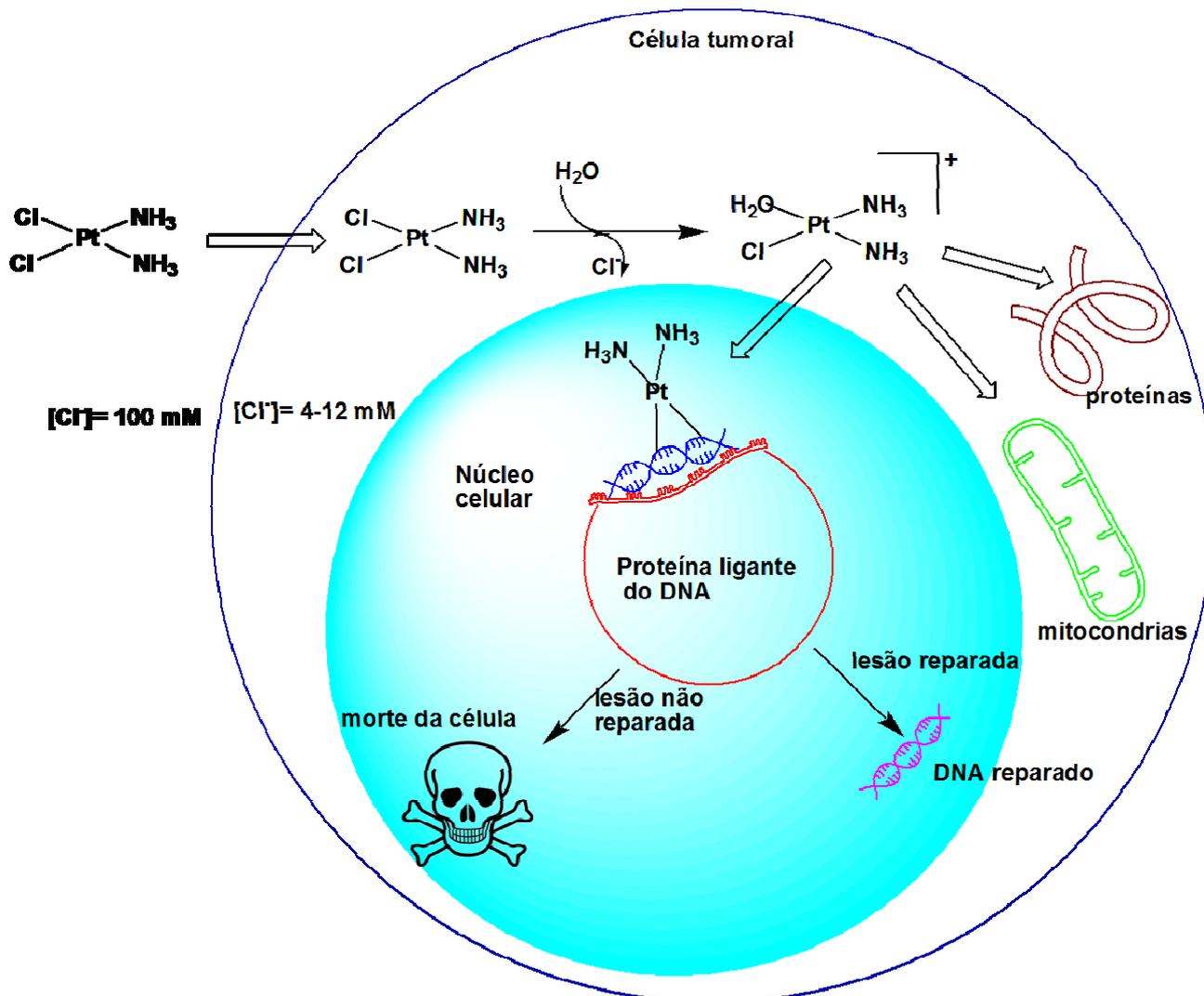


Figura 1.6 Esquema do caminho citotóxico da cisplatina na célula

Dentro das células as espécies hidrolisadas podem reagir com diferentes nucleófilos: DNA, RNA e proteínas. Embora a reação com as bases nitrogenadas do DNA seja responsável pela ação antitumoral da droga, sabe-se que cerca de 75% a 85% da droga se liga a proteínas e somente 5 a 10% se coordena covalentemente ao DNA. A ligação no DNA ocorre na maior parte no N7 da guanina e em menor proporção no N7 da adenina, formando os adutos monofuncionais. Os principais sítios de ligação da platina no DNA são mostrados na Figura 1.7. A formação do aduto bifuncional pode ocorrer diretamente do monofuncional ou pode ocorrer uma segunda hidrólise e finalmente a reação com uma segunda base nitrogenada formando adutos bifuncionais, que podem ser do tipo guanina-guanina (GpG) ou adenina-guanina (ApG), principalmente intrafitas, na proporção aproximada de 65% GpG e 25% ApG (Legendre *et al.*, 2000). A partir daí ocorrem distorções no DNA que podem ainda

ser reparadas pela ação de proteínas reparadoras. Caso isso não ocorra a célula tem a morte programada (apoptose) (ver Figura 1.6).

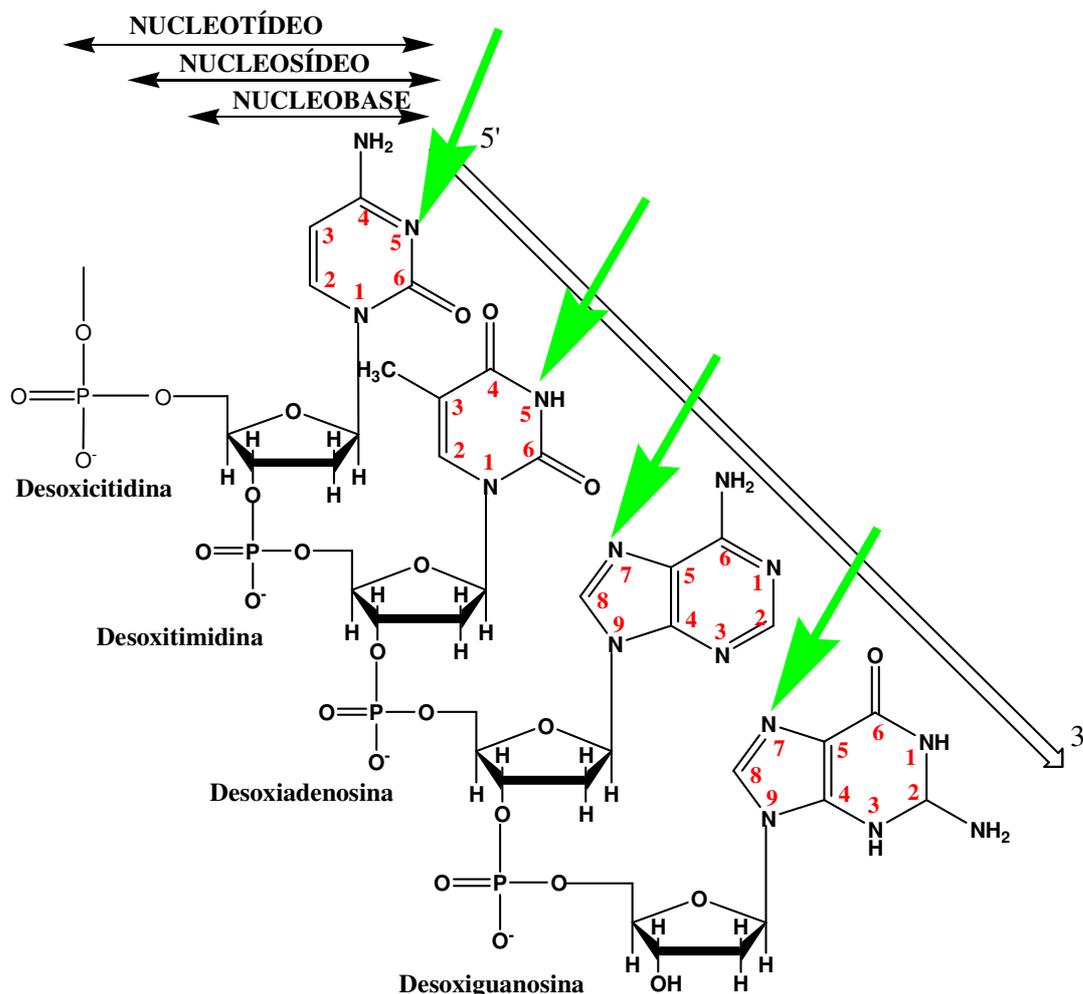


Figura 1.7 Tetranucleotídeo, em destaque os sítios de ligação da cisplatina.

O mecanismo de ação da cisplatina e outros derivados tem sido objeto de diversos estudos experimentais com intensa colaboração de metodologias teóricas (Costa *et al.*, 2003; , 2004; Zhu, Raber e Eriksson, 2005; Costa *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2006; Summa *et al.*, 2006; Da Silva, Costa e Dos Santos, 2008; Lopes *et al.*, 2008; Marcial *et al.*, 2008) buscando elucidar várias questões relacionadas à atividade antitumoral, bem como os efeitos indesejados que estão associados à droga. Estudos de reações com proteínas e outras biomoléculas, além do DNA, têm ocupado um grande espaço dentro dessa classe de compostos, principalmente com a possibilidade de prever a reatividade de novos análogos, que poderão superar os problemas da cisplatina. Sobretudo, com o avanço do poder computacional que permite aproximar sempre mais dos sistemas reais.

1.4 Complexos de Platina(IV) e Complexos Multinucleares de Platina(II)

Apesar dos elevados efeitos colaterais relacionados à cisplatina, o seu sucesso no tratamento do câncer é indiscutível, sendo hoje um dos três antitumorais mais usados no mundo. Isso tem motivado a pesquisa por novas alternativas com base em complexos de platina (Figura 1.5)(Jung e Lippard, 2007). Rosenberg e colaborador (Rosenber.B *et al.*, 1969) em seus experimentos haviam identificado que ambos os complexos de Pt(II) e Pt(IV) possuíam atividade antitumoral. A maioria dos pesquisadores até hoje opta por estudar complexos de Pt(II), entretanto, atualmente, características como maior solubilidade, por consequência a possibilidade de administração via oral, e a baixa toxicidade de complexos de Pt(IV) tem estimulado as pesquisas nessa área (Jung e Lippard, 2007).

Os complexos inertes de platina(IV) são considerados como pró-drogas, uma vez que no organismo devem ser reduzidos a platina(II), e agindo a partir daí com o mecanismo descrito para a cisplatina. Muitos compostos de platina(IV) têm entrado em fase de testes clínicos, muitos são descartados nessa fase, como a tetraplatina (Figura 1.5), por causa da alta neurotoxicidade. Entretanto, uma das drogas mais promissoras, administrada por via oral, é o JM216 {*cis,trans*-[PtCl₂(acetato)₂(NH₃)(ciclohexalamina)]} (Figura 1.5)(Jung e Lippard, 2007), com vários análogos tendo sido sintetizados. Apresentando melhores resultados do que a cisplatina, com nefrotoxicidade e neurotoxicidade mínima, está atualmente na fase III de testes clínicos para o tratamento de câncer de próstata. Alguns pesquisadores acreditam estar nos complexos de platina(IV) a chave para a cura do câncer.

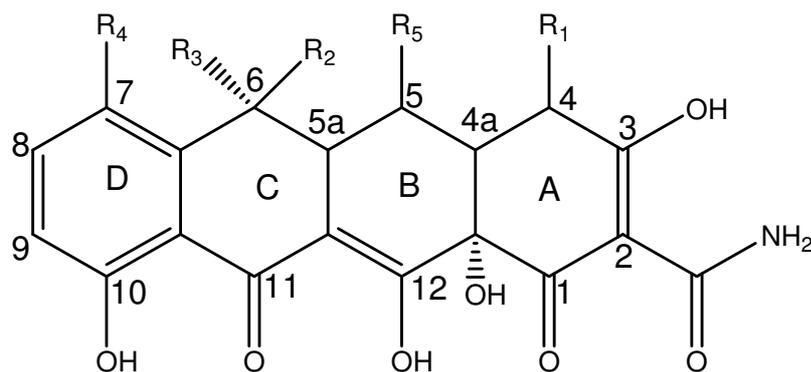
Outro grupo de moléculas que vem sendo amplamente estudado, visando, sobretudo, uma maior afinidade ao DNA, são os compostos multinucleares de platina, os quais são drogas de terceira geração (Qu *et al.*, 1993). Estudos recentes têm mostrado a capacidade desses compostos em superar a resistência adquirida à cisplatina, provavelmente por apresentarem mecanismos distintos de interação com o DNA, resultando em diferentes tipos de lesões na célula. Esses análogos possuem a capacidade de formarem ligações cruzadas intrafitas e interfitas com o DNA, utilizando os diferentes átomos de platina. Outra característica importante é a possibilidade de desenhar moléculas com distintos grupos ligando os centros metálicos, grupos espaçadores, e que devem ter influência no modo de ação da droga. Dentre os diversos compostos já propostos, alguns estudos mostram um alto potencial clínico de complexos multinucleares de platina contendo poliaminas como grupo espaçador, representando uma nova e promissora classe de agentes antitumorais. Em

particular o BBR 3464 (Figura 1.5) tem mostrado grandes vantagens em relação às células resistentes à cisplatina. Esse composto já está em fase de testes desde 1998 e espera-se que este possa representar um grande avanço na terapia do câncer (Qu *et al.*, 1993; Alderden, Hall e Hambley, 2006; Jung e Lippard, 2007).

1.5 Complexos Híbridos

Nos últimos anos pesquisadores têm buscado propostas de novos análogos de Pt(II) que contenham, coordenado ao sítio metálico, ligantes que apresentem algum tipo de atividade biológica. Esses novos compostos são chamados de “híbridos moleculares”, e é esperado que ambas as moléculas conservem suas características, ocorrendo uma “atividade sinérgica”, o que poderia facilitar a ação da droga no organismo (Guddneppanavar *et al.*, 2007). Esses híbridos, normalmente são formados por moléculas inorgânicas-orgânicas. Exemplos são os complexos que atuam como intercaladores e alquilantes simultaneamente, estes estão sendo estudados visando, sobretudo aumentar a velocidade de reação com o DNA. Bierbach *et al* (Choudhury e Bierbach, 2005; Guddneppanavar *et al.*, 2007) propuseram uma série de compostos híbridos, com destaque para complexos de platina(II) com moléculas da família da acridina, que têm mostrado promissora atividade *in vitro* em vários tumores sólidos.

Existem outros complexos que podem ser considerados híbridos moleculares, e também podem representar alternativas aos compostos já existentes, como os complexos de platina(II) com ligantes da família das tetraciclinas (TC). Recentemente alguns complexos de platina(II) foram sintetizados tendo como ligante a TC e alguns análogos como a anidrotetraciclina (AHTC) (Aly, Strasser e Vogler, 2002), 7-clorotetraciclina, doxiciclina entre outros (Figura 1.8) (Guerra *et al.*, 2006). Esses complexos têm sido estudados, devido ao seu potencial antibiótico, mas também podem representar uma alternativa à cisplatina como agentes antineoplásicos (Dos Santos *et al.*, 2006).



Molécula	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tetraciclina	N(CH ₃) ₂	OH	CH ₃	H	H
Anidrotetraciclina	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	H
Doxiciclina	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	OH
7-Clorotetraciclina	N(CH ₃) ₂	OH	CH ₃	Cl	H

Figura 1.8 Tetraciclina e alguns dos seus derivados.

As TCs constituem uma família de antibióticos de amplo espectro de atividade antibacteriana, atuando principalmente na inibição da síntese protéica (Chopra e Roberts, 2001). Estes compostos foram inicialmente isolados de várias espécies de *streptomyces*, sendo posteriormente desenvolvidos derivados semissintéticos e sintéticos. O termo tetraciclina é usado para descrever todo o grupo, em função da natureza estrutural caracterizada pela fusão de quatro anéis de seis membros. De um modo geral, todos os análogos biologicamente importantes pertencentes a esta classe de antibióticos apresentam atividade semelhante, sendo as principais diferenças relacionadas à farmacocinética e à toxicidade envolvida com o processo de ação do fármaco. Dentro dos análogos mais recentes, destacam-se as tetraciclina quimicamente modificadas (no inglês *Chemically Modified Tetracycline* – CMT), nas quais há adição ou remoção de algum grupo na estrutura da TC, o que normalmente altera as propriedades bioquímicas do composto. Como exemplo, a remoção do grupo dimetilamino na posição C4 da TC, elimina a atividade antimicrobiana, no entanto, potencializa a inibição de certas metaloproteinases (MMPs), as quais estão diretamente relacionadas ao processo de metástase de células tumorais (Golub *et al.*, 1991; Greenwald e Golub, 2001; Hidalgo e Eckhardt, 2001; Islam *et al.*, 2003; Acharya *et al.*, 2004).

Uma das características mais relevantes das tetraciclina é a capacidade de formar complexos com uma grande variedade de íons metálicos, o que altera as propriedades físico-químicas da molécula, bem como a biodisponibilidade do fármaco (Machado *et al.*, 1995; Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998a; 1998b; Wessels *et al.*, 1998; De Paula *et al.*,

1999; Dos Santos *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2006). Essa característica motivou a síntese dos complexos com Pt(II). Como híbrido molecular, o ligante TC pode funcionar como intercalador e a platina como alquilante. Um estudo teórico da formação de complexos de platina(II) com o análogo 5a,6-anidrotetraciclina (AHTC) foi realizado recentemente em nosso grupo (Dos Santos *et al.*, 2006). No presente trabalho, nós focamos na cinética da reação do complexo AHTC-Pt com os nucleófilos representativos dos possíveis alvos da platina no meio biológico, incluindo bases nitrogenadas e os resíduos de aminoácidos. Na segunda parte do trabalho, propriedades estruturais, termodinâmicas e espectroscópicas do complexo de platina(II) com um novo análogo da classe das tetraciclinas quimicamente modificadas foram obtidas e discutidas. Esse trabalho visa, sobretudo, contribuir com o planejamento de novos agentes antitumorais, construídos dentro do conceito de híbridos moleculares.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS (Szabo, 1996; Levine, 2000)

Os modelos teóricos têm por objetivo descrever quanticamente a estrutura molecular e as propriedades químicas, dependentes por sua vez de movimentos e interações entre núcleos e elétrons que constituem as moléculas. Essas propriedades moleculares e estruturais podem ser obtidas a partir da resolução da equação de Schrödinger independente do tempo,

$$\hat{H}\Psi(r, R) = E\Psi(r, R) \quad (2.1)$$

na qual \hat{H} é operador hamiltoniano de energia total e Ψ é a função de onda total dependente das coordenadas eletrônicas r e nucleares R . A primeira aproximação considerada para se obter soluções para a eq. (2.1) é chamada *Aproximação de Born-Oppenheimer*. Em termos qualitativos essa aproximação consiste basicamente na separação dos movimentos nucleares e eletrônicos, ou seja, considera-se o fato do núcleo ser muito mais pesado que os elétrons e por consequência os elétrons se movem muito mais rápido que os núcleos, portanto podemos considerar que os elétrons se movem num campo onde os núcleos estão fixos e a função de onda total pode ser descrita como o produto das funções de onda eletrônica $\Psi_e(r; R)$ e nuclear $\Psi_n(R)$.

$$\Psi(r, R) = \Psi_e(r; R)\Psi_n(R) \quad (2.2)$$

O hamiltoniano puramente eletrônico que descreve o movimento de N elétrons num campo de M cargas pontuais é representado na equação (2.3)

$$\hat{H}_e = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_\alpha \sum_i \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} + \sum_j \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.3)$$

A equação de Schrödinger eletrônica pode, portanto, ser escrita como:

$$\hat{H}_e \Psi_e(r; R) = E_e(R) \Psi_e(r; R) \quad (2.4)$$

Nessa equação o hamiltoniano eletrônico \hat{H}_e opera sobre as coordenadas eletrônicas r , e a função de onda total $\Psi_e(r; R)$ depende parametricamente das coordenadas nucleares R . Dessa forma, para diferentes arranjos dos núcleos, ou seja, diferentes valores de R obtêm-se uma função diferente das coordenadas eletrônicas. Devido a essa dependência, a energia total para os sistemas numa determinada configuração (núcleos fixos) inclui a contribuição da repulsão nuclear, embora as coordenadas nucleares não apareçam explicitamente na função de onda eletrônica.

$$E_{total} = E_e + \sum_\alpha \sum_{\beta>\alpha} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{r_{\alpha\beta}} \quad (2.5)$$

Uma vez resolvido o problema eletrônico é possível resolver a equação para o movimento nuclear. Como os elétrons se movem muito mais rápido que os núcleos, é razoável substituir as coordenadas eletrônicas por seus valores médios, obtendo um hamiltoniano nuclear para o movimento dos núcleos definidos em um campo médio dos elétrons.

$$\hat{H}_n = \sum_\alpha -\frac{1}{2} \nabla_\alpha^2 + E_{total} \quad (2.6)$$

Resolvendo-se o problema eletrônico para um conjunto de coordenadas nucleares (R), obtemos uma superfície de energia potencial (do inglês *Potential energy surface* - PES),

através da qual podemos calcular a função de onda dos núcleos que descreve o movimento nuclear, ou seja, a rotação, vibração e translação da molécula.

2.1 Aproximação de Hartree-Fock (HF) (Szabo, 1996; Jansen, 1999; Levine, 2000; Morgon e Koutinho, 2007)

Para resolver a equação (2.4) para sistemas de muitos elétrons, utiliza-se a aproximação de um elétron de Hartree-Fock (HF). O método de HF se baseia na determinação de uma função de onda geral Ψ_e na forma de um produto antissimétrico de funções de onda de um elétron. De acordo com a teoria de orbitais moleculares (OM), a cada elétron está associado uma função spin-orbital $\phi_{i\alpha}$ ou $\phi_{i\beta}$, em que ϕ_i é função de onda espacial e $\alpha(m_s = 1/2)$ e $\beta(m_s = -1/2)$ as funções de spin. Considerando que elétrons são férmions e “partículas” idênticas, os princípios de exclusão de Pauli e da indistinguibilidade devem ser satisfeitos. Portanto, a função de onda eletrônica deve ser escrita, na forma compactada, como um determinante de Slater.

$$\Psi_e = \frac{1}{\sqrt{n!}} \left| \phi_1(1)\alpha(1)\phi_1(2)\beta(2) \dots \phi_{n/2}(n)\beta(n) \right| \quad (2.7)$$

Para encontrar a função de onda e o valor exato da energia devem-se conhecer as funções spin-orbitais que minimizam a mesma, para tal utiliza-se o teorema Variacional.

$$E \leq \int_{\tau} \Psi_e^* \hat{H}_e \Psi_e d\tau \quad (2.8)$$

Utilizando as eqs. (2.3), (2.7) e (2.8) obtemos a energia de HF escrita como,

$$E = E_{HF} = \sum_{i=1}^{n/2} \varepsilon_i - \sum_{i=1}^{n/2} \sum_{j=1}^{n/2} (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (2.9)$$

na qual J_{ij} e K_{ij} representam as integrais de Coulomb e de troca, respectivamente.

$$J_{ij} = \iint \phi_i^*(1)\phi_j^*(2)r_{12}^{-1}\phi_i(1)\phi_j(2)d\tau_1d\tau_2 \quad (2.10)$$

$$K_{ij} = \iint \phi_i^*(1)\phi_j^*(2)r_{12}^{-1}\phi_i(2)\phi_j(1)d\tau_1d\tau_2 \quad (2.11)$$

E ε_i é o autovalor da equação de Fock (2.12), representando a energia dos orbitais.

$$\hat{F}\phi_i = \varepsilon_i\phi_i \quad (2.12)$$

Para tornar mais factível a resolução das funções de onda HF, Roothaan propôs que os orbitais moleculares poderiam ser representados por uma combinação linear de orbitais atômicos (LCAO- Linear Combination of Atomic Orbitals) centrados em cada átomo do sistema.

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^k C_{\mu i} \chi_{\mu} \quad i = 1, 2, 3 \dots k/2 \quad (2.13)$$

χ_{μ} são os AO, $C_{\mu i}$ a contribuição do AO μ para o OM i e k é número de AO usados na expansão. Substituindo a eq. (2.13) na eq. (2.12) obtemos as equações de HF-Roothaan

$$\sum_{\mu=1}^k C_{\mu i} (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) = 0 \quad (2.14)$$

Na qual $F_{\mu\nu}$ são os elementos da matriz da Fock e $S_{\mu\nu}$ as integrais de sobreposição do AO χ_{μ} e χ_{ν} . A solução não trivial para a equação (2.14) vem pela resolução do determinante secular eq. 2.15.

$$\det(F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) = 0 \quad (2.15)$$

Esse determinante é resolvido por um processo iterativo, conhecido como campo autoconsistente (SCF), uma vez que os elementos da matriz de Fock $F_{\mu\nu}$ dependem do operado F que por sua vez depende dos coeficientes $C_{\mu i}$. Após o cálculo dos elementos da matriz de Fock, o determinante secular é resolvido obtendo-se os valores para a energia ε_i , e

a matriz de coeficientes $C_{\mu i}$ é determinada. Com a nova matriz C realiza-se uma nova expansão e o processo se repete até que ocorra convergência.

O conjunto de funções χ_{μ} é denominado de base de funções e representam orbitais semelhantes àqueles do átomo de hidrogênio, contendo parte radial e angular. As funções de base atômica radiais usadas em cálculos de orbitais moleculares podem ser orbitais atômicos de Slater (STO's/ Slater Type Atomic Orbitals) ou funções de base atômicas do tipo gaussianas (GTO's/ gaussian Type Atomic Orbitals). A maioria dos cálculos quânticos utiliza funções do tipo GTO's isso porque, embora menos realísticas, o custo computacional para resolução das integrais eletrônicas é bem menor.

As GTO's são polinômios em coordenadas cartesianas (x, y, z) multiplicados por uma exponencial em r^2 . São representados como:

$$\chi_{ijk} = Nx^i y^j z^k \exp(-\epsilon r^2) \quad (2.16)$$

Onde N é a constante de normalização e i, j, k são números inteiros positivos ou zero e podem definir os orbitais s, p, d. Se $i + j + k = 0$, a GTO representa o orbital atômico s; se $i + j + k = 1$ o orbital representado é p.

Outra possibilidade de descrição dos orbitais atômicos é usar uma combinação linear de funções gaussianas como funções de base; originando novas funções chamadas funções contraídas (CGTO/ *Contracted Gaussian-Type Function*) representadas como:

$$\chi_i = \sum_{\mu} d_{\mu r} g_r \quad (2.17)$$

$d_{\mu r}$ são novos coeficientes de expansão e g_r são as funções gaussianas originais (GTO) e são denominadas primitivas. A notação geral utilizada para representar a contração de funções gaussianas é: (10s,4p,1d/4s,1p) \rightarrow [3s,2p,1d/2s,1p]

$$\underbrace{\hspace{10em}}_{32 \text{ funções GTO}} \quad \underbrace{\hspace{10em}}_{19 \text{ funções CGTO}}$$

As funções de base podem ser classificadas pelo número de funções gaussianas que as formam. Uma base é dita mínima quando o número de funções é mínimo, ou seja, uma única função para cada elétron do átomo. Uma base estendida ou estendida de valência quando cada orbital é definido por duas ou mais funções de base. Dessa forma tem-se para C(H), que uma

função de base mínima, por exemplo: STO-3G, pode ser representada por $(6s,3p/3p) \rightarrow [2s,1p/1s]$.

Funções de base estendida são normalmente representadas por K-nlmG, na qual K representa o número de funções utilizadas para os elétrons de camada interna (*core*). A notação nlm, define as funções utilizadas para a camada de valência e “G” o uso de GTOs para representar os orbitais atômicos.

Como exemplo, a notação 3-21G representa uma base de camada de valência estendida, com o esquema de contração definido abaixo.

$$3-21G \left\{ \begin{array}{l} \chi_1 = \sum_{i=1}^3 d_i \chi_i^{GTO} \\ \chi_2 = \sum_{i=4}^5 d_i \chi_i^{GTO} \\ \chi_3 = \chi_6^{GTO} \end{array} \right.$$

$(6s,3p/3s) \rightarrow [3s,2p/2s]$

Para aumentar a flexibilidade da base ou melhorar a descrição da mesma na região de valência, são adicionadas funções extras, como as funções de polarização que são gaussianas com número quântico azimutal maior (por exemplo: adição de funções p para o átomo de H).

Nos cálculos de sistemas moleculares quanto maior o número de elétrons envolvidos maior será o número de funções de base necessárias para expandir os correspondentes orbitais moleculares, o que aumenta o custo computacional. Entretanto, para os sistemas com grande número de elétrons, a maioria deles é de camada interna (*core*), com destaque para os metais de transição. Esses elétrons do ponto de vista químico não são, a princípio, “importantes” por não estarem diretamente envolvidos na formação de ligações químicas. Portanto, uma aproximação muito utilizada para simplificar o número de funções de base consiste em substituir os orbitais internos por pseudopotenciais e tratar explicitamente somente os elétrons da camada de valência. Esses potenciais, denominados de ECP (*Effective Core Potentials*), e são acompanhados de um conjunto de bases de valência, que varia de acordo com o pseudopotencial. Os ECP's podem também incluir efeitos relativísticos são os chamados RECP (*Relativistic Effective Core Potentials*), que tem importância para alguns átomos pesados. Os pseudopotenciais são conhecidos também como potenciais efetivos de caroço e existem diferentes potenciais descritos na literatura com formas analíticas normalmente baseadas em expansão de funções gaussianas.

$$U_{ECP}(r) = \sum_k d_k r^{n_k} e^{-\zeta_k r^2} \quad 2.18$$

Os parâmetros d_k , n_k e ζ_k dependem do momento angular e são determinados pelo método dos mínimos quadrados. Para metais de transição os melhores resultados energéticos são encontrados considerando o espaço de valência uma camada abaixo da última camada.

A aproximação dos potenciais de caroço é muito usada principalmente para os metais de transição. Nos cálculos realizados para reação de análogos da cisplatina, a função de base usada para a platina(II) foi um pseudopotencial, uma vez que o átomo de Pt contém 78 elétrons, sendo sua configuração (**Z=78**): $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2 4p^6 4d^{10} 4f^{14} 5s^2 5p^6 5d^8 6s^2$. A camada de valência será representada por: **$5s^2 5p^6 5d^8 6s^2$** que será tratada explicitamente, e o resto dos elétrons que formam o *core*, serão tratados pelo pseudopotencial, neste caso o LANL2DZ. Esse pseudopotencial foi desenvolvido por P. J. Hay e W. R. Wadt (Hay e Wadt, 1985), sendo os elétrons de valência tratados por um conjunto de bases $(8s,6p,3d) \rightarrow [3s,3p,2d]$.

Como já foi mencionado, o método é variacional, por consequência, quanto maior o número de funções de base usadas para expandir os orbitais moleculares, menor será a energia. Se o conjunto de função de base fosse completo então teríamos o resultado exato para a função de onda molecular dentro da aproximação de HF. Como esse conjunto completo é em geral infinito, ficamos limitados a uma base incompleta e a energia obtida é chamada energia SCF.

2.2 Correlação Eletrônica (Szabo, 1996; Levine, 2000)

A aproximação de Hartree e Fock não contempla as interações instantâneas entre dois elétrons, ou seja, seu movimento correlacionado não é propriamente tratado. A correlação eletrônica é geralmente definida como a diferença entre a energia exata (não relativística) e a solução da equação de HF no limite de um conjunto de função de base completo.

$$E^{corr} = E^{exata} - E^{HF} \quad (2.19)$$

Quando se inclui a correlação eletrônica que leva em consideração o acoplamento dos movimentos eletrônicos individuais, contribui-se para a diminuição da repulsão elétron-elétron diminuindo a energia total.

Existem vários métodos que contém correlação eletrônica e que se baseiam no método de HF. Com exceção da teoria do funcional de densidade (DFT), que será brevemente discutida a seguir, todos os métodos correlacionados envolvem a mistura de funções de onda do estado fundamental com funções de onda do estado excitado. Os métodos mais conhecidos são a Teoria de Perturbação de Muitos Corpos (MBPT-*Many Body Perturbed Theory*), Interação de Configuração (CI-*Configuration Interaction*) e o método Coupled Cluster (CC). Esses são os chamados métodos pós-HF, os quais não serão detalhados neste texto. Além dos métodos de HF e MBPT, a DFT também foi utilizada no desenvolvimento do presente trabalho.

2.3 A Teoria do Funcional de Densidade (Morgon e Custodio, 1995; Morgon e Koutinho, 2007)

As bases da teoria do funcional de densidade estão no teorema de Hohenberg-Kohn (HK). Este propõe que a energia eletrônica do estado fundamental (E_0) e outras propriedades moleculares podem ser determinadas completamente a partir da densidade eletrônica deste estado (ρ_0). A energia para o estado fundamental não degenerado é um funcional da densidade eletrônica,

$$E_0 = E_0[\rho_0] \quad (2.20)$$

O colchete denota o funcional e o subscrito zero representa o estado fundamental.

A equação de Kohn-Sham (KS) apresenta explicitamente a repulsão elétron-elétron de Coulomb e definem uma função universal dependente da energia cinética e do funcional de troca e correlação:

$$E_v[\rho] = T_s[\rho] + E_{xc}[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_{12}|} dr_1 dr_2 + \int \rho(r)v(r)dr \quad (2.21)$$

em que $T_s[\rho]$ é o funcional energia cinética de um sistema de elétrons que não interagem, $E_{XC}[\rho]$ é o funcional de troca e correlação e o índice v denota a dependência da energia com o potencial externo.

A equação de Kohn-Sham é capaz, a princípio, de produzir resultados exatos para energia, no entanto apresenta um funcional que não é conhecido, chamado de funcional de troca e correlação. O funcional de energia é descrito por quatro termos, como mostra a Equação (2.21), dos quais três são conhecidos e um ($E_{XC}[\rho]$) é aproximado. Quando se compara as formulações da teoria do funcional da densidade e a Teoria de Hartree-Fock a diferença mais significativa está no potencial de troca e correlação. A chave para se obter um bom resultado com o método de KS DFT é conseguir uma boa aproximação para a energia de troca e correlação. Existe um grande número de representações para esse termo e pesquisadores que trabalham no desenvolvimento de funcionais de troca e correlação.

Uma aproximação comum para o funcional de troca e correlação é chamada “Aproximação da densidade Local” (do inglês Local Density Approximation - LDA) baseada na teoria do gás de elétrons homogêneo, um sistema com densidade eletrônica $\rho(r)$ não-homogêneo, como uma molécula ou átomo, é tratado aproximando-se $E_{XC}[\rho]$ pelo valor correspondente ao gás de elétrons homogêneo com a densidade $\rho(r)$. Outra aproximação para o termo de troca e correlação é chamado de aproximação do gradiente generalizado (GGA), é uma forma melhorada do LDA, que inclui a informação do gradiente da densidade eletrônica, $\nabla\rho(r)$, para se levar em conta a não-homogeneidade da verdadeira densidade eletrônica.

Uma forma usada para desenvolver funcionais aproximados para serem usados na teoria de KS DFT é escrever o funcional $E_{XC}[\rho]$ como uma soma do funcional de troca E_X e do funcional de correlação E_C . Dessa forma os funcionais de troca GGA mais populares são os de Perdew (1986) e Becke (1988), já os funcionais de correlação GGA os mais comuns são os propostos por Lee, Yang e Parr (LYP), Perdew e Yang (PW91). É válido ressaltar que qualquer funcional de troca pode ser combinado com qualquer funcional de correlação, formando os funcionais híbridos, bastante usados nos cálculos DFT, é o caso do funcional B3LYP usado neste trabalho.

A grande vantagem do método DFT é incluir um tratamento aproximado da correlação eletrônica por um custo computacional bem menor do que os métodos pós-HF, uma vez que a demanda computacional num cálculo HF varia com N^4 , onde N é o número de funções de base usada na expansão dos orbitais moleculares (LCAO), nos métodos pós-HF variam com

N^5-N^7 e no caso do DFT com N^3 , portanto é uma alternativa para sistemas maiores sem perder qualidade nos resultados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta principal dessa dissertação (de mestrado) foi utilizar métodos da química computacional para a obtenção de parâmetros estruturais e energéticos de complexos de Pt(II) com potencial antitumoral, com ênfase no estudo de híbridos moleculares de platina(II) com análogos da tetraciclina. Ligantes do tipo TC podem atuar como carreadores de metais, que entre outras vantagens, facilitaria o transporte da droga no organismo. Nesse sentido, nas próximas sessões, primeiramente serão discutidos os resultados termodinâmicos e estruturais obtidos nos estudos de formação dos complexos de AHTC-Pt(II) e, para investigar a reatividade do complexo híbrido AHTC-Pt(II) serão discutidos as propriedades cinéticas e termodinâmicas determinadas para reações do complexo com modelos simples de nucleófilos (Nu), os aminoácidos metionina e cisteína (Met e Cys); e as bases nitrogenadas guanina e adenina (G e A). Por fim, será apresentada uma análise das propriedades termodinâmicas e estruturais do complexo de platina(II) com a tetraciclina quimicamente modificada denominada CMT-3.

3.1 Termodinâmica de Formação de Compostos de Platina(II) Com Análogos da Tetraciclina.

Uma das características mais importantes das tetraciclinas é o fato delas formarem complexos reversíveis com diversos íons metálicos. A coordenação influencia diretamente na farmacocinética dessas moléculas e em geral no organismo, sendo tal coordenação determinante para a maior ação biológica das mesmas. As diferentes formas que as TCs podem existir, quanto à carga ou conformação, bem como o grande número de sítios de ligação que esses compostos apresentam, têm motivado diversos estudos de formação de complexos com vários íons metálicos. Técnicas como espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC), espectroscopia de absorção e fluorescência e ainda métodos eletroanalíticos têm sido aplicadas na caracterização desses complexos (Wessels *et al.*, 1998). Nesse sentido estudos teóricos têm contribuído amplamente na elucidação dos sítios de coordenação, bem como na estabilidade conformacional de diferentes análogos da TC. Nosso grupo em especial tem dado importante

contribuição, investigando estrutura, espectroscopia e reatividade dos ligantes livres e dos complexos formados. Esses estudos têm contribuído com estudos experimentais na elucidação do modo de coordenação de complexos de TCs com íons como Mg(II), Zn(II), Al(III) e mais recentemente com Pt(II) (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998a; 1998b; Dos Santos *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2006). São tais complexos de platina(II) com análogos da tetraciclina que serão discutidos nesta dissertação. O primeiro complexo estudado tem como ligante o derivado 5a,6-anidrotetraciclina. Um completo estudo de estrutura e propriedades termodinâmicas para o complexo AHTC-Pt(II) foi realizado e publicado recentemente pelo nosso grupo, apresentando resultados em bom acordo com dados experimentais (Dos Santos *et al.*, 2006). A forma mais estável do complexo AHTC-Pt(II) obtida no citado estudo foi base para os trabalhos relatados na presente dissertação de mestrado.

3.2 Estrutura e Propriedades do Complexo de Platina(II) com o Análogo 5a,6-

Anidrotetraciclina (AHTC-PT)

O complexo 5a,6-anidrotetraciclina dicloroplatina(II) (Figura 3.1) foi primeiramente sintetizado por Aly *et al.* (Aly, Strasser e Vogler, 2002), que propuseram o sítio de coordenação como sendo no anel A da AHTC. Mais tarde, Guerra e colaboradores reportaram o complexo com a TC e alguns análogos, clorotetraciclina, doxiciclina e oxitetraciclina (Guerra *et al.*, 2006). Todos os complexos obtidos apresentam estequiometria $[Pt(TC)Cl_2]$, com Pt(II) ligada ao sítio O3-Oam no anel A (Figura 1.8).

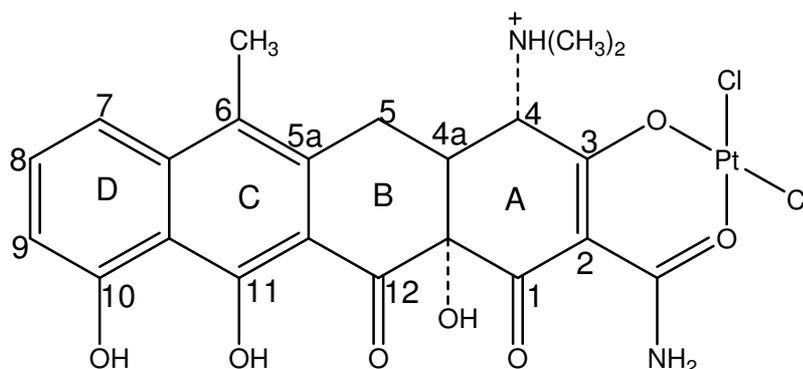


Figura 3.1 Estrutura proposta para o complexo AHTC-Pt(II)

Apesar de ter sido publicada a síntese do complexo de AHTC-Pt(II) (Aly, Strasser e Vogler, 2002), não foram descritos, na publicação, os parâmetros estruturais e termodinâmicos para a formação do complexo. Em nosso prévio trabalho foi realizada uma análise teórica da interação ligante livre-metal, tendo sido proposto todos os modos de coordenação possíveis (Dos Santos *et al.*, 2006). Numa segunda etapa, desse mesmo trabalho, foi também realizado um estudo do processo de hidrólise das estruturas mais estáveis, que é tido como a etapa de ativação da droga no organismo (Figura 1.6). Nossos resultados contribuíram para validar o sítio de coordenação como sendo no anel A. De acordo com nossas conclusões, ocorre um equilíbrio entre os complexos IVA e VA (Figura 3.2), sendo que o complexo IVA é a proposta experimental (Aly, Strasser e Vogler, 2002). Além da análise termodinâmica dos complexos, estudamos a reação de hidrólise das espécies IVA e VA. Os resultados mostram que o complexo AHTC-Pt reage com a água com velocidade similar à cisplatina. Em solução aquosa a constante de velocidade para a hidrólise é de $4,4 \times 10^{-6}$ para AHTC-Pt e $2,5-8,5 \times 10^{-5}$ (valores em $M^{-1}s^{-1}$) para cisplatina (Kozelka *et al.*, 1999). Esse é um importante resultado, pois coloca o complexo AHTC-Pt como um candidato a análogo da cisplatina. Portanto, a análise dos processos de interação com outros nucleófilos presentes no meio biológico pode contribuir para o entendimento completo da reatividade dessa classe de moléculas. É o que discutiremos na seção 3.3.

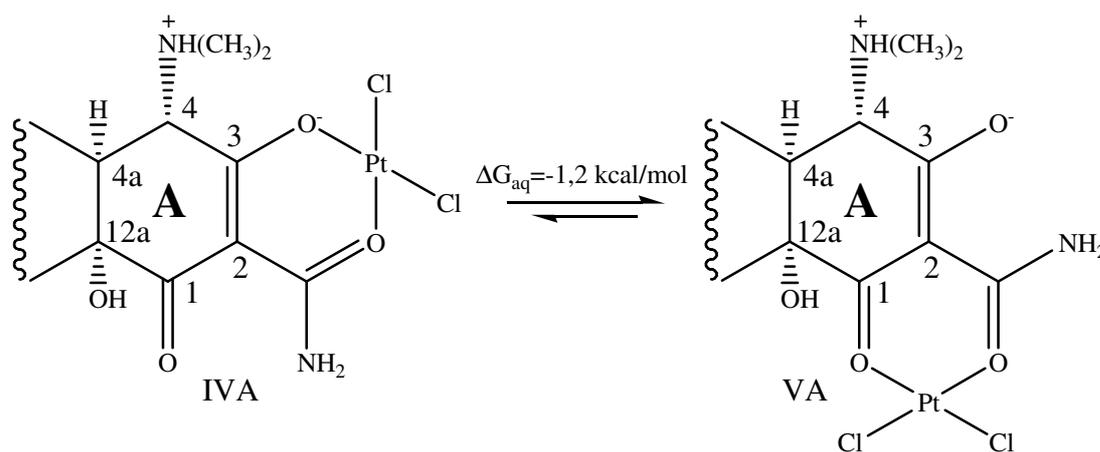


Figura 3.2 Modos de coordenação mais estáveis, para o complexo AHTC-Pt(II) (Dos Santos *et al.*, 2006).

3.3 Cinética de Interação de Bionucleófilos com o Complexo AHTC-Pt(II)

Como já foi relatado na seção anterior, a cisplatina pode realizar ligações químicas com diferentes espécies no meio biológico. Tanto no meio extracelular como intracelular há diversas biomoléculas capazes de se ligarem covalentemente com o metal. Nesse sentido, muito tem sido pesquisado sobre o modo de ação de drogas contendo Pt(II). Dentre as reações que as mesmas podem sofrer no organismo humano destacam-se a hidrólise, interação com proteínas, RNA/DNA, pequenas moléculas como aminoácidos e íons inorgânicos. É bem conhecido, no entanto, que a formação do complexo Pt-DNA é responsável pela atividade antitumoral da droga. Entretanto, as demais reações acima mencionadas competem com a reação Pt-DNA, especialmente, moléculas contendo enxofre; exercendo uma grande influência na distribuição da droga, bem como na termodinâmica e cinética de competição com nucleobases (Summa *et al.*, 2006). Isso ocorre porque os compostos de Pt são administrados via intravenosa e existem muitos nucleófilos contendo enxofre no sangue, que podem reagir com a platina, diminuindo assim a disponibilidade da droga para reagir com o DNA. Outro fator bastante relatado é a influência do meio reacional na seletividade e reatividade dos compostos de Pt(II). A ocorrência de variações no meio celular seria uma explicação para a baixa porcentagem da droga que reage com o DNA. Alguns trabalhos discutem a transferência de compostos de Pt(II) ligados a enxofre para as bases nitrogenadas, sugerindo que os sulfurados funcionariam como reservatórios de Pt para reações com o DNA (Summa *et al.*, 2006). Todos esses estudos mostram que ainda há muito para ser elucidado sobre o metabolismo desses compostos. Nessa fase do trabalho buscamos avaliar a reatividade do complexo AHTC-Pt(II), considerando reações com modelos simples para os bionucleófilos. Estruturas e propriedades cinéticas e termodinâmicas foram calculadas considerando diferentes níveis de teoria (Marcial *et al.*, 2008).

3.3.1 Metodologia de cálculo

Em nosso prévio trabalho (Dos Santos *et al.*, 2006) (ver seção 3.2) um completo estudo da formação do complexo AHTC-Pt(II) foi realizado, contribuindo quantitativamente com a proposta experimental de coordenação da platina no anel A. Além dos cálculos de propriedades estruturais e espectroscópicas, nós também analisamos a reação de hidrólise do complexo. Uma vez que, baseado no mecanismo padrão de ação biológica para compostos de

platina(II), a reação de hidrólise (eq. 3.1) representa a etapa de ativação do complexo, que é fundamental na definição da reatividade dos sistemas de interesse. A espécie hidratada pode seguir diferentes processos reativos, incluindo interações com proteínas e ácidos nucleicos (eq. 3.2).



As constantes de velocidade de hidrólise do complexo AHTC-Pt(II) são comparáveis às da cisplatina, o que coloca o composto AHTC-Pt(II) como um potencial análogo da cisplatina. Seguindo essas observações nós realizamos um estudo da reatividade do complexo com outros nucleófilos de importância biológica, partindo da espécie monoaquo, como descrito na equação 3.2, na qual L=AHTC e Nu são os nucleófilos: A, G, Met e Cys (Figura 3.3). O ligante AHTC na espécie monoaquo está na sua forma zwitteriônica (neutra) e o modo de coordenação escolhido foi o IVA (Figura 3.2), conforme proposto experimentalmente (Aly, Strasser e Vogler, 2002). As propriedades cinéticas foram calculadas usando a aproximação da supermolécula (Esquema 3.1), na qual os reagentes são tratados como complexos moleculares, chamados aqui de I-1 e I-2 para reagentes e produtos, respectivamente. Essas espécies foram localizadas na superfície de energia potencial (PES) usando o cálculo de Coordenada Intrínseca de Reação (IRC) (Gonzalez e Schlegel, 1989), partindo das estruturas dos estados de transição (TS, no inglês *transition state*). Um mecanismo associativo é assumido para todos os processos analisados, cujo TS apresenta uma geometria bipirâmide trigonal distorcida

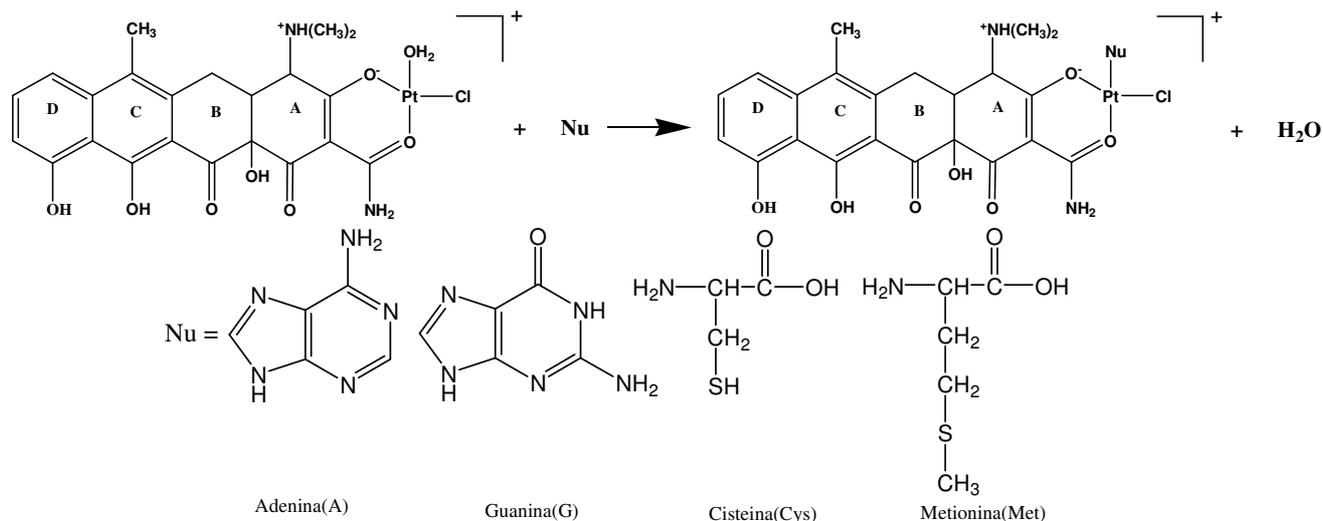
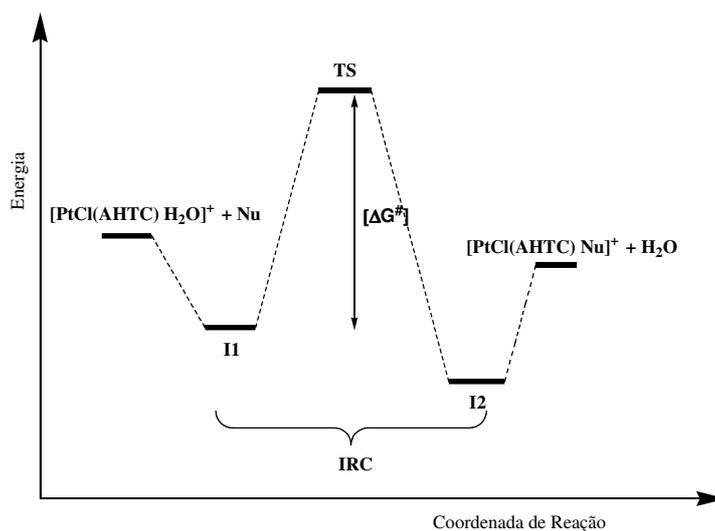


Figura 3.3 Reação considerada no presente trabalho.



Esquema 3.1 Representação do processo reativo dentro da aproximação da supermolécula.

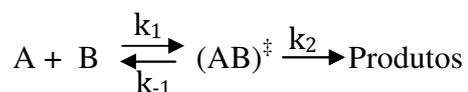
Quando duas moléculas (partículas) colidem-se de modo geometricamente favorável ocorre um aumento da energia potencial, agora do par. Toda a energia cinética das partículas em movimento é convertida em energia potencial durante o curto intervalo de tempo da colisão. Essa energia é aumentada até um máximo e se transforma em energia cinética quando as moléculas se afastam. No ponto máximo de energia potencial ocorre a formação de um agregado instável, chamado estado ativado ou estado de transição (TS). O Esquema 3.2 mostra o perfil da curva de variação de energia no decorrer de uma reação bimolecular. A energia máxima é chamada de energia de ativação (E_a) e representa o aumento de energia envolvido na formação do TS, portanto, é igual à energia cinética que as partículas devem ter

para reagirem. O estudo da formação e decomposição do TS é focado pela teoria do estado de transição (TST) ou teoria do estado ativado. Teoria essa desenvolvida por Henry Eyring na década de 1930 (Connors, 1990). De maneira simplificada a TST reduz a dinâmica da colisão em um equilíbrio entre as moléculas reagentes e o estado de transição.



Esquema 3.2 Perfil energético de uma reação bimolecular.

Todas as reações estudadas neste trabalho são do tipo bimoleculares e podem ser escritas de forma geral como:



onde $(AB)^\ddagger$ é o complexo ativado.

De acordo com a TST a constante de equilíbrio para a reação acima pode ser escrita como

$$k^\ddagger = \frac{[(AB)^\ddagger]}{[A][B]} \quad (3.3)$$

A taxa de variação da concentração da espécie $(AB)^\ddagger$ com o tempo pode ser escrita como

$$\frac{d[(AB)^\ddagger]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[(AB)^\ddagger] - k_2[(AB)^\ddagger] \quad (3.4)$$

De acordo com a TST há um equilíbrio entre reagentes e TS, portanto, os dois primeiros termos da equação (3.4) se cancelam

$$\frac{d[(AB)^\ddagger]}{dt} = -k_2[(AB)^\ddagger] \quad (3.5)$$

k_2 é dado pela mecânica estatística e é chamado de constante universal para o estado de transição,

$$k_2 = \frac{k_B T}{h} \quad (3.6)$$

Onde, k_B é a constante de Boltzman, h é a constante de Planck e T a temperatura.

Devido ao equilíbrio que é atingido rapidamente a taxa de variação da concentração dos reagentes e do complexo ativado com o tempo é a mesma. Logo podemos reescrever a equação 3.5 como:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_2[(AB)^\ddagger] \quad \therefore \quad -\frac{d[A]}{dt} = k_2 k^\ddagger [A][B] \quad (3.7)$$

Fazendo $k_2 k^\ddagger = k$ temos,

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B] \quad (3.8)$$

Utilizando a equação do equilíbrio químico $\Delta G^0 = -RT \ln k^\ddagger$ tem-se a constante de velocidade macroscópica:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (3.9)$$

ΔG^\ddagger é a diferença da energia livre de Gibbs entre o TS e o reagente. Da equação (3.9) fica claro que para calcular a constante de velocidade é preciso calcular a energia livre para reagentes, TS e produto. Isto pode ser feito se a geometria, energia e constantes de força são conhecidas para estas espécies. O cálculo da energia livre é feito baseado no formalismo da mecânica estatística. As contribuições translacionais e rotacionais requerem cálculos simples. Já as contribuições vibracionais requerem a completa matriz da constante de força (todas as derivadas segunda da energia com relação às coordenadas), as quais podem envolver um significativo trabalho computacional (Jansen, 1999).

Considerando-se a aproximação de Born-Oppenheimer, ou seja, a distribuição eletrônica de uma molécula ajusta-se rapidamente a qualquer movimento dos núcleos, podemos dizer que a energia e o comportamento de uma molécula podem ser expressos como uma função da posição dos núcleos. Definindo assim a superfície de energia potencial (PES) que é, portanto, governada pelos movimentos dos núcleos. Através de métodos da química computacional é possível explorar essa superfície. Um desses métodos é chamado de coordenada intrínseca de reação (IRC). Este método é extremamente útil quando o interesse é obter a coordenada de reação a partir de um determinado TS. A definição natural dessa coordenada corresponde ao caminho descendente de energia mínima a partir do TS, movendo-se em direção aos mínimos (reagentes e produtos) na superfície de energia potencial (PES). Quando as coordenadas ponderadas pela massa são usadas, esse caminho é chamado de IRC. Na prática, para obter os mínimos na PES parte-se de geometria inicial previamente confirmada como um TS verdadeiro. A reação pode caminhar no sentido direto ou reverso. Para atingir os mínimos as geometrias são otimizada a cada ponto ao longo do caminho escolhido. Os cálculos de IRC usados neste trabalho para encontrar as espécies envolvidas no caminho de reação são fundamentados no algoritmo de Gonzales e Schlegel (Gonzalez e Schlegel, 1989) como implementado no programa Gaussian 03 (Frisch *et al.*).

Todas as estruturas, incluindo intermediários, produtos e estado de transição, foram otimizadas em fase gasosa com a Teoria do Funcional de Densidade (DFT), com o funcional B3LYP (Becke, 1988; Lee, Yang e Parr, 1988), usando o conjunto de funções de base 6-31G(d) para todos os átomos exceto para platina que foi tratada com o pseudopotencial de Hay e Wadt especificado como LANL2DZ (Hay e Wadt, 1985). Nessa construção o potencial de caroço (ECP) representa 60 elétrons, sendo os 18 elétrons de valência representados por uma base expandida de funções (DZ). As estruturas para os TS foram caracterizadas como de primeira ordem mediante cálculo de frequência harmônica (uma única frequência imaginária). A energia livre de ativação ($\Delta G_{a,g}$) foi calculada usando a equação 3.10, na qual $\Delta E_{a,g}^{ele-nuc}$

vem da contribuição eletrônica nuclear (eq. 2.5) e $\Delta G_{a,g}^T$ da correção térmica. Esta última contribuição é obtida utilizando o formalismo da termodinâmica estatística, o qual tem como princípios modelos simples como gás ideal, rotor-rígido e oscilador harmônico (Jansen, 1999; Levine, 2000).

$$\Delta G_{a,g} = \Delta E_{a,g}^{ele-nuc} + \Delta G_{a,g}^T \quad (3.10)$$

Para avaliar a efeito das funções de bases na energia, foram realizados cálculos de energia usando o conjunto de funções 6-311+G(2d,p). A energia livre foi calculada com a equação (3.10), mas usando a energia-eletrônica nuclear obtida com B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d). Os cálculos foram realizados também em solução ($\epsilon=78,39$) usando o modelo contínuo de polarização (PCM) dentro do formalismo IEF (Cances, Mennucci e Tomasi, 1997). A cavidade do soluto foi construída de acordo com o esquema UAHF, incluindo as contribuições eletrostáticas e não eletrostáticas para a energia de solvatação. A energia livre de ativação em solução é calculada de acordo com a equação 3.11. Todos os cálculos foram realizados com o programa Gaussian 03 (Frisch *et al.*).

$$\Delta G_{a,aq} = \Delta G_{a,g} + \delta \Delta G_a^{solv} \quad (3.11)$$

Na equação (3.11) o último termo na direita representa a diferença de energia de solvatação entre as espécies interagentes (intermediários e TS).

Os espectros de RMN foram calculados no nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d) usando o método GIAO (*Gauge-Independent Atomic Orbital*) (Wolinski, Hinton e Pulay, 1990), para o cálculo dos tensores de blindagem magnética isotrópica (σ) para ^{13}C e ^1H . O deslocamento químico (δ) foi obtido relativo ao TMS (Equação 3.12), com $\sigma^{TMS} = 182,4656$ para C e $\sigma^{TMS} = 31,8821$ para H.

$$\delta_i = \sigma^{TMS} - \sigma_i \quad (3.12)$$

O tensor de blindagem magnética nuclear é dado por:

$$\sigma_{ji}^N(SCF) = \left[\frac{\partial^2 E(SCF)}{\partial B_i \partial m_{N_j}} \right]_{B=0} \quad (3.13)$$

Onde \vec{B} é o campo magnético e \vec{m}_N o momento magnético do núcleo N, e i e j as componentes do campo magnético externo e momento magnético induzido, respectivamente.

Para o estudo de propriedades magnéticas deve haver uma dependência implícita do campo magnético no modelo em estudo, Ditchfield (Ditchfie.R, 1974) usando a descrição de Ramsey (Ramsey, 1950) para moléculas isoladas na presença de um campo magnético criou um método chamado GIAO. Este método calcula o deslocamento químico (RMN) usando a seguinte função de base, explicitamente dependente do campo:

$$\chi_\mu(B) = \exp\left[-\frac{i}{2c}(B \times R_\mu) \cdot r\right] \chi_\mu(0) \quad (3.14)$$

Na qual R_μ é o vetor posição na função de base χ_μ e $\chi_\mu(0)$ é a função de base independente do campo.

Podemos escrever a equação (3.12) considerando a energia SCF

$$\sigma_{ji}^N(SCF) = \sum_{\mu\nu} D_{\mu\nu}^{SCF} \frac{\partial^2 h_{\mu\nu}}{\partial B_i \partial m_{N_j}} + \sum_{\mu\nu} \frac{\partial D_{\mu\nu}^{SCF}}{\partial B_i} \frac{\partial h_{\mu\nu}}{\partial m_{N_j}} \quad (3.15)$$

Onde $D_{\mu\nu}^{SCF}$ é a matriz densidade, $h_{\mu\nu}$ o hamiltoniano de um elétron e μ, ν, \dots são os orbitais atômicos.

3.3.2 Análise estrutural

Inicialmente serão mostrados resultados de estrutura e de espectros de RMN para os produtos, $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{Nu})]^+$ (Nu=G, A, Cys, Met). Ainda não há na literatura dados experimentais disponíveis para esses compostos, entretanto nós acreditamos que os seguintes resultados podem auxiliar aos estudos experimentais futuros, identificando adutos formados pela mistura de tetraciclina e biomoléculas.

A Tabela 3.1 mostra os parâmetros estruturais ao redor do centro metálico (numeração como na Figura 3.1). Podemos notar que a geometria do metal é próxima de quadrática plana para todos os complexos, com os ângulos de ligação $\angle\text{X}(\text{Nu})\text{-Pt-Cl}$ e $\angle\text{X}(\text{Nu})\text{-Pt-O}_3$ variando de 87-94° e os de torção $\delta\text{X-O}_3\text{-Oamd-Cl}$ variando de 180-187°. Uma maior distorção foi

encontrada no complexo com G (187°), que ocorre devido a uma fraca interação eletrostática envolvendo o oxigênio na posição C6 da G com o metil do grupo dimetilamônio na AHTC (ver Figura 3.4). A distância entre esses grupos é de 2,47 e 2,13 Å. Para o complexo com adenina essa interação também é observada, mas a distância entre o grupo metil e o NH₂ na posição C6 foi de 2,69 Å (ver Figura 3.4). Não são esperados efeitos significantes dessas interações na estabilidade dos complexos, mas estas podem afetar o espectro de RMN, como será discutido mais a frente. A principal mudança na estrutura dos produtos são os comprimentos de ligação rPt-X(Nu), os quais são aproximadamente 2,0 Å para os complexos com A e G e aproximadamente 2,3 Å para os complexos com Met e Cys.

Tabela 3.1 Parâmetros estruturais calculados no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ para os distintos complexos [Pt(AHTC)Cl(Nu)]⁺, mostrados na Figura 3.4. Os comprimentos de ligação (r) são dados em Å e ângulos de ligação (∠) e torção (δ) em graus. A numeração foi dada na Figura 3.2.

	Nu			
	Cys	Met	A	G
rPt-X(Nu)	2,32	2,33	2,02	2,05
rPt-Cl	2,34	2,34	2,33	2,34
rPt-O3	2,06	2,07	2,07	2,05
rPt-Oamd ^a	2,04	2,05	2,03	2,03
rC3-O3	1,28	1,28	1,28	1,27
rC2-C3	1,41	1,41	1,41	1,41
rC2-Camd	1,49	1,48	1,48	1,48
rCamd-Oamd	1,27	1,27	1,27	1,27
rC2-C1	1,47	1,47	1,47	1,47
rC1-O1	1,23	1,23	1,23	1,23
∠X(Nu)-Pt-Cl	87,9	88,7	88,6	89,3
∠X(Nu)-Pt-O3	92,8	94,0	91,9	93,5
∠Cl-Pt-Oamd	89,9	88,8	90,5	88,3
∠O3-Pt-Oamd	89,2	88,3	88,8	88,9
δX-O3-Oamd-Cl	180	180	181	187

^a O subscrito amd se refere ao grupo amida.

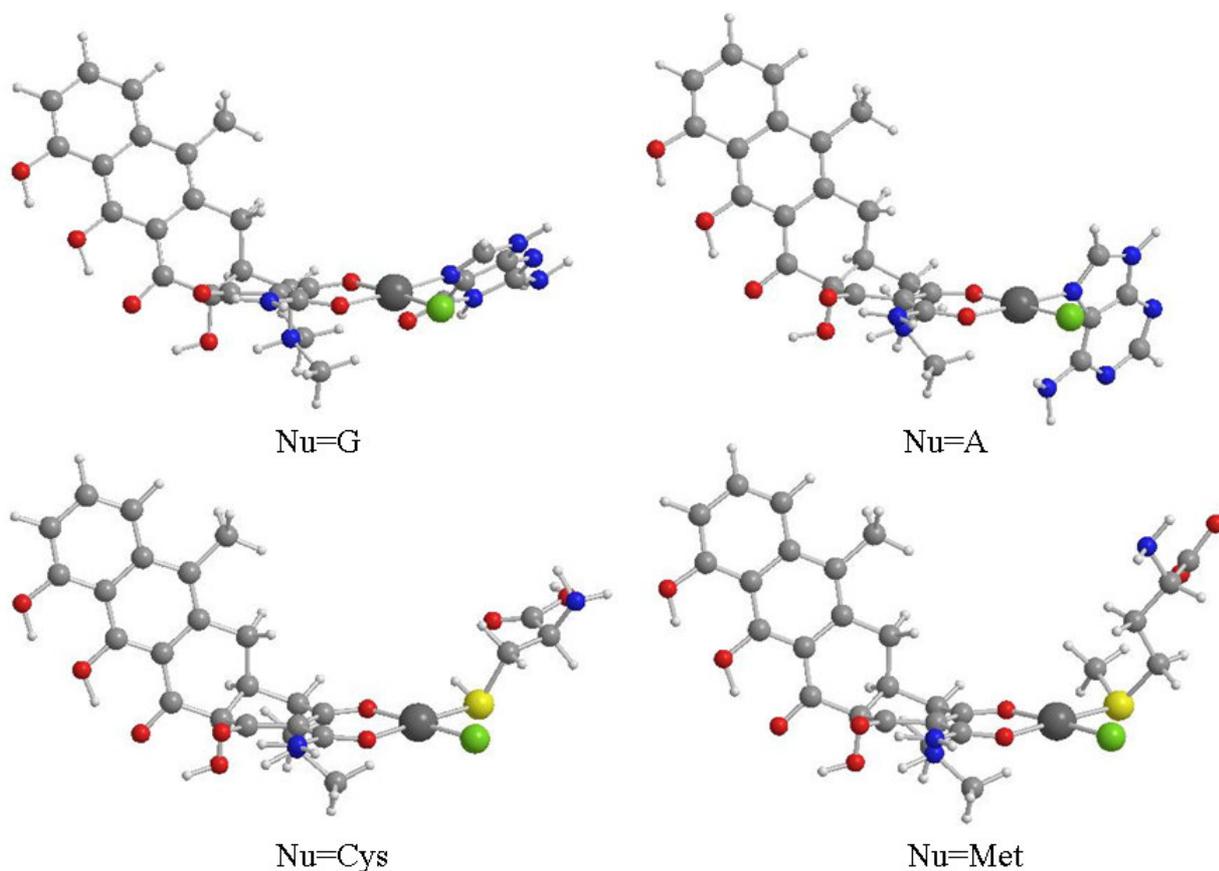


Figura 3.4 Geometrias otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d) para os complexos $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{Nu})]^+$ com Nu=G, A, Cys, Met, indicado na Figura. Alguns parâmetros estruturais são dados na Tabela 3.1.

Os deslocamentos químicos relativos para os principais átomos do anel A são mostrados na Figura 3.5, com os valores absolutos calculados para o ligante livre usados como referência. Observando a Figura 3.5 podemos ver que o espectro de RMN não é muito sensível ao tipo de nucleófilo, apresentando o mesmo perfil para todos os complexos. Na Figura 3.5a podemos ver que a maior parte dos átomos de carbono apresenta deslocamentos para campos baixos em relação ao ligante livre, com os maiores valores calculados para os átomos C3 e Camd, os quais estão ligados diretamente ao sítio de coordenação ao metal. O deslocamento químico médio para esses carbonos nos quatro complexos considerados é de 184 (C3) e 175 ppm (Camd), sendo os valores para A e G levemente maiores (185 e 176 ppm, respectivamente). Para o ligante livre, AHTC, os valores calculados foram de 176,4 (C3) e 169,2 ppm (Camd), que estão em acordo com os dados experimentais, com variação de apenas 5% (Lee e Everett, 1981). Esta concordância sugere que o deslocamento químico absoluto e relativo calculado pode ser usado como guia na caracterização de complexos.

Apesar disso, considerando uma precisão de 5% nós não podemos precisamente atribuir o RMN de ^{13}C para distinção entre os complexos com os diferentes nucleófilos analisados.

Os deslocamentos químicos para ^1H , mostrados na Figura 3.5b também apresentam características importantes para identificação das estruturas dos complexos. Os átomos de hidrogênio do grupo dimetilamônio são afetados diferentemente dependendo do nucleófilo. O deslocamento químico médio dos H em cada grupo metil ($-\text{CH}_3$) foi de $\delta=2,8$ ppm no ligante livre, está em perfeito acordo com os dados experimentais que apresentam um único pico em 2,9 ppm.

Para os complexos com os aminoácidos Met e Cys os valores médios calculados para esses deslocamentos foram iguais a 2,8 ppm, para ambos os grupos CH_3 . Para os complexos com A e G os valores são diferentes, prevendo dois picos em 3,2 e 3,8 ppm (G) e 2,8 e 3,3 ppm (A). Esses deslocamentos para campos mais baixos se devem a interação do grupo metil com os nucleófilos (ver Figura 3.4). Para o complexo com G os dois grupos metil do complexo são afetados, porque ambos estão próximos da carbonila no C6 da guanina, enquanto que no complexo com A somente um metil interage com o grupo NH_2 . Em nosso trabalho anterior (Dos Santos *et al.*, 2006) já havíamos observado, para o complexo $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}_2]$ modo IVA, o mesmo deslocamento para campo baixo no metil do grupo dimetilamônio. Agora podemos concluir que não era apenas efeito da coordenação do metal, mas também efeito da interação do grupo metil com o cloreto.

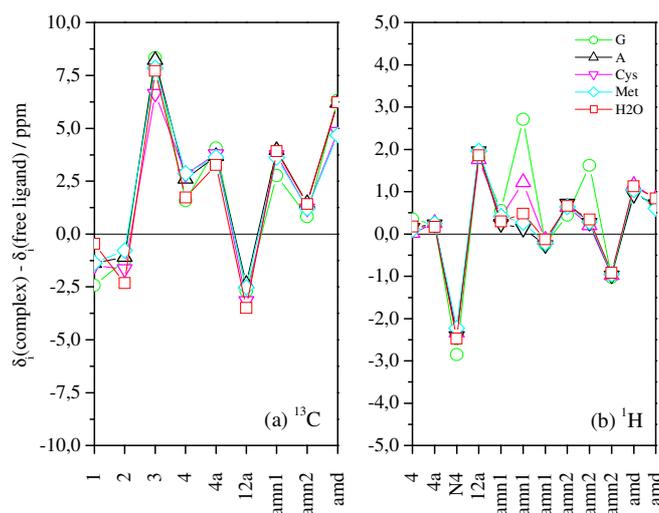


Figura 3.5 ^{13}C (a) e ^1H (b) deslocamentos químicos relativos para os complexos $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{Nu})]^+$ com Nu=G, A, Cys, Met. Os valores absolutos calculados para o ligante

livre foram usados como referência. Os deslocamentos absolutos foram calculados com a equação 3.12.

A coordenação da platina ao DNA é fundamental para a ação da droga como atitumoral. E o sucesso dessa reação envolve diversos fatores, como por exemplo, a estrutura do ligante. No entanto, os fatores cinéticos relacionados são decisivos, tendo em vista o número de outras reações desejáveis ou não e que são termodinamicamente favoráveis ocorrendo simultaneamente no meio biológico. Nesse sentido, entender no nível molecular esses processos é essencial para o desenho racional de novas moléculas ou ainda melhorar a ação das que já existem no mercado. Portanto essa dissertação foi direcionada para a cinética da reação do complexo AHTC-Pt com os nucleófilos representativos dos possíveis alvos da platina no meio biológico, incluindo bases nitrogenadas e os resíduos de aminoácidos.

Um mecanismo associativo foi considerado para todas as reações, passando por um estado de transição pentacoordenado. Na reação com as bases A e G ocorre a troca da molécula de água pelo N7 da guanina e da adenina. No caso dos aminoácidos a coordenação ocorre pelo enxofre da Met e da Cys. A geometrias otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d) para TSG e TSA-1 são mostradas na Figura 3.6, com alguns parâmetros estruturais relatados na Tabela 3.2.

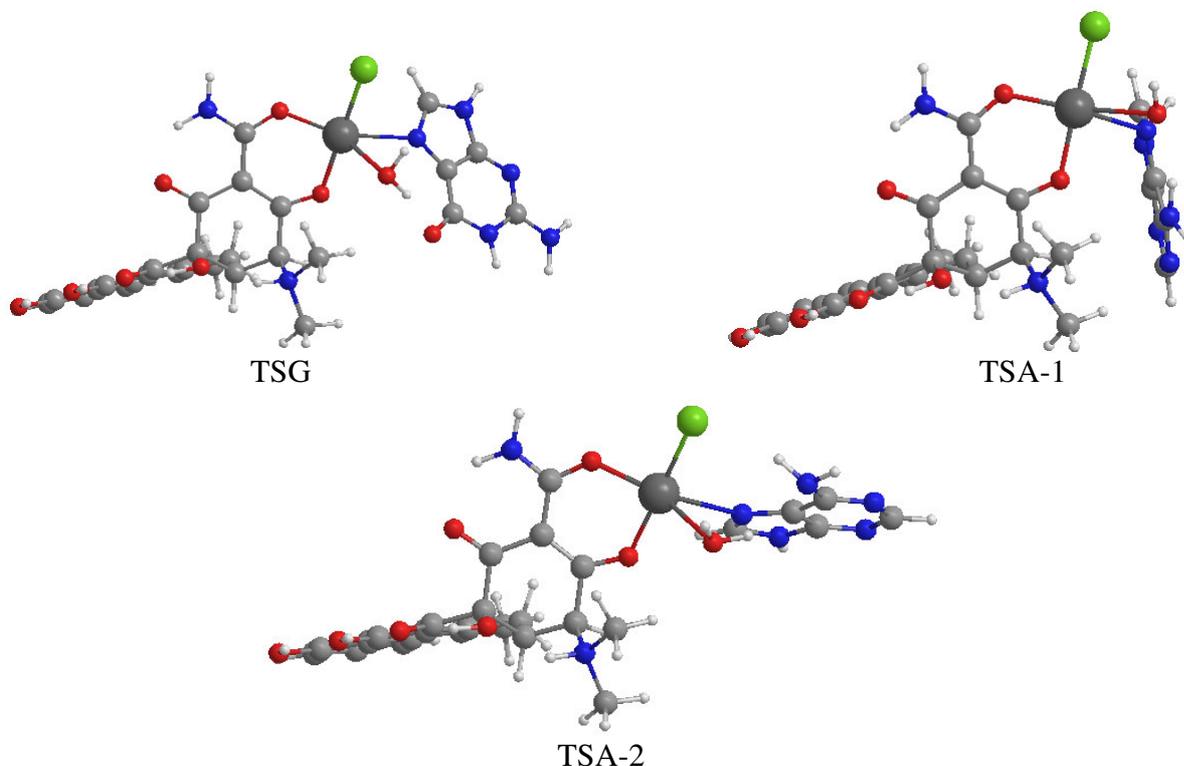


Figura 3.6 Estrutura otimizada (B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ) para o estado de transição envolvendo o ligante AHTC-Pt monoáquo com as bases A e G.

Tabela 3.2 Parâmetros estruturais (B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ) para os intermediários (I-1 e I-2) e para o estado de transição (TS) envolvidos na reação de formação dos complexos $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{Nu})]^+$ com $\text{Nu}=\text{G}$ e A . Os comprimentos de ligação (r) são dados em Å e ângulos de ligação (\angle) e torção (δ) em graus^a.

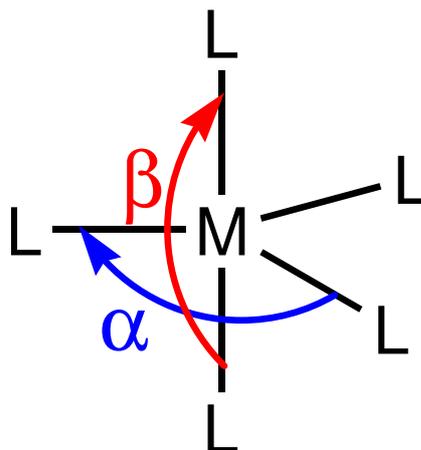
	G			A		
	I-1	TSG	I-2	I-1	TSA-1	I-2
rPt-N7	4,22	2,53	2,03	3,88	2,60	2,02
rPt-Ow	2,07	2,43	3,34	2,09	2,51	3,33
rPt-Oamd	2,00	2,03	2,03	2,00	2,00	2,03
rPt-O3	2,05	2,05	2,07	2,05	2,04	2,05
rPt-Cl	2,33	2,34	2,34	2,33	2,34	2,34
dHw...O6 ^b	1,69	1,82	1,99	-	-	-
dNH2...Ow ^b	-	-	-	2,16	1,99	1,88
dHw...N7 ^b	1,82	-	-	1,63	-	-
$\angle\text{Ow-Pt-N7}$	33,3	73,3	11,0	39,4	64,0	92,2
$\delta: [\text{N7-Pt-Oamd-Ow}]$	-	-177,6	-	-	-174,9	-
τ^c	-	0,54	-	-	0,46	-

^a Ver Fig. 3.2; ^b Distâncias intermoleculares em Å; ^c Ver eq. (3.16)

Analisando a estrutura do TSG e TSA-1 (Figura 3.6) vemos que o hidrogênio da molécula de água interage com o substituinte da posição C6 do nucleófilo, formando uma forte ligação de hidrogênio. No TSG a molécula de água atua como um doador de próton ($r_{\text{Hw}\dots\text{O6}}=1,82$ Å). Este comportamento é diferente no TSA-1, no qual a água é um grupo aceitador de próton ($r_{\text{NH}_2\dots\text{Ow}}=1,99$ Å). Essa diferença promove uma distorção na esfera de coordenação do metal. Os comprimentos das ligações rPt-N7 e rPt-Ow foram 2,53 e 2,43 Å para G e 2,60 e 2,52 Å para A, respectivamente. O ângulo de ligação $\angle\text{Ow-Pt-N7}$ foi maior para G (73,3°) do que para A (64,0°), refletindo diretamente no grau de trigonalidade (τ) da molécula. O parâmetro τ foi calculado para o TS de acordo com a equação (3.16).

$$\tau = (\beta - \alpha)/60^\circ, \quad (3.16)$$

na qual, β é o ângulo entre os ligantes axiais e α o maior ângulo no plano equatorial como mostra o esquema 3.3.



Esquema 3.3. Esquema usado para o cálculo do grau de trigonalidade (τ).

Esse parâmetro é usado para compostos pentacoordenados, nos quais para $\tau=1$ a geometria possui simetria D_{3h} perfeita (bipirâmide trigonal) e para $\tau=0$ a geometria é C_{4v} (pirâmide de base quadrada) (Addison *et al.*, 1984). Para a reação com as bases purinas, τ foi 0,54 (G) e 0,46 (A) indicando que as geometrias para ambos os TSs são uma mistura entre bipirâmide trigonal e pirâmide de base quadrada. Esses valores são próximos do encontrado para reação com a cisplatina $\tau=0,54$ (Addison *et al.*, 1984). As estruturas mostradas na Figura 3.6 podem ser comparadas com aquelas descritas nas referências 21 e 63. Para a reação da cisplatina monoáquo com G, a geometria do TS é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o grupo NH_3 axial da cisplatina e a carbonila na posição C6. Os valores para as distâncias r_{Pt-N7} e r_{Pt-Ow} , calculados no mesmo nível de teoria do nosso trabalho, foram de 2,53 e 2,42 Å, valores muito próximos daqueles calculados no presente trabalho (ver Tabela 3.2). O mesmo acontece com o ângulo $\angle Ow-Pt-N7$, igual a $73,1^\circ$ para a reação da cisplatina com G. Essas similaridades geométricas são esperadas, tendo em vista que os ligantes são os mesmos. A maior diferença se apresenta no arranjo espacial da G em torno do centro metálico, a qual é determinada pela interação com a cadeia lateral do ligante AHTC. O TS para a coordenação da adenina com cisplatina diaquo foi descrito por Raber e colaborador (Raber, Zhu e Eriksson, 2005), onde dois caminhos foram propostos para a reação. O mais estável apresenta ligações de hidrogênio entre o grupo NH_2 da A e molécula de água axial. O nível de teoria usado para otimização da geometria foi o mesmo usado no presente trabalho, entretanto os autores observaram transferência de próton intramolecular da água para o grupo NH_2 da A, durante a otimização de geometria. Essa transferência de próton foi atribuída à carga +2 da cisplatina diaquo e à ausência do solvente no cálculo. Apesar desse efeito não físico, a energia de ativação calculada foi obtida em bom acordo com o valor experimental.

Discutiremos tal energia de ativação adiante no presente texto. É interessante notar que as geometrias descritas na literatura para os TS das reações com as bases purínicas, mostram interações intramoleculares com o ligante axial (no caso da cisplatina é o grupo NH_3). Para a reação descrita aqui, da AHTC-Pt com as bases A e G, essas interações não são favoráveis devido à natureza do ligante AHTC (ver Figura 3.6).

A estrutura do estado de transição para reação com guanina (TSG) mostrado na Figura 3.6 pode ser considerado único. Entretanto para o TSA, duas possíveis estruturas foram encontradas, uma com a água agindo como um aceitador de próton (TSA-1, Figura 3.6) e outra com a água agindo como doador de próton (TSA-2, Figura 3.6). A geometria otimizada para TSA-2 é similar à do TSA-1, os valores das distâncias $r_{\text{Pt-N7}}$ e $r_{\text{Pt-Ow}}$ são 2,57 e 2,44 Å, respectivamente. O ângulo $\angle \text{Ow-Pt-N7}$ aumentou para $74,4^\circ$, mudando o valor de τ para 0,49. A ligação de hidrogênio $\text{dHw}\dots\text{NH}_2$ foi levemente mais curta (1,90 Å), mas a energia do TSA-2 foi maior por 2,7 Kcal/mol no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ em fase gasosa. A escolha do melhor caminho de reação não é baseada apenas na estabilidade do TS, mas depende também da energia dos reagentes os quais, dentro da aproximação da supermolécula, são diferentes para coordenadas de reação distintas. Esse ponto será discutido posteriormente no contexto energético.

As geometrias otimizadas para os TS envolvendo as reações com Cys e Met são mostradas na Figura 3.7 e os parâmetros estruturais são descritos na Tabela 3.3. Entre as várias estruturas possíveis para o TS, devido à grande flexibilidade dos aminoácidos, somente duas foram consideradas para cada processo neste trabalho, diferindo pela conformação em torno do centro metálico (ver Figura 3.7). Na Tabela 3.3 estão descritos os parâmetros somente para o TSM-1 e TSC-1, pois essas geometrias levam para a menor barreira de reação. Analisando a Tabela 3.3 podemos perceber que os parâmetros para o centro de reação são similares para TSM-1 e TSC-1, sendo $r_{\text{Pt-S}}$ e $r_{\text{Pt-Ow}}$ 2,9 e 2,5 Å, respectivamente. O ângulo definido entre grupo que entra e o que sai é menor no TS da Met ($72,8^\circ$) do que no TS da Cys ($74,1^\circ$), diminuindo o valor de τ para 0,41 na estrutura TSM-1, a qual pode ser caracterizada como 60% pirâmide de base quadrada. É interessante comparar os dados da Tabela 3.3 com os valores relatados recentemente para reação com a cisplatina (Da Silva, Costa e Dos Santos, 2008). No estudo Da Silva *et al* o grupo de saída é o cloreto e, no presente trabalho, o grupo de saída é água. Para reação com a cisplatina, ambas as estruturas mostradas para o TS apresentam a distância $r_{\text{Pt-S}}$ próxima de 2,7 Å e o ângulo $\angle \text{Cl-Pt-S}$ próximo de 85° . Como resultado desses valores, o τ calculado foi de 0,70, assegurando que a geometria do TS era 70% bipirâmide trigonal. Esta análise revela uma característica interessante no caminho de

reação, sugerindo dois mecanismos associativos diferentes para reação da cisplatina e o análogo AHTC-Pt com os aminoácidos, sendo os ligantes de saída cloreto e água, respectivamente.

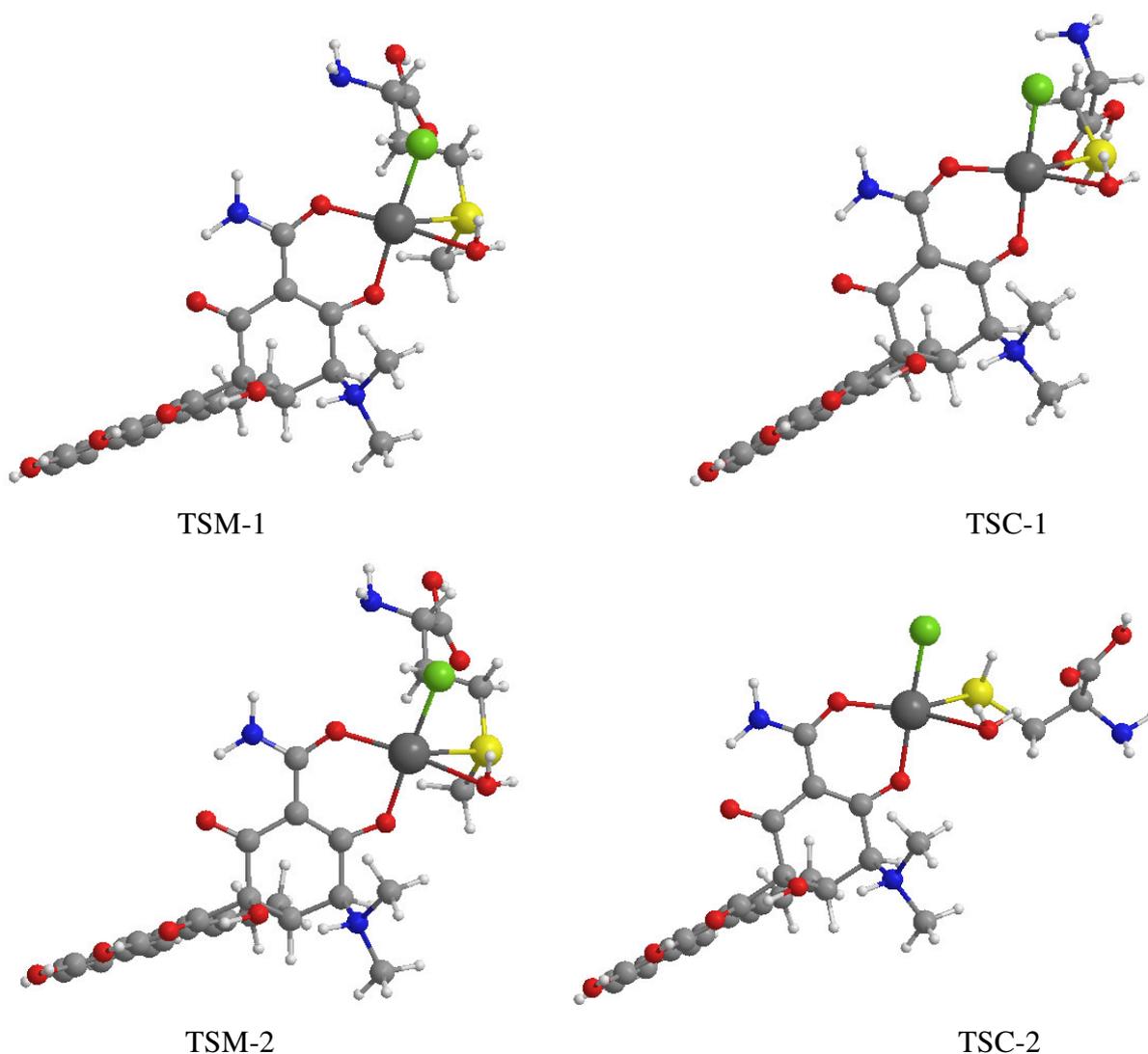


Figura 3.7 Estrutura otimizada (B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ) para os estados de transição envolvendo o ligante AHTC-Pt monoáquo com resíduos de aminoácidos Met e Cys.

As outras duas geometrias encontradas para o TS na reação com Met e Cys, chamados TSM-2 e TSC-2, têm energias próximas ao TSM-1 e TSM-1, sendo mais favorável em fase gasosa por 0,5 e 3,1 Kcal/mol, respectivamente. A principal torção no TSM-2 ocorre em torno da ligação Pt-S, com a cadeia lateral do aminoácido projetando sobre os anéis hidrofóbicos da tetraciclina. Como consequência, a ligação Pt-S foi 0,1 Å maior do que a encontrada no TSM-1 (ver Tabela 3.3) e o ângulo $\angle \text{Cl-Pt-S} = 65,9^\circ$, aumentado o valor de τ para 0,46. No caso do TSC-2, uma forte ligação de hidrogênio foi observada entre a água e o grupo carboxila do

aminoácido ($dHw...O=1.84 \text{ \AA}$), que é o principal fator responsável pela estabilidade do TSC-2 em relação ao TSC-1.

Todas as geometrias dos TS obtidas nesse trabalho foram caracterizadas como TS de primeira ordem através do cálculo de frequências harmônicas. Uma única frequência imaginária foi obtida para cada estrutura. No nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ, as frequências obtidas foram 150,0i (TSG-1), 190,6i (TSA-1), 159,2i (TSC-1) e 155,0i cm^{-1} (TSM-1). As energias de ativação foram calculadas usando a aproximação da supermolécula (ver Esquema 3.1) com os reagentes e produtos (I-1 e I-2) (Figura 3.8) tratados como complexos moleculares.

Tabela 3.3 Parâmetros estruturais (B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ) para os intermediários (I-1 e I-2) e para os respectivos estados de transição (TS) envolvidos nas reações de formação dos complexos $[Pt(AHTC)Cl(Nu)]^+$ com Nu=Met e Cys. Os comprimentos de ligação (r) são dados em \AA e ângulos de ligação (\angle) e torção (δ) em graus^a.

	Cys			Met		
	I-1	TSC-1	I-2	I-1	TSM-1	I-2
rPt-S	4,24	2,85	2,32	4,46	2,88	2,32
rPt-Ow	2,09	2,47	3,43	2,09	2,44	3,39
rPt-Oamd	1,99	2,03	2,05	2,00	2,04	2,06
rPt-O3	2,05	2,04	2,06	2,04	2,04	2,07
rPt-Cl	2,33	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34
dHw...S ^b	2,17	-	-	2,16	-	-
$\angle Ow-Pt-S$	46,0	74,1	119,0	40,3	72,8	118,0
$\delta:[S-Pt-Oamd-Ow]$	-	-172,8	-	-	-171,3	-
τ^c	-	0,46	-	-	0,41	-

^a Ver Fig. 3.2; ^b Distâncias intermoleculares em \AA ; ^c Ver eq. (3.16)

As geometrias para as supermoléculas (I-1 e I-2) envolvidas em todas as reações foram encontradas através de um cálculo de IRC incluindo 120 pontos para cada processo analisado. A Figura 3.8 mostra a curva de IRC para reação com adenina e metionina, respectivamente. O último ponto de cada IRC foi otimizado para garantir completa convergência para o ponto de mínimo na PES.

Os parâmetros estruturais para os intermediários I-1 e I-2 estão incluídos nas Tabelas 3.2 e 3.3. Uma análise desses parâmetros permite ver claramente a variação das distâncias rPt-N7/S e rPt-Ow ao longo do caminho de reação I-1→TS→I-2, mostrando a formação da ligação Pt-N7/S e simultaneamente a quebra da ligação Pt-Ow no plano equatorial. Em ambos

os complexos analisados, aminoácidos e bases purinas, as diferenças nos comprimentos de ligação são no rPt-N7 e rPt-S, sendo que a ligação rPt-S é maior.

Algumas distâncias intermoleculares são mostradas para os intermediários, revelando contatos atrativos curtos que existem entre as espécies interagentes. O aduto I-1 formado na reação com a base nitrogenada G é estabilizado por uma forte ligação de hidrogênio envolvendo a água e grupos em N7 e C6 das bases do DNA. Para o I-1 da G duas ligações de hidrogênio foram computadas com dHw...N7 e dHw...O6 iguais a 1,82 e 1,69 Å, respectivamente. Para a reação com a adenina somente uma interação relevante foi observada com dHw...N7 igual a 1,63 Å. Os intermediários I-1 envolvidos nas reações com a Met e Cys não apresentam nenhuma interação intermolecular forte, o contato mais curto foi encontrado para Hw...S, com distância de aproximadamente 2,2 Å em ambos os casos. No intermediário I-2, no qual a molécula de água não está mais coordenada, a mesma interage com o complexo por diferentes caminhos. Para o complexo com G a água forma ligação de hidrogênio com o O6, sendo dHw...O6=1,99 Å e para o aduto com A, a molécula de água age como aceitador de próton para o NH₂ no C6 e doador de próton para o Cl. As distâncias caracterizam ambas as ligações como curtas, sendo dNH₂...Ow=1,88 Å e dHw...Cl=2,39 Å (Aullon *et al.*, 1998). Para os aminoácidos, uma fraca ligação de hidrogênio é observada entre a água e o Oamd da AHTC, com dHw...Oamd~2,1 Å (ver Figura 3.9).

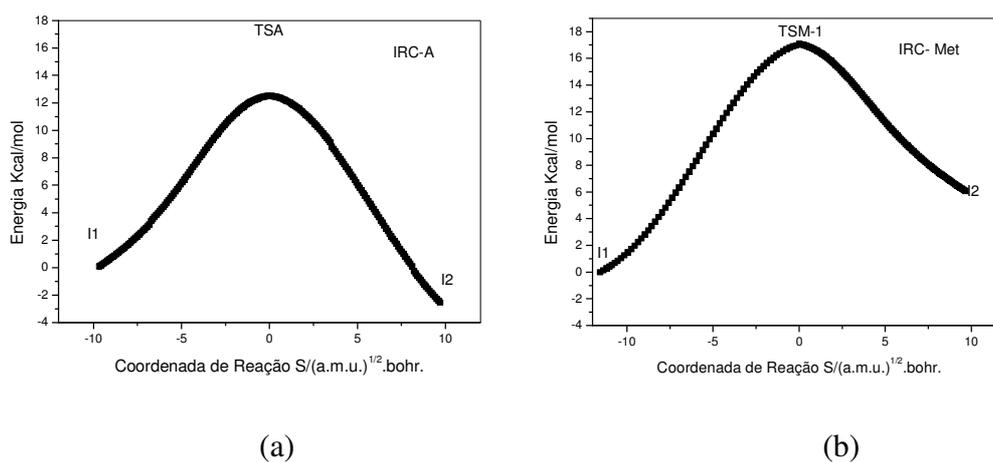


Figura 3.9 IRC calculado no nível HF/6-31G(d)/LANL2DZ para reação com G (a) e Met (b).

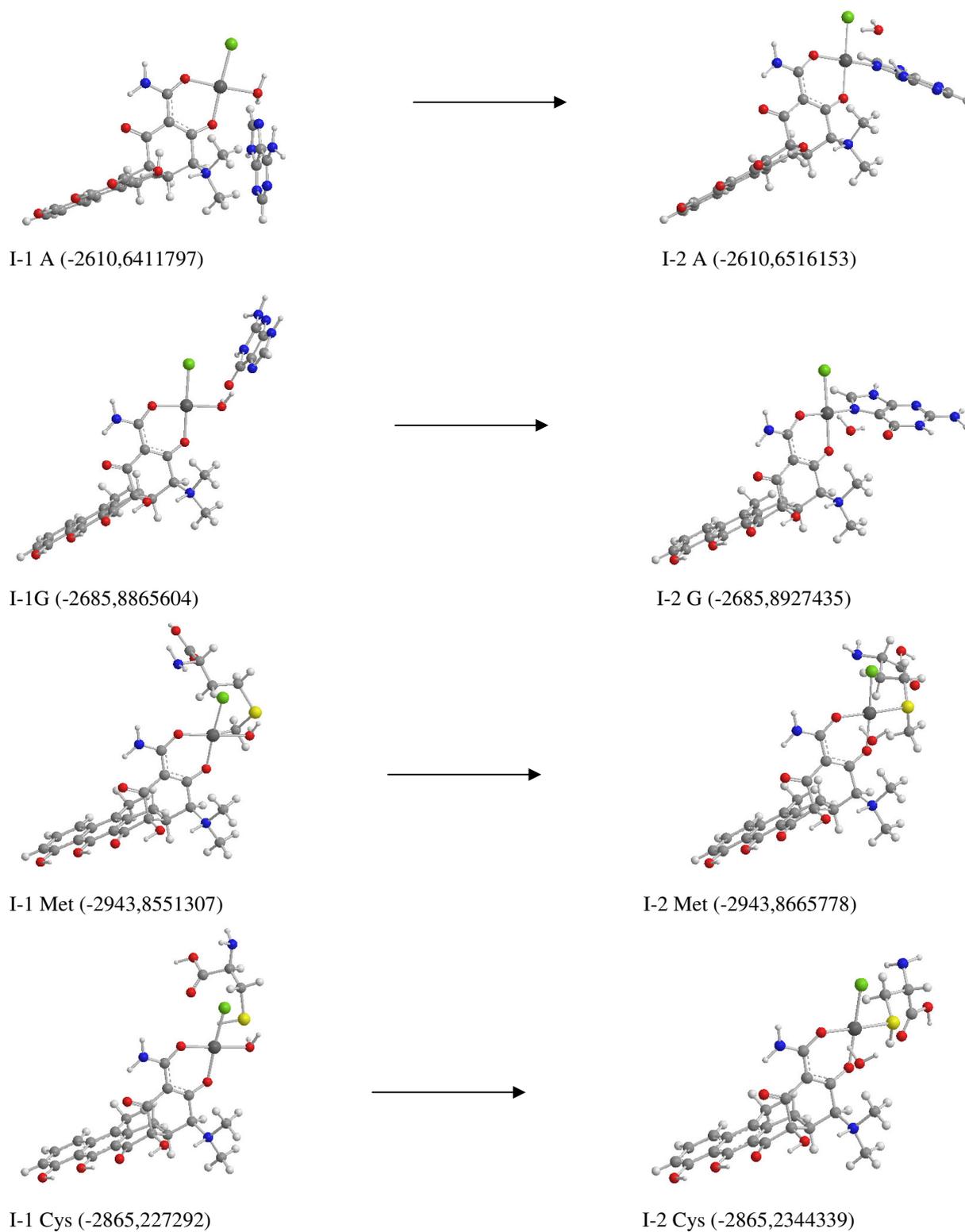


Figura 3.8 Estruturas otimizadas (B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ) para os intermediários I-1 e I-2 envolvidos na formação do complexo $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{Nu})]^+$ com Nu=G, A, Met e Cys.

Energia absoluta entre parênteses (valores em u.a.).

3.3.3 Análise cinética

Até aqui analisamos a estrutura das espécies envolvidas no caminho de reação, as quais determinam as energias das reações, que serão analisadas nesse momento. Para A, Cys e Met, que apresentaram duas estruturas para o TS, nós calculamos a barreira de energia para ambos os processos em fase gasosa no nível HF/6-31G(d)/LANL2DZ. Esse procedimento foi usado para decidir qual caminho de reação seria considerado, sendo que em ambos os casos aquele que forneceu menor barreira de energia foi escolhido. Os valores para o $\Delta G_{a,g}^{ele-nuc}$ no nível HF foram (em Kcal/mol): 18,4 (TSA-1); 23,5 (TSA-2); 18,8 (TSC-1); 41,6 (TSC-2); 18,6 (TSM-1) e 21,6 (TSM-2), mostrando que para todos os casos o TS-1 levou à menor barreira de energia. A grande diferença encontrada para Cys é consequência da alta estabilidade do I-1 encontrado do TSC-2, sendo essa estrutura muito estável devido a ligações de hidrogênio curtas. Essa análise energética não foi realizada no nível DFT, isso porque baseado em trabalhos anteriores com sistemas análogos (Costa *et al.*, 2006; Da Silva, Costa e Dos Santos, 2008), os resultados HF são confiáveis e demandam um menor custo computacional. Como já mencionado, os produtos e reagentes são tratados como complexos moleculares, toda a reação pode ser representada por I-1→TS→I-2, na qual a barreira da reação direta I-1→TS é a que nos interessa, assumindo a competição entre os vários processos. Todas as contribuições para barreira de energia livre em fase gasosa (equação 3.10) e em solução aquosa (equação 3.11) estão dadas na Tabela 3.4 no nível B3LYP usando os conjuntos de funções de base 6-31G(d) e 6-311+G(2d,p). Esses níveis de cálculo já foram usados em outros trabalhos com análogos da cisplatina, dando resultados com variação média de 1Kcal/mol para os valores experimentais (Dos Santos *et al.*, 2006; Da Silva, Costa e Dos Santos, 2008). Primeiramente analisando os dados em fase gasosa vemos que as reações com os aminoácidos são mais rápidas do que as reações com as bases nitrogenadas. Para cisteína e metionina as barreiras de energia de reação foram 19,3 e 18,2 Kcal/mol, respectivamente, comparados com 20,9 e 20,2 Kcal/mol para A e G (valores calculados na fase gasosa no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ). As barreiras em fase gasosa e solução aquosa estão mostradas na Figura 3.10. Para A, Met e Cys a contribuição térmica é de apenas 2%, logo esses valores de $\Delta G_{a,g}$ são próximos da variação de energia eletrônica-nuclear $\Delta G_{a,g}^{ele-nuc}$. Entretanto, para G a correção térmica é de 7%, diminuindo a barreira o suficiente para que o valor obtido de $\Delta G_{a,g}$ para G fosse menor do que para A (ver Tabela 3.4). O efeito da base com o cálculo B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ diminui as barreiras em todas as

reações por 1Kcal/mol em média. Em solução aquosa as barreiras são levemente mais altas (6-11%) comparadas com a fase gasosa, exceto para reação com Cys, para qual o valor de 18,8Kcal/mol (0,5 Kcal/mol menor do que em fase gasosa) foi calculado no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ. Para os outros processos os valores de ΔG_a^{aq} calculados foram 21,4 (G), 23,1 (A) e 19,4 (Met) no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ. Experimentalmente os valores médios da barreira de energia para reação da cisplatina com Cys e Met são 20,4 e 20,2 Kcal/mol, respectivamente (Bose, Ghosh e Moghaddas, 1997). Entretanto de acordo com nossos resultados podemos dizer que a reação da espécie $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ com os aminoácidos Met e Cys são mais rápidas do que para cisplatina, sendo o complexo com a cisteína o produto cinético. Na reação da guanina com a cisplatina monoáquo a barreira de energia calculada na referencia 26 é de 20,9 Kcal/mol, somente 0,5 Kcal/mol menor do que a calculada neste trabalho. Experimentalmente a barreira para reação de cisplatina com G varia de 17,8-18,9 Kcal/mol envolvendo medidas com várias matrizes de DNA (Kozelka *et al.*, 1999), não sendo, portanto, diretamente comparáveis com os processos estudados neste trabalho. A reação da cisplatina com A e G foi recentemente reportada por Eriksson e Raber (Raber, Zhu e Eriksson, 2005) usando metodologia DFT no mesmo nível de teoria usado no nosso trabalho. A barreira de energia de ativação calculada foi de 19,5 (G) e 24,0 Kcal/mol (A), valores bastante próximos dos calculados no presente trabalho (21,4 e 23,1 Kcal/mol para G e A, respectivamente), tendo em vista a diferença no sistema e processo analisado.

Tabela 3.4 Energia de ativação (Kcal/mol) e constantes de velocidade ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para a reação de formação dos complexos $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{Nu})]^+$ com Nu=Met, Cys, A e G. Os valores de k foram obtidos em solução.

	$\Delta E_{a,g}^{ele-nuc}$	$\Delta G_{a,g}^T$	$\delta \Delta G_a^{solv}$	$\Delta G_{a,g}^a$	$\Delta G_{a,aq}$	$10^2 k^c$
G						
B3LYP/6-31G(d)/LanL2DZ	21,9	-1,70	1,19	20,2	21,4	0,14
B3LYP/6-	21,2			19,5	20,7	0,44
A						
B3LYP/6-31G(d)/LanL2DZ	21,0	-0,18	2,23	20,9	23,1	0,01
B3LYP/6-	19,6			19,4	21,7	0,08
Met						
B3LYP/6-31G(d)/LanL2DZ	18,6	-0,39	1,25	18,2	19,4	3,55
B3LYP/6-	17,6			17,2	18,5	17,64
Cys						
B3LYP/6-31G(d)/LanL2DZ	19,4	-0,10	-0,47	19,3	18,8	9,77
B3LYP/6-	18,2			18,1	17,6	74,07

^a Calculado com a equação (3.10); ^b Calculado com a equação (3.11); ^c Calculado com a equação (3.9); ^d A correção térmica $\Delta G_{a,g}^T$ e a energia de solvatação relativa ΔG_a^{solv} foram obtidas no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ.

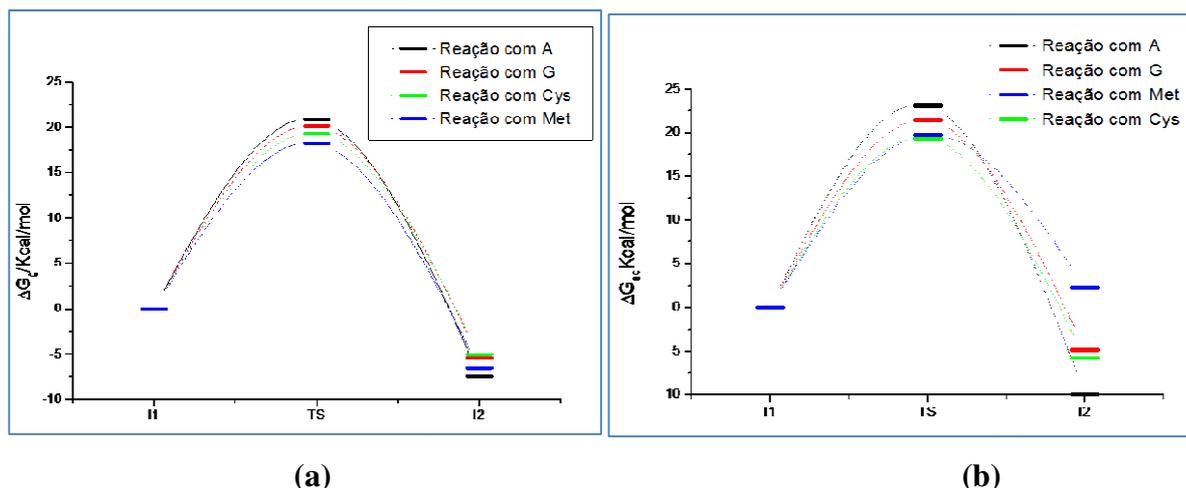
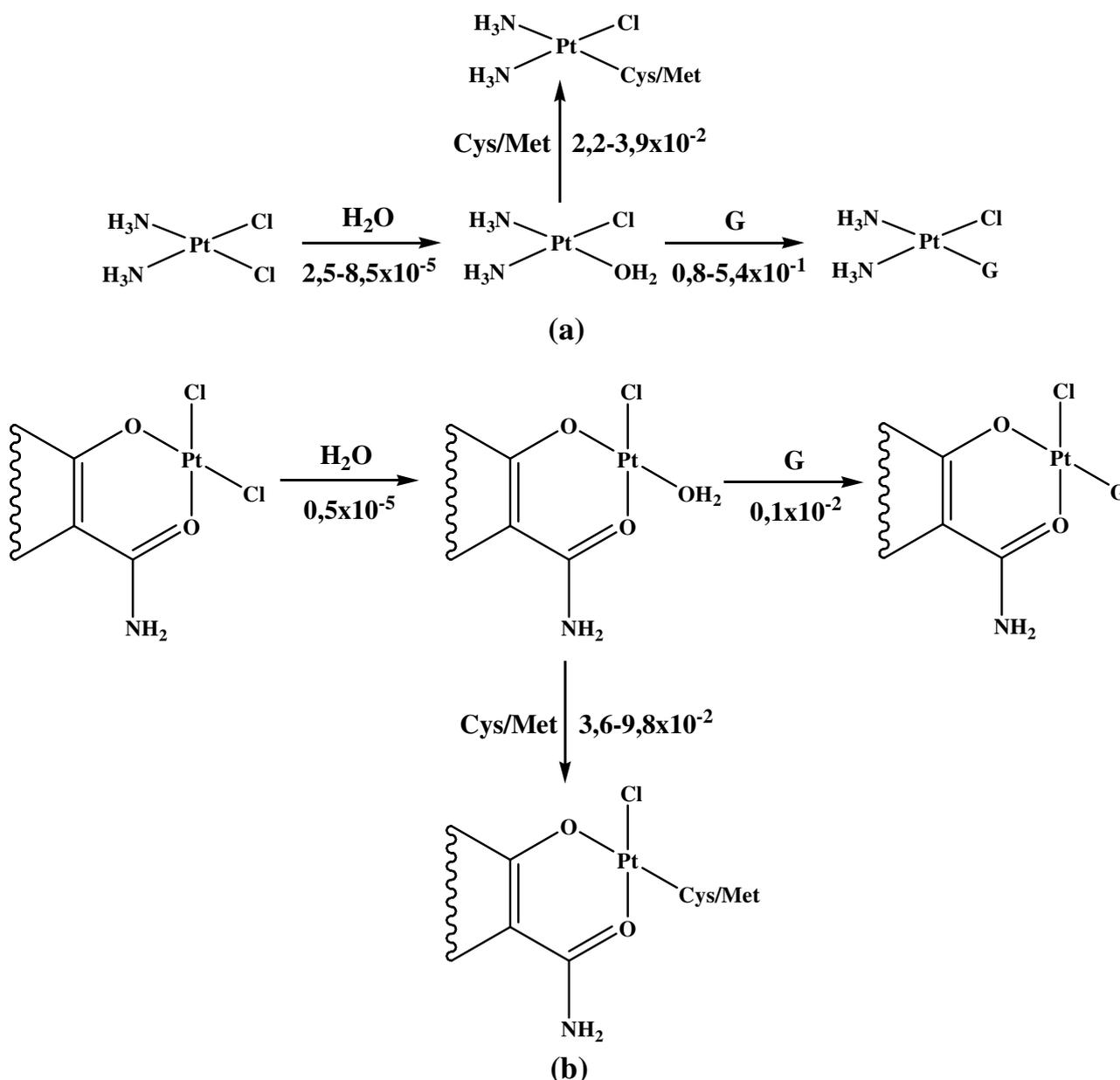


Figura 3.10 Caminho de reação plotado a partir dos valores das barreiras de energia calculadas no nível B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ. (a) em fase gasosa e (b) em fase aquosa.

A teoria do estado de transição (TST) desenvolvida por Eyring tem sido muito usada em estudos de cinética química (Connors, 1990) (ver seção 3.3.1). É interessante notar que a constante de velocidade é mais sensível do que a energia de ativação, e qualquer pequena variação na energia livre de ativação ΔG_a pode levar a grande alteração no valor de k . As constantes de velocidade para os processos estudados aqui foram calculadas em solução aquosa e estão descritas na Tabela 3.4. Para reação com G os valores de k foram de $0,1-0,4 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dados experimentais para a cisplatina (Kozelka *et al.*, 1999) mostram valores uma ordem de magnitude maiores $0,8-5,4 \times 10^{-1} \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. A reação com os aminoácidos é mais rápida, com as constantes iguais a $9,8-74,1 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Cys e $3,6-17,6 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Met. Esses valores são próximos dos dados experimentais relatados para cisplatina $2,2-3,86 \times 10^{-2}$ e $3,6-3,96 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ para interações com Cys e Met, respectivamente (Bose, Ghosh e Moghaddas, 1997).

O estudo cinético descrito no presente trabalho mostra que o complexo AHTC-Pt segue de perto o mecanismo padrão do modo de ação da cisplatina com o mesmo perfil de velocidade (Esquema 3.4), dessa forma esse novo composto pode ser promissor na busca por novas drogas antitumorais.



Esquema 3.4 Modo de ação padrão para derivados da cisplatina. A primeira etapa é a hidrólise (interação com água), seguida da ligação com as bases do DNA (representada aqui pela G). As interações com proteínas são mostradas como um processo paralelo (representado aqui pela interação com Met e Cys). (a) processos para cisplatina. Os valores das constantes de velocidade experimentais (em $\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) foram coletados da literatura. (b) Processos para o análogo AHTC-Pt. Os valores foram obtidos de cálculos DFT realizados nesta dissertação (somente o cálculo da constante de velocidade de hidrólise foi realizado em nosso trabalho (Dos Santos *et al.*, 2006)).

3.4 Estrutura e Propriedade de um Novo Complexo de Platina(II) com a Tetraciclina Quimicamente Modificada Denominada CMT-3

A família das tetraciclinas constitui um grupo de moléculas, cujas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas são bem caracterizadas (Chopra e Roberts, 2001). Entretanto novos análogos ainda são objetos de estudos, visando explorar os efeitos biológicos favoráveis dessa classe de moléculas. Os análogos mais recentes são as chamadas tetraciclinas quimicamente modificadas (CMTs), elas constituem um grupo de 10 moléculas (CMT-1 a 10), que entre outras diferenças, não possuem o grupo dimetilamino na posição C4 no anel A, o que elimina a atividade antibiótica da molécula. A 6-dimetil-6-dioxi-4-dedimetilamino-tetraciclina, também conhecida como CMT-3 e caracterizada como uma tetraciclina simples é uma das CMTs mais estudadas (Golub *et al.*, 1991; Hidalgo e Eckhardt, 2001). A estrutura química da CMT-3 é mostrada na Figura 3.11.

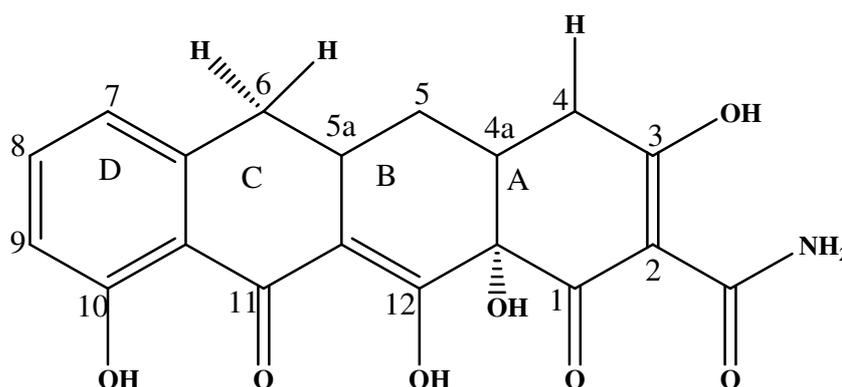


Figura 3.11 Estrutura da 6-demetil-6-deoxi-4-dedimetilamino-tetraciclina (CMT-3).

Nos últimos anos diferentes CMTs foram estudadas devido à sua atividade, *in vitro* e *in vivo*, como inibidoras de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) (Golub *et al.*, 1991; Acharya *et al.*, 2004). As MMPs constituem uma família de proteínas enzimáticas que contém Zn^{2+} e são ainda dependentes de cálcio, essas enzimas degradam a matriz extracelular, contribuindo diretamente na metástase de células tumorais. Há vários trabalhos na literatura discutindo a eficácia da CMT-3 (Greenwald e Golub, 2001; Sandler *et al.*, 2005; Kothari e Simon, 2006; Li *et al.*, 2006; Onoda *et al.*, 2006; Leskinen *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2008), demonstrando, inclusive, que a CMT-3 tem atividade antimetástase e antitumoral. De forma geral, o mecanismo de ação da CMT-3 inclui a inibição de MMPs, indução de apoptose e inibição da proliferação celular (Syed *et al.*, 2004). Algumas vantagens da CMT-3 são: o fato

de ser um antitumoral administrado oralmente, ser um inibidor de MMP combinado com propriedades citotóxicas, além de apresentar baixa toxicidade e alta acumulação plasmática e, portanto, seria necessária uma menor dose da droga (Syed *et al.*, 2004). Lokeshwar (Lokeshwar, Escatel e Zhu, 2001) estudou a inibição de MMP em casos de câncer de próstata, aplicando diferentes CMTs e concluiu que a CMT-3 poderia representar uma efetiva terapia no tratamento de tumores avançados, principalmente câncer de próstata.

O mecanismo pelo qual a CMT-3 inibe as MMPs ainda não é bem conhecido, entretanto é sabido que as tetraciclinas se ligam aos íons metálicos Zn^{2+} e Ca^{2+} associados com as metaloproteinases, bloqueando o sítio ativo das enzimas ou induzindo mudanças na conformação das mesmas. De acordo com Islam e colaboradores (Islam *et al.*, 2003) a CMT-3 provavelmente reduz a atividade das MMPs pelo mesmo mecanismo. Em geral a forte habilidade das TCs e análogos em formar complexos metálicos são tidos como um dos principais fatores para o potencial biológico dessas moléculas (Chopra e Roberts, 2001). Vários complexos de TCs e análogos com metais de transição são descritos na literatura, Mg(II) e Ca(II) são os principais íons a se coordenarem ao ligante livre (Desiqueira *et al.*, 1994; Machado *et al.*, 1995; Wessels *et al.*, 1998; De Paula *et al.*, 1999). No entanto, mais recentemente outros metais têm despertado interesse, como por exemplo, a formação de complexos com Pt(II) (Aly, Strasser e Vogler, 2002; Guerra *et al.*, 2006) (como o complexo AHTC-Pt que foi amplamente discutido nas seções anteriores desse trabalho). Alguns complexos com outros análogos da TC já foram sintetizados e testados sua atividade antibiótica (ver seção 3.1). Mas além do interesse como antibiótico, os complexos de TCs com Pt(II) podem ser vistos como potenciais análogos da cisplatina (Dos Santos *et al.*, 2006). Em nosso estudo com o complexo AHTC-Pt(II) (Marcial *et al.*, 2008) concluímos que as principais reações envolvidas no mecanismo de ação da cisplatina, são cineticamente comparáveis, cisplatina e AHTC-Pt(II), portanto esses complexos podem representar potenciais drogas antitumorais. Nesse sentido, na presente dissertação realizamos uma análise teórica da termodinâmica de formação e estabilidade de um novo complexo de platina(II) com a mais importante das tetraciclinas quimicamente modificadas, a CMT-3. Descrevemos a estrutura, análise energética e propriedades espectroscópicas para o ligante livre e os complexos de coordenação com a platina. O complexo CMT-3-Pt(II) poderia representar um novo agente antitumoral, agindo como um híbrido molecular intercalador-alquilante com o alvo principal da platina, o DNA. Este estudo pode estimular os experimentalistas a sintetizarem o complexo e assim modelar novas compostos para o uso na terapia do câncer. Os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar na caracterização da estrutura das

diferentes espécies produzidas, através dos dados espectroscópicos obtidos para os complexos individualmente.

3.4.1 Metodologia de cálculo

A CMT-3 possui apenas dois grupos ionizáveis, devido à ausência do grupo dimetilamino na posição C4, por isso não possui um terceiro pKa como a tetraciclina (Duarte *et al.*, 1999). A CMT-3, dependendo do pH, pode existir nas formas não ionizada (LH₂) ou nas formas ionizadas LH⁻ (O3) e L²⁻ (O3,O12). Yalkowsky e colaboradores (Pinsuwan *et al.*, 1999b) usaram a técnica de espectrofotometria para determinar as constantes de acidez da CMT-3, encontrando os valores de 5,6±0,2 (pKa1) e 8,35±0,07 (pKa2). No presente trabalho, vários modos de coordenação foram propostos, considerando a geometria para o ligante livre nas suas diferentes formas ionizadas (ver Figura 3.12). As geometrias foram completamente otimizadas e caracterizadas como mínimo na superfície de energia potencial (PES) nos níveis de teoria Hartree-Fock (HF) e teoria do funcional de densidade (DFT) com o funcional B3LYP (Becke, 1988; Lee, Yang e Parr, 1988). O conjunto de funções de base 6-31G(d) foi usado para todos os átomos, exceto para platina que foi tratada com potencial efetivo de caroço (ECP) chamado LANL2DZ (Hay e Wadt, 1985). Este conjunto de funções já foi usado em trabalhos prévios, nos quais os valores das propriedades calculadas se apresentaram em acordo quantitativo com os dados experimentais (Costa *et al.*, 2003; , 2004; Costa *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2006; Da Silva, Costa e Dos Santos, 2008; Marcial *et al.*, 2008).

As propriedades termodinâmicas foram calculadas a 25° C e 1atm em fase gasosa e solução aquosa nos níveis de teoria HF e DFT. O efeito do solvente foi incluído usando o modelo contínuo de polarização (PCM)(Cances, Mennucci e Tomasi, 1997), como implementado no programa Gaussian-03. A cavidade do soluto foi construída de acordo com o esquema UAHF e foram consideradas apenas as contribuições eletrostáticas para a energia de solvatação.

Para o ligante livre e os complexos formados os espectros de RMN ¹³C foram calculados usando o nível B3LYP/6-311+G(2d,p) em solução aquosa, considerando a geometria otimizada no nível B3LYP/6-31G(d) em fase gasosa (B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d)). O método GIAO (Wolinski, Hinton e Pulay, 1990) foi usado para o cálculo das constantes de blindagem magnética isotrópica (σ) para ¹³C. O deslocamento químico (δ) foi obtido relativo ao TMS (Equação 3.12), com $\sigma^{TMS} = 183,8839$ ppm para C.

O espectro de RMN para a tetraciclina também foi calculado, e foi usado como referência assegurando que o nível de teoria aplicado nos demais sistemas foram adequados. Para a TC o espectro de RMN em solução de DMSO já foi obtido experimentalmente, logo possibilita a comparação dos deslocamentos químicos calculados incluindo o efeito do mesmo solvente (DMSO $\epsilon=46,7$). A constante de blindagem magnética para o TMS em DMSO é ligeiramente diferente da obtida em água, nesse caso $\sigma^{TMS} = 183,8726$ ppm. Finalmente as transições na região do UV/VIS foram calculadas e atribuídas em solução aquosa ($\epsilon=78.39$) para o ligante livre e todos os complexos usando a aproximação TD (*Time-Dependent*) (Stratmann, Scuseria e Frisch, 1998) no nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)// B3LYP/6-31G(d). Todos os cálculos foram realizados com o programa Gaussian 03 (Frisch *et al.*).

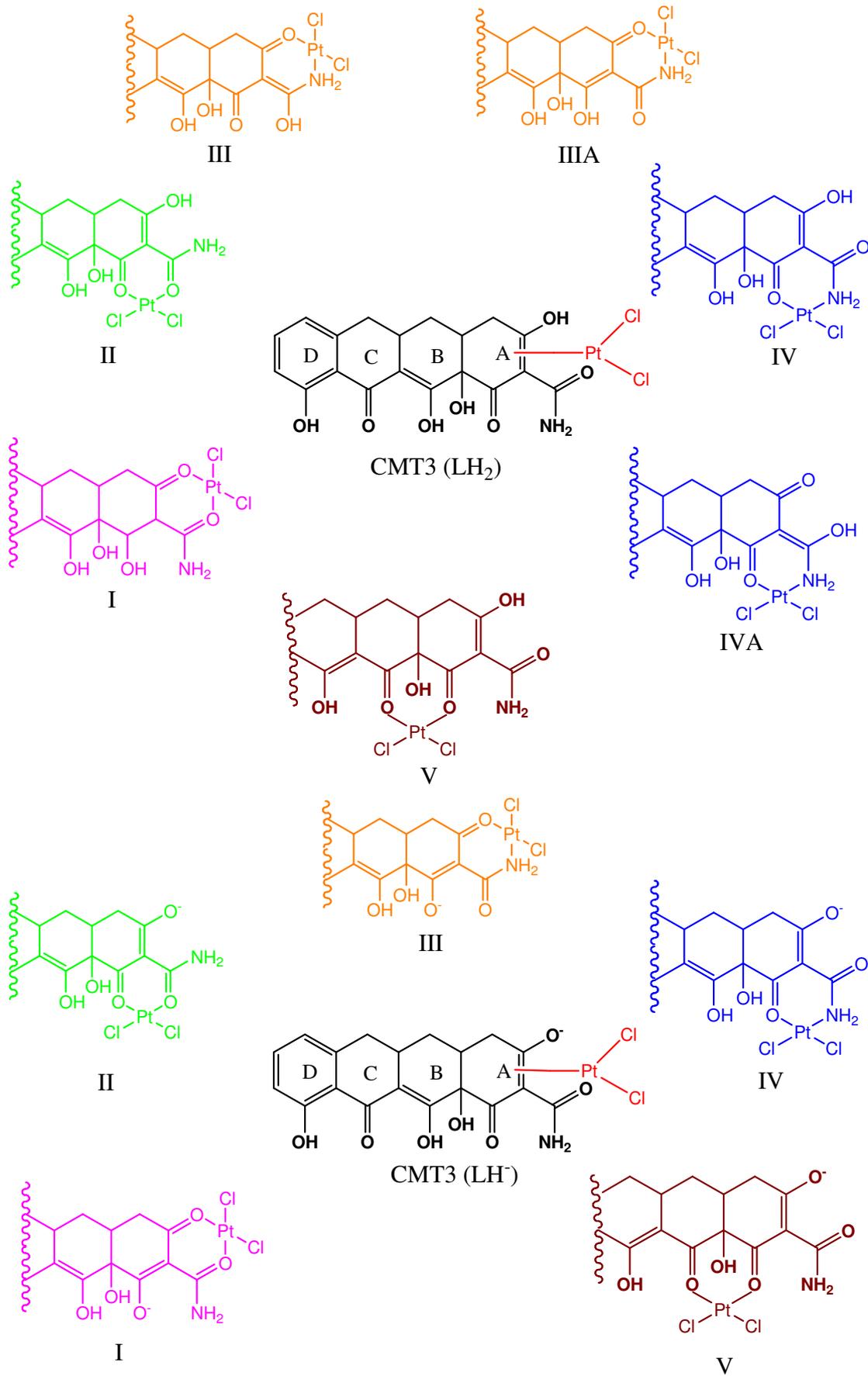


Figura 3.12 Representação dos diferentes modos de coordenação

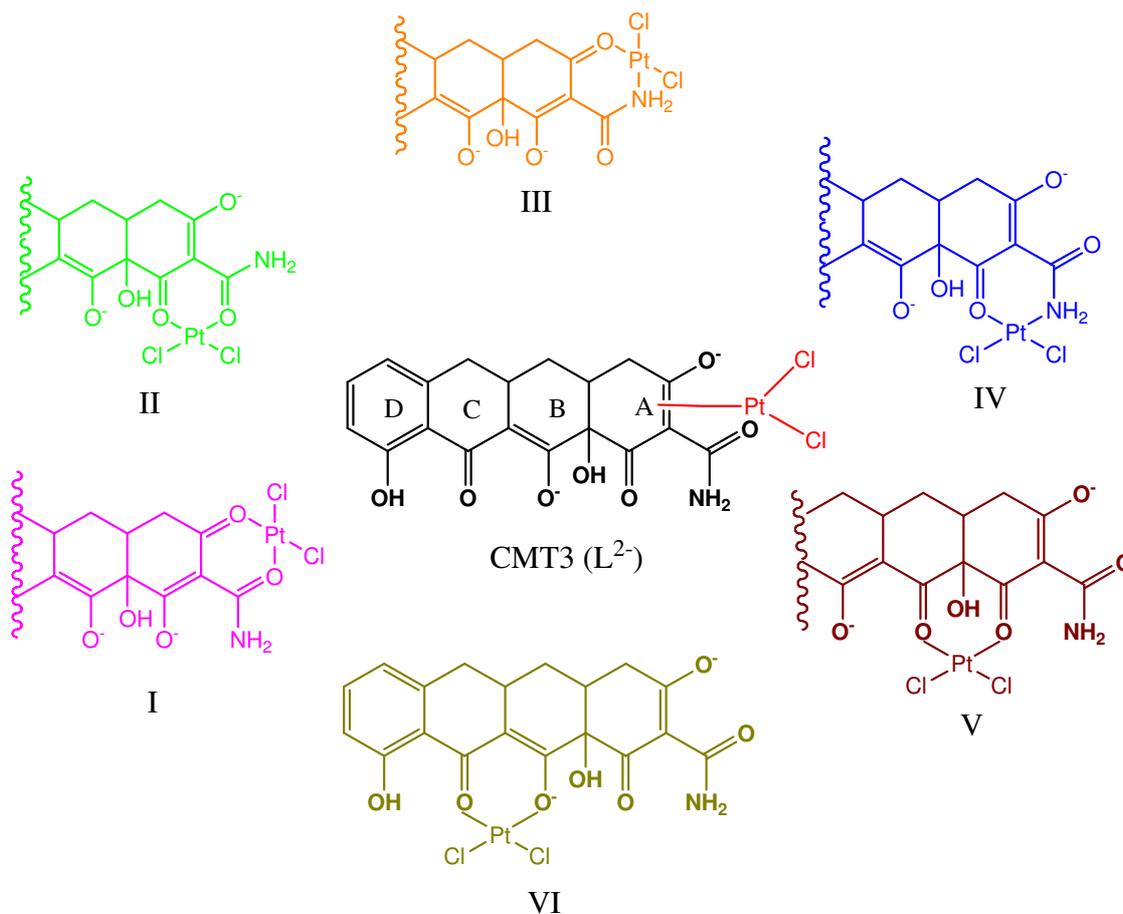


Figura 3.12 Continuação.

3.4.2 Análise estrutural dos ligantes livres

Inicialmente serão discutidas as propriedades estruturais e espectroscópicas do ligante livre (CMT-3). Em seguida a análise das diferentes formas de complexos formados $[\text{Pt}(\text{CMT-3})\text{Cl}_2]^x$, onde x pode ser 0, -1 e -2, de acordo com o estado de ionização do ligante livre.

A molécula da CMT-3 pode existir em três estados de ionização diferentes dependendo do pH. A principal espécie foi caracterizada experimentalmente por Yalkowsky e colaboradores (Pinsuwan *et al.*, 1999a; Pinsuwan *et al.*, 1999b), usando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com o pH variando de 2-10. Neste mesmo trabalho os autores também relatam o espectro eletrônico UV/VIS (ver Figura 3.13), obtido em diferentes pHs. Os valores do pKa para a CMT-3 são de 5,6 e 8,35 (Pinsuwan *et al.*, 1999b).

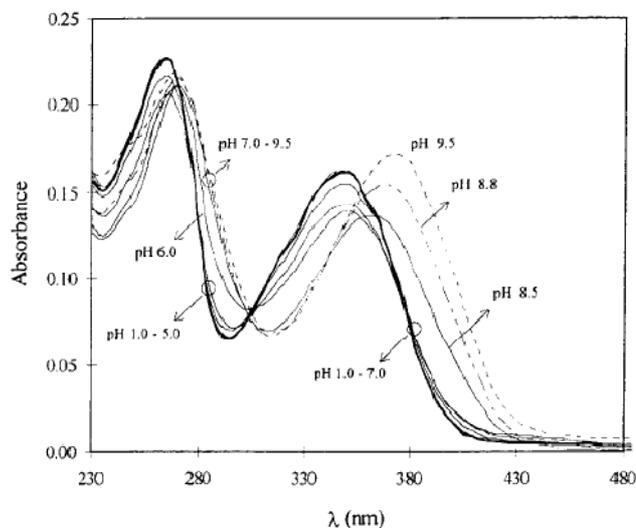


Figura 3.13 Espectro UV/VIS experimental para CMT-3 (Pinsuwan *et al.*, 1999b).

O espectro UV/VIS calculado em solução aquosa e as atribuições para as formas LH_2 , LH^- e L^{2-} da molécula de CMT-3 são mostrados na Tabela 3.5. Experimentalmente, duas bandas de absorção são observadas na região do ultravioleta em 349/264, 353/268 e 371/271 nm (pH 1,0-9,5) com um deslocamento das bandas para a região do vermelho sendo observado com o aumento do pH (Pinsuwan *et al.*, 1999b). A mesma tendência qualitativa é observada no espectro calculado, com as duas transições mais intensas encontradas na região de 339/238 nm (LH_2), 371/261 nm (LH^-) e 359/271 nm (L^{2-}). Como mostrado na Tabela 3.5 há outras transições, com energias próximas, que contribuem para essas bandas, o que justificaria, em parte, as diferenças entre os comprimentos de onda calculados e os observados experimentalmente. Usualmente os deslocamentos das bandas de menor energia são usados para caracterizar o modo de coordenação em complexos de TC, então iniciamos com as transições encontradas nas regiões de comprimentos de onda maiores. Comparando com os dados experimentais, os valores calculados para essas transições são encontrados em comprimentos de onda menores (diferença de ~3%), exceto para a espécie LH^- , para qual a transição de menor energia foi calculada em 379 nm e observada experimentalmente em 353 nm (o valor calculado é aproximadamente 5% maior). Como mostrado na Tabela 3.5, às transições de menor energia são atribuídas às excitações HOMO→LUMO (H→L), exceto para a espécie LH^- , onde duas transições, H-1→L (379 nm) e H-2→L (371 nm) contribuem para a banda de absorção, sendo que a última é mais intensa. Os orbitais de fronteira que contribuem para as principais transições são mostrados na Figura 3.14. Na Figura 3.14a e 3.14c pode ser observado que os orbitais moleculares (MOs) participantes das transições de menor energia são localizados sobre os anéis BCD para espécies LH_2 e L^{2-} . Para a forma

ionizada LH^- (Figura 3.14b), o AO dos átomos do anel A tem também uma contribuição para todos os orbitais de fronteira, especialmente para o H e H-1, os quais estão localizados diretamente sobre o anel A (ver Figura 3.14b). Este comportamento pode ser importante para a identificação do sítio de coordenação, uma vez que as mudanças no espectro UV/VIS é frequentemente relatada para modos de ligação de metais (Wessels *et al.*, 1998). O segundo conjunto de transições, correspondente a banda observada em torno de 240-260 nm, envolve MOs localizados no anel A para todas as espécies analisadas, como é mostrado na Figura 3.14. As atribuições prévias estão de acordo com a estrutura eletrônica esperada para tetraciclina e alguns de seus análogos, isto é, a banda de absorção ao redor de 260nm é comumente atribuída ao sistema β -tricarbonila (O3-Oam-O1 no anel A), e a banda ao redor de 360 nm são atribuídas ao grupo diceto-fenol (O10-O11-O1 no anel BCD) (Pinsuwan *et al.*, 1999b).

Para suportar a metodologia utilizada neste trabalho, nós calculamos o espectro eletrônico para a tetraciclina no mesmo nível aplicado para a CMT-3. Os resultados mostram duas transições principais em 358nm e 262nm, atribuídas a H-1 \rightarrow L (anel CD) e H \rightarrow L+1 (anel A), respectivamente, as quais estão em bom acordo com os dados experimentais para TC (Pinsuwan *et al.*, 1999b).

Tabela 3.5 Transições eletrônicas calculadas e atribuições para a molécula de CMT-3 em solução aquosa. As espécies LH_2 , $LH(O3)$ e L^{2-} (O3,O12) foram consideradas. Resultados obtidos usando o nível de teoria B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d).

	λ/nm^a	f^b		
LH_2	339	0,201	44%(97 \rightarrow 98)	H \rightarrow L
	327	0,154	35%(96 \rightarrow 98)	H-1 \rightarrow L
	238	0,205	29%(94 \rightarrow 99)	H-2 \rightarrow L+1
LH^- (O3)	379	0,135	35%(96 \rightarrow 98)	H-1 \rightarrow L
	371	0,215	32%(95 \rightarrow 98)	H-2 \rightarrow L
	325	0,131	34%(93 \rightarrow 98)	H-4 \rightarrow L
	261	0,159	34%(97 \rightarrow 99)	H \rightarrow L+1
L^{2-} (O3,O12) ^c	359	0,416	38%(97 \rightarrow 98)	H \rightarrow L
	271	0,109	40%(97 \rightarrow 100)	H \rightarrow L+2
	244	0,194	35%(96 \rightarrow 101)	H-1 \rightarrow L+3

^aValores experimentais: 394/264 nm, 353/268 nm e 371/271 nm (pH variando de 1,0 a 9,0) (Pinsuwan *et al.*, 1999b). ^bSomente transições com frequências maiores que 0,1 foram incluídas.

^cOs valores em parênteses foram calculados para o tautômero onde o próton no O10 foi transferido para o O11.

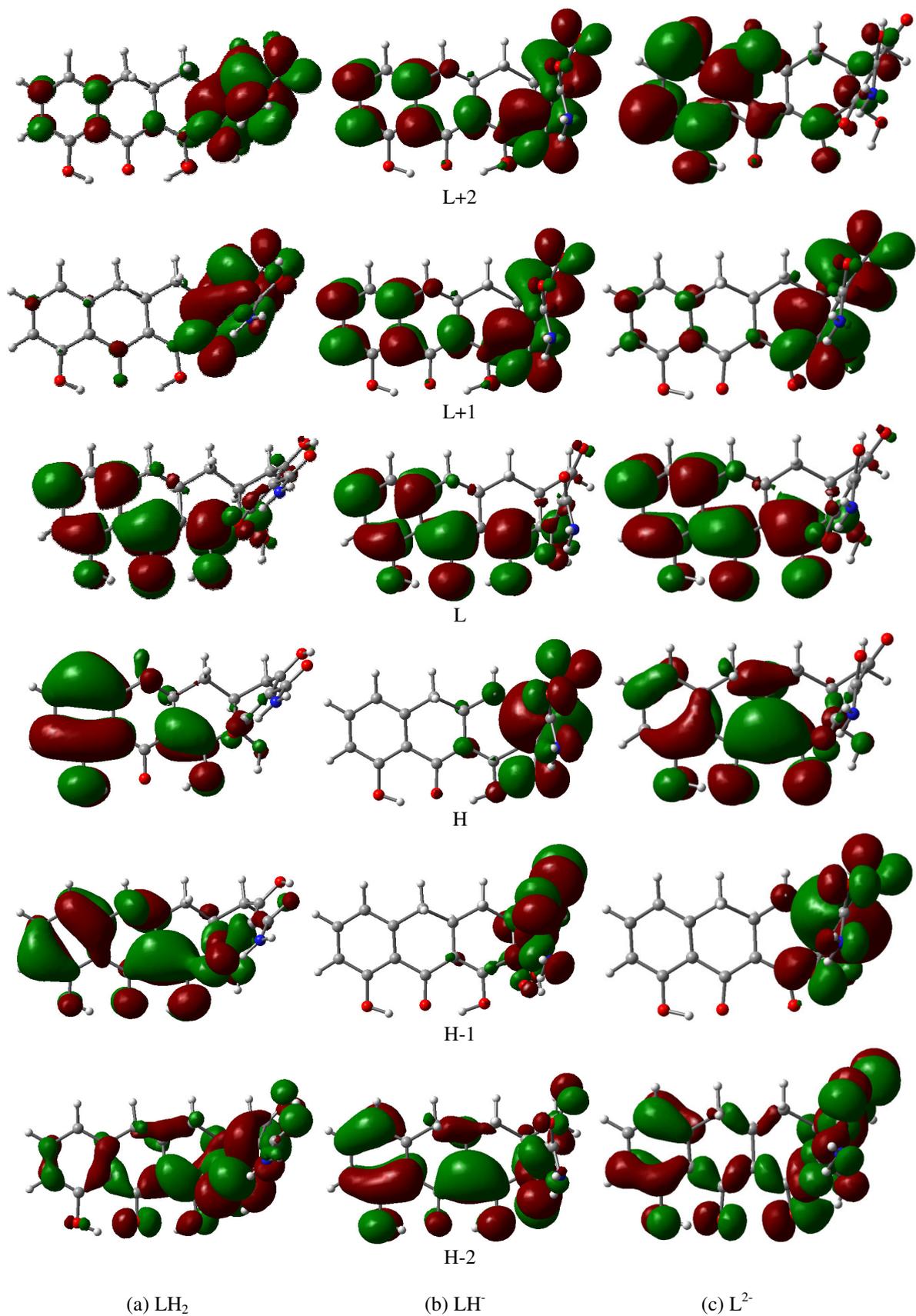


Figura 3.14 Orbitais moleculares (DFT) calculados com B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d) em solução aquosa. H e L são os orbitais HOMO e LUMO, respectivamente.

Além das bandas de absorção na região do UV/VIS, as quais têm sido consideradas importantes para caracterizar reações de formação de complexos, para a tetraciclina e seus análogos os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H têm também contribuído no estudo de modos de coordenação com metais (Wessels *et al.*, 1998; De Paula *et al.*, 1999). Entretanto, para o análogo CMT-3 não há, ainda, disponível na literatura dados experimentais de espectroscopia de RMN. Nós calculamos os valores dos deslocamentos químicos (δ) de ^{13}C nas diferentes formas ionizadas da CMT-3 e da TC, usada como referência, para mais adiante podermos discutir o modo de coordenação da platina. Esses cálculos foram realizados em solução aquosa para CMT-3 e em DMSO para TC, como detalhado na seção de metodologia. Para TC os dados experimentais disponíveis na literatura foram obtidos em DMSO (Asleson e Frank, 1975; Lee e Everett, 1981).

Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ calculados para a TC serão discutidos primeiramente e comparados com os valores experimentais para avaliar a metodologia usada (Tabela 3.6) (Asleson e Frank, 1975; Lee e Everett, 1981). Como já foi descrito na literatura (Hughes, Stezowski e Hughes, 1979), a tetraciclina adota a forma zwitteriônica (LH_2^\pm) em solução aquosa no pH~5. No entanto, o tautômero neutro (LH_2^0) pode existir também em solventes orgânicos. Interessantemente, além da transferência do próton N4/O3 no processo $\text{LH}_2^\pm \rightarrow \text{LH}_2^0$, a interconversão conformacional da forma torcida (*twisted*) para dobrada (*folded*) pode ocorrer, sendo que a forma dobrada predomina em meio não polar (Stezowski, 1976; Prewo e Stezowski, 1977; Hughes, Stezowski e Hughes, 1979). Uma análise detalhada do equilíbrio conformacional para a AHTC foi discutida no trabalho de Dos Santos e colaboradores (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998a) Dos valores da Tabela 3.6 observamos que há um acordo satisfatório entre os valores de deslocamento químico calculado e o experimental para as formas LH_2^\pm e LH_2^0 (torcida), com um erro médio igual a 7,1 e 7,2 ppm (~5% na média), respectivamente. Com respeito à similaridade entre os espectros de ambas as formas, o deslocamento químico calculado para o C1, C2 e C3, os quais são mais sensíveis, pois estão envolvidos no equilíbrio envolvendo transferência de próton do N4 para O3, na forma LH_2^\pm estão mais próximos dos valores observados. No entanto o valor de C4 para a espécie LH_2^0 (74,3 ppm) é o mais próximo do valor observado experimentalmente (67,9 ppm). De acordo com esses resultados podemos supor que haveria um equilíbrio entre essas duas formas em solução de DMSO. É válido observar que o RMN calculado foi bastante sensível às conformações da TC, os valores encontrados para a forma torcida são sistematicamente deslocados para campo alto relativamente à forma dobrada (ver Tabela 3.6). O desvio da

forma LH_2^0 (dobrada) relativo ao experimental foi de -10,7 ppm, esse resultado suporta a presença da forma LH_2^0 em solução de DMSO, como esperado, existindo um equilíbrio das espécies zwitteriônica e neutra. O pequeno desvio relativamente aos dados experimentais (erro médio de 5%) também suportam a adequação do nível de teoria usado, que será aplicado para CMT-3 e para os complexos formados com a platina(II).

Os deslocamentos químicos calculados para a CMT-3 são mostrados na Tabela 3.7 para as espécies predominantes em meio ácido (LH_2), neutro (LH^+) e básico (L^{2-}). Em geral os deslocamentos calculados para ambas as espécies da CMT-3 são muito próximos dos valores para TC, com as maiores diferenças nos C4 e C6, para os quais os sinais são deslocados para campo alto na TC, devido aos grupos retiradores de elétrons que estão ligados nestas posições na TC (OH no C6 e $N(CH_3)_2$ no C4). Analisando os deslocamentos dos átomos diretamente envolvidos nos processos de ionização, alguns fatores interessantes podem ser discutidos. A primeira ionização ocorre no O3 e, como pode ser notado na Tabela 3.7, o valor de δ para o C3 é levemente deslocado para campo baixo com a desprotonação, chegando a 203 ppm (L^{2-}), valor característico de grupo carbonila. Este comportamento está em acordo com as cargas atômicas previstas para o C3 para as diferentes espécies: +0,5 (LH_2), +0,7 (LH^+) e 0,7e (L^{2-}) (cargas ChelpG). O efeito da ionização no deslocamento do C1 é pequeno, sendo δ igual a 200 e 205 ppm para as forma neutra e totalmente ionizada, respectivamente. Os outros sítios, C10, C11 e C12 são afetados principalmente pela segunda ionização no O12 que leva o sinal do C12 para campo baixo de 174 (LH_2) para 199 ppm (L^{2-}) e um deslocamento para campo alto do C11 de 198 (LH_2) para 190 ppm (L^{2-}). Isso é consistente com as cargas atômicas calculadas para os C11 e C12: +0,3 e +0,7e (LH_2) e +0,7 e 0,6e (L^{2-}), a qual é consequência da deslocalização eletrônica sobre sistema C11-C11a-C12. O pico de ressonância para o C11 é também calculado em valor maior, devido interação de hidrogênio do O10-H com o O11 na espécie L^{2-} ser maior do que na espécie LH^+ . A carga ChelpG encontrada para o átomo de C10 é +0,5e para a espécie neutra e totalmente ionizada. Todas as mudanças prévias no espectro de RMN de ^{13}C da CMT-3 sobre a ionização sugerem a predominância da estrutura eletrônica canônica representada na Figura 3.15.

Tabela 3.6 Deslocamentos químicos do ^{13}C calculados para os átomos da tetraciclina (em ppm). Os valores foram obtidos em solução de DMSO usando o TMS como padrão no nível de teoria B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d).

	Exp. ^a	LH ₂ [±] (torcida)	LH ₂ ⁰ (torcida) ^c	LH ₂ ⁰ (dobrada) ^c
C1	191,7	204,8	209,7	181,4
C2	101,2	107,7	111,9	101,2
C3	185,9	189,4	192,9	168,3
C4	70,7 ^b	82,4	74,3	58,8
C4a	35,0 ^b	35,0	34,7	32,6
C5	27,3 ^b	33,9	33,3	16,5
C5a	42,3 ^b	47,6	47,3	35,5
C6	69,2	77,3	77,0	66,8
C6a	148,7	158,4	158,9	136,1
C7	118,0	121,4	121,1	103,9
C8	137,5	144,9	145,7	124,8
C9	116,4	123,6	123,4	105,9
C10	162,2	173,1	173,0	151,0
C10a	115,6	120,5	119,8	103,8
C11	193,8	201,5	201,2	179,1
C11a	107,0	108,1	111,4	95,0
C12	178,3	190,0	188,1	164,7
C12a	75,7	84,1	84,0	67,4
C2amd	171,0	174,7	171,6	147,6

^a (Lee e Everett, 1981) ^b (Hughes, Stezowski e Hughes, 1979) ^c As distintas conformações torcida e dobrada foram analisadas (nomenclatura dada por Dos Santos (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998a).

Tabela 3.7 Deslocamentos químicos do ^{13}C calculados para os átomos da CMT-3 (em ppm). Os valores foram obtidos em solução aquosa usando o TMS como padrão no nível de teoria B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d).

	$\text{LH}_2(\text{torcida})$	$\text{LH}_2(\text{dobrada})$	$\text{LH}^-(\text{O3})$	$\text{L}^{2-}(\text{O3},\text{O12})$
C1	199,7	182,0	198,2	205,4
C2	105,7	94,7	113,2	115,3
C3	194,5	180,5	200,7	202,9
C4	35,8	29,6	46,5	48,7
C4a	39,1	31,3	40,9	43,0
C5	33,6	21,2	37,4	39,4
C5a	37,7	25,2	38,9	42,0
C6	39,7	33,3	41,2	43,9
C6a	152,7	133,5	154,5	152,1
C7	121,2	106,6	123,7	120,4
C8	140,9	124,2	143,2	138,0
C9	119,0	103,8	121,2	120,0
C10	167,9	150,3	173,1	175,2
C10a	120,8	105,8	123,9	126,9
C11	198,0	180,6	201,2	189,9
C11a	114,1	98,2	115,2	107,2
C12	173,8	159,9	192,8	198,5
C12a	79,3	67,8	82,9	85,3
C2amd	173,4	155,5	180,4	184,2

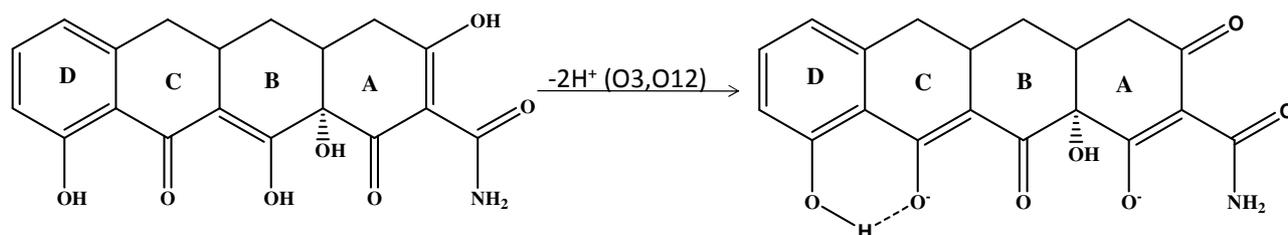


Figura 3.15 Mudança na estrutura canônica da CMT-3 com a ionização.

3.4.3 Análise energética e estrutural dos complexos

As três formas, LH_2 , LH^- e L^{2-} , da CMT-3 foram consideradas no processo de complexação com a platina. Para as espécies LH_2 e LH^- foram analisados cinco sítios de coordenação, com dois tautômeros distintos propostos para os sítios III e IV na forma LH_2 . Isto é necessário para manter a estequiometria dos complexos como $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$. Logo, um total de 7 estruturas do tipo $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$ e 5 para $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$ foram calculadas (ver Figura 3.12). Para o ligante L^{2-} , seis estruturas distintas foram propostas com estequiometria $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$, com um sítio de coordenação adicional envolvendo os átomos O11-O12.

Em todos os complexos a CMT-3 se coordena como um ligante bidentado. O centro metálico apresenta uma geometria quadrado plana levemente distorcida, com a distância da ligação Pt-Cl variando de 2,31-2,39Å e o ângulo Cl-Pt-Cl variando de 91,8° para 96,2°. Os menores valores desses parâmetros foram encontrados para a estrutura V (2,39Å e 96,2°), em todas as espécies analisadas, devido a interação de hidrogênio entre o NH_2 da CMT-3 e o cloreto do ligante ($r_{\text{Cl}\cdots\text{HNH}} = 2,9\text{Å}$). As principais diferenças estruturais entre os diferentes complexos formados e os ligantes livres são observadas no ângulo de torção definido pelos átomos C1-C2-C2amd-O2am, o qual é próximo de zero (conformação cis do grupo amida) para os sítios II e III. A Tabela 3.8 mostra a energia relativa (ΔE) e a energia livre de Gibbs (ΔG) para os 18 complexos de CMT-3-Pt(II), tomando como referência o modo mais estável. Os valores foram calculados em fase gasosa (ΔE_g e ΔG_g) e em solução aquosa (ΔG_{aq}) nos níveis de teoria B3LYP/6-31G(d) e B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d). Para o último nível a correção térmica para energia livre de Gibbs foi obtida do nível B3LYP/6-31G(d).

Para os complexos de Pt(II) com a forma LH_2 , $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$, a geometria V(O12-O1) foi caracterizada como a mais estável em fase gasosa e em solução. Quando o nível de teoria é o B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d), a coordenação no sítio O1-NH₂ (estrutura IV) é predita ser somente 0,10 kcal/mol menos favorável do que a estrutura V. O modo de coordenação III(O3-NH₂) é também bastante estável, tendo energia apenas 1,43 kcal/mol maior do que o composto V, já o seu tautômero IIIA é o modo menos favorável em meio básico. Podemos concluir que a ordem de estabilidade para os complexos $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$ é V>IV>III>IVA>II>I>IIIA, com as diferenças na energia sendo significativamente menores em solução. As geometrias otimizadas dos complexos são mostrados na Figura 3.16.

Considerando os complexos com o ligante LH, a geometria I(O3-Oam) é a mais estável em fase gasosa e em solução aquosa em ambos os níveis de teoria. O sítio II(O1-Oam) tem energia somente 0,96 kcal/mol maior do que o sítio I, isso no maior nível de cálculo usado. Os sítios mais favoráveis diferem bastante daquele observado para a espécie neutra, embora os sítios mais favoráveis continuem envolvendo átomos do anel A. A ordem de estabilidade energética para os complexos $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$ é I>II>III>IV>V tanto em fase gasosa quanto em solução (ver geometrias otimizadas para as estruturas na Figura 3.17). Um comportamento similar é apresentado pelo ânion L^{2-} , para qual a geometria I é também a mais estável. Interessantemente, para a espécie completamente ionizada o sítio VI(O11-O12), exclusivo para este estado de ionização, é apenas 2,26 kcal/mol menos favorável do que o sítio I em solução aquosa. Para o complexo $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$ a ordem de estabilidade é I>VI>II>III>V>IV, mesmo com o efeito do solvente, que estabiliza ambos os complexos analisados. As geometrias otimizadas são mostradas na Figura 3.18.

Tabela 3.8 Energias relativas e propriedades termodinâmicas (298,15K e 1atm) para os distintos modos de coordenação do complexo CMT-3-Pt calculados nos níveis B3LYP/6-31G(d) e B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d) (em parênteses). Valores em kcal/mol.

	ΔE_g	ΔG_g	$\Delta^2 G^{ele}$	ΔG^{ele}
$[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$				
I	17,38 (17,47)	17,27 (17,36)	-12,39 (-11,95)	4,88 (5,41)
II	22,18 (20,64)	21,90 (20,36)	-15,91 (-15,88)	5,99 (4,47)
III	7,01 (7,16)	8,50 (8,65)	-6,94 (-7,22)	1,56 (1,43)
III A	31,02 (29,15)	30,69 (28,83)	-15,29 (-15,32)	15,40 (13,51)
IV	5,28 (4,93)	6,37 (6,01)	-6,00 (-5,91)	0,37 (0,10)
IV A	10,40 (9,66)	10,28 (9,54)	-5,15 (-5,15)	5,12 (4,38)
V	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
$[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$				
I	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
II	1,46 (1,22)	1,41 (1,17)	-0,11 (-0,21)	1,30 (0,96)
III	4,76 (4,24)	5,08 (4,57)	1,45 (0,51)	6,53 (5,08)
IV	7,52 (6,52)	7,71 (6,71)	0,97 (-0,44)	8,68 (6,27)
V	17,62 (15,25)	17,27 (14,92)	2,06 (0,90)	19,33 (15,82)
$[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$				
I	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
II	9,81 (9,77)	10,54 (10,51)	-6,47 (-5,94)	4,07 (4,57)
III	8,26 (7,45)	8,87 (8,06)	-1,41 (-2,36)	7,46 (5,70)
IV	15,53 (14,20)	16,02 (14,69)	-5,66 (-6,34)	10,36 (8,35)
V	10,57 (9,46)	11,27 (10,16)	-4,76 (-3,98)	6,52 (6,19)
VI	7,71 (5,65)	9,24 (7,17)	-5,21 (-4,91)	4,03 (2,26)

É oportuno comparar os resultados da CMT-3 com os dados prévios relatados para a TC e o análogo AHTC. Para a molécula de TC³⁴ e para o análogo anidrotetraciclina (AHTC) (Aly, Strasser e Vogler, 2002; Dos Santos *et al.*, 2006), as evidências experimentais e teóricas sugerem que a coordenação da platina ocorre no sítio O3-Oam no anel A (sítio I). As moléculas de TC e AHTC nestes complexos estão na forma LH₂[±], ionizada no O3. Este estado é equivalente à forma LH⁻ considerada para CMT-3, para qual a platina também coordena no sítio I, como mostrado anteriormente (ver Tabela 3.8 e Figura 3.16). Nossos resultados prévios para o complexo AHTC-Pt(II) (Dos Santos *et al.*, 2006) mostrou haver um equilíbrio dos sítios I e II, baseado em parâmetros termodinâmicos. Nos modos I e II a platina está ligada a um sítio comum, o Oam, e o outro átomo ao qual o metal se liga O3(I) e O1(II) são muito similares devido à deslocalização eletrônica no sistema tricarbonil (C1-C2-C3). O modo de coordenação do metal com o sítio tricarbonilmetano (I e II) foi previamente discutido por Lee e Everett (Lee e Everett, 1981) para o complexo tetraciclina-Mn(II), mostrando um rápido equilíbrio entre esses dois sítios. O modo de coordenação encontrado para LH₂ (IV e V) também envolvem um sítio comum, o O1, entretanto um equilíbrio pode também existir em solução. Logo, nós acreditamos que, em geral, a coordenação do átomo de platina(II) com as moléculas da família da TC ocorre no sítio I, em pH neutro e básico. É importante destacar que o sítio VI(O11-O12) também foi predito como provável em meio básico para o ligante CMT-3. Este modo de coordenação é comum para complexos de tetraciclina com metais alcalinos e alcalinos terrosos (Wessels *et al.*, 1998).

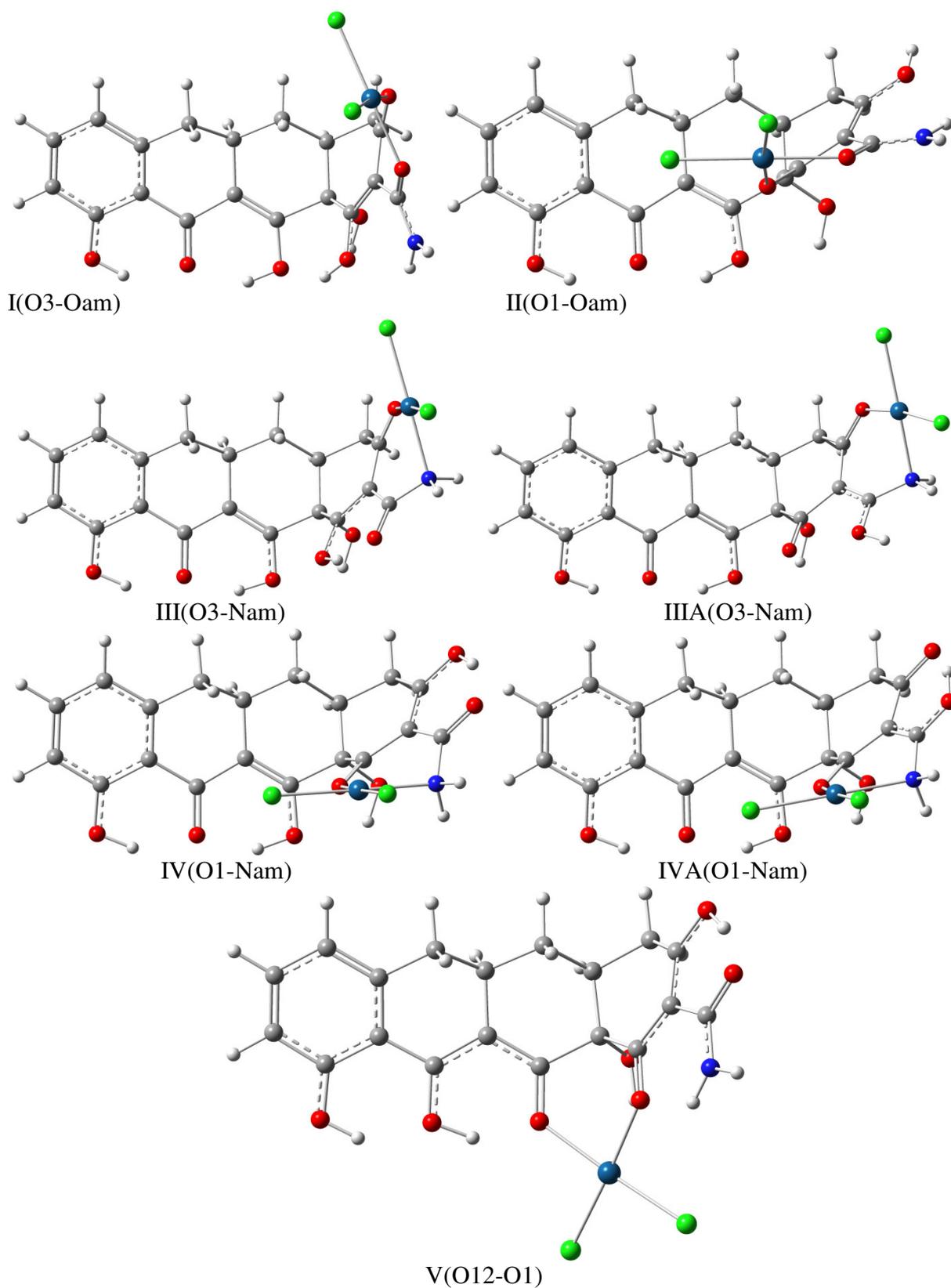


Figura 3.16 Geometrias otimizadas para os complexos [Pt(LH₂)Cl₂] calculadas no nível B3LYP/6-31G(d).

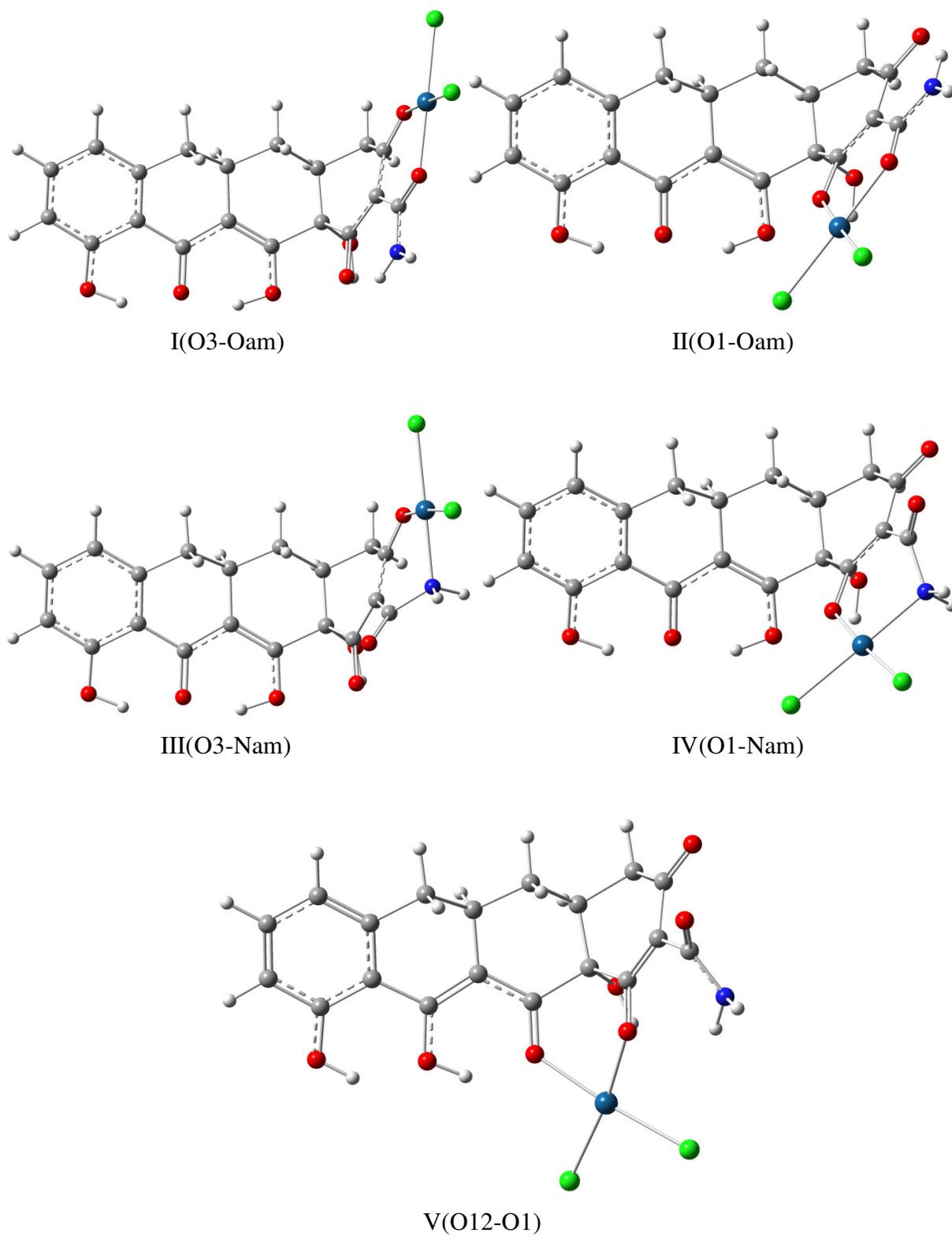


Figura 3.17 Geometrias otimizadas para os complexos $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$ calculadas no nível B3LYP/6-31G(d).

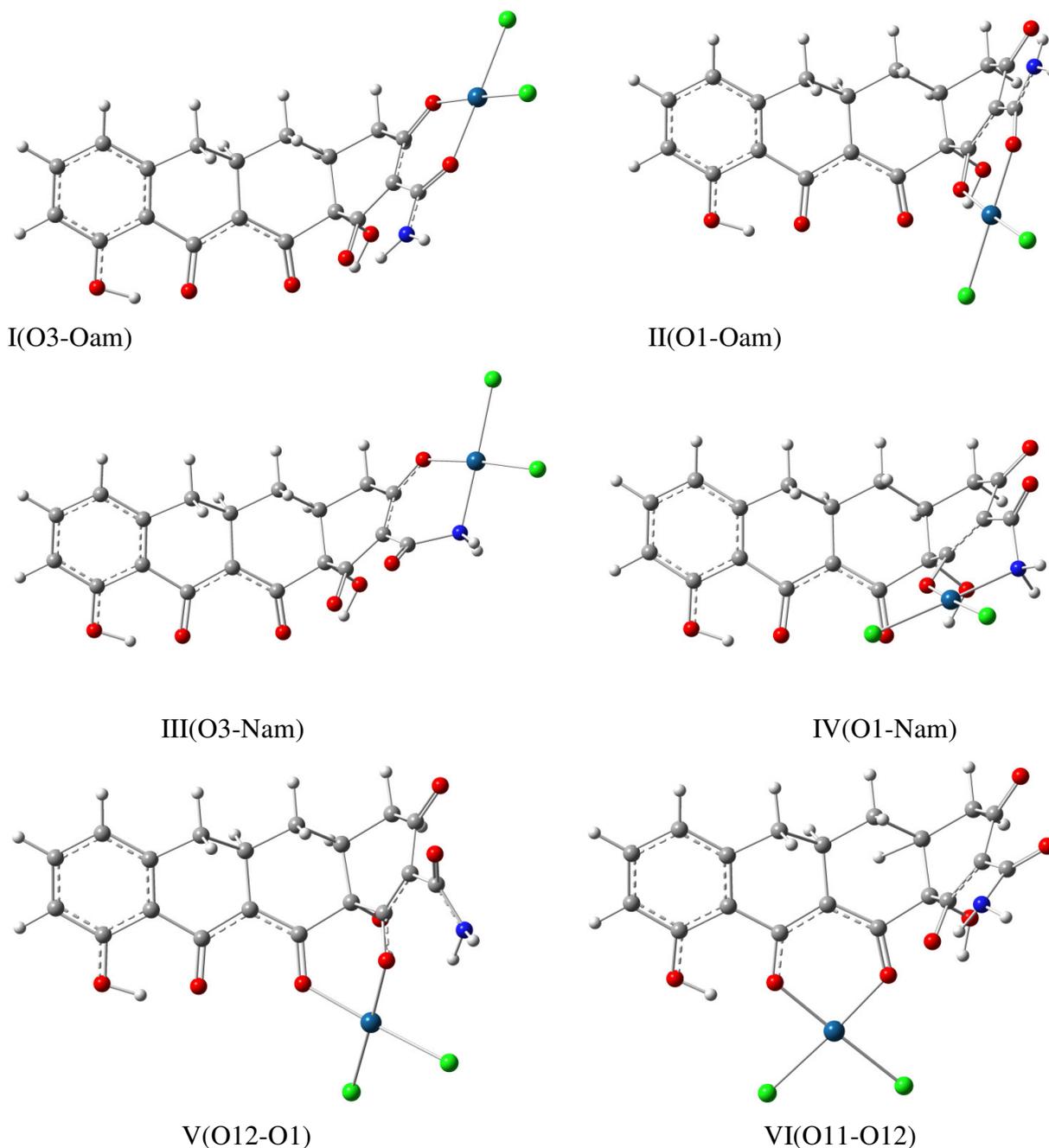


Figura 3.18 Geometrias otimizadas para os complexos $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$ calculadas no nível B3LYP/6-31G(d).

As transições eletrônicas e as atribuições calculadas para as distintas estruturas dos complexos são mostrados na Tabela 3.9. Dos valores apresentados podemos observar algumas mudanças no espectro que poderiam contribuir com a caracterização do modo de coordenação. Para o ligante LH_2 , o qual apresenta duas bandas intensas em 339 e 238 nm, ocorre um deslocamento para região do vermelho (~ 60 nm) na transição de menor energia para os complexos I(O3-Oam) e V(O12-O1) (modos mais estáveis). Estes modos de

coordenação são particularmente interessantes, porque o metal está coordenado somente sobre o anel A, onde mudanças no espectro UV/Vis não são comumente esperadas (Aly, Strasser e Vogler, 2002). Para o complexo V mais estável, as transições são atribuídas a transferências de carga metal ligante (MLCT), com o orbital molecular HOMO-1 localizado na sua maioria sobre o centro metálico (ver Figura 3.19a). Os sítios de coordenação III, IIIA e IVA também promovem um pronunciado deslocamento para região do vermelho na transição de menor energia. A coordenação nos sítios II e IV não provoca mudanças no espectro UV, com a transição de menor energia em torno de 330 nm (ver Tabela 3.9). As transições em menores comprimentos de onda são significativamente afetadas pela coordenação em todos os sítios no ligante LH₂, as transições aparecem em torno de 312-374 nm. Para a estrutura mais estável, o complexo V, a banda de menor energia se desloca de 238 nm para 357 nm. Isto é um comportamento esperado, uma vez que os orbitais moleculares envolvidos nestas transições estão localizados, na sua maioria sobre o anel A (ver Figura 3.19a).

No caso dos complexos com o ligante LH⁻, um pequeno deslocamento para região do azul, cerca de 1-5 nm foi observado para a transição de menor energia para as coordenações nos sítios I e II, os quais foram os dois modos mais estáveis na coordenação com a forma ionizada. Outra transição intensa calculada para o ligante livre em 261 nm é também afetada, mas na direção oposta, sendo calculada em torno de 325-340 nm para os sítios I-IV. O comportamento do complexo V é um pouco distinto, com ambas as transições encontradas em maior comprimento de onda (ver Tabela 3.9). As transições de menor energia para o complexo I envolvem orbitais moleculares principalmente dos anéis BCD (ver Figura 3.19b). É importante notar que o efeito da coordenação do metal no espectro eletrônico da espécie LH⁻ é menos pronunciado do que para a espécie neutra, logo seria mais difícil caracterizar o sítio de coordenação analisando somente o espectro UV/Vis. Isto também foi observado para o complexo AHTC-Pt(II) (Aly, Strasser e Vogler, 2002), para o qual a coordenação ocorre no sítio I (ou II) e não foram observadas mudanças no espectro UV/Vis com a coordenação do metal.

O espectro eletrônico calculado para os complexos [Pt(L)Cl₂]²⁻ mostram um deslocamento para região do vermelho na transição de menor energia com a coordenação nos sítios I, II e V. Para o complexo VI, o qual é também favorável energeticamente, a transição de menor energia é calculada com o mesmo valor do ligante livre (358 nm). Na Figura 3.19c podemos visualizar os orbitais moleculares envolvidos na transição de menor energia para o sítio I, esses orbitais envolvem os anéis BCD, já para o complexo VI, uma MLCT também contribui para a transição calculada (ver Figura 3.19d). O sítio VI é comum para complexos

de tetraciclina com metais alcalinos e alcalinos terrosos (Wessels *et al.*, 1998) e normalmente está associado a um deslocamento para a região do vermelho na transição de menor energia, como mostrado experimentalmente (Machado *et al.*, 1995; Wessels *et al.*, 1998) e teoricamente (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998b). Para CMT-3 em um pH alto (forma totalmente ionizada L^{2-}) a transição de menor energia é calculada na mesma posição do complexo no sítio O11-O12. Esta observação pode ser importante para experimentalistas na análise do sítio de coordenação com o ligante CMT-3.

As Tabelas 3.5 e 3.9 mostram que algumas transições eletrônicas dos ligantes livres e dos complexos são próximas em energia. Experimentalmente, a maioria delas produzirá bandas centradas num valor fixo. Para uma comparação direta dos espectros experimentais e teórico, um conjunto de funções lorentzianas pode ser ajustado para as frequências e intensidades calculadas. Este procedimento já foi aplicado em trabalhos com complexos de AHTC-Zn(II) (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998b; Dos Santos *et al.*, 2000). A Figura 3.20 mostra o espectro de bandas simulado para o ligante livre e para as estruturas mais estáveis dos complexos com Pt(II). Foram incluídas as bandas de comprimento de onda máximo. Um fator comum para todos os complexos é o desaparecimento da banda de maior energia observada para o ligante. Para o complexo $[Pt(LH_2)Cl_2]$, Figura 3.20a, o sítio de coordenação V, o qual é o mais estável em pH baixo, a banda de menor energia desloca de 333 para 376 nm mantendo a intensidade quase constante. A coordenação da Pt(II) com a CMT-3 em pH baixo seria primeiramente caracterizada pela ausência da banda ao redor de 230-260 nm e especialmente pelo deslocamento para região do vermelho da banda de maior comprimento de onda. Para o complexo $[Pt(LH)Cl_2]^-$, a atribuição do modo de coordenação seria mais difícil, a banda de menor energia do complexo mais estável I está na mesma posição do ligante livre (370 nm). Entretanto, para o complexo II seria observado um deslocamento para o azul de 370 para 341 nm como mostra a Figura 3.20b. Em ambos os casos a ausência da banda de absorção na região de 230-260 nm é uma evidência da complexação do metal. Em pH alto, onde a forma L^{2-} é predominante, o sítio mais favorável O3-Oam não apresenta mudanças no espectro, com as bandas centradas em 358 nm e 352 nm para o ligante livre e o complexo I, respectivamente. O mesmo comportamento apresentado pelo complexo VI(O11-O12), o qual apresenta um pico de menor intensidade em 350 nm. Logo, a Figura 3.20 pode ser usada diretamente pelos experimentalistas como um guia para atribuição do sítio de complexação da Pt(II) com a CMT-3.

Tabela 3.9 Transições eletrônicas e atribuições calculadas para os complexos CMT-3-Pt(II) em solução aquosa. Resultados obtidos no nível de teoria B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d).

		λ/nm	f^a		
[Pt(LH ₂)Cl ₂]	I(O3-Oam)	403	0,14	38%(123→124)	H→L
		360	0,21	43%(118→124)	H-5→L
		312	0,15	41%(119→125)	H-4→L+1
	II(O1-Oam)	335	0,14	27%(120→125)	H-3→L+2
		326	0,12	41%(119→125)	H-4→L+2
	III(O3-Nam)	390	0,13	41%(123→124)	H→L
		323	0,17	38%(121→126)	H-2→L+2
	IIIA(O3-Nam)	363	0,18	37%(123→125)	H→L+1
		341	0,23	28%(122→125)	H-1→L+1
	IV(O1-Nam)	330	0,12	32%(122→126)	H-1→L+2
		327	0,10	30%(121→125)	H-2→L+2
	IVA(O1-Nam)	364	0,15	44%(123→125)	H→L+1
		332	0,22	19%(121→125)	H-2→L+1
		V(O12-O1)	409	0,12	12%(122→124)
	374		0,16	31%(119→124)	H-4→L
357	0,11		27%(123→126)	H→L+2	
[Pt(LH)Cl ₂] ⁻	I(O3-Oam)	370	0,33	33%(121→124)	H-2→L
	II(O1-Oam)	365	0,12	38%(122→124)	H-1→L
		336	0,26	37%(119→124)	H-4→L
		375	0,40	38%(122→124)	H-1→L
	IV(O1-Nam)	325	0,10	13%(116→124)	H-7→L
		366	0,12	45%(123→124)	H→L
		361	0,11	40%(122→124)	H-1→L
	V(O12-O1)	340	0,20	36%(120→124)	H-2→L
		418	0,16	13%(122→124)	H-1→L
380		0,16	42%(118→124)	H-5→L	
[Pt(L)Cl ₂] ²⁻	I(O3-Oam)	374	0,10	37%(123→125)	H→L+1
		350	0,37	35%(123→126)	H→L+2
		293	0,11	25%(119→125)	H-4→L+1
	II(O1-Oam)	384	0,13	42%(123→125)	H→L+1
		349	0,26	32%(123→126)	H→L+2
	III(O3-Nam)	362	0,20	28%(123→125)	H→L+1
		353	0,24	31%(123→126)	H→L+2
	IV(O1-Nam)	354	0,37	30%(123→126)	H→L+2
	V(O12-O1)	377	0,40	13%(123→124)	H→L
		286	0,11	28%(122→126)	H-1→L+2
		VI(O11-O12)	358	0,15	36%(120→124)
	315		0,11	24%(115→124)	H-8→L

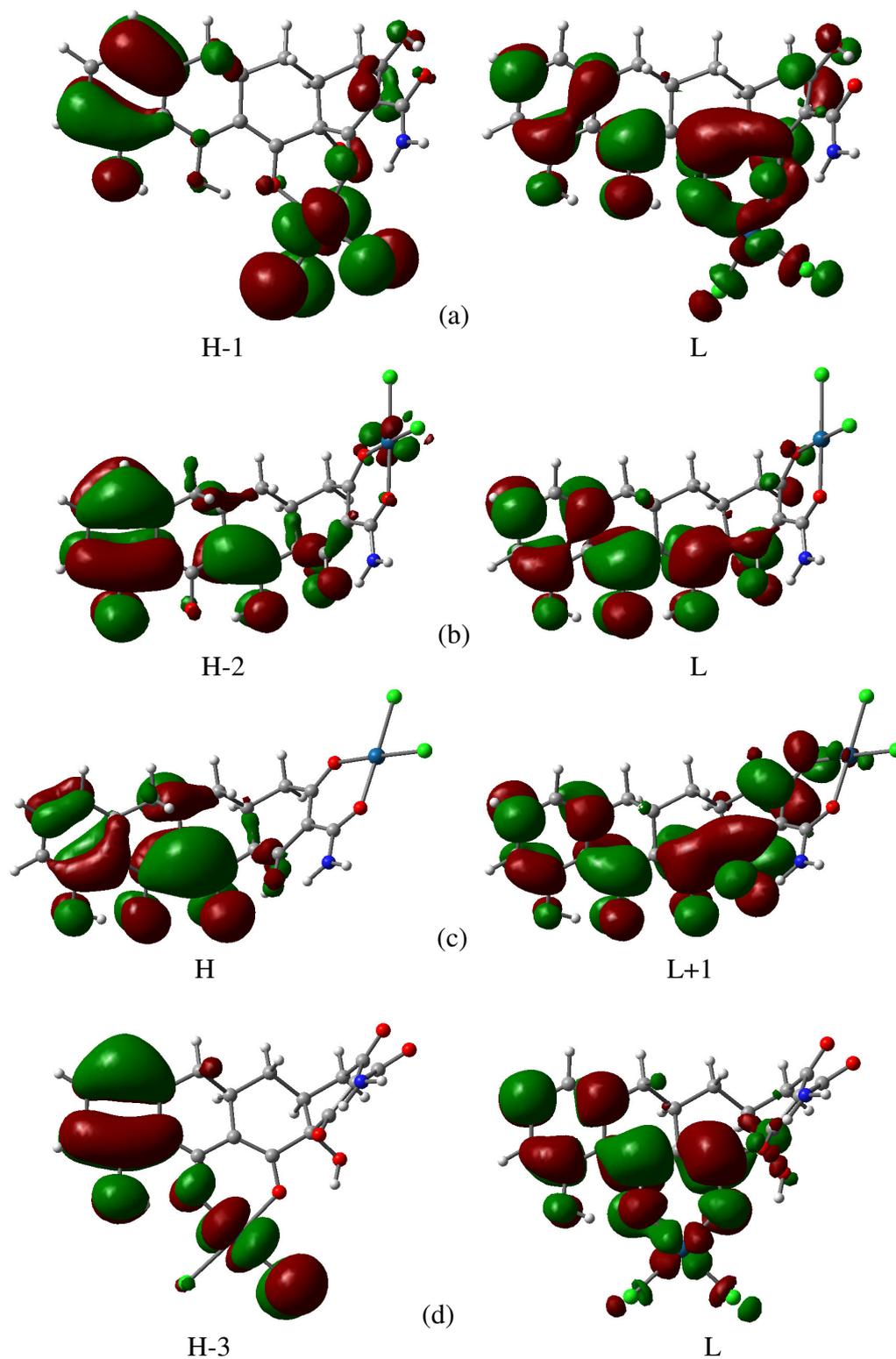


Figura 3.19 Orbitais moleculares DFT dos complexos para CMT-3. Somente os sítios mais estáveis são mostrados. (a) $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$ (sítio V); (b) $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$ (sítio I); (c) $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$ (sítio I); (d) $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$ (sítio VI).

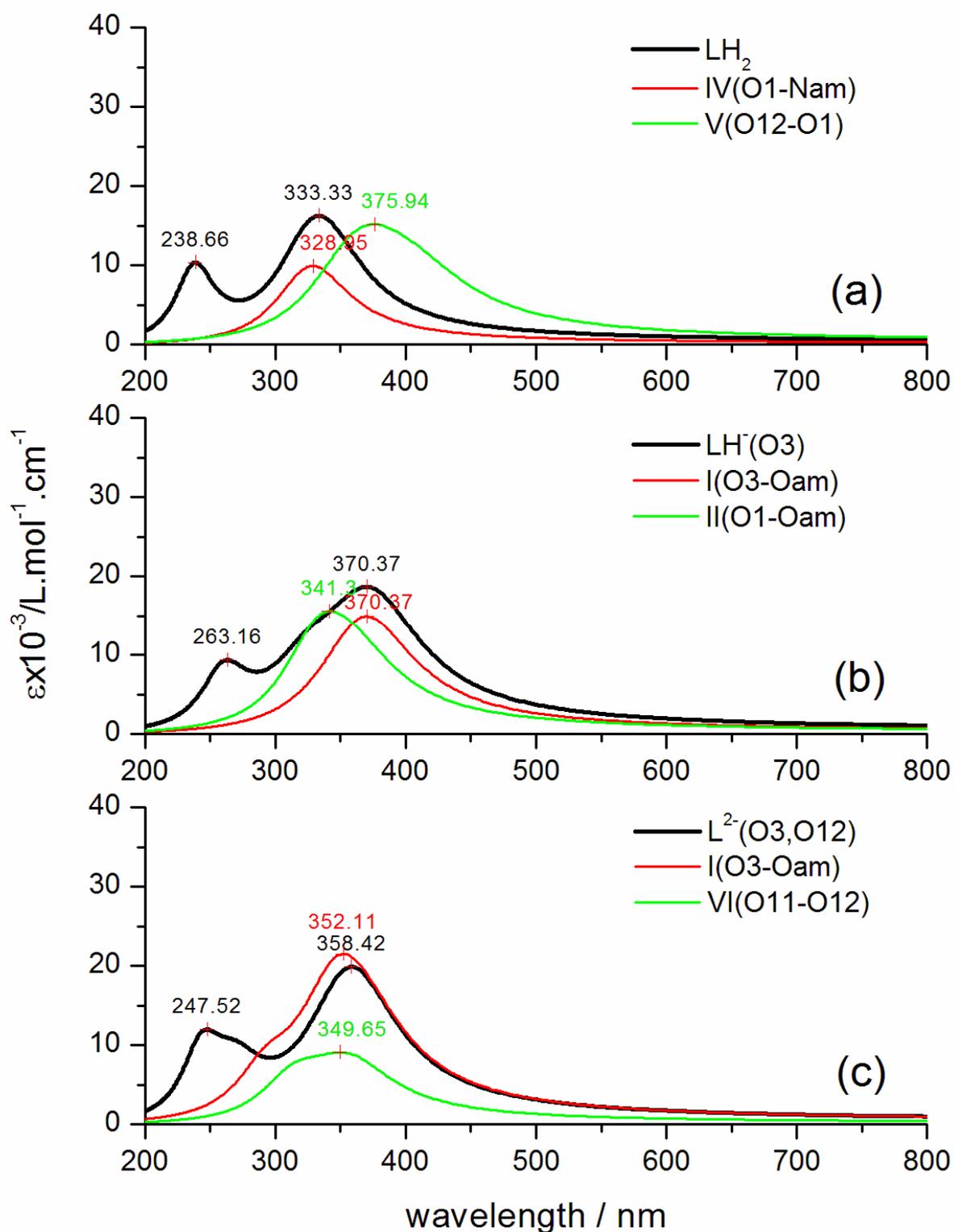


Figura 3.20 Espectro UV/Vis simulado para CMT-3 e os principais complexos em solução aquosa. (a) LH_2 e $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$; (b) LH^- e $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$; (c) L^{2-} e $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$.

Nesta parte do trabalho os espectros de RMN ^{13}C para os complexos formados serão analisados e comparados com aqueles obtidos para os ligantes livres. Nas Tabelas 3.10, 3.11 e

3.12 estão expostos os valores absolutos dos deslocamentos químicos para os complexos do tipo $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$ e $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$, respectivamente. Na Figura 3.21 são mostrados os deslocamentos químicos relativos dos complexos mais estáveis tomando o ligante livre como referência. A Figura 3.21a mostra as mudanças no espectro da CMT-3 com o processo de ionização. Comparando com o espectro da espécie LH_2 , é possível observar claramente deslocamentos para campo baixo dos átomos de C2, C3 e C4 com a ionização no O3, esse comportamento é devido à deslocalização eletrônica na região destes carbonos. Como já havia sido observado, o C12 também é bastante afetado pela primeira ionização, tendo sido calculado um deslocamento para campo baixo de quase 20 ppm. A segunda ionização no O12 provoca mudanças específicas nos deslocamentos químicos dos C11 e C11a, com ambos os sinais são deslocados para campo alto. As Figuras 3.21b-d representam as mudanças no espectro de RMN após a coordenação da platina(II) relativos ao ligante correspondente. Somente os dois complexos mais estáveis para cada espécie foi analisado. No caso do ligante LH_2 (Figura 3.21b), a coordenação no sítio IV(O1-Nam) desloca os sinais de todos os carbonos para campo baixo, sendo mais pronunciado nos átomos C1, C2, C3 e C2amd. Comportamento que pode ser distinguido do complexo V(O12-O1), para o qual o átomo de C11 é deslocado cerca de 10 ppm para campo alto e o C12 é deslocado quase 25 ppm para campo baixo quando ocorre a coordenação do metal (ver Tabela 3.10). Para os complexos $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$ a atribuição do sítio de coordenação seria mais difícil quando os principais sítios I(O3-Oam) e II(O1-)AM são considerados. Como mostrado na Figura 3.21c, as mudanças no espectro são muito similares para ambos os modos, resultado da conjugação eletrônica na região C3-C2-C1. Quando a espécie completamente ionizada é considerada, o espectro de RMN é menos sensível à coordenação da Pt(II) (ver Figura 3.21d).

Em geral, os resultados obtidos nesta dissertação levantam os principais fatores relativos à estrutura e propriedades da CMT-3 e os complexos com P(II). Dentro das muitas possibilidades de sítios de coordenação, nossos resultados sugerem os mais prováveis e apresentam propriedades espectroscópicas importantes para identificá-los. Nós acreditamos que a análise descrita neste trabalho pode auxiliar fortemente os experimentalistas na atribuição dos modos de coordenação para Pt(II) e outros metais na CMT-3 e outras tetraciclinas quimicamente modificadas.

Tabela 3.10 Deslocamento químico do ^{13}C (em ppm) para os átomos do ligante livre (LH_2) e para os complexos $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$. Os valores foram obtidos em solução aquosa usando o TMS como padrão no nível de teoria B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d).

Núcleos	LH_2	I	II	III	IIIA	IV	IVA	V
C1	199,7	191,8	216,3	204,8	199,9	214,1	212,1	203,1
C2	105,7	114,8	115,9	113,1	115,8	114,4	114,4	110,5
C3	194,5	215,4	195,3	216,2	216,7	209,2	215,8	210,4
C4	35,8	46,7	38,2	45,8	46,0	39,4	43,0	39,8
C4a	39,1	44,6	43,1	46,0	42,8	43,9	43,6	42,2
C5	33,6	36,0	35,1	35,3	35,7	35,4	36,0	36,4
C5a	37,7	38,6	39,1	39,1	39,5	39,1	39,7	38,7
C6	39,7	39,4	40,7	40,5	40,6	41,6	41,5	40,8
C6a	152,7	156,3	155,7	154,7	154,7	154,7	154,8	155,6
C7	121,2	124,1	124,7	125,0	125,0	124,3	124,6	126,0
C8	140,9	147,0	146,0	145,9	144,9	145,4	145,5	147,5
C9	119,0	122,2	121,8	122,2	121,8	122,0	122,0	123,1
C10	167,9	173,8	173,2	173,8	173,6	174,1	174,1	172,0
C10a	120,8	123,2	122,2	122,3	122,4	122,8	122,8	119,8
C11	198,0	203,4	202,3	202,9	202,7	203,3	203,3	189,6
C11a	114,1	122,9	118,3	119,8	117,6	118,7	118,9	121,3
C12	173,8	175,7	176,6	176,2	181,1	176,2	176,5	198,1
C12a	79,3	78,0	85,5	79,8	82,7	84,9	84,8	82,2
C2amd	173,4	175,1	174,7	183,7	176,5	183,6	188,2	179,9

Tabela 3.11 Deslocamento químico do ^{13}C (em ppm) para os átomos do ligante livre (LH^-) e para os complexos $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$. Os valores foram obtidos em solução aquosa usando o TMS como padrão no nível de teoria B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d).

Núcleos	$\text{L}^{2-}(\text{O3},\text{O12})$	I	II	III	IV	V
C1	205,4	204,2	200,0	202,4	202,0	186,7
C2	115,3	108,4	108,6	111,9	113,7	120,6
C3	202,9	203,3	207,4	204,9	201,9	201,9
C4	48,7	45,4	45,3	44,9	44,3	45,9
C4a	43,0	41,5	42,5	40,3	42,2	43,1
C5	39,4	36,0	35,9	36,3	35,9	37,2
C5a	42,0	38,5	39,4	38,5	39,7	38,2
C6	43,9	41,2	40,8	41,2	40,6	41,0
C6a	152,1	154,4	155,4	154,6	155,4	154,9
C7	120,4	124,5	123,9	124,0	124,1	125,7
C8	138,0	143,8	144,4	143,7	144,8	145,2
C9	120,0	121,8	121,4	121,7	121,5	122,8
C10	175,2	173,1	172,9	172,8	173,3	170,7
C10a	126,9	123,7	123,0	123,7	122,9	120,3
C11	189,9	202,4	201,6	201,7	201,7	187,1
C11a	107,2	118,2	114,9	117,5	114,9	120,3
C12	198,5	186,8	185,6	187,0	185,7	205,6
C12a	85,3	81,4	84,8	80,9	84,9	82,7
C2amd	184,2	177,1	177,9	177,2	178,7	177,9

Tabela 3.12 Deslocamento químico do ^{13}C (em ppm) para os átomos do ligante livre (L^{2-}) e para os complexos $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^-$. Os valores foram obtidos em solução aquosa usando o TMS como padrão no nível de teoria B3LYP-PCM/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d).

Núcleos	$\text{L}^{2-}(\text{O3})$	I	II	III	IV	V	VI
C1	198,2	210,4	204,6	204,3	210,2	194,8	203,3
C2	113,2	108,4	109,3	113,5	115,3	119,3	112,5
C3	200,7	202,2	210,2	204,5	203,5	203,0	201,9
C4	46,5	45,9	47,4	45,3	46,4	47,1	48,0
C4a	40,9	43,0	43,2	42,2	42,7	43,8	42,1
C5	37,4	37,9	37,8	38,2	38,3	39,0	38,1
C5a	38,9	40,9	41,4	42,0	42,7	41,8	39,3
C6	41,2	43,7	44,5	43,8	42,7	43,4	42,8
C6a	154,5	151,8	153,1	151,7	153,2	153,5	153,7
C7	123,7	120,6	120,5	121,1	121,5	121,8	123,1
C8	143,2	137,7	137,8	137,8	138,0	140,2	141,0
C9	121,2	120,0	119,2	120,0	120,3	120,7	122,2
C10	173,1	174,2	172,6	174,1	174,8	173,7	171,0
C10a	123,9	126,9	126,4	126,0	126,7	126,4	125,3
C11	201,2	192,0	192,7	192,0	192,6	197,5	186,4
C11a	115,2	108,6	107,2	108,9	108,2	120,7	112,7
C12	192,8	193,3	191,3	194,2	191,8	189,5	195,3
C12a	82,9	83,2	85,2	83,2	87,6	84,6	89,5
C2amd	180,4	177,8	180,5	176,6	176,0	180,3	182,7

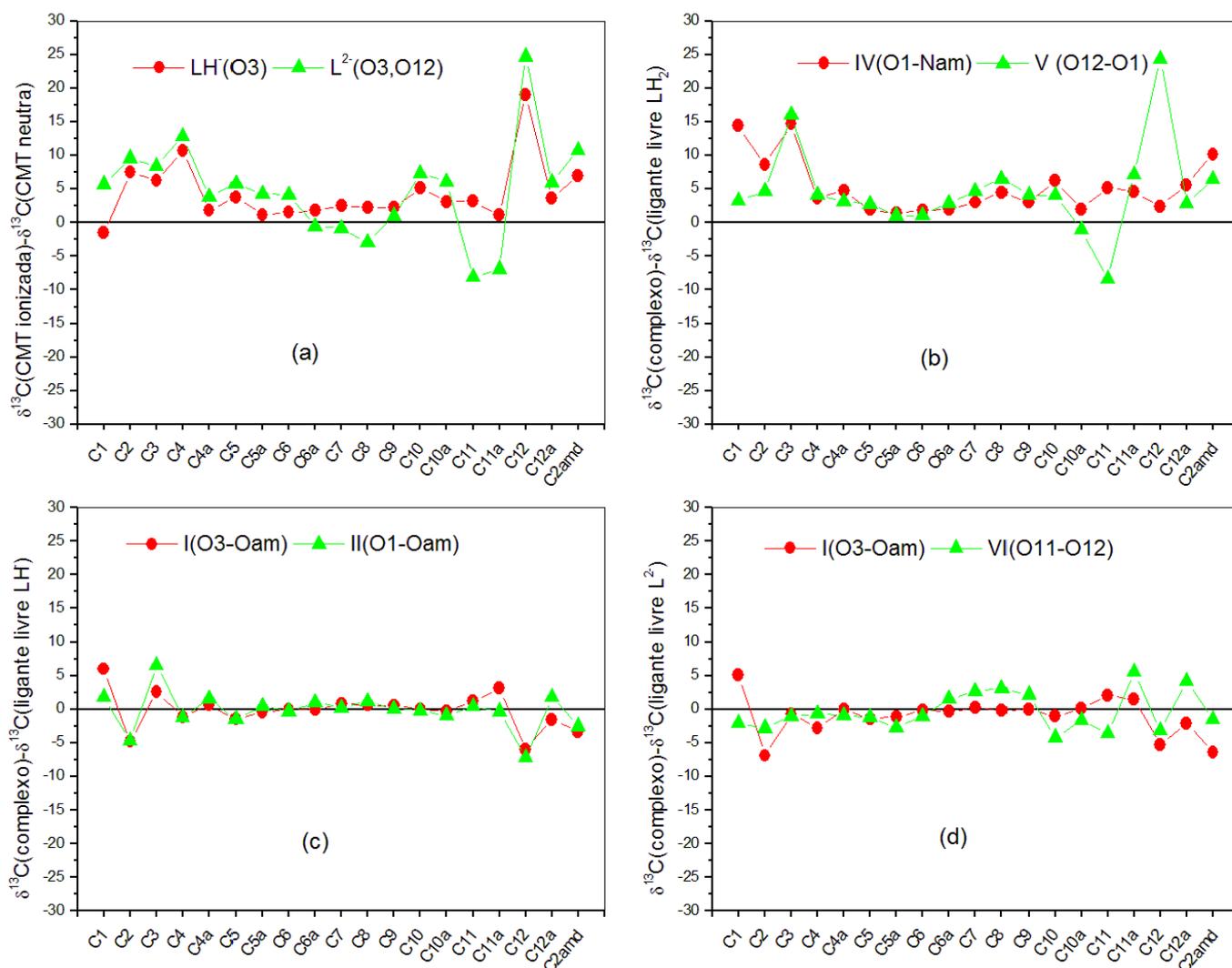


Figura 3.21 Deslocamento químico relativo de RMN ^{13}C . (a) Distintos estados ionizados da CMT-3 onde os valores para LH_2 foram usados como referências; (b) complexos $[\text{Pt}(\text{LH}_2)\text{Cl}_2]$ com os valores da LH_2 usados como referência; (c) complexos $[\text{Pt}(\text{LH})\text{Cl}_2]^-$ com os valores da LH^- usados como referência; (d) complexos $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]^{2-}$ com os valores L^{2-} usados como referência.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 Considerações Gerais e Perspectivas

Essa dissertação teve como foco o estudo da cinética da reação do complexo AHTC-Pt com os nucleófilos representativos dos possíveis alvos da platina no meio biológico, incluindo

bases nitrogenadas (Adenina e Guanina) e os resíduos de aminoácidos (Citosina e Metionina). Na sequência, a descrição das propriedades estruturais, termodinâmicas e espectroscópicas do complexo de platina(II) com um novo análogo da classe das tetraciclina quimicamente modificadas, a CMT-3 foi apresentada. Ambos os complexos podem representar potenciais análogos da cisplatina. Portanto, esse trabalho visou contribuir com o planejamento de novos agentes antitumorais.

Para avaliar a reatividade do complexo AHTC-Pt(II) foram estudadas as interações deste com diferentes nucleófilos de importância biológica (guanina, adenina, metionina e cisteína). Esses processos reativos seguem o mecanismo padrão do modo de ação dos análogos da cisplatina, que compreendem a etapa de ativação como hidrólise e a reação com as bases do DNA. As reações com os aminoácidos também desempenham um papel fundamental, sendo essas reações importantes quanto à biodisponibilidade da droga no organismo. Entender o mecanismo de ação no nível molecular pode auxiliar no planejamento de novas moléculas com potencial biológico.

Partindo da espécie monoáquo do complexo AHTC-Pt foram estudadas as reações com os nucleófilos G, A, Met e Cys, formando novos complexos com estequiometria $[\text{Pt}(\text{AHTC})\text{Cl}(\text{Nu})]^+$. Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H foram calculados e analisados para cada estrutura. O espectro de ^1H se mostrou mais sensível, principalmente para os adutos formados com A e G. Para essas espécies o substituinte na posição C6 das bases purinas está interagindo com o grupo metil na posição C4 da AHTC, desdobrando-se e deslocando os sinais atribuídos ao grupo $-\text{CH}_3$ para campos mais baixos, relativamente ao ligante livre. O deslocamento químico médio dos três átomos de hidrogênio encontrado foi de $\delta=2,8$ ppm, para ambos os grupos $-\text{CH}_3$ no ligante livre e também nos complexos formados com Met e Cys. Entretanto, para os complexos com G e A dois picos aparecem em $\delta=2,8$ e $3,3$ ppm (A) e $\delta= 3,2$ e $3,8$ ppm (G).

As propriedades cinéticas foram calculadas dentro da aproximação da supermolécula. Nesta metodologia os reagentes e produtos são tratados como complexos moleculares, para os quais as estruturas são determinadas mediante o cálculo de coordenada intrínseca de reação a partir da geometria do estado de transição (TS). A estrutura do TS desempenha um papel chave na barreira de ativação, e não pode ser acessada experimentalmente, portanto a descrição teórica apresentada aqui pode ser valiosa para experimentalistas no planejamento de moléculas e estudos de processos com reatividade controlada. Para as reações analisadas neste trabalho, os valores das constantes de velocidade foram ($10^2 k_2$ in $\text{mol}^{-1}\text{L s}^{-1}$): 0,1 (G), 0,01 (A), 3,6 (Met) e 9,8 (Cys), em solução aquosa. Esses processos são 10^3 vezes mais rápidos do

que a reação de hidrólise ($0,5 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ para hidrólise da AHTC-Pt), o que está em perfeito acordo com o comportamento padrão de análogos da cisplatina, uma vez que a hidrólise é a etapa lenta do processo. Comparando os valores experimentais para cisplatina $8-54 \times 10^{-2}$ (G) e $2,2-3,9 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ (Cys e Met) nota-se que a reação do análogo AHTC-Pt com G é quase duas ordens de grandeza mais lenta e as reações com Cys e Met são levemente mais rápidas. Mesmo com essas diferenças os valores calculados para o análogo AHTC-Pt são comparáveis com a cisplatina, tendo em vista a diferença na esfera de coordenação e conseqüentemente nos processos investigados.

Para o complexo Pt(II)-CMT-3 foram estudadas propriedades estruturais e energéticas usando a teoria do funcional da densidade (DFT). Para o ligante livre foi obtido o espectro de RMN de ^{13}C considerando todos os possíveis estados ionizados, chamados LH_2 , LH^- e L^{2-} . Seguindo os estudos experimentais para a tetraciclina, nós investigamos a coordenação da Pt(II) com a CMT-3, tendo sido propostos 18 sítios distintos de coordenação. Os modos mais estáveis de coordenação estão no anel A, sendo os sítios O12-O1 (ligante LH_2) e O3-Oam (ligantes LH^- e L^{2-}). O último sítio é comum para a tetraciclina complexada com Pt(II). Outros sítios foram estáveis, como mo O1-Oam para LH^- e O11-O12 para ligante totalmente ionizado (L^{2-}). Essa conclusão é importante mostrando que a coordenação pode ser controlada pela mudança do pH.

A análise espectroscópica incluiu UV/Vis e RMN de ^{13}C . Em ambos as técnicas somente os processos envolvendo a espécie neutra (LH_2) foi sensível à coordenação do metal. Neste caso a coordenação no sítio O12-O1 (sítio mais favorável em pH baixo) poderia ser facilmente atribuída pela observação do deslocamento para região do vermelho na transição de menor energia ($\sim 40 \text{ nm}$) e um significativo deslocamento químico, relativo ao ligante livre, para campo alto do C11 ($\sim 10 \text{ ppm}$) e para campo baixo no C12 ($\sim 24 \text{ ppm}$). Quando o ligante livre for a espécie LH^- ou L^{2-} a coordenação poderia ser confirmada pelo desaparecimento da banda em torno de 260 nm , mas o sítio de coordenação seria mais difícil de ser identificado. Essa mesma conclusão se aplica ao RMN, no qual as mudanças no deslocamento químico foram menores que 5%, o qual está dentro da precisão do método aplicado ($\sim 7 \text{ ppm}$). O conjunto de dados, incluindo propriedades estruturais e espectroscópicas, apresentados para a CMT-3 e os complexos com platina(II) podem ser aproveitados por experimentalistas na atribuição dos modos de coordenação da Pt(II) com CMT-3 e outros análogos da tetraciclina.

Acreditamos ter contribuído com a proposta de empregar metodologias teóricas no estudo de processos químicos relevantes, como reações envolvendo moléculas de fármacos e alvos biológicos. As moléculas estudadas neste trabalho, consideradas híbridos moleculares,

são potenciais análogos ou alternativas à cisplatina, portanto, candidatos a antitumorais. Tendo como ligantes moléculas da família das tetraciclinas podem ainda, desempenhar outros papéis farmacológicos, como antibióticos ou no caso das TC modificadas atuarem como antitumorais através de outros mecanismos envolvendo a interação com proteínas. Em geral podemos ressaltar que o presente trabalho pode servir como um guia para experimentalista, que entre outras vantagens facilitaria o difícil caminho de caracterização de complexos metálicos. Nesse sentido, dado o bom acordo entre os resultados obtidos teoricamente e os dados experimentais, e ainda uma maior disponibilidade computacional, podemos avançar no estudo da reatividade dessas moléculas aumentando o tamanho dos sistemas modelos e conseqüentemente nos aproximando do real. Nosso objetivo futuro é estudar a interação dos complexos de Pt(II) com seqüências nucleotídicas e de aminoácidos representativos do DNA e das proteínas, respectivamente. Uma metodologia adequada para tratar seqüências nucleotídicas foi previamente analisada por nós durante a execução do presente trabalho. Aspectos estruturais de diversas seqüências nucleotídicas foram avaliados utilizando métodos híbridos (QM/MM), e os resultados obtidos mostram que o método ONIOM é eficiente para o tipo análise proposta (resultados mostrados no Apêndice A). Outro caminho será o uso de cálculos envolvendo dinâmica molecular para investigar interações dos complexos com proteínas especificamente relacionadas aos processos cancerígenos, como as MMPs citadas na seção 3.4.

4.2 Trabalhos Apresentados em Eventos

Estudo teórico da interação do complexo 5a,6-anidrotetraciclinaaquocloroplatina(II) com 5'-GPG-3': Um híbrido intercalante-alkilante.

Bruna Luana Marcial e Hélio F. Dos Santos

IV Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2008, Petrópolis, RJ.

Aspectos Estruturais de Oligonucleotídeos: Aplicação de Metodologias Teóricas

Bruna Luana Marcial, Juliana Fedoce Lopes, Wagner B. De Almeida, Hélio F. Dos Santos

XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2007, Poços de Caldas, MG.

4.3 Artigos Publicados

Reactivity of 5a,6-anhydrotetracycline platinum(II) complex with biological nucleophiles: A theoretical study.

Bruna L. Marcial, Luiz Antônio S. Costa, Wagner B. De Almeida e Hélio F. Dos Santos

Journal of the Brazilian Chemical Society, 100, 1437-1449, 2008.

Structure and properties of the new complex of the platinum(II) with the chemically modified tetracycline CMT-3: A theoretical study.

Bruna L. Marcial, Luiz Antônio S. Costa, Wagner B. De Almeida e Hélio F. Dos Santos

Submetido

Tetraciclina e glicilciclina: Uma visão geral

Elene C. Pereira Maia, Priscila P. Silva, Wagner B. de Almeida, Hélio Ferreira dos Santos,

Bruna L. Marcial, Reinaldo Ruggiero e Wendell Guerra

Submetido

REFERÊNCIAS

ACHARYA, M. R. et al. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. **Drug Resistance Updates**, Maryland Heights, 2004. v. 7, n. 3, p. 195-208.

ADDISON, A. W. et al. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(I) Compounds Containing Nitrogen Sulfur Donor Ligands - the Crystal and Molecular-Structure of Aqua[1,7-Bis(N-Methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-Dithiaheptane]Copper(I) Perchlorate. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, London, 1984. n. 7, p. 1349-1356.

ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. The discovery and development of cisplatin. **Journal of Chemical Education**, Washington, 2006. v. 83, n. 5, p. 728-734.

ALY, A. A. M.; STRASSER, A.; VOGLER, A. Synthesis and spectroscopic properties of anhydrotetracyclineplatinum(II)dichloride. **Inorganic Chemistry Communications**, Washington, 2002. v. 5, n. 6, p. 411-413.

ASLESON, G. L.; FRANK, C. W. C-13 Nuclear Magnetic-Resonance Spectral Analysis of Tetracycline Hydrochloride and Related Antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1975. v. 97, n. 21, p. 6246-6248.

AULLON, G. et al. Metal-bound chlorine often accepts hydrogen bonds. **Chemical Communications**, London, 1998. n. 6, p. 653-654.

BANCROFT, D. P.; LEPRE, C. A.; LIPPARD, S. J. Pt-195 Nmr Kinetic and Mechanistic Studies of Cis-Diamminedichloroplatinum and Trans-Diamminedichloroplatinum(Ii) Binding

to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1990. v. 112, n. 19, p. 6860-6871.

BECKE, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic-Behavior. **Physical Review A**, Washington, 1988. v. 38, n. 6, p. 3098-3100.

BERNGES, F.; HOLLER, E. The Reaction of Platinum(II) Complexes with DNA - Kinetics of Intrastrand Cross-Link Formation In vitro. **Nucleic Acids Research**, Southampton, 1991. v. 19, n. 7, p. 1483-1489.

BOSE, R. N.; GHOSH, S. K.; MOGHADDAS, S. Kinetic analysis of the cis-diamminedichloroplatinum(II)-cysteine reaction: Implications to the extent of platinum-DNA binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Washington, 1997. v. 65, n. 3, p. 199-205.

BRADAC, O.; ZIMMERMANN, T.; BURDA, J. V. Comparison of the electronic properties, and thermodynamic and kinetic parameters of the aquation of selected platinum(II) derivatives with their anticancer IC50 indexes. **Journal of Molecular Modeling**, Berlin, 2008. v. 14, n. 8, p. 705-716.

BULLUSS, G. H.; WALLER, M. P.; HAMBLEY, T. W. Mechanism of action of platinum complex binding to DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Washington, 2003. v. 96, n. 1, p. 109-109.

BURDA, J. V.; ZEIZINGER, M.; LESZCZYNSKI, J. Hydration process as an activation of trans- and cisplatin complexes in anticancer treatment. DFT and ab initio computational study of thermodynamic and kinetic parameters. **Journal of Computational Chemistry**, Washington, 2005. v. 26, n. 9, p. 907-914.

CANCES, E.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. **Journal of Chemical Physics**, Melville, 1997. v. 107, n. 8, p. 3032-3041.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, 2001. v. 65, n. 2, p. 232-+.

CHOUDHURY, J. R.; BIERBACH, U. Characterization of the bisintercalative DNA binding mode of a bifunctional platinum-acridine agent. **Nucleic Acids Research**, Southampton, 2005. v. 33, n. 17, p. 5622-5632.

CONNORS, K. A. **Chemical Kinetics - The Study of Reaction Rate in Solutions**. New York: John Wiley, 1990. 498 p.

COSTA, L. A. S. et al. Kinetics and structural aspects of the cisplatin interactions with guanine: A quantum mechanical description. **International Journal of Quantum Chemistry**, New York, 2006. v. 106, n. 9, p. 2129-2144.

_____. The hydrolysis process of the cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II): A theoretical study. **Journal of Chemical Physics**, Melville, 2003. v. 118, n. 23, p. 10584-10592.

_____. The solvent effect on the aquation processes of the cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) using continuum solvation models. **Chemical Physics Letters**, Maryland Heights, 2004. v. 387, n. 1-3, p. 182-187.

DA SILVA, V. J.; COSTA, L. A. S.; DOS SANTOS, H. F. Ab initio reaction path for cisplatin interaction with L-cysteine and L-methionine. **International Journal of Quantum Chemistry**, New York, 2008. v. 108, n. 2, p. 401-414.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: An introduction. **Quimica Nova**, São Paulo, 2005. v. 28, n. 1, p. 118-129.

DE PAULA, F. C. S. et al. A physicochemical study of the tetracycline coordination to oxovanadium(IV). **Journal of Inorganic Biochemistry**, Washington, 1999. v. 76, n. 3-4, p. 221-230.

DESIQUEIRA, J. M. et al. Metal-Complexes of Anhydrotetracycline .1. a Spectrometric Study of the Cu(II) and Ni(II) Complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, 1994. v. 83, n. 3, p. 291-295.

DITCHFIELD, R. Self-Consistent Perturbation-Theory of Diamagnetism .1. Gauge-Invariant Lcao Method for Nmr Chemical-Shifts. **Molecular Physics**, 1974. v. 27, n. 4, p. 789-807.

DOS SANTOS, H. F.; DE ALMEIDA, W. B.; ZERNER, M. C. Conformational analysis of the anhydrotetracycline molecule: A toxic decomposition product of tetracycline. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, 1998a. v. 87, n. 2, p. 190-195.

_____. Theoretical near UV and VIS electronic spectra for the Zn-II-anhydrotetracycline complex. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**, Washington, 1998b. n. 11, p. 2519-2525.

DOS SANTOS, H. F. et al. Structure and properties of the 5a,6-anhydrotetracycline-platinum(II) dichloride complex: A theoretical ab initio study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Washington, 2006. v. 100, n. 10, p. 1594-1605.

_____. Spectroscopic investigation of the Al(III)-anhydrotetracycline complexation process. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, Maryland Heights, 2000. v. 527, p. 193-202.

DUARTE, H. A. et al. Importance of tautomers in the chemical behavior of tetracyclines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, 1999. v. 88, n. 1, p. 111-120.

FDA. Food and Drug Administration. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: 24 jan. 2009.

FRISCH, M. J. et al. Gaussian 03. Wallingford - CT:Gaussian Inc, 2004.

GOLUB, L. M. et al. Tetracyclines Inhibit Connective-Tissue Breakdown - New Therapeutic Implications for an Old Family of Drugs. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Ipswich, 1991. v. 2, n. 3, p. 297-322.

GONZALEZ, C.; SCHLEGEL, H. B. An Improved Algorithm for Reaction-Path Following. **Journal of Chemical Physics**, Washington, 1989. v. 90, n. 4, p. 2154-2161.

GREENWALD, R. A.; GOLUB, L. M. Biologic properties of non-antibiotic, chemically modified tetracyclines (CMTs): A structured, annotated bibliography. **Current Medicinal Chemistry**, Ipswich, 2001. v. 8, n. 3, p. 237-242.

GUDDNEPPANAVAR, R. et al. Effect of the diamine nonleaving group in platinum-acridinylthiourea conjugates on DNA damage and cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, 2007. v. 50, n. 9, p. 2259-2263.

GUERRA, W. et al. Three new complexes of platinum(II) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São paulo, 2006. v. 17, n. 8, p. 1627-1633.

HAMBLEY, T. W. Chemistry - Metal-based therapeutics. **Science**, Washington, 2007. v. 318, n. 5855, p. 1392-1393.

HAY, P. J.; WADT, W. R. Abinitio Effective Core Potentials for Molecular Calculations - Potentials for the Transition-Metal Atoms Sc to Hg. **Journal of Chemical Physics**, Washington, 1985. v. 82, n. 1, p. 270-283.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, Southampton, 2001. v. 93, n. 3, p. 178-193.

HOLMES, S. et al. CMT3 alters mitochondrial function in murine osteoclast lineage cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, 2008. v. 365, n. 4, p. 840-845.

HUGHES, L. J.; STEZOWSKI, J. J.; HUGHES, R. E. Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives .7. Evidence for the Coexistence of the Zwitterionic and Nonionized Forms of the Free Base in Solution. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1979. v. 101, n. 26, p. 7655-7657.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. 2009. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 24 jan. 2009. .

ISLAM, M. M. et al. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. **American Journal of Pathology**, Washington, 2003. v. 163, n. 4, p. 1557-1566.

JANSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. New York John Wiley, 1999. 624 p.

JUNG, Y. W.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chemical Reviews**, Washington, 2007. v. 107, n. 5, p. 1387-1407.

KOTHARI, M.; SIMON, S. R. Chemically modified tetracyclines inhibit VEGF secretion by breast cancer cell. **Cytokine**, Maryland Heights, 2006. v. 35, n. 3-4, p. 115-125.

KOZELKA, J. et al. Kinetic aspects of interactions between DNA and platinum complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, Maryland Heights, 1999. v. 192, p. 61-82.

LEE, C. T.; YANG, W. T.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. **Physical Review B**, Maryland Heights, 1988. v. 37, n. 2, p. 785-789.

LEE, J. Y.; EVERETT, G. W. Binding of Mn(II) by Tetracycline - a C-13 Nmr Spin-Lattice Relaxation Study. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1981. v. 103, n. 17, p. 5221-5225.

LEGENDRE, F. et al. A complete kinetic study of GG versus AG platination suggests that the doubly aquated derivatives of cisplatin are the actual DNA binding species. **Chemistry-a European Journal**, New York, 2000. v. 6, n. 11, p. 2002-2010.

LESKINEN, M. J. et al. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by a chemically modified tetracycline. **Coronary Artery Disease**, New York, 2007. v. 18, p. 663-667.

LEVINE, I. **Quantum Chemistry**. New Jersey: 2000. 739 p.

LI, J. et al. Population pharmacokinetics of COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, New York, 2006. v. 79, n. 2, p. P20-P20.

LOKESHWAR, B. L.; ESCATEL, E.; ZHU, B. Q. Cytotoxic activity and inhibition of tumor cell invasion by derivatives of a chemically modified tetracycline CMT-3 (COL-3). **Current Medicinal Chemistry**, Southampton, 2001. v. 8, n. 3, p. 271-279.

LOPES, J. F. et al. Theoretical study of the potential energy surface for the interaction of cisplatin and their aquated species with water. **Journal of Chemical Physics**, Melville, 2008. v. 128, n. 16.

MACHADO, F. C. et al. Metal-Complexes of Anhydrotetracycline .2. Absorption and Circular-Dichroism Study of Mg(II), Al(III), and Fe(II) Complexes - Possible Influence of the Mg(II) Complex on the Toxic Side-Effects of Tetracycline. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Washington, 1995. v. 60, n. 3, p. 163-173.

MARCIAL, B. L. et al. Reactivity of 5a,6-Anhydrotetracycline Platinum(II) Complex with Biological Nucleophiles: a Theoretical Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São paulo, 2008. v. 19, n. 8, p. 1437-1449.

MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. The Density-Functional Theory. **Quimica Nova**, São Paulo, 1995. v. 18, n. 1, p. 44-55.

MORGON, N. H.; KOUTINHO, K. E. São Paulo: Livraria da Física, 2007. 540 p.

NCI. National Cancer Institute. 2009. Disponível em: <www.cancer.gov>. Acesso em: 24 jan. 2009.

ONODA, T. et al. Tetracycline analogues (doxycycline and COL-3) induce caspase-dependent and -independent apoptosis in human colon cancer cells. **International Journal of Cancer**, Washington, 2006. v. 118, n. 5, p. 1309-1315.

PINSUWAN, S. et al. Degradation kinetics of 4-dedimethylamino sancycline, a new anti-tumor agent, in aqueous solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, Maryland Heights 1999a. v. 181, n. 1, p. 31-40.

_____. Spectrophotometric determination of acidity constants of 4-dedimethylamino sancycline (Col-3), a new antitumor drug. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Maryland Heights 1999b. v. 88, n. 5, p. 535-537.

PREWO, R.; STEZOWSKI, J. J. Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives .3. Integrity of Conformation of Non-Ionized Free Base. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1977. v. 99, n. 4, p. 1117-1121.

QU, Y. et al. Cisplatin as a Synthone - Synthesis and Characterization of Triplatinum Complexes Containing 3 Cis-Pt(Amine)₂ Units Linked in a Linear Fashion. **Inorganic Chemistry**, Washington, 1993. v. 32, n. 11, p. 2591-2593.

RABER, J.; ZHU, C. B.; ERIKSSON, L. A. Theoretical study of cisplatin binding to DNA: The importance of initial complex stabilization. **Journal of Physical Chemistry B**, Maryland Heights, 2005. v. 109, n. 21, p. 11006-11015.

RAMSEY, N. F. Magnetic Shielding of Nuclei in Molecules. **Physical Review**, Maryland Heights, 1950. v. 78, n. 6, p. 699-703.

ROSENBERG, B. et al. Platinum Compounds - a New Class of Potent Antitumor Agents. **Nature**, New York, 1969. v. 222, n. 5191, p. 385-&.

SANDLER, C. et al. Chemically modified tetracyclines induce apoptosis in cultured mast cells. **International Immunopharmacology**, Maryland Heights, 2005. v. 5, n. 11, p. 1611-1621.

SMITH, A. Cisplatin: The Invention of an Anticancer Drug. 2009. Disponível em: <<http://www.chemcases.com/cisplat>>. Acesso em: 20 jan. 2009

STEZOWSKI, J. J. Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives .1. Molecular-Structure and Conformation of Free Base Derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1976. v. 98, n. 19, p. 6012-6018.

STRATMANN, R. E.; SCUSERIA, G. E.; FRISCH, M. J. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. **Journal of Chemical Physics**, Melville, 1998. v. 109, n. 19, p. 8218-8224.

SUMMA, N. et al. Thermodynamic and kinetic studies on reactions of Pt(II) complexes with biologically relevant nucleophiles. **Inorganic Chemistry**, Washington, 2006. v. 45, n. 7, p. 2948-2959.

SYED, S. et al. A phase I and pharmacokinetic study of Col-3 (metastat), an oral tetracycline derivative with potent matrix metalloproteinase and antitumor properties. **Clinical Cancer Research**, New York, 2004. v. 10, n. 19, p. 6512-6521.

SZABO, A. O., N. . **Modern Quantum Chemistry - Introduction to Advanced Electronic Structure Theory** New York: Dover Pubs., 1996. 481 p.

WESSELS, J. M. et al. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg²⁺ and Ca²⁺: A spectroscopic study. **Journal of Physical Chemistry B**, Maryland Heights, 1998. v. 102, n. 46, p. 9323-9331.

WOLINSKI, K.; HINTON, J. F.; PULAY, P. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for Nmr Chemical-Shift Calculations. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1990. v. 112, n. 23, p. 8251-8260.

ZAMBLE, D. B.; LIPPARD, S. J. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy (vol 20, 435 1995). **Trends in Biochemical Sciences**, Maryland Heights, 1996. v. 21, n. 1, p. 38-38.

ZHU, C. B.; RABER, J.; ERIKSSON, L. A. Hydrolysis process of the second generation platinum-based anticancer drug cis-amminedichlorocyclohexylamineplatinum(II). **Journal of Physical Chemistry B**, Maryland Heights, 2005. v. 109, n. 24, p. 12195-12205.

APÊNDICE A

APENDICE A – ASPECTOS ESTRUTURAIS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS: APLICAÇÕES DE METODOLOGIAS TEÓRICAS

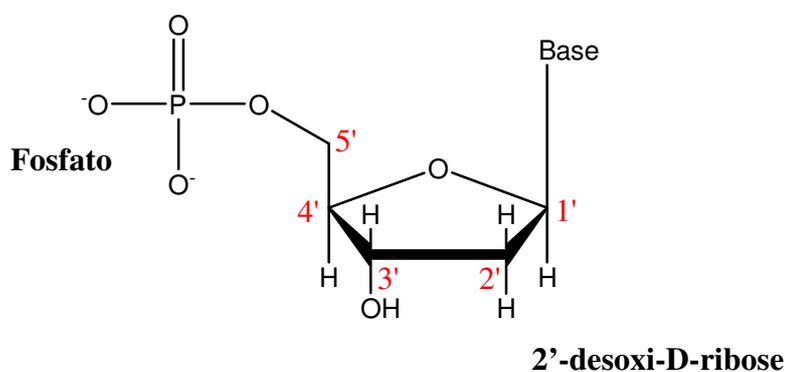
Há mais de meio século, a humanidade entrou no que hoje pode ser chamada de “era da biologia molecular”. Este início foi marcado pela descoberta da estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA), ocorrida em fevereiro de 1953, quando o biólogo norte-americano James Watson e o físico inglês Francis Crick postularam um modelo tridimensional para estrutura do DNA (Watson e Crick, 1953); evento considerado um dos mais importantes do século XX (Van Holde, Johnson e Ho, 1998; Rappe e Caewit, 2000; Ferreira, 2003).

A estrutura proposta, baseada na análise de dados de difração de raios X, é constituída de uma dupla hélice, na qual cada fita é formada pela união das unidades nucleotídicas, que consistem em um grupo fosfato ligado a um açúcar, a 2'-desoxi-D-ribose, que por sua vez pode estar ligada a quatro diferentes nucleobases: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) (Esquema A). Os nucleotídeos se unem através dos grupos fosfatos, formando um *esqueleto* hidrofílico composto por desoxirribose e *fosfato* no exterior da molécula, chamado “esqueleto açúcar-fosfato”. A dupla hélice é sustentada pela formação de ligações de hidrogênio entre pares de bases específicos ou complementares. A modelagem da estrutura do DNA permitiu a Watson e Crick à explicação de diversos processos fundamentais em genética: mutação, replicação, codificação da mensagem genética, tudo pode ser entendido observando o modelo proposto. A estrutura além de elegante explicava todas as observações que haviam sido feitas por outros pesquisadores que também investigavam a estrutura do DNA (Ferreira, 2003). A descoberta desta estrutura tridimensional do DNA culminou no prêmio Nobel de medicina aos seus idealizadores em 1962 (Nobelprize.Org, 2009).

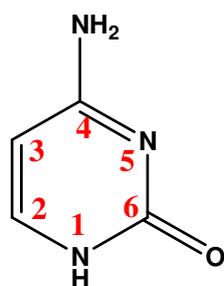
O conhecimento da estrutura do DNA possibilitou não somente o entendimento e o avanço na área da genética, da biologia molecular e celular, como também da bioquímica abrindo caminhos para elucidar mecanismo de ação de compostos cujo alvo principal é a própria molécula do DNA. Nesse sentido podemos destacar anticancerígenos à base de metais inorgânicos como a cisplatina (Hambley, 2007). Como já foi introduzido anteriormente (ver seção 1.2), a cisplatina é um dos fármacos mais usados em todo mundo no tratamento de diversos tumores. Seu potencial antitumoral está diretamente relacionado à sua coordenação as bases nitrogenadas do DNA (Bernges e Holler, 1991; Kozelka *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2006; Jung e Lippard, 2007), tornando relevante o estudo dos processos de interação no nível molecular.

A estrutura do DNA, bem como as diferentes conformações que essas podem apresentar, é cada vez mais explorada experimentalmente com o avanço nas técnicas de análises. Além da difração de raios X, técnicas como RMN e eletroforese em gel têm permitido caracterizar e explorar novas formas do DNA. Além dos estudos experimentais, o avanço na computação científica tem possibilitado estudos importantes para o entendimento da estrutura, dinâmica e propriedades energéticas do DNA (Lu e Olson, 2003; Fan e Zhang, 2006; Robertazzi e Platts, 2006), como relatado por Hobza (Hobza e Sponer, 1999) e co-autores em um artigo de revisão que reporta o grande número de trabalhos aplicando dinâmica clássica e cálculos *ab initio* no estudo dos ácidos nucleicos. Entretanto, o DNA é uma macromolécula estruturalmente complexa, o que limita a aplicação de métodos teóricos a pequenos modelos, como por exemplo, os pares de bases isolados.

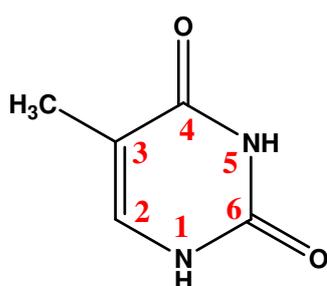
O interesse em estudar sistemas moleculares grandes, como o DNA, levou ao desenvolvimento de metodologias precisas e viáveis computacionalmente, que não exigem novos parâmetros, mas que incluem contribuições importantes para prever propriedades moleculares, além de permitirem a substituição da mecânica molecular por qualquer outro método quântico. Nesse sentido destacam-se os métodos híbridos, que serão foco desse trabalho, buscando uma metodologia eficaz e viável computacionalmente para cálculos com seqüências nucleotídicas.



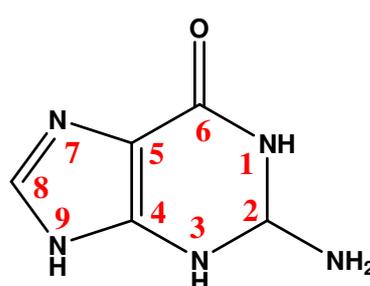
BASES:



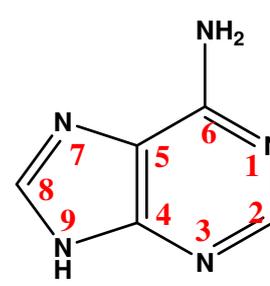
CITOSINA (C)



TIMINA (T)



GUANINA (G)



ADENINA (A)

Esquema A Estrutura do nucleotídeo.

A.1 METODOLOGIA DE CÁLCULO

Com o objetivo de estabelecer uma metodologia adequada para otimizar sequências nucleotídicas com a maior precisão possível, dentro dos limites computacionais despendidos no nosso laboratório, primeiramente, foi realizada uma busca por uma sequência nucleotídica resolvida experimentalmente. Uma sequência de um B-DNA, composta com doze pares de bases nitrogenadas foi tomada como referência (Figura A.1). Essa geometria foi obtida no estado sólido (difração de raios X) por Moras e colaboradores (Timsit, Vilbois e Moras, 1991) e está depositada no *Protein Data Bank* sob o código 330D (Pdb, 2009). As moléculas de água foram eliminadas da estrutura e prótons adicionados aos grupos fosfatos para neutralizar o sistema. Esse dodecâmero foi escolhido por apresentar pontos de interesse para futuros estudos com compostos platinados, uma vez que é bem descrito na literatura a preferência da platina(II) em se ligar principalmente com as sequências GpG. Cálculos de otimização de geometria foram realizados nos níveis de mecânica molecular (UFF) (Casewit, Colwell e Rappe, 1992; Rappe e Casewit, 2000), semi-empírico (PM3MM) (Stewart, 1989a; 1989b), Hartree-Fock (HF/LANL2MB, HF/ LANL2DZ) e método híbrido QM:MM ONIOM (HF/LANL2DZ: UFF, B3LYP/LANL2DZ:UFF) (Vreven e Morokuma, 2000b), que será melhor descrito na próxima seção.

Numa segunda etapa foram realizados cálculos de otimização de geometrias a partir de sequências “ideais”, geradas no programa Hyperchem (HyperChem™ Release 4) visando eliminar possíveis influências relacionadas a defeitos da estrutura de raios X. Foram aplicados cálculos ONIOM, previamente testados com as estruturas inicialmente tomadas como referência.

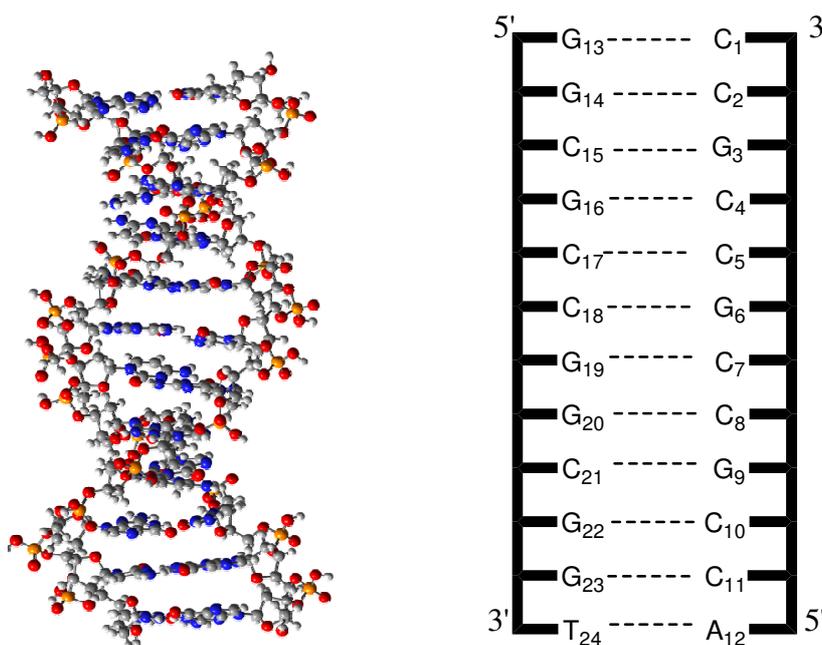


Figura A.1 Estrutura de difração de raios X de um B-DNA (Composta por 12 pares nucleotídicos com um total de 755 átomos), depositada no PDB sob o código 330D (Pdb, 2009).

Estudos teóricos de sistemas macromoleculares têm sido realizados baseando-se em campos de força da mecânica molecular (Hobza e Sponer, 1999; Rappe e Caewit, 2000). Tal metodologia é bastante útil na análise de sistemas que possam ter suas interações atômicas reproduzidas adequadamente por um campo de força aplicado. A mecânica molecular tem sido amplamente utilizada em sistemas macromoleculares na área da bioquímica e ainda em casos onde um grande número de cálculos é necessário, como em estudos envolvendo dinâmica molecular (DM). A grande limitação da MM é o fato de desconsiderar os efeitos eletrônicos e as interações entre os ligantes, prejudicando os resultados encontrados (Casewit, Colwell e Rappe, 1992). Tais efeitos podem ser obtidos aplicando métodos de mecânica quântica (MQ), mas os tamanhos dos sistemas limitam a aplicação dos mesmos.

Uma estratégia que vem sendo aplicada a sistemas moleculares grandes são os chamados métodos híbridos, uma forma encontrada para tentar aproveitar as vantagens de cada aproximação, ou seja, da mecânica quântica (Jansen, 1999; Levine, 2000) e da mecânica molecular, contornando às suas limitações. Os métodos combinados (híbridos) de mecânica quântica e mecânica molecular são conhecidos como QM/MM e trata-se de uma aproximação que envolve a divisão do sistema em regiões QM e MM, onde a energia é determinada parte pelo cálculo de estrutura eletrônica por mecânica quântica e parte pelo campo de força da

mecânica molecular. Essa separação conceitualmente pode ser explicada como atribuições específicas dos métodos em diferentes partes da molécula. Em outras palavras, nas regiões onde existem átomos não parametrizados, interações “incomuns” ou átomos diretamente participantes de um estado de transição de uma reação, são aplicados métodos quânticos, computacionalmente caros, enquanto que no restante do sistema, constituído por átomos parametrizados e interações consideradas simples, pode-se usar métodos mais simples e rápidos, como os baseados em mecânica molecular. Os métodos QM/MM são especialmente adequados a sistemas orgânicos e inorgânicos que possuem sítios de interesse (p.e. centro ativo) concentrados numa região particular da molécula. Estudos com complexos de metais de transição são especialmente beneficiados por esses métodos devido aos grandes ligantes orgânicos que podem ser tratados classicamente (Robertazzi e Platts, 2006; Payne *et al.*, 2008a). Outros tantos sistemas são tratados com métodos QM/MM apresentando bons resultados (Morokuma *et al.*, 2004; Re e Morokuma, 2004; Ohmiya, Morokuma e Yokoyama, 2005; Ohmiya e Morokuma, 2006; Robertazzi e Platts, 2006; Payne *et al.*, 2008b).

O primeiro cálculo com um potencial híbrido foi realizado na década de 70, por Warshel e Levitt (Warshel e Levitt, 1976). Neste trabalho eles estudaram uma reação química dentro de uma enzima. Já na década de 80 Singh e Kolman propõem uma maneira prática de uso da metodologia híbrida. Nesta etapa do trabalho foi dada ênfase nos modelos QM/MM que surgiram por volta de 1995, como a proposta de Morokuma e colaboradores (Vreven e Morokuma, 2000b).

Basicamente os métodos híbridos usam diferentes metodologias para diferentes partes da molécula e a partição do sistema pode ser representada pela Figura abaixo:

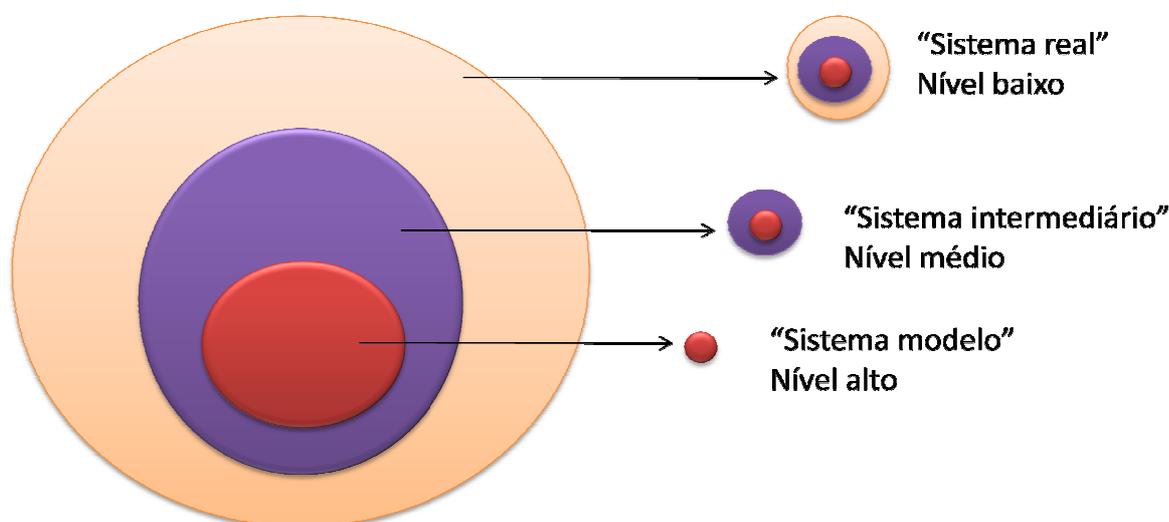


Figura A.2 Modelo esquemático representando as camadas de diferentes níveis de cálculos.

É importante observar que as partições do sistema ou as camadas não precisam ser contínuas, podendo ser definidas em qualquer parte do sistema. As camadas podem estar explícitas em uma parte do sistema e aparecer também em outras partes não consecutivas do sistema.

A metodologia QM/MM limita o cálculo quântico à região do modelo. O cálculo MM é aplicado a todo o sistema. A maior parte das abordagens que combinam o uso de mecânica quântica e mecânica clássica são chamadas convencionais. Nessa abordagem o tratamento quântico e o tratamento clássico se dão ao mesmo tempo. Na maioria dos métodos QM/MM já implementados o hamiltoniano do sistema é escrito como:

$$H = H^{QM} + H^{MM} + H^{QM/MM} \quad (A.1)$$

na qual H^{QM} é o hamiltoniano da região na qual são usados cálculos quânticos no vácuo, H^{MM} é a energia potencial U da mecânica clássica e $H^{QM/MM}$ é o hamiltoniano de interação entre as regiões de QM e MM. O hamiltoniano $H^{QM/MM}$ é geralmente aproximado como interações entre cargas (elétrons e núcleos) da região QM e cargas atômicas clássicas parciais nos átomos da região MM. Tal tratamento é chamado de acoplamento mecânico e é representado por:

$$H^{QM/MM} = - \sum_i \sum_M \frac{Q_M}{r_{i,M}} + \sum_\alpha \sum_M \frac{Z_\alpha Q_M}{R_{\alpha,M}} + \sum_\alpha \sum_M \epsilon_{\alpha M} \left[\left(\frac{R_{\alpha M}^*}{R_{\alpha M}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\alpha M}^*}{R_{\alpha M}} \right)^6 \right] \quad (A.2)$$

onde i e α denotam, os elétrons e o núcleo na região QM, respectivamente, enquanto M denota um átomo com carga atômica parcial Q_M na região clássica. Nessa aproximação, a interação é tratada classicamente, ou seja, cargas parciais são atribuídas aos átomos da região quântica de modo a interagir com as cargas parciais da região clássica. Esse tratamento perde por não permitir, em princípio, que o subsistema quântico seja polarizado pela parte clássica.

Além da interação entre as camadas, outro fator importante é quanto ao truncamento das mesmas. Quando o sistema não apresenta ligações covalentes entre as regiões pode-se dizer que os limites dessas regiões são estabelecidos pela própria molécula, por exemplo, no caso de alguns compostos de inclusão, onde a molécula hospedeira limita uma região externa e a molécula incluída uma região interna (Figura A.3). Entretanto em muitos sistemas, principalmente em macromoléculas orgânicas, será preciso em algum momento quebrar ligações covalentes (Figura A.4a), sendo importante redefinir os átomos que farão parte da

região interna. A solução mais popular é preencher a valência com átomos, usualmente de hidrogênio (Figura A.4b) que são chamados de “*link atoms*” ou “átomos de ligação” (Warshel e Levitt, 1976; Vreven e Morokuma, 2000a; 2000b; Re e Morokuma, 2001; Vreven *et al.*, 2001; Vreven e Morokuma, 2001; Tschumper e Morokuma, 2002; Vreven *et al.*, 2003; Morokuma *et al.*, 2004; Re e Morokuma, 2004). É válido ressaltar que esses átomos de ligação não estão representados na expressão usada para descrever a interação entre as regiões do sistema, sendo algumas vezes questionável o uso dos mesmos, visto que freqüentemente não são subtraídos da expressão da energia final e podem polarizar incorretamente a região do sistema QM.

A escolha do limite entre as regiões do sistema é muito importante. Alguns estudos têm mostrado que uma escolha imprópria pode levar a resultados finais de pouca confiança. Não existem regras rigorosas para essa escolha, mas há algumas recomendações que podem ser seguidas:

- I. Algumas ligações que estão sendo formadas ou quebradas devem ficar inteiramente na região QM do cálculo.
- II. Regiões com mudanças de hibridização devem ficar na região QM.
- III. Sistemas de conjugação ou região aromática devem ficar completamente numa única região.
- IV. Método QM/MM não permite transferência de carga entre diferentes regiões do sistema, portanto, a partição não deve ocorrer em seções onde são operadas transferências de carga.

A diferença entre os tipos de métodos híbridos está na forma de tratar as regiões limites da molécula. Os métodos híbridos que surgiram na década de 90 fazem parte de uma nova geração de métodos integrados, dos quais os mais comuns são o IMOMM (Genest *et al.*, 2006) (*Integrated molecular orbital + molecular mechanics*), IMOMO (Vreven e Morokuma, 2000a) (*integrated molecular orbital + molecular orbital*) e o método testado nesse trabalho, o ONIOM (Vreven e Morokuma, 2000b) (*N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics*).

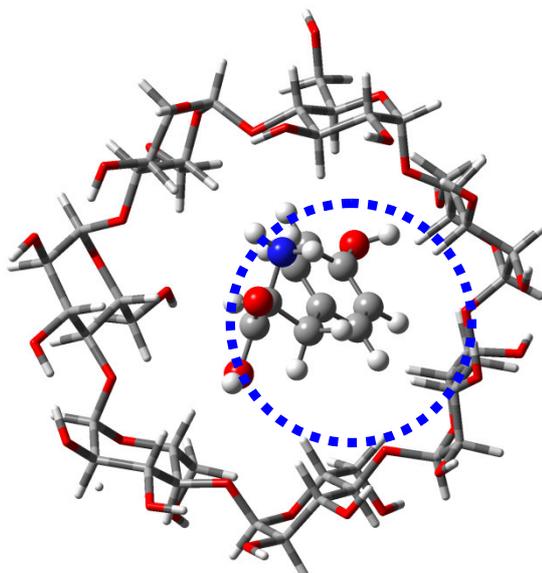


Figura A.3 Representação do limite entre as camadas de cálculo.

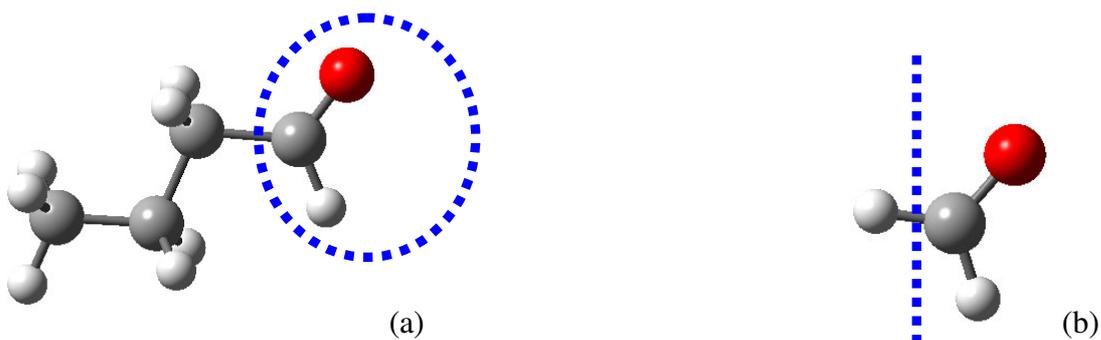


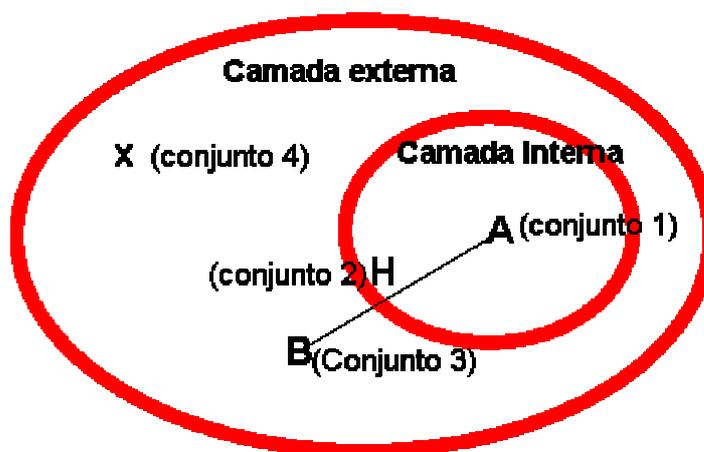
Figura A.4 (a) quebra de ligação covalente; (b) preenchimento da valência com o átomo de H.

A.2 O MÉTODO ONIOM

Na busca por um método que fosse a generalização dos outros já existentes e que permitisse a combinação de diversas metodologias, permitindo uma melhor representação do sistema modelo, bem como de todo o sistema “real”, surge um novo método que ficou conhecido como ONIOM (*N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics*). O conceito do ONIOM é bastante simples. Como mencionado anteriormente, no ONIOM você pode tratar diferentes partes da molécula com diferentes metodologias de cálculo. O sítio ativo ou a parte onde se tenha um maior interesse é tomado como sistema modelo e deve, então, ser tratado em um nível alto de teoria, enquanto o restante da molécula em um nível mais baixo de teoria. De forma generalizada o sistema pode ser dividido em diferentes níveis, os quais podem estar ligados a qualquer ordem e cada um tem liberdade para ser tratado com

o método que se queira e ao integrar-se os métodos para cada parte da molécula, tem-se a extrapolação do resultado para níveis altos de precisão sobre a molécula como um todo.

Como já foi também mencionado, a valência nas camadas formadas são preenchidas eventualmente por átomos de hidrogênio, chamados átomos de ligação e a maneira como esses átomos são tratados é um aspecto importante no método ONIOM. O tratamento dos átomos de ligação é um importante fator nos cálculos com métodos integrados. A Figura A.4 pode ser representada como no Esquema (A.2).



Esquema A.2 Representação esquemática da divisão de camadas no cálculo ONIOM.

onde os átomos presentes no sistema modelo representam o conjunto 1 (representados por A) e tem coordenadas R_1 . O conjunto 2 são os átomos artificialmente introduzidos (átomos links, H) de coordenadas R_2 . Os átomos ligados no sistema modelo (representados por B) são descritos por R_3 . Os demais átomos são chamados conjunto 4 (representados por X) com coordenadas R_4 . Logo a geometria do sistema real é descrita por R_1 , R_3 e R_4 que são coordenadas independentes no ONIOM.

$$E_{ONIOM} = E_{ONIOM}(R_1, R_3, R_4) \quad (A.3)$$

Os átomos de ligação têm coordenadas R_2 dependentes, embora o funcional explícito de R_2 possa ser escolhido arbitrariamente, os átomos são usados para substituir as interações covalentes do sistema real, devendo reproduzir fielmente o movimento dos átomos originais. R_2 pode ser escrito como:

$$R_2 = f(R_1, R_3) \quad (A.4)$$

Os átomos do conjunto 2 (representados por H) tem ângulos diedros e de ligação iguais aos átomos do conjunto 3, ou seja, os átomos de ligação são sempre colocados ao longo dos vetores de ligação do sistema real (eixo A-B no esquema 6.2). Entretanto a posição exata de r_2 ao longo da ligação A-B ($r_3 - r_1$) é obtida com a introdução de um fator de escalonamento (ou parâmetro de distância) g . Assim,

$$r_2 = r_1 + g(r_3 - r_1) \quad (A.5)$$

Se a distância entre A-B ($r_3 - r_1$) muda durante a otimização da geometria, a distancia de A-H ($r_2 - r_1$) também muda. Na realidade g é uma constante de proporcionalidade entre as distâncias de A-B e A-H.

O valor razoável para o parâmetro g depende da natureza dos átomos envolvidos. Por exemplo, para substituir uma ligação C-C por C-H, um razoável valor de g seria a razão entre a distância padrão da ligação C-H (1,084 Å) pela ligação C-C (1,528 Å), g seria 0,709 Å. No Gaussian 03, se o parâmetro g não é especificado automaticamente o programa toma g como a razão entre o somatório do raio covalente do conjunto 2 e conjunto 1 pelo raio covalente do conjunto 3 e conjunto 1.

O fator importante é como a interação entre as camadas é feita. Se a energia total é dada por:

$$E(R_1, R_3, R_4) = E_{alto}(R_1, R_2) + E_{baixo}(R_3, R_4) + E(R_1, R_3, R_4) \quad (A.6)$$

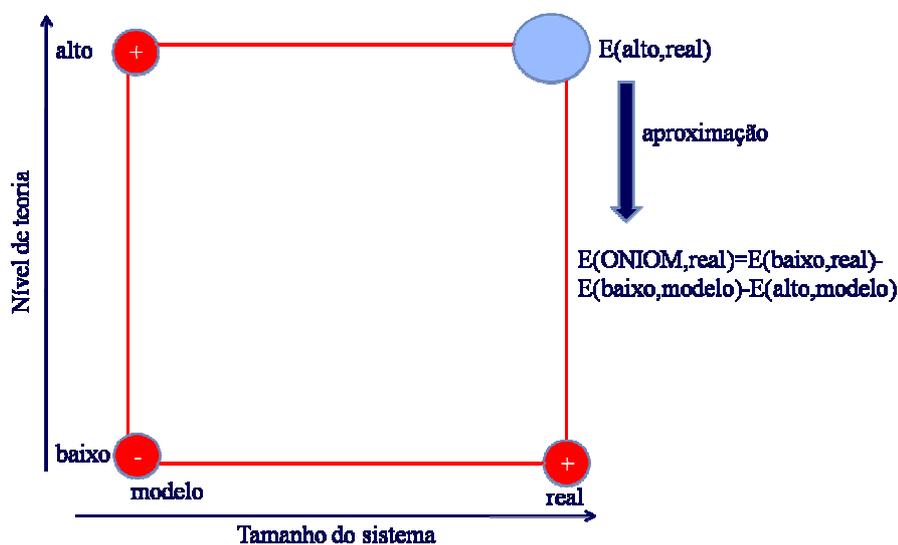
onde R_n são as coordenadas de cada região do sistema, a variável $E(R_1, R_3, R_4)$ é a energia de interação entre as camadas. Entretanto, se a energia total for calculada por:

$$E(R_1, R_3, R_4) = E_{baixo}(R_1, R_3, R_4) + E_{alto}(R_1, R_2) - E_{baixo}(R_1, R_2) \quad (A.7)$$

a interação entre as camadas está sendo tratado num nível baixo. Igualando as duas equações temos:

$$E_{baixo}(R_3, R_4) + E(R_1, R_3, R_4) = E_{baixo}(R_1, R_3, R_4) - E_{baixo}(R_1, R_2) \quad (A.8)$$

onde o termo $E(R_1, R_3, R_4)$ corresponde à interação exata entre as camadas obtida no menor nível de teoria. O esquema de extrapolação de energia ONIOM pode ser melhor compreendido observando o Esquema A.3.



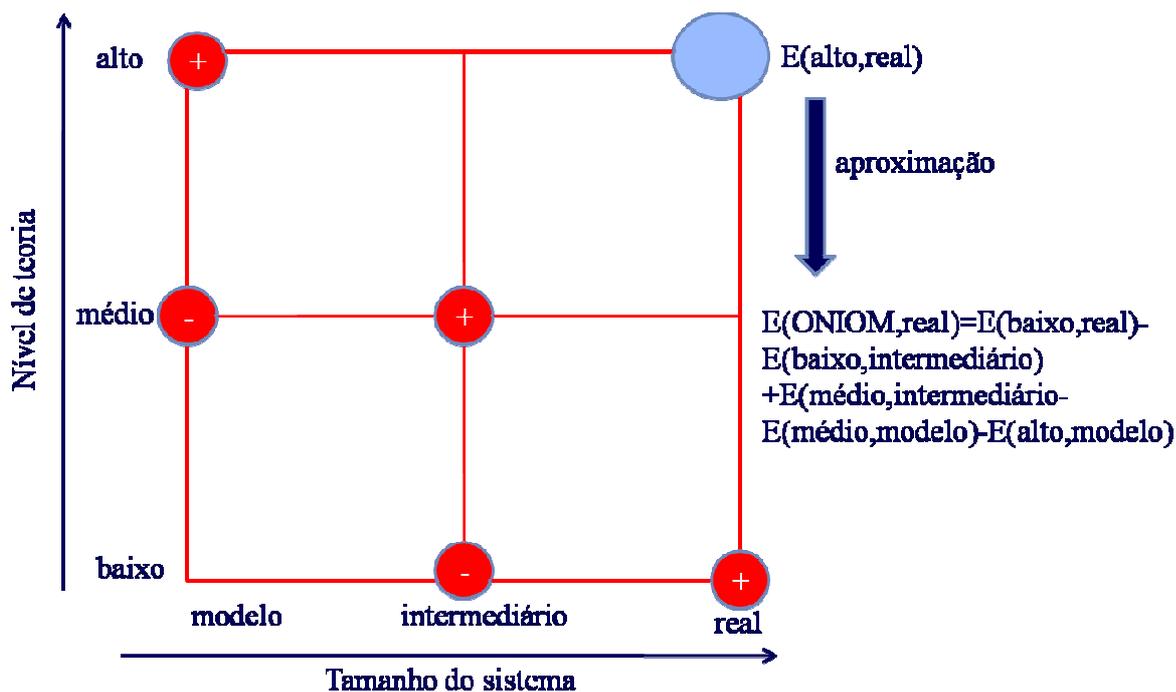
Esquema A.3 Esquema de extrapolação ONIOM.

Nessa ilustração foi representado o nível de teoria pelo tamanho do sistema. Como o objetivo do modelo é descrever o sistema real no nível mais alto de teoria ($E(\text{alto}, \text{real})$). Isto significa fazer uma aproximação e reescrever a equação (6.7).

$$E(\text{ONIOM}, \text{real}) = E(\text{baixo}, \text{real}) - E(\text{baixo}, \text{modelo}) - E(\text{alto}, \text{modelo}) \quad (\text{A.9})$$

Onde a $E(\text{baixo}, \text{real})$ é a energia do sistema real calculada no nível baixo de teoria e as energias $E(\text{baixo}, \text{modelo})$ e $E(\text{alto}, \text{modelo})$ são as energias do sistema modelo calculado no nível baixo e alto, respectivamente. Já a $E(\text{ONIOM}, \text{real})$ é a energia aproximada (extrapolada) que descreve o sistema real num nível mais alto de teoria. Para alguns sistemas a diferença entre essa energia e a verdadeira energia ONIOM é dada por um erro, que pode ser desprezado, uma vez que este é similar nas estruturas participantes das reações, como por exemplo, reagentes e estados de transição.

O esquema pode ser facilmente expandido para três ou múltiplas camadas como mostrado no Esquema A.4.



Esquema 6.4 Expansão do esquema ONIOM para múltiplas camadas.

A.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A complexidade estrutural dos oligonucleotídeos é evidenciada pelas forças responsáveis pela sua estabilidade, principalmente as ligações de hidrogênio. A principal importância dessas interações é quanto à própria formação da estrutura do DNA, uma vez que elas permitem o emparelhamento das bases de forma específica, o que está diretamente relacionado aos processos de replicação do DNA, fazendo com que ocorram quase sem erros. Além das ligações de hidrogênio, as forças hidrofóbicas são também responsáveis pela estabilidade da dupla hélice. Essas forças de interações hidrofóbicas se devem ao fato das bases usualmente se encontrarem parcialmente sobrepostas. Estruturas cristalográficas exibem, com frequência, bases empilhadas apresentando interação *stacking*, que no estado sólido são uma forma de interação de van der Waals (Rappe e Caewit, 2000). Alguns trabalhos discutem bem essas interações, bem como as suas implicações nos processos relacionados ao DNA (Hobza e Spomer, 1999; Robertazzi e Platts, 2006).

Com o objetivo de testar metodologias de cálculo, começamos usando como modelo um dinucleotídeo (pares de base 6 e 7 da estrutura de raios X). A sequência 5'-GpC-3' foi otimizada em diferentes níveis de teoria, mecânica clássica, *ab initio* e método híbrido (QM/MM) segundo o formalismo do ONIOM. A aplicação dos diferentes métodos citados só foi possível devido ao tamanho relativamente pequeno do sistema, até então considerado. A

partir da geometria otimizada (Figura A.5) alguns parâmetros estruturais foram comparados com a estrutura de raios X (Tabela A.1). As distorções são evidentes em algumas estruturas, como aquelas otimizadas com mecânica molecular. Esse resultado já era esperado, pois como já foi mencionado anteriormente, sequências nucleotídicas são sistemas nos quais as interações, principalmente entre átomos não ligados, são de extrema importância na sua estabilidade, e os campos de força da mecânica molecular são ineficientes na representação dessas interações. Os dados estruturais (Tabela A.1) evidenciam o fato de não haver alteração na conformação da geometria do dímero ao ser otimizado em ambos os níveis de cálculo aplicados. Embora seja nítido que a melhor representação do sistema é usando cálculos *ab initio*, os parâmetros da geometria otimizada usando método híbrido são bastante confiáveis, visto que o desvio relativo do diâmetro médio para o CPG é de aproximadamente 2%. Essa observação aliada ao fato do cálculo ONIOM apresentar uma grande diminuição no tempo de CPU, motivaram a continuar investigando diferentes aplicações do método híbrido nesse sistema. Recentemente, Magistrato e Spiegel (Spiegel e Magistrato, 2006) aplicaram a metodologia QM/MM em estudos de dinâmica molecular para interações de drogas com o DNA. Nesse trabalho as regiões QM ficam restritas à molécula da droga e a nucleobase que está covalentemente ligada a ela; já o restante do sistema é tratado com mecânica molecular. As autoras discutem a importância do uso de métodos híbridos, alternativamente, para estudar processos que envolvam macromoléculas.

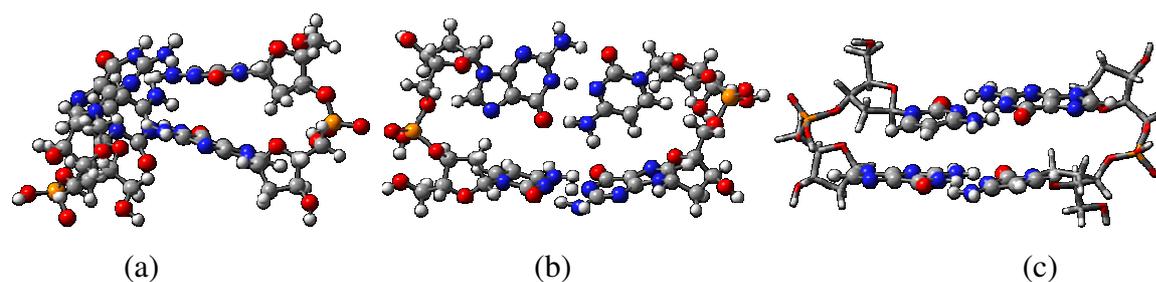
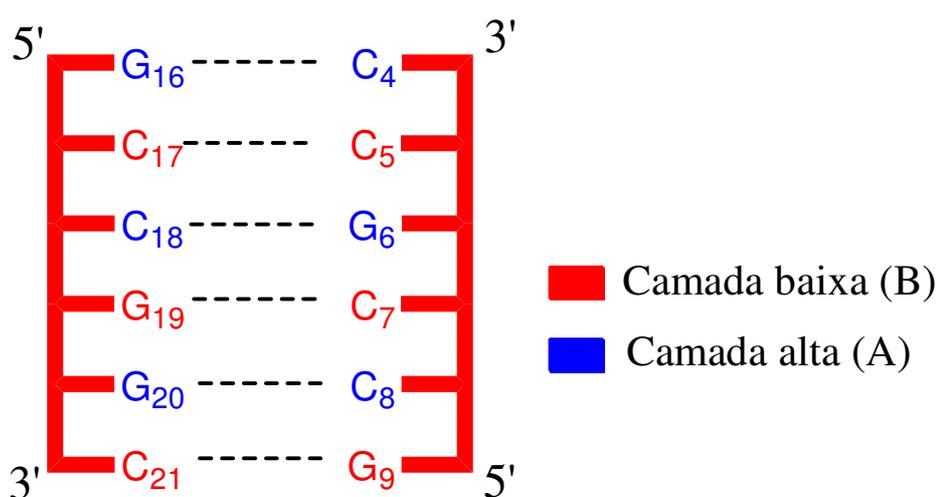


Figura A.5 Geometrias otimizadas (a) UFF (b) HF/LANL2MB (c) ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF). Ball and stick: *high layer* e stick: *low layer*.

Tabela A.1 Parâmetros estruturais para o dímero CpG (valores em Å).

	Eixo principal (O ₆ terminais)	Diâmetro médio (C1'---C1')	Conformação
HF/LANL2DZ	4,39	10,45	<i>anti</i>
UFF	6,73	9,50	<i>anti</i>
PM3MM	4,13	10,79	<i>anti</i>
HF/LANL2DZ:UFF	6,42	10,71	<i>anti</i>
Raios X	5,25	10,46	<i>anti</i>

Para tentar avaliar a melhor aplicação do método híbrido ONIOM na otimização de geometria de oligonucleotídeos foi adotado a seguinte estratégia: a partir do dinucleotídeo central da sequência do dodecâmero tomada como referência (estrutura de raios X), foi sendo aumentado gradativamente o número de pares de base, acrescentando sempre um par de bases acima e um abaixo ao longo da sequência nucleotídica e realizados cálculos de otimização de geometria. Como o método ONIOM permite que as camadas de cálculo sejam distribuídas de maneira aleatória ao longo da molécula, foram realizados testes variando a disposição dessas camadas (camada baixa (B) e camada alta (A)) (Figura A.6). O esqueleto açúcar fosfato foi mantido sempre na camada baixa, já os pares de base foram alternados entre camada baixa e alta.

**Figura A.3** Camadas de cálculo ONIOM. As camadas podem variar de acordo com a sequência.

Para a sequência [5'-GpGpCpC-3'], as geometrias otimizadas usando o método ONIOM com as diferentes combinações das camadas de cálculo são mostradas na Figura A.7. As menores distorções ocorrem quando todos os pares de bases nitrogenadas são mantidos na região de mecânica quântica. As Tabelas A.2 e A.3 apresentam as medidas de distâncias das interações de hidrogênio entre os pares de bases complementares e alguns parâmetros estruturais importantes, como os ângulos diedros ao longo do esqueleto açúcar-fosfato. As interações de hidrogênio são importantes na estabilidade da estrutura, e observando a Tabela A.2 percebemos que essas interações são mantidas e que são também melhores representadas quando estão na camada alta de cálculo. Isto é, a princípio justificável uma vez que o campo de força da mecânica molecular usado nas regiões de camada baixa é o UFF, um campo que dispõe de poucos parâmetros para um grande número átomos, podendo não ser eficiente na descrição de sistemas como o DNA, como discutido por Costa (Costa, 2007) em sua tese de doutorado. Entretanto observa-se que os pares de base tratados com mecânica molecular, mas que ficavam intercalados entre pares de base tratados com mecânica quântica eram melhores descritos mantendo consideravelmente as interações de hidrogênio. Baseados nessa observação foram realizados cálculos procurando manter sempre uma alternância das camadas entre os pares de base.

Tabela A.2 Distâncias (valores em Å) de ligação entre os pares de bases opostos do DNA.

Pares de base		Raios X	ONIOM	Camada de cálculo
	HNH...O ₆	2,43	1,89	
C...G	N...H	2,23	1,95	A
	O...HNH	2,06	1,82	
	HNH...O ₆	2,05	2,59	
c...G	N...H	2,04	2,84	B
	O...HNH	1,81	3,42	
	O ₆ ...HNH	1,70	1,79	
G...C	N...H	1,69	1,93	A
	HNH...O	1,59	1,84	
	O ₆ ...HNH	2,12	-	
G...C	N...H	2,28	-	B
	HNH...O	2,42	-	

Tabela A.3 Comparação dos ângulos de torção (graus) para fragmentos do DNA.

Combinação das camadas	χ	α	β	γ	δ	ϵ	ζ
Raio-X (5'-CPCPGPG-3')	-105	126	42	138	-146	-144	-55
AAAA(5'-CPCPGPG-3')	-112	143	60	92	-149	-142	-74
ABAB(5'-CPCPGPG-3')	-114	164	66	89	-170	-60	-82

O4'---C1' χ -N9---C4 para A ou G e O4'---C1' χ -N9---C2 para T ou C
 ---P α -O5' β -C5' γ -C4' δ -C3' ϵ -O3' ζ -P

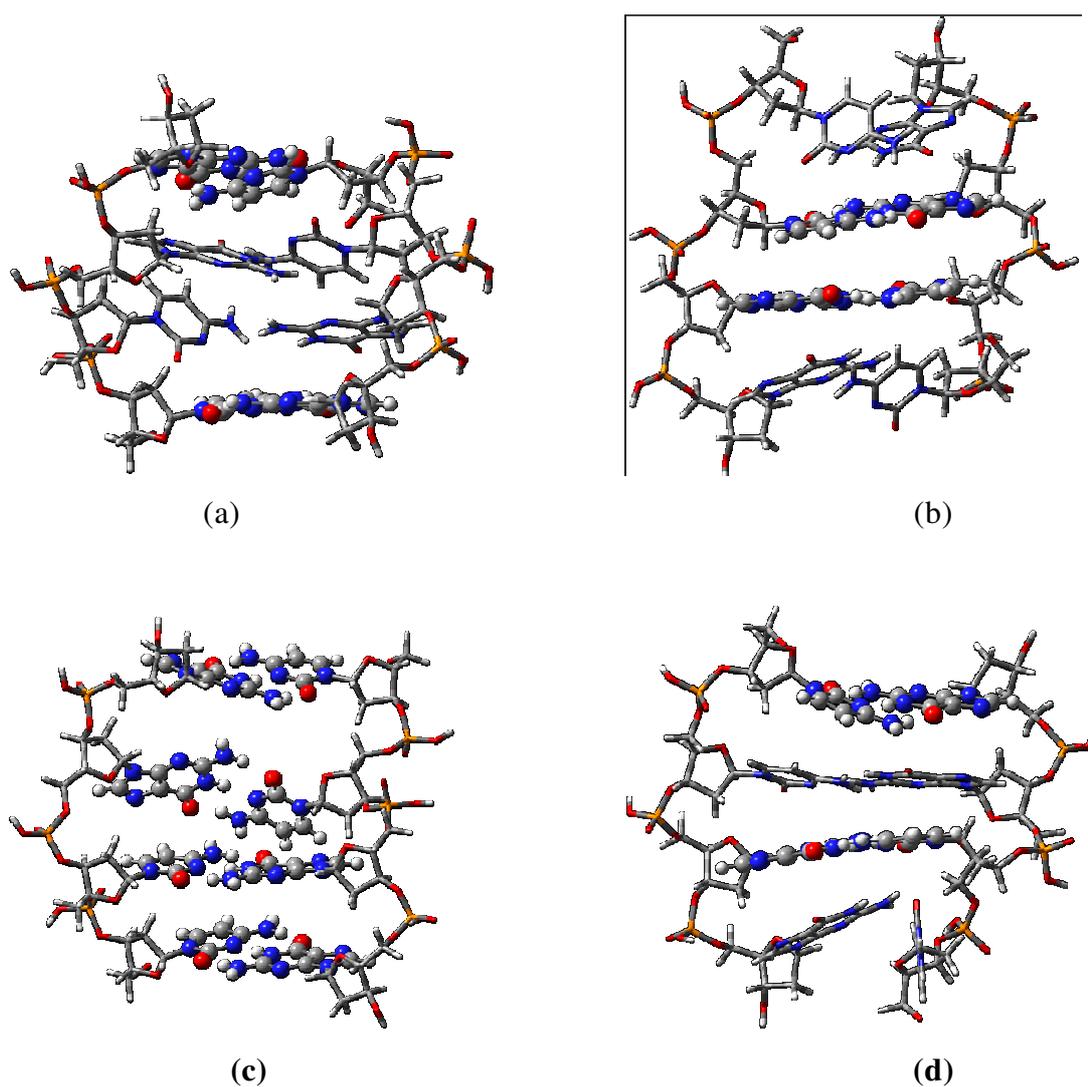


Figura A.7 Geometrias do DNA(5'-CP*CP*GP*G-3') otimizadas usando ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF) Ball and stick: *high layer* e stick: *low layer*. (a) camada ABAB (b) BAAB (c) AAAA (d) BABA.

Para avaliar melhor a eficiência da alternativa proposta, a sequência foi aumentada para oito pares de bases da estrutura de raios X. As distâncias das interações de hidrogênio são mostradas na Tabela A.4. Observando as distâncias de ligação é possível concluir que a

metodologia híbrida ONIOM, dispondo as camadas de maneira alternada é uma alternativa razoável para otimizar seqüências nucleotídicas. A Figura A.8 mostra a estrutura completamente otimizada. O maior problema na representação da geometria ocorre nas extremidades, sugerindo que é necessário distribuir as camadas de maneira a manter sempre os pares de base das extremidades em um nível alto de cálculo. Os demais pares de base que não estão na extremidade da seqüência estão dispostos quase que paralelos, mantendo a estrutura regular. O fato dos pares de base estarem mais coplanares facilita as interações hidrofóbicas (π -stacking) estabilizando a molécula da dupla hélice, além de facilitar a interação com moléculas externas.

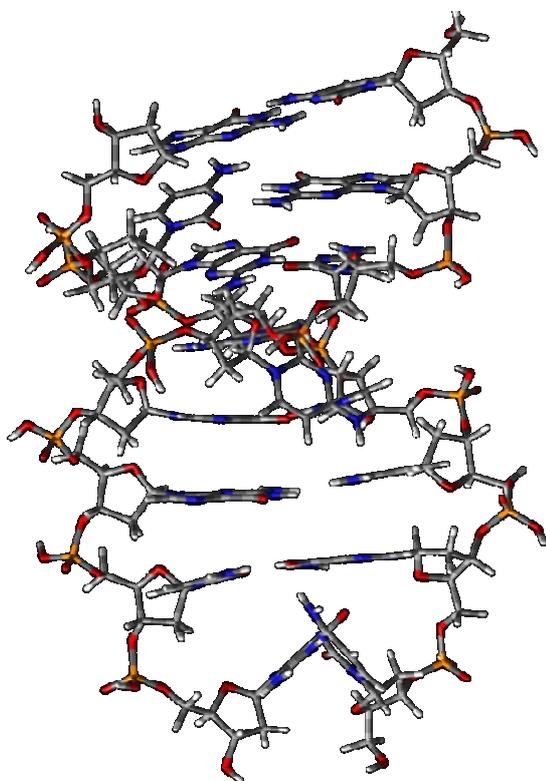


Figura A.8 Geometria do DNA(5'-(CP*GP*CP*CP*GP*GP*CP*G)-3') otimizada usando ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF), camadas ABABABAA.

Tabela A.4 Distâncias (valores em Å) de ligação entre os pares de bases opostos do DNA.

Pares de base		Raios X	ONIOM	Camada de cálculo
C····G	HNH····O₆	2,13	1,78	
	N····H	2,24	1,96	A
	O····HNH	2,38	1,91	
G····C	O₆····HNH	3,09	2,82	
	N····H	2,49	2,68	B
	HNH····O	2,02	2,91	
C····G	HNH····O₆	2,12	1,86	
	N····H	2,28	1,89	A
	O····HNH	2,42	1,81	
C····G	HNH····O₆	1,70	-	
	N····H	1,69	-	B
	O····HNH	1,59	-	
G····C	O₆····HNH	2,06	1,77	
	N····H	2,04	1,91	A
	HNH····O	1,82	1,88	
G····C	O₆····HNH	2,43	2,79	
	N····H	2,23	2,67	B
	HNH····O	2,06	2,60	
C····G	HNH····O₆	2,93	1,76	
	N····H	2,16	1,98	A
	O····HNH	1,66	1,98	
G····C	O₆····HNH	-	-	
	N····H	-	-	A
	HNH····O	-	-	

No caso da sequência em questão as interações entre os pares de base que não são mantidos, sobretudo, nas extremidades da sequência de oito pares de base são justificáveis, uma vez que essas ligações já não são bem representadas na estrutura de raios X, como discutido por Moras e colaboradores. Segundo eles ocorre formação de ligações de hidrogênio entre o oxigênio do grupo fosfato e o grupo amino da sequência C3-C21 e C6-C18 (ver Figura A.1). A Citosina (C3) compõe exatamente o par de bases da extremidade do octâmero que foi otimizado (Figura A.8), o que explica as distorções observadas, principalmente o fato das

ligações de hidrogênio entre os pares de base complementares C3-G22 não serem representadas mesmo quando tratadas com um nível alto de cálculo, como mostra a Tabela A.4. As ligações de hidrogênio entre os pares C6-C19 que na estrutura otimizada também não são bem representadas, poderiam a princípio sugerir que fosse um efeito do cálculo que nesse par de bases foi feito com mecânica molecular (camada baixa), entretanto essa deformação também é um defeito proveniente da própria estrutura experimental. Mais uma vez a metodologia parece ser satisfatória, uma vez que as interações observadas na estrutura de raios X são mantidas.

Como a geometria tomada como ponto de partida para os cálculos de otimização foi obtida por difração de raios X, observou-se que isso poderia prejudicar a avaliação do método aplicado. Para reavaliar e validar a metodologia que se destacou até aqui, foram realizados cálculos com as geometrias “ideais” geradas no programa Hyperchem. As sequências “ideais” [5'-GpGpCpC-3'], [5'-ApGpGpA-3'] e [5'-GpApGpGpApApApGpT-3'] foram otimizadas usando o método ONIOM com camadas alternadas.

Observando os dados referentes às geometrias “ideais” otimizadas com a metodologia ONIOM é evidenciado o fato de o método influenciar mais na representação das interações de hidrogênio, em geral, quando o par de bases está disposto na camada baixa de cálculo, ou seja, mecânica molecular apresenta uma discrepância do valor esperado para esse tipo de interação (Ver Tabela A.5.) para sequência [5'-GpApGpGpApApApGpT-3'].

Tabela A.5 Distâncias (valores em Å) de ligação entre os pares de bases opostos do DNA “ideal” (ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF) para sequência [5'-GpApGpGpApApApGpT-3'].

Pares de base	Sequência inicial	Sequência otimizada	Camada de cálculo	
	O ₆ -····HNH	1,70	1,80	
G····C	H····N	1,92	1,94	A
	HNH····O	2,01	1,90	
	N····H	1,95	2,70	
A····T	HNH····O	1,81	2,60	B
	O ₆ -····HNH	1,70	1,79	
G····C	H····N	1,92	1,92	A
	HNH····O	2,01	1,88	
	O ₆ -····HNH	1,70	2,64	
G····C	H····N	1,92	2,76	B
	HNH····O	2,00	3,12	
	N····H	1,81	1,79	
A····T	HNH····O	1,95	2,01	A
	N····H	1,81	-	
A····T	HNH····O	1,95	-	B
	N····H	1,81	1,75	
A····T	HNH····O	1,95	2,19	A
	O ₆ -····HNH	1,70	2,64	
G····C	H····N	1,92	2,72	B
	HNH····O	2,00	3,03	
	H····N	1,81	1,97	
T····A	O····HNH	1,95	1,86	A

O fato dessas interações não serem muito bem representadas faz com que o diâmetro médio da dupla hélice sofra uma variação relevante, como mostra a Tabela A.6, a partir da medida da distância entre os grupos fosfatos interfitas. Entretanto as regiões tratadas com mecânica quântica são bem representadas. A Figura A.6 mostra que algumas regiões da sequência são menos sensíveis para alguns pares de base específicos que se repetem, onde o diâmetro variou menos com a otimização, caso da região com três pares A---T (ver Figura A.9).

Tabela A.6 Diâmetro (valores em Å) dos nucleotídeos para a sequência “ideal” [5'-GpApGpGpApApApGpT-3']. Calculados no nível ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF).

$(\text{PO}_3)\text{O}\cdots\text{O}(\text{PO}_3)$	Sequência inicial	Sequência otimizada	Camada de cálculo
G····C	19,57	21,32	A
A····T	19,63	21,17	B
G····C	19,58	21,04	A
G····C	19,58	20,82	B
A····T	19,57	19,72	A
A····T	19,57	19,72	B
A····T	19,57	19,30	A
G····C	19,63	20,66	B
T····A	19,63	20,92	A

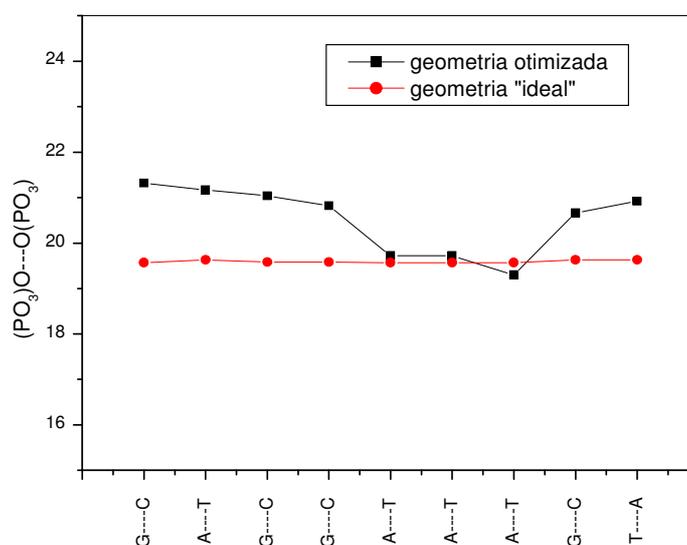


Figura A.9 Distância entre os pares de base interfitas.

As distâncias entre os pares de base sobrepostos ao longo da sequência mostrados nas tabelas A.7, A.8 e A.9, para as sequências “ideais” [5'-GpApGpGpApApApGpT-3'], [5'-GpGpCpC-3'] e [5'-ApGpGpA-3'] (ver Figuras A.10 e A.11) respectivamente, parecem sofrer menor influência do método de cálculo aplicado. Podemos perceber que o desvio em relação ao valor inicial é bastante pequeno em todas as sequências otimizadas, tanto nas camadas altas quanto nas baixas. Para as sequências [5'-GpGpCpC-3'] e [5'-ApGpGpA-3']

foi avaliado a aplicação do funcional de densidade no método ONIOM, usando o funcional B3LYP. As sequências foram otimizadas no nível de teoria (ONIOM(B3LYP/LANL2DZ:UFF). Alguns parâmetros estão descritos nas Tabelas A.8 e A.9 e em comparação com os cálculos (ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF) ocorrem variações muito pequenas, que não justificam a aplicação dessa metodologia, podendo assim garantir, a princípio, que as interações hidrofóbicas estão sendo mantidas com a metodologia aplicada. É importante observar esses parâmetros, pois os mesmos permitem avaliar a estrutura do DNA, observando as variações nos chamados sulco maior e sulco menor, que por sua vez estão diretamente relacionados à sua interação com outras biomoléculas, como as proteínas e ainda moléculas cujo o alvo biológico seja o DNA. Considerando a média dos parâmetros estruturais obtidos com a metodologia ONIOM, acompanhada da alternância das camadas de cálculo, e ainda as geometrias otimizadas, observa-se que as distorções são pequenas, mantendo a conformação do DNA. Todos os parâmetros estruturais avaliados neste estudo potencializam o uso de metodologias híbridas, que permitem aumentar os sistemas aproximando-os sempre que possível do real e ainda aplicar níveis de teoria adequados para reproduzir as propriedades desejadas.

Tabela A.7 Distância (valores em Å) entre os pares de base consecutivos para a sequência [5'-GpApGpGpApApApGpT-3']. Calculados no nível ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF).

$N_6 \cdots N_6$	Sequência inicial	Sequência otimizada	Camada de cálculo
G	3,50	3,56	A
A	3,48	3,45	B
G	3,49	3,54	A
G	3,50	3,51	B
A	3,49	4,09	A
A	3,49	3,54	B
A	3,48	3,83	A
G	3,88	3,43	B
T(N₃)			A

Tabela A.8 Distância (valores em Å) entre os pares de base consecutivos para a sequência [5'-GpGpCpC-3']. Calculados nos níveis ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF) e ONIOM(B3LYP/LANL2DZ:UFF)

N ₆ -- N ₆	HF		DFT		Camada de cálculo
	Geometria inicial	Geometria otimizada	Geometria otimizada	Geometria otimizada	
G	3,30	3,44	3,43		A
G	3,39	3,58	3,58		B
C(N ₃)	3,50	4,66	4,71		A
C(N ₃)					B

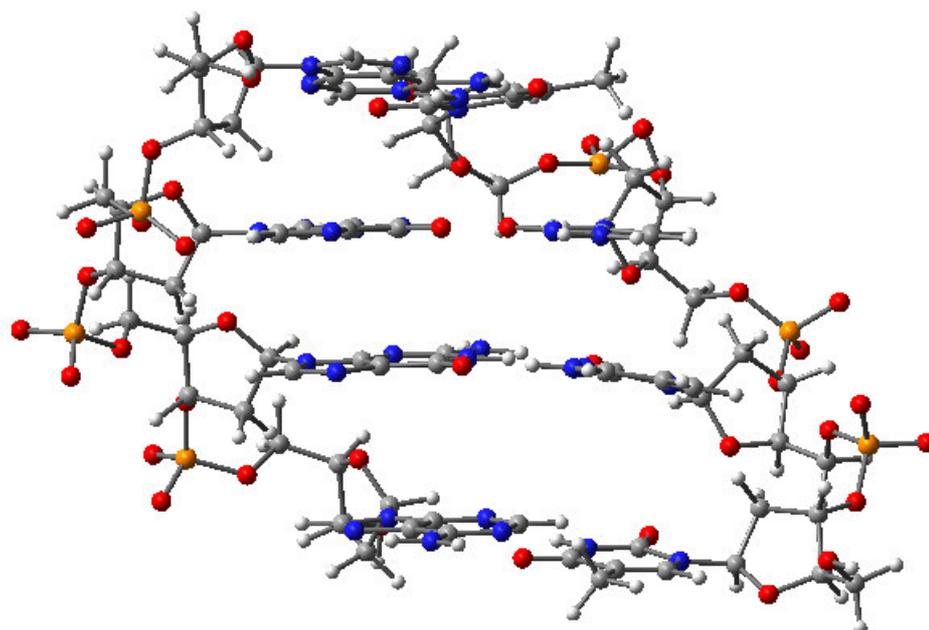


Figura A.10 Sequência [5'-GpGpCpC-3']. Calculada no nível de teoria ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF).

Tabela A.9 Distância (valores em Å) entre os pares de base empilhados para sequência 5'-ApGpGpA-3'}. Calculados nos níveis ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF) e ONIOM(B3LYP/LANL2DZ:UFF).

N ₆ - N ₆	HF		DFT	Camada de cálculo
	Geometria inicial	Geometria otimizada	Geometria otimizada	
A	3,64	4,26	4,15	A
G	3,37	3,56	3,72	B
G	3,09	3,97	3,72	A
A				B

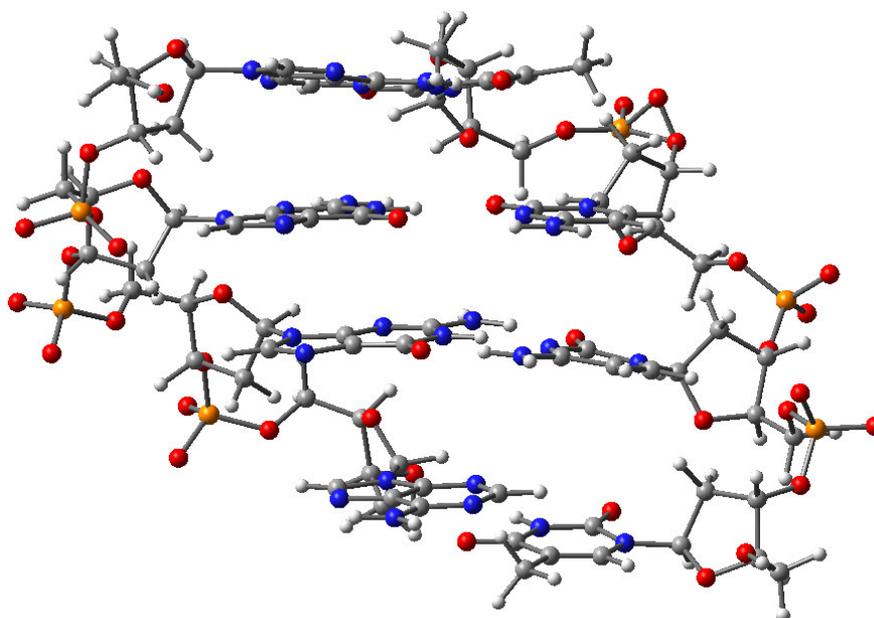


Figura A.11 Sequência 5'-ApGpGpA-3'}. Calculada no nível de teoria ONIOM(HF/LANL2DZ:UFF).

A.4 CONCLUSÃO

A metodologia híbrida (QM/MM) segundo o formalismo ONIOM parece ser a melhor alternativa para estudar macromoléculas, sobretudo processos de interesse que envolvam sistemas biomacromoleculares. Dada a relevância de representar com elevada precisão esses sistemas, e devido à dificuldade computacional de se aplicar um cálculo *ab initio* puro para sistemas tão grandes, o uso de modelos como o ONIOM se faz necessário, uma vez que, entre outras vantagens, possibilita a restrição do alto nível de cálculo a regiões de maior interesse. Portanto é extremamente relevante a avaliação de metodologias que envolvam modelos híbridos.

Nesse trabalho, foi possível observar que o ONIOM se aplica bem para a otimização de geometria de sequências nucleotídicas. Os resultados obtidos ainda sugerem que a metodologia ONIOM com região quântica tratada com HF é adequada, uma vez que aplicando DFT não há variação relevante na geometria e em contrapartida o custo computacional é bem maior que o HF. Fica evidente a importância da escolha correta das camadas de cálculo, pois a geometria parece ser bastante sensível ao tratamento dado a regiões específicas da molécula. Nossos resultados sugerem que a aplicação do método ONIOM, alternando as camadas de cálculo entre os pares de base e mantendo as extremidades no nível alto de cálculo é a melhor metodologia, apresentando bons resultados de estrutura e um ganho computacional relevante.

Cálculos de complexos de interação entre sequências nucleotídicas e compostos da família das tetraciclina são sendo realizados usando a metodologia estabelecida nesse trabalho. O método ONIOM tem permitido explorar quanticamente sistemas biológicos, como complexos de intercalação com o DNA. Os resultados são ainda motivadores para estudar interações de sequências nucleotídicas cada vez maiores com moléculas de interesse, como anticancerígenos à base de Pt(II), permitindo uma melhor avaliação da influência da própria estrutura do DNA no mecanismo de ação dessas reações, algumas ainda carentes de serem elucidadas.

REFERÊNCIAS

- BERNGES, F.; HOLLER, E. The Reaction of Platinum(II) Complexes with DNA - Kinetics of Intrastrand Cross-Link Formation In Vitro. **Nucleic Acids Research**, Southampton, 1991. v. 19, n. 7, p. 1483-1489.
- CASEWIT, C. J.; COLWELL, K. S.; RAPPE, A. K. Application of a Universal Force-Field to Organic-Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, 1992. v. 114, n. 25, p. 10035-10046.
- COSTA, L. A. S. **Estudos Computacionais dos Mecanismos de Ação Antitumoral da cisplatina e seus Análogos**. 2007. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COSTA, L. A. S. et al. Kinetics and structural aspects of the cisplatin interactions with guanine: A quantum mechanical description. **International Journal of Quantum Chemistry**, New York, 2006. v. 106, n. 9, p. 2129-2144.
- FAN, W. J.; ZHANG, R. Q. Computation of large systems with an economic basis set: Ab initio calculations of biological nucleic acid base pairs. **Journal of Theoretical & Computational Chemistry**, Ipswich, 2006. v. 5, p. 411-420.
- FERREIRA, R. **Watson & Crick: A história da descoberta da estrutura do DNA**. Recife: Odysseus, 2003. 131 p.
- GENEST, A. et al. The IMOMM (integrated molecular orbitals/molecular mechanics) approach for ligand-stabilized metal clusters. Comparison to full density functional calculations for the model thiolate cluster Cu-13(SCH₂CH₃)(8). **Journal of Chemical Theory and Computation**, Washington, 2006. v. 2, n. 1, p. 47-58.
- HAMBLEY, T. W. Chemistry - Metal-based therapeutics. **Science**, 2007. v. 318, n. 5855, p. 1392-1393.
- HOBZA, P.; SPONER, J. Structure, energetics, and dynamics of the nucleic acid base pairs: Nonempirical ab initio calculations. **Chemical Reviews**, Maryland Heights, 1999. v. 99, n. 11, p. 3247-3276.
- HyperChemTM Release 4. Canada: Hypercube Inc, 1994.
- JANSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. New York John Wiley, 1999. 624 p.
- JUNG, Y. W.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chemical Reviews**, Maryland Heights, 2007. v. 107, n. 5, p. 1387-1407.
- KOZELKA, J. et al. Kinetic aspects of interactions between DNA and platinum complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, Maryland Heights, 1999. v. 192, p. 61-82.
- LEVINE, I. **Quantum Chemistry**. New Jersey: 2000. 739 p.

LU, X. J.; OLSON, W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. **Nucleic Acids Research**, Southampton, 2003. v. 31, n. 17, p. 5108-5121.

MOROKUMA, K. et al. ONIOM method and its applications to modeling of chemical and biological systems. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, Washington, 2004. v. 228, p. 266-PHYS.

NOBELPRIZE.ORG. The Nobel Prize in Physiology or Medicine. 2009. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/>. Acesso em: 12 Fev. 2009.

OHMIYA, K.; MOROKUMA, K. ONIOM(QM : QM) trajectory calculation of N-Me-protonated Schiff base of retinal. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, Washington, 2006. v. 231, p. 466-PHYS.

OHMIYA, K.; MOROKUMA, K.; YOKOYAMA, S. ONIOM(QM : MM) calculation of chicken SWS1 visual pigment and its S90C mutant. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, Washington, 2005. v. 229, p. 290-PHYS.

PAYNE, C. M. et al. Molecular dynamics simulation of ss-DNA translocation between copper nanoelectrodes incorporating electrode charge dynamics. **Journal of Physical Chemistry B**, Maryland Heights, 2008a. v. 112, n. 6, p. 1712-1717.

_____. Molecular dynamics simulation of ss-DNA translocation between copper nanoelectrodes incorporating electrode charge dynamics. **Journal of Physical Chemistry B**, Maryland Heights, 2008b. v. 112, n. 6, p. 1712-1717.

PDB. Protein Data Bank. 2009. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb>>. Acesso em 10 jan. 2009.

RAPPE, A. K.; CAEWIT, C. J. **Molecular Mechanics Across Chemistry**. New York: University Science Books, 2000. 444 p.

RE, S.; MOROKUMA, K. ONIOM study of chemical reactions in microsolvation clusters: (H₂O)_(n)CH₃Cl+OH-(H₂O)_(m) (n+m = 1 and 2). **Journal of Physical Chemistry A**, Maryland Heights, 2001. v. 105, n. 30, p. 7185-7197.

RE, S. Y.; MOROKUMA, K. Own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics study of the reaction of OH⁻ with polychlorinated hydrocarbons CH_(4-n)Cl_n (n=2-4). **Theoretical Chemistry Accounts**, Southampton,, 2004. v. 112, n. 2, p. 59-67.

ROBERTAZZI, A.; PLATTS, J. A. Gas-phase DNA oligonucleotide structures. A QM/MM and atoms in molecules study. **Journal of Physical Chemistry A**, Maryland Heights, 2006. v. 110, n. 11, p. 3992-4000.

SPIEGEL, K.; MAGISTRATO, A. Modeling anticancer drug-DNA interactions via mixed QM/MM molecular dynamics simulations. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, 2006. v. 4, p. 2507-2517.

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods .1. Method. **Journal of Computational Chemistry**, New York, 1989a. v. 10, n. 2, p. 209-220.

_____. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods .2. Applications. **Journal of Computational Chemistry**, New York, 1989b. v. 10, n. 2, p. 221-264.

TIMSIT, Y.; VILBOIS, E.; MORAS, D. Base-Pairing Shift in the Major Groove of (Ca)N Tracts by B-DNA Crystal-Structures. **Nature**, New York, 1991. v. 354, n. 6349, p. 167-170.

TSCHUMPER, G. S.; MOROKUMA, K. Gauging the applicability of ONIOM (MO/MO) methods to weak chemical interactions in large systems: hydrogen bonding in alcohol dimers. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, Maryland Heights, 2002. v. 592, p. 137-147.

VAN HOLDE, K. E.; JOHNSON, C.; HO, P. S. **Principles of physical biochemistry**. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 752 p.

VREVEN, T. et al. The ONIOM-PCM method: Combining the hybrid molecular orbital method and the polarizable continuum model for solvation. Application to the geometry and properties of a merocyanine in solution. **Journal of Chemical Physics**, Maryland Heights, 2001. v. 115, n. 1, p. 62-72.

VREVEN, T.; MOROKUMA, K. On the application of the IMOMO (integrated molecular orbital plus molecular orbital) method. **Journal of Computational Chemistry**, New York, 2000a. v. 21, n. 16, p. 1419-1432.

_____. The ONIOM (our own N-layered integrated molecular orbital plus molecular mechanics) method for the first singlet excited (S-1) state photoisomerization path of a retinal protonated Schiff base. **Journal of Chemical Physics**, Maryland Heights, 2000b. v. 113, n. 8, p. 2969-2975.

_____. Development and applications of the ONIOM(MO : MM) method. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, Washington, 2001. v. 222, p. 26-COMP.

VREVEN, T. et al. Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints. **Journal of Computational Chemistry**, New York, 2003. v. 24, n. 6, p. 760-769.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical Studies of Enzymic Reactions - Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of Carbonium-Ion in Reaction of Lysozyme. **Journal of Molecular Biology**, Maryland Heights, 1976. v. 103, n. 2, p. 227-249.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, New York, 1953. v. 171, n. 4356, p. 737-738.