



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Willian Tássio Gomes Novato

**QUÍMICA DO CÉREBRO: MODELAGEM MOLECULAR DE PROCESSOS
RELACIONADOS A DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Juiz de Fora

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Willian Tássio Gomes Novato

**QUÍMICA DO CÉREBRO: MODELAGEM MOLECULAR DE PROCESSOS
RELACIONADOS A DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós – graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Hélio Ferreira Dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Sodré Costa

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Novato, Willian Tássio Gomes.

Química do Cérebro : Modelagem molecular de processos relacionados a doenças neurodegenerativas / Willian Tássio Gomes Novato. -- 2017.

150 p. : il.

Orientador: Hélio Ferreira Dos Santos

Coorientador: Luiz Antônio Sodré Costa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

1. Alzheimer. 2. Doenças Neurodegenerativas. 3. Platina. 4. DFT. 5. Dinâmica Molecular. I. Dos Santos, Hélio Ferreira , orient. II. Costa, Luiz Antônio Sodré, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

- Sem nenhuma dúvida, agradeço a Oxalá, Yemanjá e a meus guias por todo suporte! Sem eles, este marco não seria possível;
- A minha mulher, amiga, parceira e incomparável musa que esteve ao meu lado durante esta jornada: Sarah, você foi fundamental para a ocorrência desta tese! Amo muito você e obrigado pela incalculável paciência;
- Aos meus pais Paulo Afonso e Maria José que sempre lutaram para me dar o melhor. Sem a moral que vocês me passaram, seria impossível chegar até aqui. Sempre me lembrarei de meu primeiro contato com o universo quando fui pela primeira vez em um planetário com meu pai, e sempre agradecerei por cada caneta dada de bom grado pela minha mãe;
- Ao meu irmão Aldo, minha cunhada Kelly e minha afilhada e sobrinha Manuela. Por mais que possa não transparecer, eu sempre penso em vocês;
- A todos meus irmãos do Centro São Dimas e da Loja Amor à Ordem que me acompanharam durante esta longa jornada, e pela compreensão devido minhas ausências;
- Aos amigos de NEQC – Arthur, Lucas, Antônio, Bruna, Diego, Nathália, Yulianna. Afinal, sem as discussões que temos, mal conseguimos estar lúcidos;
- Aos meus amigos *out* NEQC – Pedro e Naiara! Vocês me ajudaram muito na percepção e prática experimental;
- Ao meu coorientador Luiz Antônio que sempre me motivou independente das circunstâncias;
- Ao meu orientador Hélio pela orientação e discussões durante esta jornada. Você é o professor para o qual sempre me esforço para impressionar;
- A professora Flávia pela bronca na hora certa! Com certeza, eu te agradeço muito por isso;

➤ As conversas do mecanismo reacional da vida dados pelos professores Gustavo, Mara, Gilson;

➤ A UFJF, FAPEMIG, CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro durante todos estes anos.

Eu devia sorrir mais, abraçar meus
pais, viajar o mundo, e socializar...

(Supercombo)

...Tuas ideias não correspondem aos
fatos, o tempo não para...

(Cazuza)

RESUMO

A presente tese propõe um estudo de alvos específicos recorrentes a quimioterapia da Doença de Alzheimer. Estudos apontam que complexos de platina(II) podem ser utilizados como compostos anti-aglomeração de peptídeos β -amilóide que se compactam entre as fendas sinápticas, impedindo a efetivação do estímulo do potencial de ação, e com isso, inativação da região cerebral. Estas espécies são portadoras de sítios com potencial probabilidade de coordenação metálica, onde a ordem de reatividade de cada aminoácido foi investigada. Para tanto, foram elaborados experimentos para validação de resultados de barreira de energia livre de ativação utilizando Teoria do Funcional de Densidade (DFT) para a hidrólise do complexo $\text{Pt}(\text{ofen})\text{Cl}_2$ ($\Delta G^{\#}_{1,\text{EXP}}=26,94$; $\Delta G^{\#}_{1,\text{TEO}}=25,54 \text{ kcal mol}^{-1}$) e também para substituição nucleofílica de segunda ordem de cloreto por histidinas (HIS) ($\Delta G^{\#}_{1,\text{EXP}}=20,73$; $\Delta G^{\#}_{1,\text{TEO}}=20,74 \text{ kcal mol}^{-1}$). Após ajuste metodológico, o mesmo protocolo foi utilizado para comparar a reatividade para todos os aminoácidos (AA) que constituem a espécie β -amilóide dada por $\text{MET} > \text{LYS} > \text{HIS} > \text{GLU} > \text{ASP}$, e termodinamicamente é pronunciado com a comparação $\text{LYS} > \text{HIS} > \text{GLU} > \text{ASP} > \text{MET}$. Para verificar o perfil estrutural para agregados peptídicos e consequentemente, atribuição de um valor energético em cada evento recorrente entre os ligantes derivados de fenantrolina, batofenantrolina, curcumina e pt01 , a metodologia de *Docking* Molecular e cálculos de Dinâmica Molecular (DM) seguidos de cálculos MM-PBSA foram necessários, dos quais foram indicativos de desestruturação da agregação inicial. Após análise estrutural dada por resultados de DM, foi possível observar a alta flexibilidade dos resíduos na região central do peptídeo quando é inserido o ligante curcumina, na forma enoláto (CUR^{-1}). O modelo de simulação mais destacável foi $9\text{PEP}@\text{pt01}$, onde é observado o completo colapso do agregado, obtendo valor mais negativo de $\Delta G_{\text{GBTOT}} = -39 \pm 7 \text{ kcal mol}^{-1}$, valor este que porta 19 kcal mol^{-1} mais negativo comparado aos outros ligantes, e portanto, evidenciando o papel da platina como potencial fator utilizado em estágios de aglomeração inicial, mesmo sem a coordenação metálica com os sítios de MET, LYS ou HIS.

Palavras-chave: Platina, Alzheimer, Doenças Neurodegenerativas.

ABSTRACT

The present thesis proposes a study of specific targets recurrent to Alzheimer's disease chemotherapy. Studies show that platinum (II) complexes can be used as anti-agglomeration compounds of β -amyloid peptides that are compacted between the synaptic clefts, preventing the activation of the action potential stimulus, and thus, inactivation of the brain region. These species are carriers of sites with potential probability of metallic coordination, where the order of reactivity of each amino acid was investigated. For this, experiments were developed to validate the results of activation free energy barrier using Density Functional Theory (DFT) for the hydrolysis of the pt01 complex, Pt(ofen)Cl₂ ($\Delta G^{\#}_{1,EXP}=26,94$; $\Delta G^{\#}_{1,TEO}=25,54$ kcal mol⁻¹) and also for second order nucleophilic substitution of histidines (HYS) ($\Delta G^{\#}_{1,EXP}=20,73$; $\Delta G^{\#}_{1,THEO}=20,74$ kcal mol⁻¹). After methodological adjustment, the protocol was used to compare the reactivity for all aminoacids (AA) which constitute the β -amyloid species given by MET > LYS > HIS > GLU > ASP, and is thermodynamically pronounced with the comparison LYS > HIS > GLU > ASP > MET. To verify the structural profile for peptide aggregates and, consequently, assign an energetic value in each recurrent event among the ligands derived from phenanthroline, batofenanthroline, curcumin and pt01, the Molecular Docking methodology and Molecular Dynamics (DM) calculations followed by MM-PBSA approximation with indicative of the destructuring of the initial aggregation. After structural analysis given by DM results, it was possible to observe the high flexibility of the residues in the central region of the peptide when the ligand curcumin is inserted, in the enolate form (CUR⁻¹). The most detachable simulation model was 9PEP @ pt01, where the complete collapse of the aggregate is observed, obtaining a more negative value of $\Delta G_{GBTOT} = -39 \pm 7$ kcal mol⁻¹. This value carries 19 kcal mol⁻¹ plus negative compared to other ligands, and therefore, evidencing the role of platinum as a potential factor used in initial agglomeration stages, even without metallic coordination with the MET, LYS and HYS sites.

Keywords: Platinum, Alzheimer, Neurodegenerative Diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1.	Ilustração de dois neurônios comunicantes por uma fenda sináptica, evidenciando o sentido da corrente de transmissão de sinal, e nomenclatura de suas respectivas partes.....	19
Figura 1.3.1.	Domínios da APP, domínio E1 (código pdb 4PWQ) e domínio E2 (código 3NYJ) (LEE, 2011, HOEFGEN, 2015).....	23
Figura 1.3.2.	Estrutura da β -secretase obtida a partir do código pdb 5HTZ (SCOTT, 2016).....	24
Figura 1.3.3.	Estrutura do peptídeo β -amilóide com 42 resíduos de amino ácidos, $A\beta(1-42)$, com suas coordenadas dispostas no código pdb 1Z0Q.....	26
Figura 1.3.4.	Estrutura do modelo $A\beta(1-40)$ de 9 fitas de peptídeos com o destaque das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas e os AA relevantes no presente trabalho, bem como a região de interface entre as fitas.....	27
Figura 1.4.1.	a) Algumas expectativas de vida para países expressivos em continentes distintos. b) Relação de número de casos com pessoas portadoras de casos com demência, incluindo Alzheimer. c) Número de pessoas que possuem Alzheimer, projetando o número de enfermos até o ano de 2050.....	28
Figura 1.5.1.	Esquemática da passagem de corrente entre um neurônio pré e pós sináptico através da modulação de vesículas de ACh e de sua respectiva hidrólise via AChE.	31
Figura 1.5.2.	Compostos inibidores de AChE aceitos no tratamento da DA.	32
Figura 1.5.2.1.	Estruturas de compostos naturais utilizados no combate de radicais livres...	35
Figura 1.5.3.1.	Estruturas de ligantes orgânicos com potencial terapêutico na quelatação de neurocátions.....	37
Figura 1.5.4.1.	Estruturas dos principais compostos derivados da fen, destacando sua notação utilizada.....	39
Figura 1.5.4.2.	Estruturas dos AA contidos na estruturação de $A\beta$ que são mais relevantes para estudo de coordenação metálica em seu estado zwitterion.....	40
Figura 1.5.4.3.	Esquema de suposta atuação das espécies derivadas de pt01 em estágios de aglomeração de espécies $A\beta$	41
Figura 3.1.2.1.	Esquema de montagem reacional para obtenção do complexo modelo pt01.....	45
Figura 3.1.3.1.	Processo de obtenção dos valores de k_1 e k_2 , utilizando monitoramento de absorção na região de 252 nm.....	48

Figura 3.2.3.1.	Algoritmo de resolução numérica em cálculos DFT.....	64
Figura 3.2.4.1.	Esquema de contração para a função de base de Pople 6-31G.....	67
Figura 3.3.1.1.	Comportamento da função Si para os valores máximo e de idealidade no ranqueamento do algoritmo escolhido.....	76
Figura 3.3.2.1.	Esquematização da definição de um cromossomo para cálculo de poses....	77
Figura 3.3.2.2.	Ilustração das operações genéticas denominadas como recombinação e mutação.....	78
Figura 3.3.2.3.	Escolha de Grid para a estrutura A β (1-40) estudada.....	79
Figura 3.3.3.1.	Esquema da obtenção da energia potencial total E obtida através das considerações implementadas no campo de força AMBER.....	81
Figura 3.3.5.1.	Octaedro truncado em célula unitária para expansão de condições periódicas de contorno.	85
Figura 3.4.1.	Esquema metodológico abordado para execução do trabalho.....	90
Figura 4.1.1.1.	Espectros de espalhamento Raman utilizados como evidências de coordenação metálica para apuração da síntese de pt01.....	93
Figura 4.1.1.2.	Espectro de absorção no UV-vis para o experimento de mistura reacional entre HIS/H ₂ O/pt01/NaCl (já descrito na secção metodológica), para determinação da banda de maior sensibilidade.....	94
Figura 4.1.1.3.	a) Espectro experimental de absorção na região UV-vis para investigação da banda de evidência dos processos de solvólise. b) Espectro experimental de absorção UV-vis para a confirmação da supressão da solvólise com adição de NaCl.....	95
Figura 4.1.1.4.	Espectro teórico de absorção, utilizado para caracterizar as transições do experimento.	96
Figura 4.1.2.1.	Experimento para obtenção de k _{1,EXP} . Espectros experimentais de absorção para solvólise.....	97
Figura 4.1.2.2.	Dados experimentais das absorções máximas para os espectros da mistura reacional envolvendo pt01, H ₂ O, HIS e NaCl, para obtenção do valor de k _{2,EXP} , com referência no comprimento de onda em 252 nm.....	98
Figura 4.1.2.3.	Ajuste linear para os logaritmos das absorções monitoradas no tempo, para cada mistura reacional demonstrada em cada gráfico.....	100
Figura 4.2.1.	Esquema de reações estudadas para verificação de reatividade e estabilidade.....	103

Figura 4.2.2.	Estado de transição para Nu oxigenados.....	104
Figura 4.2.3.	Estados de transição para HIS, em ambas formas tautoméricas e para LYS.....	105
Figura 4.2.4.	Estados de transição para ataques de ASN, GLN e MET.....	106
Figura 4.2.5.	Distâncias mapeadas na esfera de coordenação para todas as estruturas obtidas.....	107
Figura 4.2.6.	Montagem de um alvo para análise de preferência de AA- A β	110
Figura 4.3.1.	Compostos que foram utilizados na etapa de docking molecular, e posteriormente simulados por 100,0 ns.....	111
Figura 4.3.1.1.	Comparação energética na preferência de estado entre as estruturas de CUR com tautomerismo ceto-enólico, destacando as distâncias obtidas entre a passagem do próton do carbono beta para a carbonila adjacente. ...	112
Figura 4.3.2.1.	Parametrizações da esfera de coordenação de pt01.....	113
Figura 4.3.2.2.	Validação das distâncias obtidas do modelo pt01 em solvente explícito.....	115
Figura 4.4.1	Estrutura obtida após etapa de aquecimento por 1,0 ns, partindo de 5 K para 300 K, sob a proposta de simulação empregada na tese.....	117
Figura 4.4.2.	Imagens da simulação de 9PEP, em H ₂ O explícitas por 160,0 ns, com perspectiva de 90 graus de uma imagem em relação a outra.....	118
Figura 4.4.3.	a) Valores de RMS de todos os átomos do sistema. b) Valores de RMF relativos para cada fita peptídica. c) RMS da região central dos peptídeos [TYR10-...-ALA30].....	119
Figura 4.5.1.	Valores de RMS encontrados para os agregados derivados de CUR.....	121
Figura 4.5.2.	a) Quintil das estruturas geradas, evidenciando o efeito alostérico pela seta verde. b) Estrutura ampliada para a última pose de 100,0 ns demonstrando cada interação envolvida.	122
Figura 4.5.3.	Alta motilidade da região hidrofóbica das fitas 2, 5 e 8, devido a inserção da estrutura enólica da curcumina.....	123
Figura 4.6.1.1.	a) Monitoramento de RMS entre as estruturas 9PEP e 9PEP@bato. b) Desvios percentuais comparados entre a estrutura 9PEP@bato e isolada.....	125
Figura 4.6.1.2.	a) Quartis das estruturas geradas para 9PEP@bato, evidenciando o efeito alostérico pela seta verde. b) Estrutura ampliada para a última pose de 100,0 ns demonstrando cada interação envolvida.....	126
Figura 4.6.1.3.	Monitoramento da distância entre o ligante batofenantrolina e o resíduo MET35, mediando ligação de hidrogênio entre ASN27 e GLU22.....	127

Figura 4.6.1.4.	a) Trajetória monitorada para SO ₃ _bato por 65,0 ns. b) Ligação de hidrogênio formada pelo ligante com MET35.....	129
Figura 4.6.1.5.	Valores de RMS e desvios ao longo da trajetória de 65,0 ns.....	130
Figura 4.6.2.1.	Monitoramento de RMS e RMF para as estruturas de ofen e pt01.....	130
Figura 4.6.2.2.	Monitoramento estrutural do arranjo 9PEP@ofen.....	131
Figura 4.6.2.3.	a) Estruturas obtidas pelo sistema 9PEP@pt01 ao longo de 100,0 ns. b) Ampliação das interações ocorridas no sítio de recepção para pt01.....	132
Figura 4.6.2.4.	Esquema de proposta de desaglomeração através do complexo pt01.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.1.	Valores experimentais (em parênteses) e teóricos para pt01 e pt02. Os dados experimentais são reportados em estruturas cristalinas e os valores teóricos foram obtidos ao nível B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d), em meio aquoso utilizando aproximação IEFPCM ($\epsilon=78,4$).....	92
Tabela 4.1.2.1.	Dados experimentais das absorções máximas para os espectros da mistura reacional de solvólise, para obtenção do valor de $k_{1,EXP}$, com referência no comprimento de onda em 252 nm.....	97
Tabela 4.1.2.2.	Dados experimentais obtidos do monitoramento da absorção máxima para a reação de troca do tipo Cl ⁻ /HIS para obtenção do valor de $k_{2,EXP}$, adotando como referência em 252 nm.....	99
Tabela 4.1.2.3.	Resultados experimentais e calculados para o perfil cinético (T=345 K) da reação entre pt01 com H ₂ O (k_1) e HIS (k_2).	101
Tabela 4.2.1.	Cálculos de propriedades cinéticas e termodinâmicas a 298,15 K das reações entre complexos com cada AA utilizando o nível LC-wPBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//, em meio aquoso utilizando aproximação IEFPCM ($\epsilon=78,4$).....	108
Tabela 4.3.2.1.	Constantes de equilíbrio obtidas dos cálculos de scan a serem utilizadas na simulação de pt01, em meio aquoso utilizando aproximação IEFPCM ($\epsilon=78,4$).....	114

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Aminoácidos
Ach	Molécula de acetilcolina
AchE	Enzimas do tipo acetilcolinesterase
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement - Campo de Força
APP	Proteína precursora de amilóide - <i>Amyloid Protein Precursor</i>
A β	Espécies químicas do peptídeo β -amilóide portadoras de 39 até 43 resíduos de AA
ASN	Aminoácido Asparagina
ASP	Aminoácido ácido aspártico
BATOFEN	Molécula de batofenantrolina - BAT, BP
B3LYP	Funcional DFT híbrido de Becke, Lee, Yang e Parr
CAM-B3LYP	Funcional DFT de longo alcance
CHEMSCORE	Função matemática empírica (função de <i>scoring</i>) adotada para o ancoramento molecular (<i>docking</i> molecular)
CHN	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
cis-DDP	Molécula de cis-diaminodicloroplatina(II) – Cisplatina
CLOA	Combinação linear de orbitais atômicos
CUR	Molécula de curcumina
DA	Doença de Alzheimer
DFT	Teoria do Funcional de Densidade - <i>Density Functional Theory</i>
DM	Dinâmica Molecular
DFO	Molécula de Desferroxiamina
ECP	Potencial efetivo de caroço - <i>Effective Core Potential</i>
ESI-MS	Espectroscopia de Massas - <i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i>

EtOH	Etanol
GGA	Aproximação DFT - <i>Generalized Gradient Approximation</i>
GLN	Aminoácido glutamina
GLU	Aminoácido ácido glutâmico
GTO	Função de base gaussiana - <i>Gaussian Type Orbitals</i>
HF	Método de Hartree-Fock
HIS	Aminoácido histidina, HYS para notação em inglês
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência - <i>High performance liquid Chromatography</i>
IEFPCM	Tipo de formalismo para criar a cavidade do soluto no modelo PCM
IRC	Coordenada intrínseca de reação - <i>Intrinsic Reaction Coordinated</i>
KS-SCF	<i>Kohn-Scham - Self Consistent Field</i>
Lan12DZ	Tipo de ECP adotado para platina
LC- ω PBE	Funcional DFT de longo alcance
LIS	Aminoácido lisina, LYS para notação em inglês
LSDA	Funcional utilizado pelo método DFT - <i>Local Spin Density Approximation</i>
MA	Mal de Alzheimer
MeOH	Metanol
MET	Aminoácido metionina
MQ	Mecânica Quântica
NMDA	Molécula de N-metil-d-aspartato
Nu	Nucleófilo adotado de forma generalizada
OFEN	Molécula de ortofenantrolina
PCM	Modelo de polarização contínuo - <i>Polarizable Continuum Model</i>
pt01	Complexo de platina adotado como sonda - Pt(ofen)Cl ₂

RHF	Aproximação de Hartree-Fock-Roothaan
RMF	Desvio padrão de posições de aminoácidos - <i>Root Mean Fluctuation</i>
RMS	Desvio padrão das posições atômicas - <i>Root Mean Square</i>
ROS	Espécies reativas oxigenadas - <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCF	Self Consistent Field
SDD	Tipo de ECP utilizado para platina
SNC	Sistema Nervoso Central
STO	Funções de Slater - <i>Slater Type Orbitls</i>
TS	Estado de transição - <i>Transition State</i>
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1.	O SISTEMA NERVOSO	19
1.2.	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	21
1.3.	A DOENÇA DE ALZHEIMER	22
1.4.	IMPACTOS ESTATÍSTICOS	28
1.5.	NEUROQUÍMICA	30
1.5.1.	Descrição de inibidores de colinesterases	30
1.5.2.	Emprego de compostos antioxidantes	34
1.5.3.	Emprego de compostos quelantes	36
1.5.4.	Utilização de platina(II) como potencial apelo no Mal de Alzheimer	38
2.	OBJETIVO GERAL DO TRABALHO	43
2.1.	OBJETIVO ESPECÍFICO	43
3.	METODOLOGIA PROPOSTA	44
3.1.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	44
3.1.1.	Materiais e métodos	44
3.1.2.	Síntese do complexo modelo Pt(ofen)Cl ₂ – <i>pt01</i>	45
3.1.3.	Procedimentos de análises da cinética	46
3.2.	METODOLOGIA QUÂNTICA	48
3.2.1.	Tópicos de Mecânica Quântica – Equação de Schrödinger	48
3.2.2.	O método de Hartree-Fock – HF	51
3.2.3.	A teoria do funcional de densidade – DFT	57
3.2.4.	Funções de bases atômicas	65

3.2.5.	Potencial efetivo de caroço – ECP	68
3.2.6.	Modelo de contínuo de polarização – PCM	69
3.2.7.	Tópicos para abordagem do estado de transição – TS	71
3.3.	METODOLOGIA CLÁSSICA	74
3.3.1.	Ancoragem molecular – <i>Docking</i> Molecular	74
3.3.2.	O algoritmo lamarckiano	77
3.3.3.	O campo de força AMBER	80
3.3.4.	Dinâmica Molecular – DM	82
3.3.5.	Condições periódicas de contorno	84
3.3.6.	A descrição da técnica MM-PBSA	86
3.4.	ESQUEMA METODOLÓGICO	88
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	91
4.1.	EXPERIMENTO	91
4.1.1.	Caracterização do complexo Pt(ofen)Cl ₂ – <i>pt01</i>	92
4.1.2.	Análises cinéticas com validação de protocolo de simulação	96
4.2.	ANÁLISE DA REATIVIDADE E ESTABILIDADE DE AA	102
4.3.	MODELAGEM MOLECULAR DE AGREGADOS COM SUBSTRATOS	110
4.3.1.	Detalhes dos modelos de curcumina (CUR)	112
4.3.2.	Detalhes na parametrização de pt01	113
4.4.	MODELO AGREGADO 9PEP ISOLADO	116
4.5.	MODELOS AGREGADOS DERIVADOS DE CURCUMINA (CUR)	120
4.6.	MODELOS AGREGADOS DERIVADOS DE FENANTROLINA	124

4.6.1.	Modelos 9PEP@bato e 9PEP@SO3_bato	124
4.6.2.	Modelos 9PEP@ofen e 9PEP@pt01	130
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
5.1.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	136
5.1.1.	Trabalhos apresentados em eventos	136
5.1.2.	Artigo publicado como resultado da tese	137
5.1.3.	Artigo não relacionado com a tese publicado no período	137
	REFERÊNCIAS	138
	APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE A TESE	145

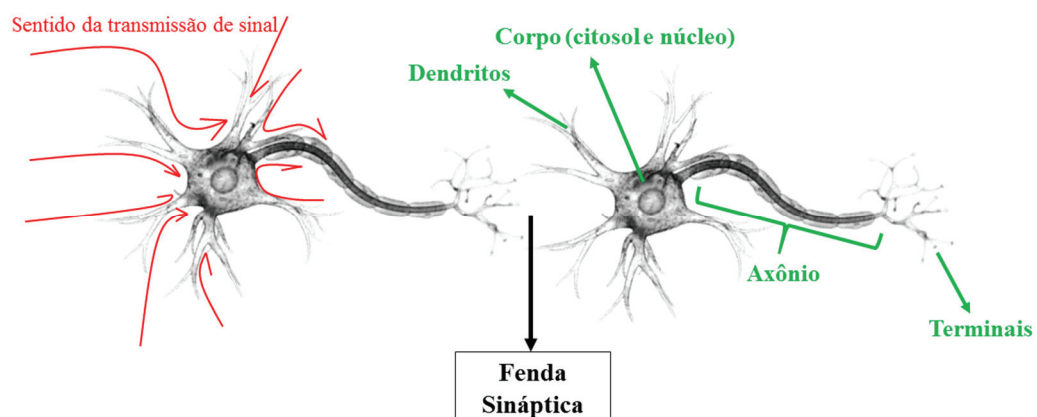
1. INTRODUÇÃO

1.1. O SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso (SN) é responsável pela coordenação voluntária e involuntária de um organismo vivo, sendo responsável pela movimentação de todos os órgãos de um corpo, pois graças as intercomunicações de todas unidades deste sistema, é possível enviar um sinal químico entre cada extremidade de órgão desejado. Para ser melhor detalhado, tal sistema pode ser dividido em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) dos quais para efeito de aprofundamento, somente será considerado como foco de definição o SNC (MOURÃO JUNIOR, 2010, RADANOVIC, 2016).

A unidade básica celular que compõe o SNC é denominada de neurônio (Figura 1.1.1). Esta célula é responsável pela interconexão de cada órgão, mantendo todos unidos em rede química de comunicação chamada de sinapse (RADANOVIC, 2016; MOURÃO JUNIOR, 2010).

Figura 1.1.1. Ilustração de dois neurônios comunicantes por uma fenda sináptica, evidenciando o sentido da corrente de transmissão de sinal, e nomenclatura de suas respectivas partes.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A sinapse é um mecanismo de transporte de corrente elétrica através da liberação dos neurotransmissores, sendo estes nada mais que ligantes específicos transportados entre sítios específicos com destinos distintos em cada neurônio, e desta forma, o mecanismo sináptico pode ser descrito entre cada fenda neural através do potencial de ação.

Entre cada célula, após o disparo deste potencial, acontecerá a liberação de vesículas pelo processo de exocitose, as quais conterão os neurotransmissores que se ligam aos receptores de membrana vinculados na célula pós-sináptica, e assim, ocasionando diferença de potencial local. Com isso haverá abertura momentânea de canais iônicos, formando o fluxo transmembrânico de íons para o exterior celular (STOR, 2009, MOURÃO JUNIOR, 2010). Ou seja, o processo descrito funciona de forma análoga a um capacitor, onde um estímulo químico é interpretado sob a forma de sinal elétrico entre cada neurônio, gerando o fluxo deste sinal dos dendritos para os axônios e chegando até o terminal, onde será transmitido para o próximo neurônio ou inserção de outro tecido conforme é ilustrado na Figura 1.1.1.

O SNC é composto por duas porções básicas: a medula espinhal e o encéfalo. A medula se inicia na inserção cranial localizada entre a primeira vértebra cervical e terminando em aproximadamente 45 cm de comprimento posterior, onde abriga os neurônios motores responsáveis pelas origens das enervação de músculos, dos nervos responsáveis pela motricidade visceral-glandular, e da sensibilidade corpórea (MOURÃO JUNIOR, 2010).

O encéfalo é composto de cérebro, cerebelo e tronco encefálico, tronco este constituído de ponte, bulbo e mesencéfalo. Esta estrutura possui aproximadamente 85 bilhões de neurônios, onde cada neurônio consegue se comunicar com mais de 10.000 fendas sinápticas através de disparos de potenciais de ação (MOURÃO JUNIOR, 2010; STOR, 2009).

Tamanha é a complexidade deste sistema que basta se retirar apenas uma ligação de qualquer neurônio que acarreta em um erro na transmissão de sinal entre cada ponto destinado, pois a corrente elétrica não encontra o caminho específico predestinado, culminando em falha da máquina cerebral.

Se esta falha ocorrer em regiões responsáveis pela memória, teremos então o efeito de déficit de cognição (demência), onde se destacam em números alarmantes as doenças neurodegenerativas (ONU, 2016; HEBERT, 2013; MOURÃO JUNIOR, 2010).

1.2. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas são de caráter progressivo visando ataque direto no SNC, e desta forma interrompendo a intercomunicação da rede neural. Ainda não há cura para estas enfermidades, sendo adotadas apenas medidas de profilaxia e amenização de sintomas.

Estima-se que hábitos relacionados ao bem-estar promovem uma relação direta com qualidade de vida, e com isso uma redução acentuada do estresse que é um dos fatores proeminentes para estes tipos de enfermidades (MOURÃO JUNIOR, 2010; MATTSON, 2004, O'BRIEN, 2011).

Estas doenças além de acarretarem estados de demência no indivíduo, ou seja, mal funcionamento do cérebro, também podem ocasionar ataxias, perdas de movimentos corpóreos, ou seja, em estados mais avançados há perda da qualidade de vida do portador.

Todos os seres vivos de capacidade cognitiva nascem com uma quantidade elevada de neurônios que irão ao longo do tempo se colapsar e perder sua função de comunicação química. Estima-se que humanos possuam cerca de 10^{12} destas células, e a capacidade de perda destas unidades está relacionada com a temporalidade do indivíduo, ou seja, é natural o processo de envelhecimento ser proporcional a perda de células nervosas (MOURÃO JUNIOR, 2010; RADANOVIC, 2016; STOR, 2009; IAB, 2016).

O grande problema com as doenças neurodegenerativas é seu surgimento em qualquer idade, e com tal aparecimento, as células neurais inativam-se mais rapidamente comparadas com o processo de envelhecimento normal, e com isso, dependendo do local ou região do SNC no qual há este declínio, teremos doenças neurodegenerativas diferentes (MATTSON, 2008; MOURÃO JUNIOR, 2010, IAB, 2016).

Há um grande destaque para duas regiões de degeneração: o encéfalo frontal, haja vista sua especificidade direta com ações de planejamento, emoção e julgamento, e a

região hipocampal, por ser a região responsável pela memória. Nestas regiões é atribuído a plasticidade cerebral, termo utilizado para definir a capacidade do cérebro de relacionar e conectar cada componente neural com a respectiva experiência de vida. Logo, à esta região, atribuímos a noção de adaptação temporal, e sua respectiva modificação circunstancial, e com isso, é implementado a temporalidade do indivíduo.

Qualquer tipo de mudança entre os mecanismos de sinapses nestas regiões podem acarretar problemas de reconhecimento espacial, emocional, temporalidade e definição existencial. Quando esta perda é caracterizada nestas regiões específicas, decorrentes de depósitos intersinápticos, dados por placas neurofibrilares insolúveis de 40 resíduos de aminoácidos (AA) em média, definimos o estágio fisiopatológico da Doença de Alzheimer (DA) a qual será o foco da proposta da tese.

1.3. A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

O médico Alois Alzheimer apontou pela primeira vez esta anomalia em 1906, no 37º Congresso de Psiquiatria do Sudoeste da Alemanha, onde reportou a patologia como uma doença inédita que corroborava para o estado de demência, e mais tarde relata aspectos fisiopatológicos destacando as características do acúmulo de placas senis, perda de neurônios e emaranhamento fibrilar (O'BRIEN, 2011; IAB, 2016; MATTSON, 2008; DE FALCO, 2016; MOURÃO JUNIOR, 2010) e na 8ª edição do *Hand Book of Psychiatry*, é deferido em sua homenagem a titulação da síndrome com seu nome.

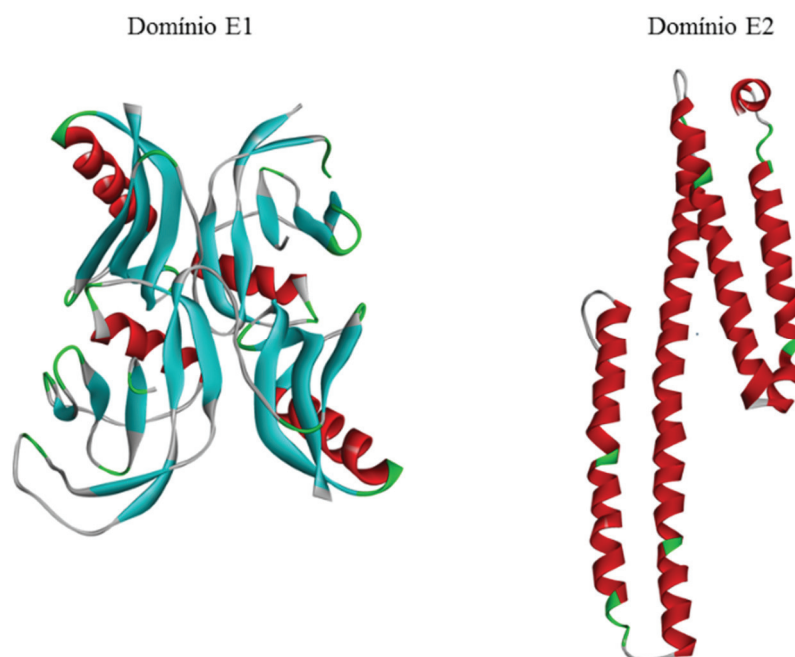
Em termos de diminuição de escala, considerando a doença sob visualização nanométrica, teremos então a interface entre cada região dos neurônios conforme é demonstrado a fenda sináptica, na Figura 1.1.1. Desta forma, é possível argumentar e modelar o conjunto de processos químicos que ocorrem entre cada etapa de eventos neurais.

Falar de DA em linguagem de mecanismos bioquímicos se torna consideravelmente complicado, pois exige do leitor um bom letramento em diversas áreas de conhecimento, logo a presente tese busca esclarecer alguns pontos de modo a propor um entendimento mais específico, com as devidas concepções químicas de cada evento.

O início do processo de declínio neurológico está na segmentação da Proteína Precursora de Amilóide (APP – *Amyloid Protein Precursor*) que pode se manifestar em virtude de um gene localizado no cromossomo 21. Esta proteína é encontrada em formato transmembrânico, e pode ser clivada em diferentes regiões por “tesouras proteicas” definidas como endoproteases ou secretases que se encontram nas membranas glicoproteicas (MATTSON, 2008; LEE, 2011; O’BRIEN, 2011; SCOOT, 2016; HOEFGEN, 2015).

As secretases podem ser divididas em basicamente três tipos: α , β , e γ -secretase. Estas enzimas são responsáveis pela proteólise da APP visualizada na Figura 1.3.1, em ambos domínios, de onde as espécies são chamadas genericamente de peptídeos β -amiloides. Quando estes peptídeos possuem até 16 resíduos de AA são denotados por sAPP α e possuem carácter predominantemente solúvel, e sua origem no espaço extra celular advém da clivagens provenientes das α -secretases. As espécies sAPP α possuem resposta antigênica e despertarão a procedência dos microglíócitos, caracterizados como agentes fagocitários (absorventes) de qualquer patógeno decorrente da região cerebral.

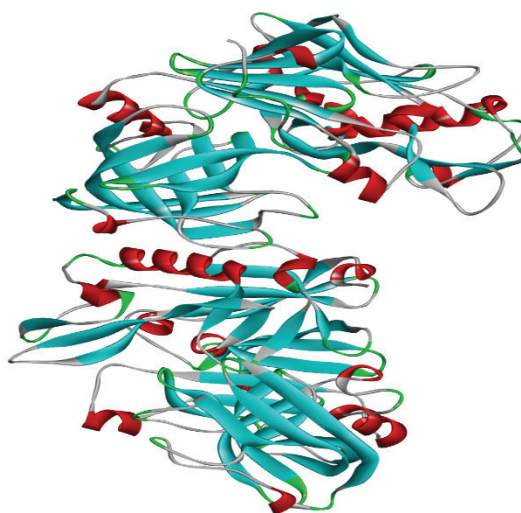
Figura 1.3.1. Domínios da APP, domínio E1 (código pdb 4PWQ) e domínio E2 (código 3NYJ) (LEE, 2011, HOEFGEN, 2015).



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Por outro lado, quando a proteólise da APP é dada por β ou γ -secretases, teremos a ruptura peptídica entre os resíduos 597 e 637, implicando na formação da espécie parcialmente solúveis de 40 resíduos de amino ácidos (AA), definidas como $A\beta(1-40)$. Quando a quebra ocorre entre os AA 597 e 639, o peptídeo possui características extremamente insolúveis e sua notação é dada por $A\beta(1-42)$. Por estas estruturas serem geralmente formadas pela β -secretase (Figura 1.3.2), chama-se de forma geral estas espécies de peptídeos β -amilóide (HAMLEY, 2012; O'BRIEN, 2011).

Figura 1.3.2. Estrutura da β -secretase obtida a partir do código pdb 5HTZ (SCOTT, 2016).



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Embora a formação da espécie $A\beta(1-42)$ seja minoritária, ela é encontrada em maior percentual nas placas de emaranhados fibrilares, ou seja, está muito ligada ao estágio de desenvolvimento da DA com sua respectiva manifestação de demência, uma vez que estas serão as espécies com alto índice de precipitação através de mecanismos de aglomeração. Com estes precipitados entre as fendas sinápticas, haverá um bloqueio plástico de comunicação entre os neurônios afetados, e devido a característica do precipitado portar considerável massa molar, estes precipitados não expressam o ataque dos microgliócitos, e portanto serão consideradas muito neurotóxicas (O'BRIEN, 2011; MOURÃO JUNIOR, 2010; WANG, 2012, DE FALCO, 2016; MATTSON, 2008).

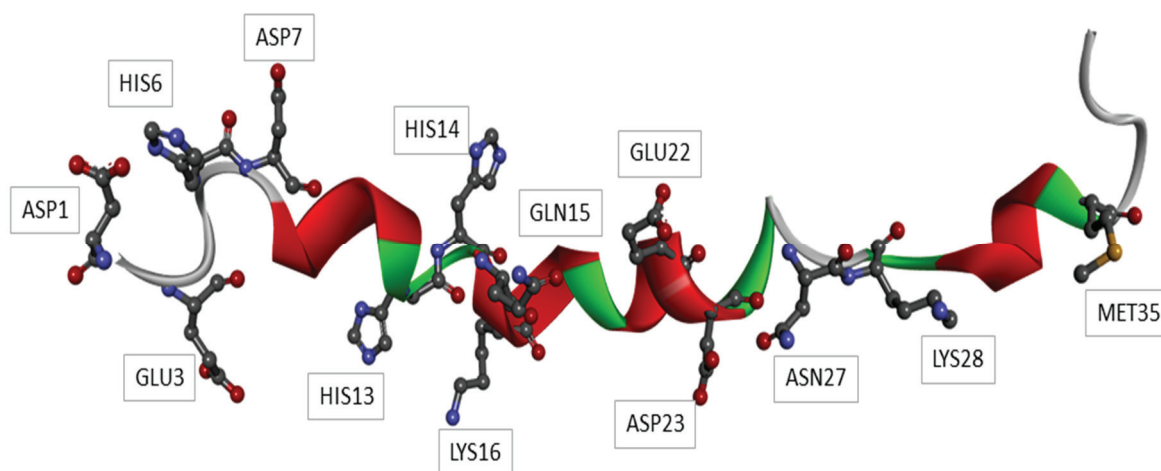
Destes fatos apontados, é notório que sAPP α , também definida como A β (1-16), exerce função reguladora da quebra de APP, pois α -secretase, a mais atuante no processo de proteólise, impede que as enzimas β e γ -secretase atuem em suas rotas metabólicas alternativas.

Quando isso não ocorre, há um excesso de liberação das espécies A β (1-40) e A β (1-42) para o exterior celular, e como consequência ocorre precipitação, conforme já descrito. A sequência de AA para a estrutura monomérica de amiloide com 42 resíduos é demonstrada na Figura 1.3.3, onde se destacam vários resíduos com potencial alvo de coordenação metálica. Esta estrutura foi obtida de medições médias de resolução em solução aquosa, via técnicas de ressonância magnética nuclear, obtida dos trabalhos de Tomaselli e colaboradores (TOMASELLI, 2008), em código pdb 1ZOQ.

Embora existam outras propostas de modelos de amilóide na literatura (PERCZEL, 2007; MILLER, 2010, LÜHRS, 2005), podemos observar na proposta de Tomaselli a não agregação entre estruturas, uma vez que a autora desvenda as transições de conversão entre folhas beta e alfa hélice dos confôrmeros. Predominantemente existe a preferência pela conformação no formato de folhas beta se o meio for muito polar (teor acima de 80% v/v H₂O), em contrapartida, este equilíbrio pode ser deslocado com alteração da concentração de certos solutos, tais como o hexafluoroisopropanol (HFIP), convertendo a conformação novamente para alfa hélice, ou seja, diminuindo a polaridade do meio.

O fato é que independentemente do formato do modelo, a toxicidade da espécie está ligada diretamente na sua capacidade não só aglomerativa, mas também na sua potencialidade de coordenação com espécies neurometálicas que se dispõem solvatadas no meio cerebral (MATTSON, 2008).

Figura 1.3.3. Estrutura do peptídeo β -amilóide com 42 resíduos de amino ácidos, $A\beta(1-42)$, com suas coordenadas dispostas no código pdb 1Z0Q.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A literatura também aponta modelos agrupados em regime de compactação de até 40 AA (LU, 2013), Figura 1.3.4. Neste modelo, predomina-se a parcialidade de solubilização em meio aquoso, sendo estruturas que poderiam servir como mediadoras entre as espécies totalmente insolúveis de 42 resíduos e totalmente solúveis e imunossupressoras, com 16 resíduos. Neste modelo, existe uma questão muito interessante no que tange a proximidade com a realidade de portadores da doença de Alzheimer, pois os autores conseguem projetar 9 estruturas de fitas peptídicas contendo 40 resíduos de amino ácidos, onde a disposição central consegue se dispor de um sítio de aproximadamente 15 Å, legitimando comportamento puramente hidrofóbico nesta localidade.

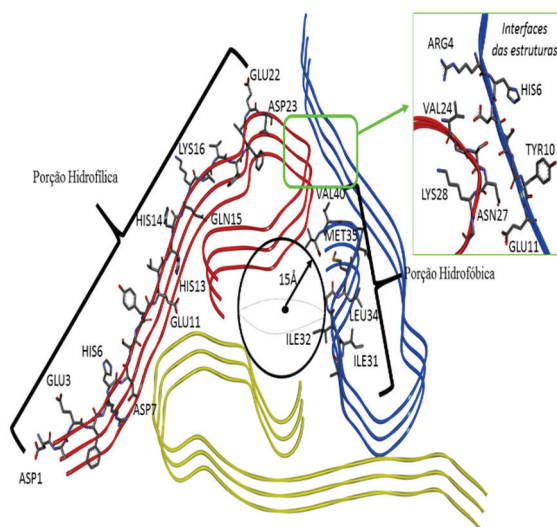
Logo, ligantes de características hidrofóbicas tendem a se direcionar para esta região, ao passo que a outra porção, partindo do resíduo 16 até o primeiro AA, agrupam-se os resíduos que podem servir de alvos substâncias hidrofílicas com potencial propensão para coordenação metálica de espécies neurometálicas catiônicas, tais como Cu(II) e Fe(III), (ALÍ-TORRES, 2011; CAVALCANTI, 2012), que irão se reduzir para estados de oxidação menores, ativando um processo de oxidação radicalar.

Concentrações consideráveis destes cátions são encontradas em portadores de DA, o que indica que as espécies $A\beta$ atuam na produção de Espécies Reativas Oxigenadas

(ROS – *Reactive Oxygen Species*), ou quaisquer outras formas de radicais livres que atacam a membrana dos neurônios. Deste ataque são liberadas neurotoxinas como produtos de oxidação de membrana, tais como o aldeído 4-hidroxi-nonenal (4HNE), atuante como potente inibidor da proteína TAU, uma das mais fundamentais na estabilização dos microtúbulos, organelas responsáveis pela estabilização celular (ALÍ-TORRES, 2011; LOVELL, 1998; MARKESBERY, 1998).

Logo, as quimioterapias empregadas na DA estão relacionadas a cada um destes processos descritos. Seja na parte inicial, onde o foco é dado na proteólise da APP, seja pela inativação de β -secretases devido a formação de espécies tóxicas do tipo $A\beta$, ou até mesmo pelo estímulo da função de α -secretases que através de deslocamento de equilíbrio, teremos uma função mediadora no processo de veto de β e γ -secretases. Também se mostra muito promissor intervir na patologia com a mediação de compostos antioxidantes para o combate de ROS, de maneira a ser uma alternativa para amenizar os sintomas. Um caminho aparentemente promissor, em termos de terapia imediatista, é o ataque das espécies insolúveis de peptídeos β -amilóides. Como estas espécies são as responsáveis por impedir o fluxo de cargas entre as sinapses, impedir que estas espécies atuem como isolantes nestas fendas seria um forte aporte no combate a DA.

Figura 1.3.4. Estrutura do modelo $A\beta(1-40)$ de 9 fitas de peptídeos com o destaque das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas e os AA relevantes no presente trabalho, bem como a região de interface entre as fitas.

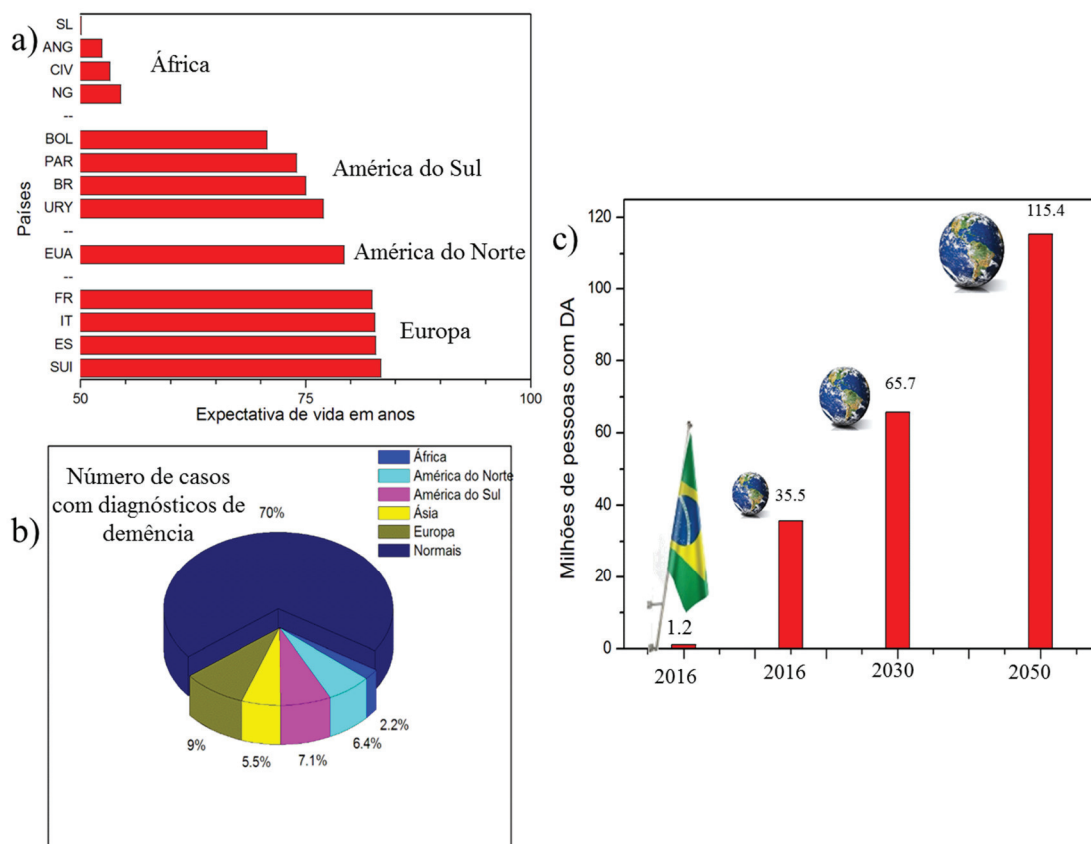


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

1.4. IMPACTOS ESTATÍSTICOS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (IAB, 2016; HEBERT, 2013; ONU, 2016, FDA, 2016) aponta que houve um aumento considerável na expectativa de vida mundial, entretanto as desigualdades ainda são consideradas discrepantes. Há relação da expectativa de vida com as condições desumanas que algumas áreas do globo terrestre possuem. Países do continente africano demonstram uma discrepância neste índice quando comparados a qualquer outro continente. A figura a seguir demonstra as relações quantitativas dadas pela Organização das Nações Unidas no Brasil (ONUBR).

Figura 1.4.1. a) Algumas expectativas de vida para países expressivos em continentes distintos. b) Relação de número de casos com pessoas portadoras de casos com demência, incluindo Alzheimer. c) Número de pessoas que possuem Alzheimer, projetando o número de enfermos até o ano de 2050.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

No continente africano, conforme aponta a Figura 1.4.1a, é possível propor um índice de expectativa de vida em aproximadamente 52,6 anos em média, quando consideramos os respectivos países: Serra Leoa (SL), Angola (ANG), Costa do Marfim (CIV) e Nigéria (NG).

O valor de 52,6 anos destoa em relação aos países latino americanos, que possuem média de 74,2 anos, considerando: Bolívia (BOL), Paraguai (PAR), Brasil (BR) e Uruguai (URY). O Brasil possui um interessante saldo etário (75,0 anos), o qual desloca a expectativa dos países latinos para valores maiores.

Nos Estados Unidos da América (EUA) existe um valor médio de 79,3 anos, sendo este muito próximo do valor de 82,7 anos encontrado nos países de origem européia, se considerarmos para os cálculos, os países: França (FR), Itália (IT), Espanha (ES) e Suíça (SUI).

Como a expectativa de vida nos países em desenvolvimento e desenvolvidos tendem a cada vez mais aumentar, segundo os dados apurados pela OMS, um fator preocupante torna-se a qualidade de vida dos indivíduos que irão atingir, ou até mesmo, passar os índices de expectativa de vida.

Logo, da maioria de enfermos que são declarados como portadores de algum caso de demência, e que estão com idade acima de 60 anos, tornam-se as evidências das doenças neurodegenerativas, destacáveis nos continentes. E, como a expectativa de vida supera os 65 anos somente em alguns continentes, estes tipos de enfermidades serão mais recorrentes nos países europeus, da América do Norte e no Brasil, conforme é demonstrado na Figura 1.4.1b.

Em relação ao número de casos de demência, temos na América do Sul 7,1% de casos declarados, onde a OMS relata que em 2016, o Brasil possui 1,2 milhões de pessoas com DA, o equivalente a 3,4% da população mundial (35,5 milhões) diagnosticada com DA só em 2016.

A expectativa de vida tende a aumentar nos últimos 35 anos. Até 2050, haverá um total de aproximadamente 115 milhões de pessoas no mundo diagnosticadas com Alzheimer (ver Figura 1.4.1c), e fazendo uma projeção proporcional, só no Brasil será possível ter aproximadamente 10,9% deste total estimado, isso se, nenhuma medida profilática for tomada. Ou seja, políticas públicas devem se mobilizar para a criação de

um protocolo de controle destes índices. Caso nenhuma medida for de fato efetivada, em 2050, o Brasil possuirá 12,6 milhões de brasileiros afetados pela DA, aproximadamente.

1.5. NEUROQUÍMICA

1.5.1. Descrição de inibidores de colinesterases

A inibição de enzimas do tipo acetilcolinesterase (AChE) é a medida de maior prevalência, e inevitável para combater os efeitos dos danos da DA, portanto praticamente todos medicamentos regulados pela ANVISA e FDA são voltados para este alvo farmacológico (DE FALCO, 2012; FORLENZA, 2012; SUGIMOTO, 2002; PETRONILHO, 2002; ANVISA, 2016; FDA, 2016), portanto é necessário a descrição de forma detalhada para este tipo de processo.

Durante a transmissão de corrente entre os neurônios, o neurotransmissor acetilcolina (ACh) está muito ligado ao estímulo de controle motor, de cognição e a alocação de memória. Para que haja transmissão de sinal em um neurônio colinérgico pré-sináptico para um pós-sináptico, é necessário que seja efetivada a síntese de moléculas denominadas de acetilcolina (ACh). Para tal, este processo é efetivado a partir da molécula de colina (Ch) e um precursor intitulado de acetil-CoA, onde o radical acetil será transmitido para Ch através da mediação enzimática da acetilcolintransferase (aTr), (PETRONILHO, 2011; MOURÃO JUNIOR, 2010; PETRONILHO, 2011).

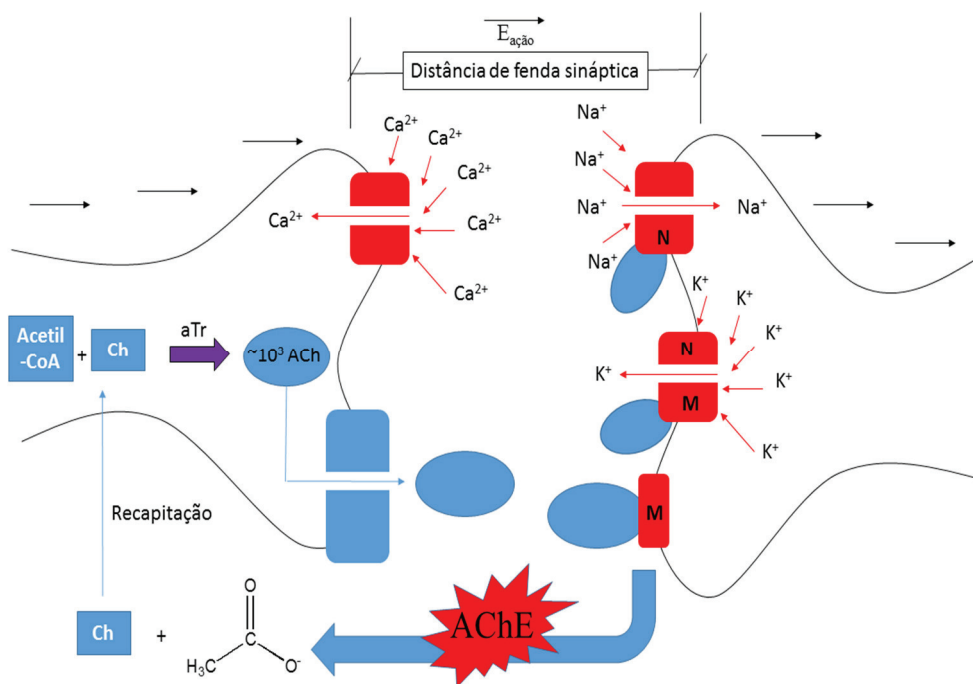
Estas moléculas irão se agrupar em grandes quantidades, na ordem de 10^3 até 10^4 compostos por vesícula dentro de cada neurônio, e serão resguardadas para disparo no espaço extracelular com a ocorrência do potencial de ação, de maneira que sejam liberados pacotes fixos de aproximadamente 100 vesículas. Na Figura 1.5.1 é esquematizado todo processo de transmissão de sinal.

Em virtude da chegada do potencial de ação no terminal do neurônio, canais de cálcio serão abertos, ocorrendo então entrada de cátions Ca^{2+} para dentro do citosol, alterando a condutância da membrana, e assim, contribuindo para o estímulo da exocitose das vesículas de ACh acumuladas.

Estes neurotransmissores irão se ligar aos receptores muscarínicos (M) e nicotínicos (N) os quais irão modular a entrada de Na^+ e saída de K^+ , localizados nos neurônios pós-sinápticos. Com isso, há indução de um novo potencial de ação no neurônio subsequente, acarretando na despolarização do mesmo, facilitando novamente a entrada de Ca^{2+} em sua membrana, reiniciando todo processo (FORLENZA, 2005; PETRONILHO, 2011; MOURÃO JUNIOR, 2010; RADANOVIC, 2016).

Após o disparo, a ACh necessita ser rapidamente hidrolisada em acetato e Ch, para que haja recapitação de Ch e repolarização do neurônio pré-sináptico, de modo a reiniciar o ciclo neuroquímico de transmissão de sinal. Assim, a enzima acetilcolinesterase (AChE) cumprirá o papel fundamental de hidrolisar a ACh e modular o fluxo de carga nos neurônios.

Figura 1.5.1. Esquemática da passagem de corrente entre um neurônio pré e pós sináptico através da modulação de vesículas de ACh e de sua respectiva hidrólise via AChE.

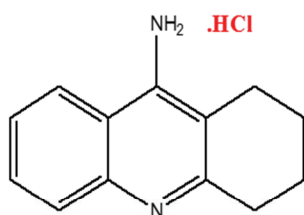


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

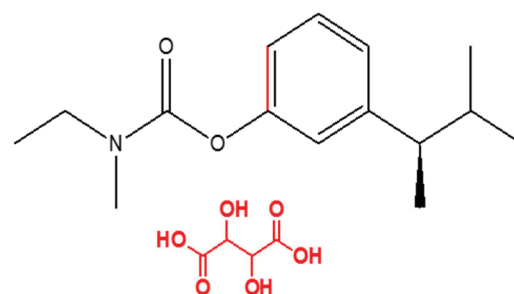
Ou seja, inibindo AChE é uma forma de forçar a passagem do potencial de ação em sentido único, de um neurônio pré-sináptico para algum outro pós-sináptico, sem despolarização do mesmo, e com isso, teremos um ciclo de ativação indo nas regiões debilitadas pelo excesso de espécies A β acumuladas entre as fendas de transmissão. Todavia, esta inibição deve ser de forma reversível ou pseudo-reversível para que não haja letalidade no indivíduo que necessite utilizar desta classe de fármacos. Na Figura 1.5.2, são demonstradas fórmulas estruturais e os respectivos nomes comerciais para os compostos utilizados contra a DA que atuam na inibição da AChE (DE FALCO, 2016; FORLENZA, 2005; PETRONILHO, 2011; SUGIMOTO, 2002).

Figura 1.5.2. Compostos inibidores de AChE aceitos no tratamento da DA.

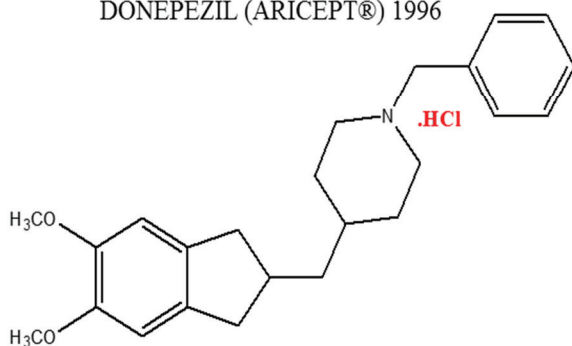
TACRINA (COGNEX®) 1993



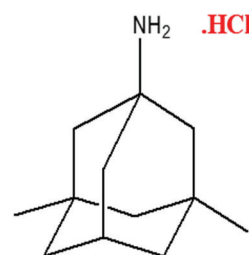
RIVASTIGMINA (EXELON®) 2000



DONEPEZIL (ARICEPT®) 1996



MEMANTINA (NEMADA®) 2003



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Embora se tenha considerável apelo na inativação de AChE, vale ressaltar que estes medicamentos possuem ação muito restritiva, como exemplo disso, temos a Tacrina. Seu uso foi deliberado em 1993, entretanto possui baixíssima biodisponibilidade e alta toxicidade hepática, comprometendo o fígado do usuário. Atualmente é recomendada apenas em último caso, quando o portador da síndrome não responde as outras classes de medicamentos (DE FALCO, 2016; FORLENZA, 2005; PETRONILHO, 2011; SUGIMOTO, 2002).

O Donepezil, embora descoberto em meados da década de 80, foi liberado posteriormente a Tacrina, somente em 1996. Este ganha profundo apelo no tratamento, sendo considerado a primeira opção de escolha, uma vez que possui alta seletividade no reconhecimento da AChE e desta forma, proporciona maior taxa na concentração de ACh nas sinapses. Este composto não possui interação alimentícia com sua absorção, sendo completamente absorvido em aproximadamente 4 horas de ingestão. Exibe elevada capacidade para passar através da barreira hematoencefálica, e, portanto, agindo no cerne da síndrome. Entretanto, a cautela deve ser tomada em relação a função renal do usuário após administração, pois possui excreção nos rins, após metabolização hepática (SUGIMOTO, 2002, DE FALCO, 2016).

Outra enzima que merece destaque no processo de hidrólise de ACh é a butirilcolinesterase (BuChE). Esta, atuará também para recapitação de Ch, no entanto, só é recorrida quando os níveis de ACh são consideravelmente altos, mas elevando-se a concentração deste Ch, é mais provável a inibição de AChE e não de BuChE. Neste sentido, tanto a Tacrina quanto a Rivastigmina mostram-se com potencial inibição, pois ambas inibem simultaneamente ambas enzimas, sendo a BuChE uma segunda alternativa no combate a DA (DE FALCO, 2016; FORLENZA, 2005; PETRONILHO, 2011; SUGIMOTO, 2002).

A Memantina possui um apelo em particular, e por enquanto, é o único fármaco relevante para reparar danos em níveis moderados ou severos. Ela possui ação direta no bloqueio de receptores de NDMA (N-metil-D-Aspartato). Enfermos de distúrbios cerebrais liberam glutamato em quantidade excessiva, e quando o glutamato é acometido de forma desregulada, e alcança os receptores, desencadeia o influxo livre e excessivo de Ca^{2+} para dentro da célula que levará a morte celular (PETRONILHO, 2011, MOURÃO JUNIOR, 2010).

Com este perfil de compostos, fica claro que intervir no sistema de recepção neural é muito complicado, pois se tornam muito expressivos os efeitos colaterais adquiridos tais como a cefaleia, constipação, diarreia, tontura, sonolência, confusão mental e também, o mais indesejado de todos os sintomas: resistência medicamentosa.

Desta forma, o paciente necessitará de novas terapias que incluem-se na definição de “alternativas”, tais como em inibição de radicais livres e as terapias de quelação para eliminar o excesso de Fe(III), Cu(II) e Zn(II) predominantes em excessiva expressão em portadores de Alzheimer, entre as fendas sinápticas (MATTSON, 2008), as quais serão descritas a seguir. Para auxiliar novas terapias, a presente tese visa investigar processos de ruptura de estágios aglomerativos de agregados de peptídeos amiloides.

1.5.2. Emprego de compostos antioxidantes

Embora haja em primeiro momento a preferência pela inibição entre a comunicação química das vesículas de ACh e os receptores ionotrópicos (M e N), é necessário destacar também a possibilidade de alvejar radicais hidroxil ($\text{OH}\cdot$) e peroxil ($\text{HOO}\cdot$), que são produtos de reações redox entre espécies $\text{A}\beta$, Cu(II) e Fe(III) e H_2O . Como já pronunciado, estas espécies são classificadas como espécies reativas oxigenadas (ROS) e irão desencadear o estresse oxidativo da membrana plasmática do neurônio. (CARAGOUNIS, 2007; BORA, 2010; VALENSIN, 2012; VIEGAS; 2011; ALÍ-TORRES, 2011).

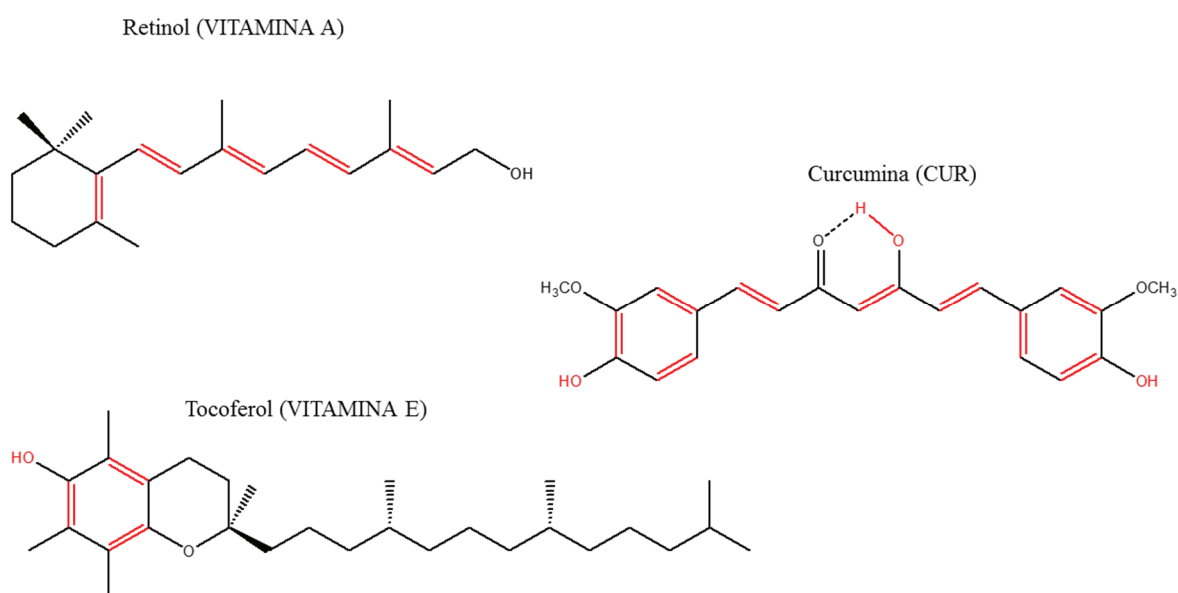
Portanto, compostos que sejam empregados como moduladores de radicais livres são bem-vindos. Em termos de estratégia de transporte através da barreira hematoencefálica, estas moléculas devem portar estrutura predominantemente hidrofóbica, e portar grupos que irão se auto-estabilizar no período pós-reacional via efeito mesomérico, logo após quando sofrem ataque de radicais livres, e com isso, há estagnação do processo de propagação radicalar que, em tese, seria muito mais viável sem o pronunciamento de tal efeito.

É possível se destacar compostos muito simples com tais propriedades do ponto de vista estrutural, como o Tocoferol (vitamina E), o Retinol (vitamina A) (GUIMARÃES, 2010), e a Curcumina (SHEN, 2016), conforme ilustra na Figura 1.5.2.1.

Nestas vitaminas, apesar de possuírem especificidade de ação no organismo, atuantes como coenzimas, é possível destacar o efeito anti-oxidativo eminente intrínseco do composto, assim como a Curcumina (SHEN, 2016; NAMRATHA, 2013; AGNIHOTRI, 2011).

Observando a estrutura destes compostos podemos destacar no grupo fenólico do Tocoferol, como o grupo mais proeminente de ataque oxidativo pelas ROS. Já na estrutura do Retinol, as instaurações da cadeia hidrofóbica são potenciais alvos. No entanto, para derivados de curcumina, a literatura aponta que o rompimento da ligação entre as carbonilas é muito mais favorável do que qualquer outro tipo de alvejamento (AGNIHOTRI, 2011).

Figura 1.5.2.1. Estruturas de compostos naturais utilizados no combate de radicais livres.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

1.5.3. Emprego de compostos quelantes

Como já relatado, durante a síndrome da DA, é importante marcar várias formas de tratamentos possíveis devido a sua alta complexidade. A DA consegue debilitar o portador com várias formas de mecanismos bioquímicos distintos. Acertar como primeira escolha de tratamento algum tipo de inibidor de AChE é desejável, no entanto, não é definitivo. Desta forma, surgem as metodologias “alternativas”, com emprego de agentes atenuantes de classes de ROS. Merecido destaque ganha nos compostos envolvidos na teoria de quelação, empregados como sequestrantes de neurocátions encontrados em excesso nas placas fibrilares, tais como Cu(II), Fe(III), Zn(II) e Al(III), uma vez que estes cátions conjuntamente com os agregados supramoleculares de β -amilóides formam excessivas quantidades de radicais livres (CARAGOUNIS, 2007; COLLIN, 2013; VIEGAS, 2011; ALÍ-TORRES, 2011, DE FALCO, 2016). Neste sentido, estes cátions estão intimamente ligados ao estresse oxidativo de membrana plasmática, e ao capturá-los teremos a possibilidade de prolongar a sobrevida do enfermo.

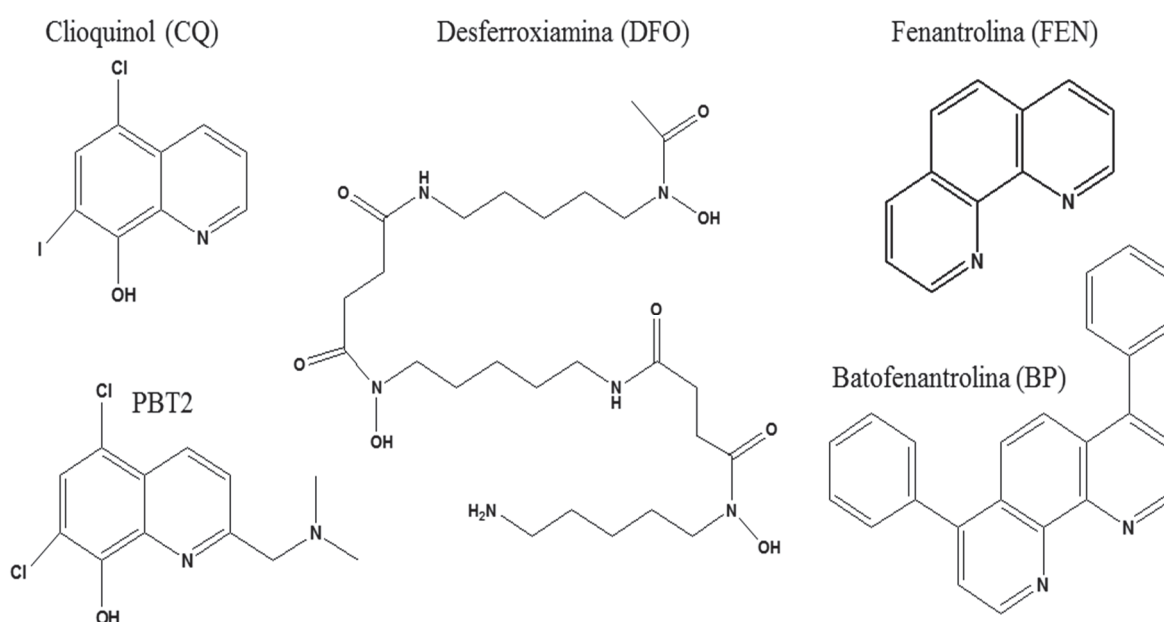
Estudos decorrentes de terapias alternativas a causa, apontam o emprego de Desferroxiamina (DFO), antes utilizada na terapia da hemocromatose, como viável agente quelante destes cátions. Sabendo da sua seletividade na captura de Fe(III), a DFO mostrou-se capaz de atuar na mediação de quantidades excessivas de cátions férricos do cérebro.

Observando as estruturas destas classes de compostos na Figura 1.5.3.1, é notório observar que as geometria de adequações podem ajustar um formato que não anula o momento dipolar da DFO sob a condição de quelato. Desta forma, seu efeito terá eficiência se a aplicação for de modo subcutâneo por longos períodos de uso, o que causa grandes incômodos para os usuários, uma vez que compostos muito polares possuem dificuldade de passagem na barreira hematoencefálica (DE FALCO, 2016; MATTSON, 2008; CARAGOUNIS, 2007).

Outra escolha para o emprego da terapia de quelação é o emprego do Clioquinol, molécula relativamente pequena, simples e passível de transporte hematoencefálico, exibindo seletividade notória para Cu(II) e Zn(II). Em detrimento a estas propriedades, este agente complexante apresentou complicações ao colaborar com o surgimento de neuropatia mielo-óptica subaguda (DE FALCO, 2016).

Utilizando a estratégia de hibridização e bioisosterismo molecular, pesquisadores brasileiros sintetizaram um composto (PBT2), que se encontra atualmente em testes da fase 2 de aprovação comercial do fármaco (CARAGOUNIS, 2007; DE FALCO, 2016). Esta nova molécula é atuante na redistribuição de íons metálicos, inativação de oligômeros de amilóide, e também na desagregação de espécies maiores, ou seja, pode ser classificada como um composto multifuncional, e com potencial emprego anti-DA.

Figura 1.5.3.1. Estruturas de ligantes orgânicos com potencial terapêutico na quelação de neurocátions.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

É também relatado na literatura o similar potencial terapêutico não só da quelação, mas também da desaglomeração de derivados da o-fenantrolina (ofen). Esta classe de compostos merece demasiado destaque desde os trabalhos de Caragounis e colaboradores (CARAGOUNIS, 2007) no qual é apontado uma série de agentes análogos da ofen, e da Quinolina (CQ) aplicados com esta finalidade.

Os resultados da autora apontam que estes ligantes podem tanto sequestrar os cátions já relatados, quanto mediar o transporte de cátions através da membrana, favorecendo a entrada de Cu(I) para o citosol, pois devido a coordenação de forma

tetraédrica com Cu(II) ser muito seletiva, estes ligantes atacam preferencialmente espécies com carga dois.

Todos os compostos citados merecem atenção em relação ao potencial terapêutico, onde cada situação é deferida à melhor forma de terapia do indivíduo portador da DA. E, com isso, a escolha poderá ser feita desde inibidores de AChE, agentes anti-ROS e compostos quelantes.

Aproveitando-se do efeito neuroacumulativo de espécies derivadas de platina(II) em regiões cerebrais, Barnham e colaboradores (BARNHAM, 2008) resolvem justapor esta propriedade com os resultados obtidos por Caragounis e colaboradores (CARAGOUNIS, 2007). Desta forma, uma nova proposta para potenciais ativos com potencial atividade *in vitro* antiagregação é sugerida visando derivados de complexos metálicos do tipo [Pt(ofen)Cl₂].

1.5.4. Utilização de platina(II) como potencial apelo no Mal de Alzheimer

Como já referido, a DA é uma doença que ataca predominantemente a região que é responsável pela memória recente do indivíduo, e nestas regiões específicas ocorrerão acúmulos de peptídeos neurotóxicos que impedem as comunicações interneurais, o que procede na inativação da cadeia de transmissão elétrica neural.

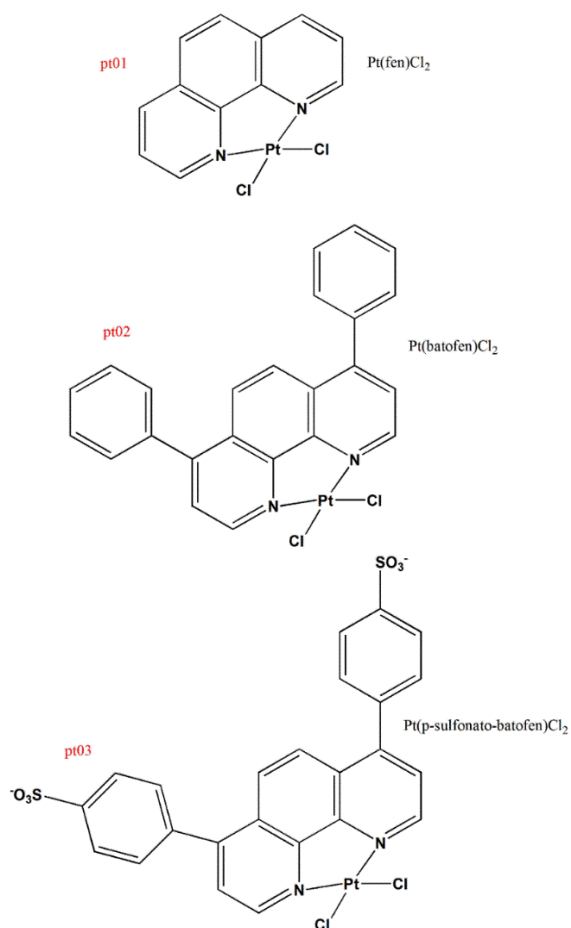
O grupo de estudos de Barnham, observando o perfil do ciclo bioquímico da doença, no que tange as características neurotóxicas para a platina, propuseram 3 complexos metálicos derivados de platina(II) e ligantes fenantrolínicos (ofen) (Figura 1.5.4.1), complexos estes que demonstraram ser ativos no modelo *in vitro* (BARNHAM, 2008; KENCHE, 2013; STRELTSOV, 2013). O efeito foi praticamente imediato, com resultados de coordenação metálica preferencial nos resíduos de histidina (HIS) (BARNHAM, 2008).

Todavia, o peptídeo porta um resíduo de metionina localizado na posição 35 (MET35), e conforme se expressa no princípio de Person, a metionina deveria ser o principal alvo destes compostos, fato este que não pode ser constatado nos experimentos de Barnham. Portanto, responder esta questão de preferência de sítio é muito válida, pois teremos que entender como o composto interage com o receptor molecular, tornando-o

fundamental para a elucidação do mecanismo de ação na resposta biológica, o que implica entender possíveis efeitos alostéricos, cinéticos ou termodinâmicos.

Na Figura 1.5.4.1 são mostradas estas estruturas de compostos platinados utilizados no estudo de Barnham, onde o autor visou investigar a mudança da hidrofobicidade do ligante pelas substituições do anel fenantrolínico, nas posições 4 e 7, obtendo como destaque o complexo Pt(ofen)Cl₂ como potencial efeito anti-agregação, aqui definido de pt01.

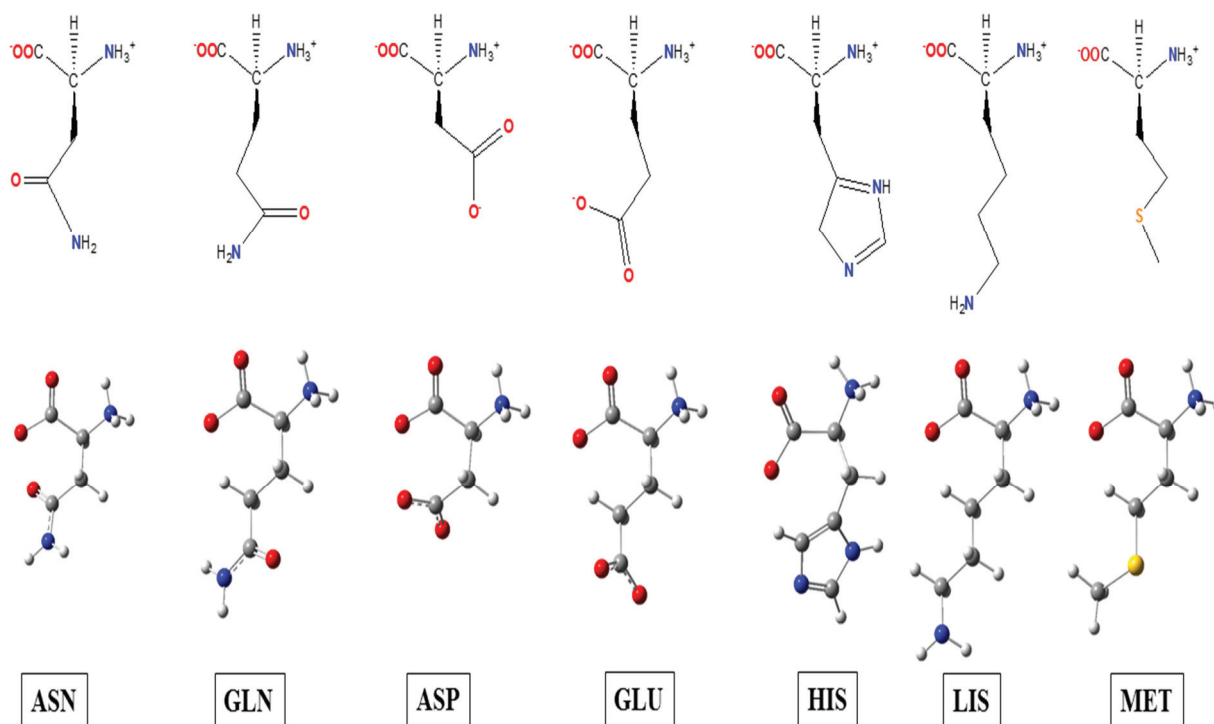
Figura 1.5.4.1. Estruturas dos principais compostos derivados da ofen, destacando sua notação utilizada.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

São inúmeros os compostos que utilizam a estratégia do uso de um núcleo metálico para aumentar a ação farmacológica. Para o átomo de platina munido de ligante cloretos, em particular com o estado de oxidação 2, é possível perceber um comportamento semelhante a *cis*-diaminodichloroplatina(II) (*cis*-DDP). Ou seja, o perfil da cinética e da termodinâmica de interação destes compostos, com os aminoácidos (AA) alvo se torna de relevância, para propor o mecanismo reacional com substituição nucleofílica, em tese de segunda ordem (S_N2) (CHVAL, 2000). A seguir, na Figura 1.5.4.2 são demonstradas as estruturas dos AA que possuem relevância para estudo mecanístico da cinética de interação, pois em conjunto, constituem em maioria de peptídeos amiloide.

Figura 1.5.4.2. Estruturas dos AA contidos na estruturação de $A\beta$ que são mais relevantes para estudo de coordenação metálica em seu estado zwitterion.



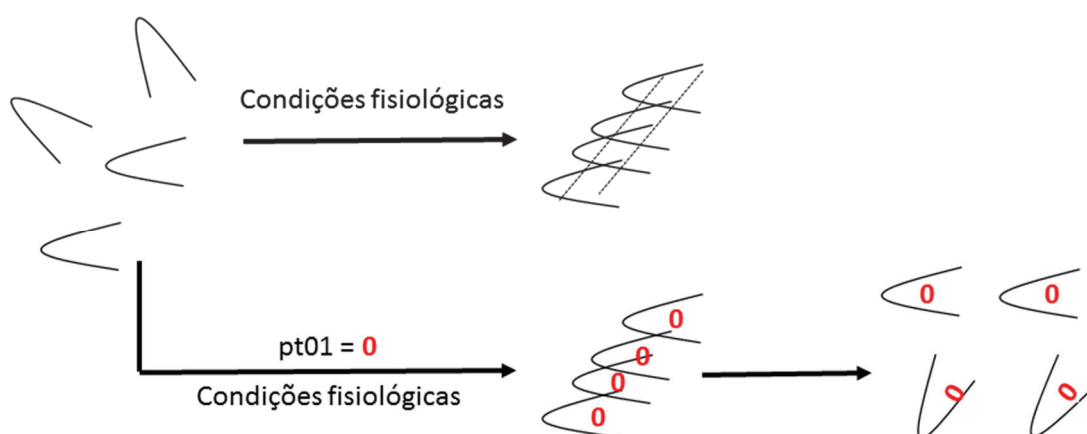
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Na Figura 1.5.4.2, se observa que todos AA estão em suas formas propícias para coordenação metálica, ou seja, forma zwitteriônica. Considerando pH fisiológico (aproximadamente 7,2-7,4), os resíduos ASP (pka=3,86) e GLU (pka=4,07) estarão desprotonados no grupo carboxilado terminal da cadeia alquil. O resíduo de HIS

($pK_a=6,10$) encontra-se desprotonado em $N\epsilon$, e o resíduo de LYS ($pK_a=10,53$), portará o grupo amino na cadeia R terminal NH_3^+ do AA, no entanto, experimentos na literatura apontam a possibilidade de coordenação no sítio de LYS de forma considerável (MA, 2011), e desta forma, o modelo desprotonado torna-se mais verídico comparado com o experimento.

Nos trabalhos de Ma e Collin (MA, 2011, 2013; COLLIN, 2013) são investigados os complexos derivados de pt01, antes estudados por Barnham, como potenciais inibidores de $A\beta(1-16)$ e $A\beta(1-28)$. Ambas as propostas não consideraram modelos contendo o resíduo de MET35, que só aparece com expressão em modelos $A\beta(1-40)$ e $A\beta(1-42)$, espécies mais insolúveis e mais complexas de serem manipuladas. Nestes trabalhos, os complexos $[A\beta:Pt(ofen)]^{2+}$ foram separados através da utilização da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada com detecção no Espectrômetro de Massas (ESI-MS). Foram detectadas grande populações de complexos quelatos nos sítios GLU7:HIS14, GLU11:HIS13, HIS6:HIS14 e HIS13:LYS16, possuindo cargas variáveis entre +1 até +4.

Figura 1.5.4.3. Esquema de suposta atuação das espécies derivadas de pt01 em estágios de aglomeração de espécies $A\beta$.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

A partir destes experimentos, os autores propõem o mecanismo de atuação destes compostos conforme a Figura 1.5.4.3, onde inicialmente existe considerável contato entre cada fita peptídica, iniciando a nucleação por contato puramente supramolecular, e com

a formação de agregados maiores, os autores comentam a possibilidade de inserção dos derivados pt01 na região interior dos agregados, nas mesmas condições. Com isso, seria formado quelatos monoméricos de cargas até +4, conforme elucidado nos experimentos. Porém, a grande questão seria o estágio inicial da inserção de complexos do tipo pt01, pois seu ligante de origem (ofen) pode ser utilizada como agente anti-aglomerativo (CARAGOUNIS, 2007).

2. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO

A presente proposta visa esclarecer eventos químicos relacionados com doenças neurodegenerativas, atendendo como foco principal da Doença de Alzheimer (DA). Desta forma, investigar como acontecem os estágios de desaglomeração se torna primordial como proposta geral do trabalho, assim como analisar, como certas classes de compostos derivados da fenantrolina e da curcumina atuam como mediadoras de interações entre as fitas peptídicas de amiloide.

2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Para facilitar o entendimento da tese, os objetivos específicos serão expostos na forma de tópicos:

- Investigar qual é o melhor nível de teoria quântica, utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) em conjunto com a melhor função de base, para reportar a reatividade e estabilidade com AA específicos que constituem o peptídeo β -amilóide;
- Propor a ordem de reatividade e estabilidade entre ASP, ASN, GLN, GLU, LYS, HYS e MET com os complexos derivados de pt01;
- Montar um protocolo experimental, para obtenção da constante de hidrólise e substituição nucleofílica entre os derivados de pt01 e os AA supracitados;
- Parametrizar a esfera de coordenação do complexo pt01 para realização de Dinâmica Molecular (DM);
- Utilizando DM, propor qual o será o efeito, na flexibilidade dos AA centrais de agregados de amilóide, quando inserimos ligantes derivados de curcuminas, fenantrolina e pt01.

3. METODOLOGIA PROPOSTA

O trabalho foi dividido em três partes metodológicas específicas. Desta forma, primeiramente uma abordagem experimental foi elaborada para verificação do controle reacional entre os processos de hidrólises de complexos metálicos e ataque competitivo com um AA modelo. Para isso, o complexo [Pt(ofen)Cl₂] (pt01) foi sintetizado, caracterizado e investigado utilizando a Espectroscopia na região do Ultra Violeta – Visível (UV-vis) bem como a Espectroscopia Raman, e Análise Elementar.

Na segunda parte, a proposta foi investigar todos os potenciais AA que constituem potenciais sítios de coordenação metálica por parte do peptídeo e complexos de Pt(II), com o mesmo protocolo anteriormente utilizado. Tal procedimento foi executado com uso da Mecânica Quântica (MQ), empregando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT).

E, em um terceiro momento, com o intuito de verificação das formas de interação entre os derivados de fenantrolina e curcuminas com os modelos de agregados encontrados na literatura, utilizou-se a metodologia de Ancoragem Molecular (*Docking*) para triar qual a melhor pose obtida frente a função de *Score* escolhida. Com esta estrutura, foi inicializado o processo de evolução temporal com protocolo de simulação de Dinâmica Molecular (DM) (DE SOUSA, 2012) em longo tempo de simulação, no ímpeto de aproximar com possíveis resultados experimentais.

Para detalhamento de cada porção metodológica, subseções serão vistas a seguir, focando em cada ponto que deve ser destacado.

3.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1.1. Materiais e métodos

O espectrômetro utilizado para investigação da região UV-vis de 200 - 400 nm foi o modelo Shimadzu PC 1601, com cubetas de quartzo de caminho óptico de 1cm de feixe duplo. Para investigação de efetiva coordenação metálica, foi selecionada a faixa de 200 – 400 cm⁻¹ com a técnica de espectroscopia Raman, utilizando o aparelho Bruker RFS100

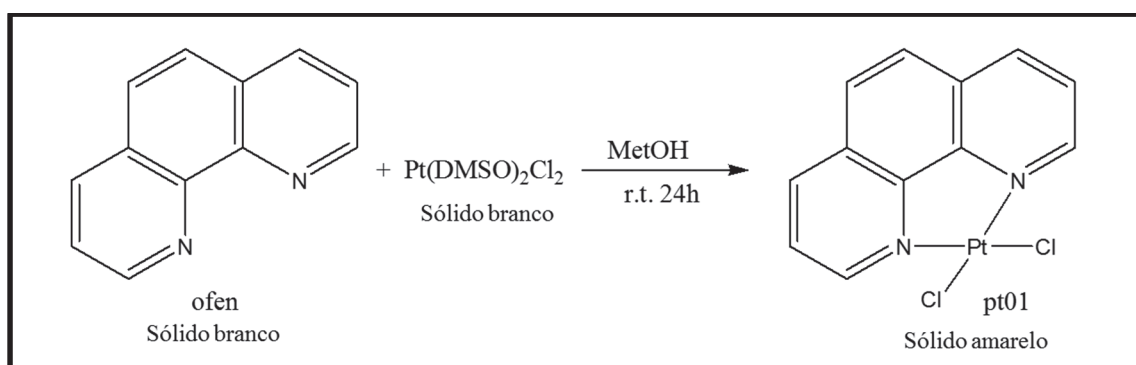
FT-Raman, equipado por refrigeração de nitrogênio líquido, *laser* Nd:YAG, possuindo resolução espectral de 4 cm^{-1} , com o protocolo de 256 *scans* e 40mW de potência. Para reportar a proporção e concretização da estrutura molecular, foi utilizado a análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) através do analisador Perkin-Elmer 2400.

3.1.2. Síntese do complexo modelo [Pt(ofen)Cl₂] – *pt01*

A metodologia de síntese foi adaptada analisando o trabalho de Price e colaboradores (PRICE, 1972), e desta foi realizada com proporção de 0,1 mmol de [Pt(DMSO)₂Cl₂] para 0,1 mmol de ofen, em meio de 20,0 mL de metanol (MeOH).

Esta mistura reacional foi mantida por agitação durante 24 horas, sendo obtido um sólido de intenso aspecto amarelado, que posteriormente foi lavado com MetOH e obtendo 76% de rendimento. Na Figura 3.1.2.1, é demonstrado o esquema reacional para obtenção de *pt01*. Todos os reagentes e solventes foram utilizados sem purificação adicional.

Figura 3.1.2.1. Esquema de montagem reacional para obtenção do complexo modelo *pt01*.

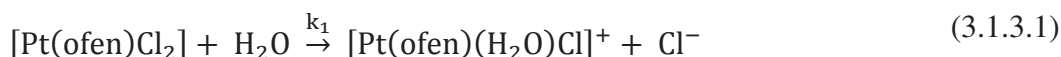


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

3.1.3. Procedimentos de análises da cinética

Para propor a metodológica de análise do perfil cinético reacional, constatações de montagens de aparatos e tempos reacionais foram embasados no trabalho de Djeković e colaboradores (DJEKOVIC, 2012). Os complexos definidos como pt01, aqui serão explicitamente tratados por $[\text{Pt}(\text{ofen})\text{Cl}_2]$, onde foram alvejados por AA nitrogenados ou pela molécula de água ($\text{Nu} = \text{HIS}$ ou H_2O).

No entanto, para realização de um experimento mais próximo das condições fisiológicas, o pH foi mantido em aproximadamente 7,2, o uso do etanol (EtOH) foi empregado na solubilização de pt01, e água foi escolhida para solubilização de HIS. Desta forma, tanto o processo de solvólise, e que envolve a troca de cloreto por H_2O ($\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}$), quanto a troca de cloreto envolvendo HIS (Cl^-/HIS), poderão ser investigados nas equações 3.1.3.1-2, tratando o sistema como processos paralelos.



Desta forma, é possível resolver as leis cinéticas reacionais, com a velocidade reacional global dada pela equação 3.1.3.3.

$$v = k_1[\text{Pt}(\text{ofen})\text{Cl}_2] + k_2[\text{Pt}(\text{ofen})\text{Cl}_2][\text{HIS}] \quad (3.1.3.3)$$

Se o processo for considerado em condição de *pseudo*-primeira ordem, ou seja, adotando $[\text{HIS}] \gg [\text{Pt}(\text{ofen})\text{Cl}_2]$, poderemos considerar constante a concentração inicial de nucleófilo frente a concentração do complexo, e assim agrupar em apenas um termo cinético observado experimentalmente (k_{obs}), conforme é detalhado na equação 3.1.3.4.

$$v = (k_1 + k_2[\text{HIS}])[\text{Pt}(\text{ofen})\text{Cl}_2] = k_{\text{obs}}[\text{Pt}(\text{ofen})\text{Cl}_2] \quad (3.1.3.4)$$

Para resolução da equação 3.1.3.4 se faz necessário monitoramento da concentração de pt01 ao longo do tempo. E, para isso, dois experimentos foram planejados de forma isolada de modo a obter os valores experimentais de k_1 e k_2 , onde primeiramente, somente a solvólise foi analisada, dada pela equação 3.1.3.1.

Para isso, 2,4 mL de solução 0.5 mmol L⁻¹ de pt01 foi adicionada a 57,6 mL de EtOH, e adicionado 20 mL de água deionizada. Ou seja, desta forma $[\text{HIS}] = 0$, sendo possível considerar a equação 3.1.3.5 para medição experimental.

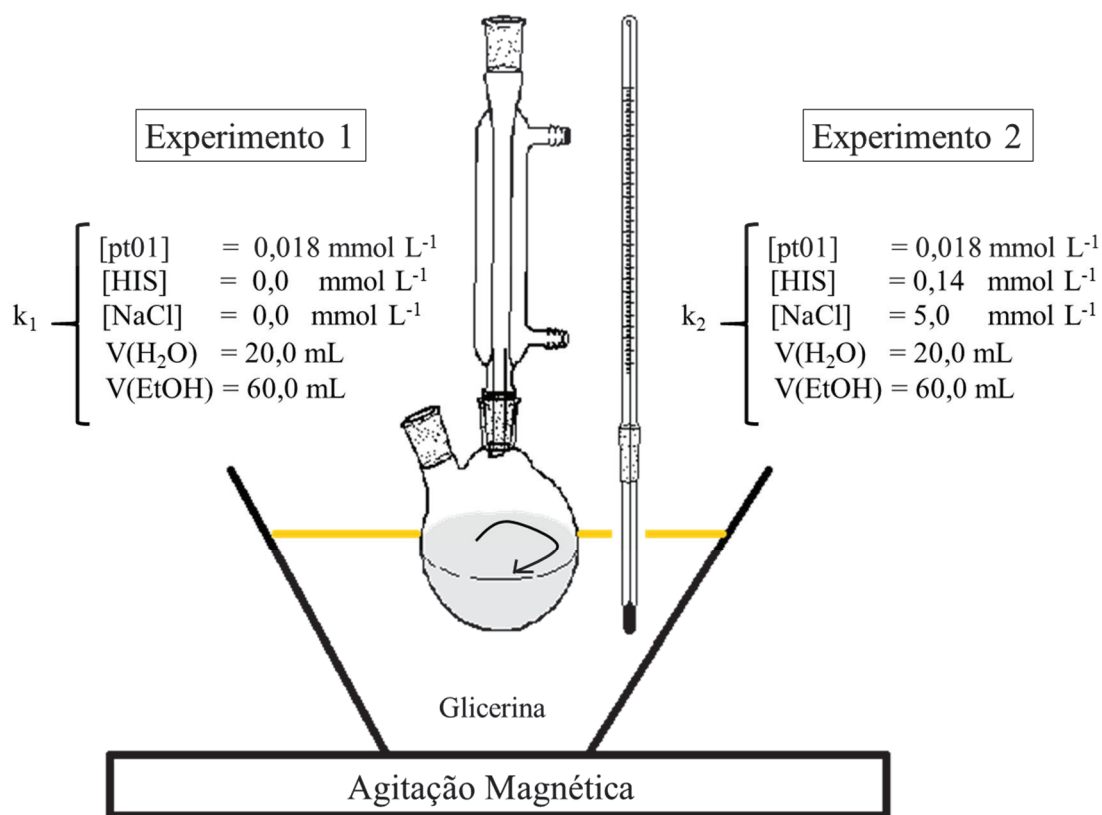
$$k_{\text{obs}} = k_1 + k_2[\text{HIS}] = k_1 + k_2[0] = k_1 \quad (3.1.3.5)$$

Para obtenção do valor de k_2 é necessário impedir que o processo solvolítico ocorra, e desta forma, não só a concentração de nucleófilo deve ser muito maior que pt01, mas também é necessário adicionar NaCl, em proporções de aproximadamente 2 mmol L⁻¹ conforme é relatado na literatura (DJEKOVIC, 2012).

Logo, a proporção $[\text{HIS}]/[\text{pt01}]=8$ foi atendida, e a concentração de NaCl 5,0 mmol L⁻¹ foi mantida na mistura reacional de 80,0 mL, com as concentrações finais de $[\text{pt01}]=0,018$ mmol L⁻¹ e $[\text{HIS}]=0,14$ mmol L⁻¹. A solvólise foi inspecionada por 30 min, e a substituição nucleofílica por 1 hora, mantendo ambos experimentos com temperatura constante em 345 K sob agitação.

As alíquotas foram coletadas a cada 5 min de agitação, e a absorbância foi aferida no comprimento de onda fixado em 252 nm com a cubeta de quartzo de 1 cm. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas independentes, e a esquematização é demonstrada na Figura 3.1.3.1.

Figura 3.1.3.1. Processo de obtenção dos valores de k_1 e k_2 , utilizando monitoramento de absorção na região de 252 nm.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

3.2. METODOLOGIA QUÂNTICA

3.2.1. Tópicos de Mecânica Quântica – Equação de Schrödinger

Durante a década de 20, é destacável o profundo interesse em tentar descrever o perfil mecânico de sistemas atômicos e moleculares. Como consequência deste advento, cria-se uma nova teoria para interpretação de coordenadas espaciais em nível atômico, denominada de Mecânica Quântica (MQ).

Erwin Schrödinger (ALBERTY, 1987; MORGON, 2007; LEVINE, 2009; LEACH, 2001) consegue provar de forma analítica, como se dão os movimentos eletrônicos para o átomo de hidrogênio, abrindo caminho para uma série de interpretações possíveis, de regiões mais prováveis para se encontrar um elétron no espaço ao redor do

núcleo atômico, regiões estas intituladas de orbitais atômicos. Para isso, podemos representar o sistema eletrônico de maneira quantitativa atribuindo aspectos ondulatórios, onde a função de onda do sistema é representada com dependência espacial (\vec{R}) e temporal (t), ou seja, $\Psi = f(\vec{R}, t)$. Desta forma, representamos a equação de Schrödinger em 3.2.1.1.

$$\hat{H} \Psi(\vec{R}, t) = E \Psi(\vec{R}, t) \quad (3.2.1.1)$$

$$\Psi(\vec{R}, t) = \Psi(\vec{R}) \cdot \Psi(t) \quad (3.2.1.2)$$

$$\frac{\partial \Psi(t)}{\partial t} = -\frac{2\pi i}{h} E \Psi(t) \quad (3.2.1.3)$$

Em que \hat{H} representa o operador de energia total do sistema definido como Hamiltoniano, o qual aplicado sobre esta função de onda quantitativa $\Psi(\vec{R}, t)$, regenera o formato inicial da função de onda, extraíndo a energia total do sistema E.

Como os operadores posição e momento não comutam, podemos separar a função de onda total $\Psi(\vec{R}, t)$ em um produto de duas funções, uma temporal $\Psi(t)$ e outra espacial $\Psi(\vec{R})$, conforme é demonstrado na equação 3.2.1.2, e desta forma, quando avaliarmos fenômenos temporais, teremos que satisfazer a equação 3.2.1.3. Para satisfazer o operador Hamiltoniano aplicado na função espacial, é necessário considerar alguns requisitos, conforme é expressado na equação 3.2.1.4.

$$\begin{aligned} \hat{H} = & -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^N \frac{\nabla_A^2}{M_A} - \sum_{A=1}^N \sum_{i=1}^n \frac{\Lambda Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1+1}^n \frac{\Lambda}{r_{ij}} \\ & + \sum_{A=1}^{N-1} \sum_{B>A}^N \frac{\Lambda Z_A Z_B}{R_{AB}} \end{aligned} \quad (3.2.1.4)$$

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (3.2.1.5)$$

$$\Lambda = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \quad (3.2.1.6)$$

Na equação anterior, n e N serão respectivamente os números de elétrons e núcleos do sistema, respectivamente. Para a notação de \hbar é dada pela divisão da constante de Planck por 2π , os operadores ∇_i^2 e ∇_A^2 são os operadores laplacianos, definidos na equação 3.2.1.5 a seguir, que representa as diferenciais infinitesimais de segunda ordem para as distâncias em todas direções. O símbolo Λ , dado pela equação 6, foi adotado como notação de agrupamento da carga elementar eletrônica ao quadrado (e^2) dividida pelo produto de 4π por ϵ_0 que é a constante dielétrica do meio. Os valores de r_{ij} serão as distâncias entre elétrons, R_{AB} serão as distâncias internucleares, m_e é a massa do elétron e M a massa do núcleo.

A partir da montagem do operador na equação 3.2.1.5, é elaborada a aproximação de Born-Oppenheimer que considera o fato da massa do núcleo muito maior que a massa do elétron, e desta forma, o termo cinético do operador associado a movimentação dos núcleos (segundo termo) poderá ser desprezado, e o termo de potencial associado aos núcleos (último termo) será mantido como constante.

Existe resolução da equação 3.2.1.1 de forma analítica para o átomo de hidrogênio, conforme já supracitado, contudo para problemas que envolvem mais de um núcleo atômico, onde o termo de interação potencial elétron-núcleo (terceiro termo) torna a solução possível de forma numérica (ver equação 3.2.1.4).

Assim sendo, vários métodos foram criados para tentar extrair a energia de um dado sistema quântico, em carácter molecular com o máximo de robustez possível dentro de cada formalismo considerado. Para exemplificar alguns destes métodos, nas seções a seguir serão explicados os métodos de Hartree-Fock (HF) e da Teoria do Funcional de Densidade (DFT).

3.2.2. O método de Hartree-Fock – HF

Como mencionado, o método HF (ALBERTY, 1987; MORGON, 2007; LEVINE, 2009; LEACH, 2001) se torna necessário quando o hamiltoniano descrito anteriormente considera apenas quatro termos. Desta forma, podemos separar a energia total do sistema com as considerações a seguir, demonstradas nas equações 3.2.2.1–4.

$$\hat{T} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 \quad (3.2.2.1)$$

$$\hat{U} = -\sum_{A=1}^N \sum_{i=1}^n \frac{\Lambda Z_A}{r_{iA}} \quad (3.2.2.2)$$

$$\hat{U}_e = \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1+1}^n \frac{\Lambda}{r_{ij}} \quad (3.2.2.3)$$

$$\hat{U}_N = \sum_{A=1}^{N-1} \sum_{B>A}^N \frac{\Lambda Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.2.2.4)$$

Com isso, temos que a equação 3.2.2.1 representa o operador de energia cinética do sistema (\hat{T}), na equação 3.2.2.2 temos o potencial externo que considera interações do tipo núcleo-elétron, na equação 3.2.2.3 temos o operador de repulsão eletrônica, e na equação 3.2.2.4 é considerada a definição do potencial associado apenas aos núcleos. Portanto, destas considerações poderemos reescrever estes termos com duas partes: uma que considera apenas a parte eletrônica, e a outra considerando a parte nuclear, conforme é demonstrado na equação 3.2.2.5.

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{U} + \hat{U}_e + \hat{U}_N \equiv \hat{H}_{ele} + \hat{H}_N \quad (3.2.2.5)$$

$$\hat{H}_{ele} \Psi_{ele}(\vec{R}) = E_{ele} \Psi_{ele}(\vec{R}) \quad (3.2.2.6)$$

Para então conhecer qual será a energia associada aos termos eletrônicos, aplica-se o operador \hat{H}_{ele} na função de onda do tipo $\Psi_{ele}(\vec{R})$, e desta forma a energia é fornecida como autovalor da função de onda, conforme é demonstrado na equação 3.2.2.6. No entanto, se torna impossível de resolver esta equação de forma analítica, uma vez que a maioria dos sistemas moleculares de forte interesse científico consideram muito mais que dois núcleos atômicos.

Desta forma, formula-se a base das teorias de computações numéricas para resolução de problemas quânticos, intitulado de método HF, e inicia-se a forma de notação por Bracket, para efeito de simplificação na observação das conclusões. Portanto, novamente aplicando o operador de energia total \hat{H}_{ele} na função de onda com dependência espacial, teremos a equação 3.2.2.7 com a reformulação simplificada dada pela equação 3.2.2.8, com a condição de normalização em valor absoluto de 1.

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{ele}(\vec{R}) | \hat{H}_{ele} | \Psi_{ele}(\vec{R}) \rangle &= \langle \Psi_{ele}(\vec{R}) | E | \Psi_{ele}(\vec{R}) \rangle \\ \therefore \langle \Psi_{ele}(\vec{R}) | \Psi_{ele}(\vec{R}) \rangle &= 1 \end{aligned} \quad (3.2.2.7)$$

$$\langle \Psi_{ele}(\vec{R}) | \hat{H}_{ele} | \Psi_{ele}(\vec{R}) \rangle = E \quad (3.2.2.8)$$

Ou seja, pela normalização garantida do teorema variacional, dado pela equação 3.2.2.9, teremos que a energia exata do sistema (E_{exata}) será sempre maior ou exatamente igual, se o resultado for aplicado incessantemente sobre a função de onda normalizada.

$$E = \frac{\int \psi_{\text{ele}}^*(\vec{R}) \hat{H} \psi_{\text{ele}}(\vec{R})}{\int \psi_{\text{ele}}^*(\vec{R}) \psi_{\text{ele}}(\vec{R})} = \frac{\langle \psi_{\text{ele}}^*(\vec{R}) | \hat{H} | \psi_{\text{ele}}(\vec{R}) \rangle}{\langle \psi_{\text{ele}}^*(\vec{R}) | \psi_{\text{ele}}(\vec{R}) \rangle} \geq E_{\text{exata}} \quad (3.2.2.9)$$

Para construir ψ_{ele} é necessário utilizar a aproximação de construção única, via determinante de Slater, dado pela equação 3.2.2.10.

$$\psi_{\text{ele}} = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} u_1(1) & u_2(1) & \dots & u_n(1) \\ u_1(2) & u_2(2) & \dots & u_n(2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ u_1(n) & u_2(n) & \dots & u_n(n) \end{vmatrix} \quad (3.2.2.10)$$

Onde $\frac{1}{\sqrt{n!}}$ será o fator de normalização da função de onda, de modo a permitir que o teorema variacional seja validado. A descrição horizontal será representada pelos elétrons, e na vertical a representação dos acoplamentos spin-orbitais. Entre os parênteses, os possíveis elétrons de 1 até n, e finalmente u_n será a função spin-orbital para cada elétron do sistema.

Considerando, a função de onda descrita pela equação 3.2.2.10, e a aproximação de Born-Oppenheimer para resolução deste tipo de sistema, por consequência da obtenção do autovalor dado pelo Hamiltoniano (E), encontramos o as regras de Condon-Slater, onde a energia poderá ser dada pela equação 3.2.2.11, e para efeito de simplificação de notação foi considerado apenas uma direção de integração.

$$E = \sum_{i=1}^N h_i + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i} (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.2.11)$$

$$h_i = \int \psi_i^*(x) \left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v(x) \right] \psi_i(x) dx \quad (3.2.2.12)$$

$$J_{ij} = \int \int \psi_i(x_1)\psi_i^*(x_1) \frac{1}{r_{12}} \psi_j^*(x_2)\psi_j(x_2) dx_1 dx_2 \quad (3.2.2.13)$$

$$K_{ij} = \int \int \psi_i^*(x_1)\psi_j(x_1) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(x_2)\psi_j^*(x_2) dx_1 dx_2 \quad (3.2.2.14)$$

Na equação 3.2.2.10, a energia total do sistema é dada pelo somatório de h_i , que representa toda energia cinética dada pelos elétrons considerados, bem como a energia potencial de atração elétron-núcleo, é apresentado na equação 3.2.2.11. O segundo termo da equação explicita a definição das integrais de Coulomb J_{ij} e de troca K_{ij} , onde a constante $\frac{1}{2}$ é levada em consideração para que não ocorra dupla contagem de repulsão eletrônica, ambas integrais são descritas nas equações 3.2.2.12-13. Com estas considerações poderemos construir o chamando operador de Fock (\hat{F}) da seguinte maneira, conforme a equação 3.2.2.14.

$$\hat{F} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + v(x) + \hat{j} + \hat{k} \quad (3.2.2.14)$$

Para se chegar na energia obtida pelo operador, teremos que supor aplicação unitária conforme é tratado na equação 3.2.2.15, e posteriormente teremos que considerar todas energias obtidas dos orbitais do sistema ϵ_i , conforme a equação 3.2.2.16. Assim, rearranjando a equação 3.2.2.16, obteremos a 3.2.2.17 de modo a evidenciar o somatório de h_{ij} .

Na sequência de manipulações matemáticas, substituindo a equação 3.2.2.17 na equação 3.2.2.11, teremos a equação 3.2.2.18 que considera a energia eletrônica de Fock, e finalmente na equação 3.2.2.19, é dado a energia total do sistema na aproximação Hartree-Fock, com a consideração de potencial nuclear explícito.

$$\varepsilon_i = \varepsilon_{ii} = \langle \psi_i(\mathbf{x}) | \hat{F} | \psi_i(\mathbf{x}) \rangle = h_i + \sum_{j=1}^N J_{ij} - K_{ij} \quad (3.2.2.15)$$

$$\sum_{i=1}^N \varepsilon_i = \sum_i h_i + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i} (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.2.16)$$

$$\sum_i h_i = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i} (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.2.17)$$

$$E_{ele} = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i} (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.2.18)$$

$$E_{HF} = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i} (J_{ij} - K_{ij}) + \sum_{A=1}^{N-1} \sum_{B>A}^N \frac{\Lambda Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.2.2.19)$$

Um dos principais pontos que podemos destacar neste método é o que chamamos de autoconsistência, pois é necessário conhecer os orbitais eletrônicos, para que sejam calculadas as interações entre elétrons. Ou seja, para termos a minimização de energia do sistema, inicialmente a estrutura deve ser suposta, e com isso, a energia se propaga de maneira a minimizar as multi-repulsões. A isso, definimos como otimização de geometria, logicamente, adotando um critério de convergência energética estrutural arbitrário.

Todavia, este método por ser numérico, é ineficaz para aplicação de grandes sistemas moleculares, devido ao alto custo computacional. Para isso, Roothaan viabiliza uma grande contribuição matemática para descrição do sistema. Ele propõe que os elementos da matriz de Slater, dada na equação 3.2.2.10, deveriam ser escritos como combinações lineares de funções atômicas já previamente conhecidas (CLOA), e desta forma, é proposta a equação 3.2.2.20 que definirá a equação 3.2.2.21, equação esta que é definida como conjunto de funções de bases.

$$u_i = \vartheta_i \alpha_i \quad (3.2.2.20)$$

$$\vartheta_i = \sum_{s=1}^b c_{si} \chi_s \quad (3.2.2.21)$$

Conforme é escrito nas equações 3.2.2.20 e 3.2.2.21, a função ϑ_i é a função espacial eletrônica responsável pela descrição de cada orbital α_i refere-se ao tipo de spin que possui o elétron i do sistema, podendo assumir α ou β . Para descrever o número s de funções atômicas necessárias, utilizamos o coeficiente de expansão c_{si} , multiplicado pelo número total de 1 até b funções consideradas de χ_s , desta forma, é possível afirmar que caso o número de funções de base seja demasiadamente grande (infinito), teríamos a representação exata dos orbitais, e conseqüentemente, a energia seria não só assintótica, mas também exata. Mas, em termos práticos, computacionalmente, isso seria inviável. Portanto, com a aproximação de Roothaan, acoplado a técnica de Hartree-Fock denotada por RHF (método Hartree-Fock-Roothaan), vem a reescreve o operador de Fock que agora será aplicado na função de onda reescrita como combinação linear de orbitais atômicos (CLOA), que é demonstrado matematicamente a seguir.

$$\sum_{s=1}^b c_{si} \hat{F} \chi_s = \varepsilon_i \sum_{s=1}^b c_{si} \chi_s \quad (3.2.2.22)$$

$$\sum_{s=1}^b c_{si} \chi_r^* \hat{F} \chi_s = \varepsilon_i \sum_{s=1}^b c_{si} \chi_r^* \chi_s \quad (3.2.2.23)$$

$$\sum_{s=1}^b c_{si} (F_{rs} - \varepsilon_i S_{rs}), \quad \text{tal que } r = 1, 2, \dots, b \quad (3.2.2.24)$$

$$F_{rs} = \langle \chi_r | \hat{F} | \chi_s \rangle, \text{ tal que } S_{rs} = \langle \chi_r | \chi_s \rangle \quad (3.2.2.25)$$

$$\det(F_{rs} - \varepsilon_i S_{rs}) = 0 \quad (3.2.2.26)$$

Ou seja, da aplicação do operador de Fock na função de onda expandida teremos a equação 3.2.2.22, que será multiplicada por χ_r^* e rearranjada entre as equações 3.2.2.23-25 de modo que para resolução numérica da equação 3.2.2.24, teremos que adotar a condição da equação 3.2.2.26.

Novamente, este método também é chamado de autoconsistente, pois apenas necessita do conjunto inicial de funções de base que serão necessárias para inclusão do operador de Fock, com isso teremos os cálculos das matrizes F_{rs} e S_{rs} , e por fim, os valores de ε_i . Se os valores encontrados para ε_i são menores que os iniciais, aceita-se estes valores para comparação com o critério de convergência estrutural adotado, do contrário, rejeitam-se os valores de ε_i . Este ciclo é reincidido, aproveitando os valores de c_{si} na equação 3.2.2.24, até que haja convergência para um valor energético aceitável, o qual geralmente encontra-se na faixa de ordem de 10^{-8} hartree.

3.2.3. A teoria do funcional de densidade – DFT

No método RHF a correlação eletrônica, dada pelo termo r_{ij} do Hamiltoniano inicialmente considerado, não é recuperada de forma significativa. Desta forma, teremos duas possíveis alternativas para representar o sistema de forma mais viáveis para contornar tal situação. Um destas formas será efetuada quando tratamos os estados eletrônicos com múltiplas configurações, método este conhecido como Teoria Perturbativa de Møller-Plesset, denotado simbolicamente de métodos do tipo MPn na qual o novo Hamiltoniano será reescrito com termos que consideram estados excitados, tendo o MP2 o método mais difundido e utilizado. No entanto, estas metodologias não foram consideradas na resolução de modelos da presente tese, portanto apenas serão citados, fato este que não será simplista ao abordar a outra forma metodológica, foco do presente trabalho.

Outra maneira, também popular para obter a energia do sistema, é abordá-la com formatos de funcionais dados pela densidade eletrônica em função do espaço $\rho(\mathbf{r})$, definida por $E_0 = E_0[\rho_0(\mathbf{r})]$. Ou seja, não há aplicação direta da função de onda contendo todas informações iniciais do sistema como é proposto nos métodos *ab initio*. Neste tipo de abordagem, conhecida como a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (ALBERTY, 1987; MORGON, 2007; LEVINE, 2009; LEACH, 2001), teremos o custo de tempo computacional reduzido de forma considerável.

A origem da técnica se dá por Hohenberg e Kohn quando demonstraram dois teoremas para sistemas moleculares em estado fundamental não degenerado, onde apontam a resolução da energia do sistema obedecendo o princípio variacional. Desta forma, o Hamiltoniano para um sistema de M núcleos e N elétrons pode ser escrito conforme a equação 3.2.3.1.

$$\hat{H} = - \sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_A^M \sum_i^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} + \sum_{i < j}^N \sum_j^N \frac{1}{|r_i - r_j|} + \sum_{B < A}^M \sum_A^M \frac{Z_A Z_B}{|R_A - R_B|} \quad (3.2.3.1)$$

A e B serão os núcleos atômicos, a simbologia para i e j é dada para os elétrons, os valores de r_i e R_A representam, as posições dos elétrons i e do núcleo atômico A, respectivamente, e os termos Z_A e Z_B são os números atômicos dos átomos A e B.

Logo, conforme já foi possível definir nas seções anteriores, cada termo do Hamiltoniano é interpretado com significado físico único, desta forma, o primeiro termo é o operador energia cinética dos elétrons (\hat{T}), o segundo termo é o operador potencial externo (\hat{U}), o terceiro termo é o operador repulsão entre elétrons (\hat{V}_e), e no último termo do Hamiltoniano é definido o operador de repulsão internuclear (\hat{E}_{rep}).

Assim, o operador potencial externo é comumente reescrito, conforme é tratado na equação 3.2.3.2 e 3.2.3.3, que para efeito de simplificação, tal notação será considerada.

$$v(r_i) = - \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} \quad (3.2.3.2)$$

$$\hat{U} = \sum_i^N v(r_i) = \langle \Psi | \sum_i^N v(r_i) | \Psi \rangle = \int \rho(r) v(r) dr \quad (3.2.3.3)$$

Portanto, $v(r_i)$ é definido como o funcional de energia potencial de atração nuclear para um elétron na posição r , e Ψ é a função dada como solução do estado fundamental. Desta forma, a densidade eletrônica $\rho(r)$ será conforme a equação 3.2.3.4.

$$\rho(r) = \int \dots \int \Psi(r_1, \dots, r_n)^* \Psi(r_1, \dots, r_n) dr_2 \dots dr_n, \text{ sendo } \int \rho(r) = N \quad (3.2.3.4)$$

Se a função de onda Ψ é solução do estado fundamental do Hamiltoniano, podemos escrever a energia do sistema E_0 conforme é demonstrado na equação 3.2.3.5.

$$E_0 = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r) v(r) dr \quad (3.2.3.5)$$

Logo, conhecendo os teoremas de Hohenberg e Kohn, do valor de $\rho(r)$ do estado fundamental será viável calcular todas as propriedades do sistema, sem a função de onda do mesmo. No entanto, para calcular os valores de E_0 e ρ_0 , Kohn e Sham elaboraram um formalismo no qual um sistema fictício como referencial (subscrito por s) com n elétrons não interagentes, são submetidos na mesma função da energia potencial externo $v_s(r)$, de modo que a densidade do sistema seja igual a densidade eletrônica do estado fundamental (marco zero) do sistema de interesse. Desta forma, poderemos reescrever o novo Hamiltoniano conforme consta na equação 3.2.3.6.

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^n \left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(r_i) \right] = \sum_{i=1}^n \hat{h}_i^{KS} \quad (3.2.3.6)$$

O operador \hat{h}_i^{KS} é o Hamiltoniano monoelétrônico, e o sistema referencial (modelo) pode ser vinculado com o modelo real através da equação 3.2.3.7.

$$\hat{H}_\lambda = \hat{T} + \sum_1 v_\lambda(r_i) + \lambda \hat{V}_{ee} \quad (3.2.3.7)$$

Os valores de λ podem variar de 0 sistemas não interagentes, até 1 (modelo real) e, desta forma, $v_\lambda(r_i)$ será o funcional que irá gerar a densidade eletrônica do estado fundamental exata do sistema real.

Desta forma, as funções de onda de Kohn e Sham Ψ^{KS} , serão obtidas por um produto antissimétrico de N funções de onda de um elétron, $\psi_i(r_i)$, conforme é análogo a estratégia adotada no determinante de Slater via método HF, e a partir disso, poderemos aplicar a equação 3.2.3.8.

$$\hat{h}_i^{KS} \psi_i^{KS} = \epsilon_i^{KS} \psi_i^{KS} \quad (3.2.3.8)$$

Desta forma, no ímpeto de tornar a aplicação da DFT plausível, é definido o termo $\Delta T[\rho]$ como a diferença de energia cinética eletrônica do estado fundamental tomando a referência entre o sistema adotado $T[\rho]$ e o modelo fictício $T_s[\rho]$, conforme será dado na equação 3.2.3.9.

$$\Delta T[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho] \quad (3.2.3.9)$$

Novamente, por analogia a repulsão intereletrônica, o funcional $\hat{V}_e[\rho]$ também será escrito na forma de variação $\Delta V_e[\rho]$ a ser demonstrado na equação 3.2.3.10.

$$\Delta V_e[\rho] = V_e - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 \quad (3.2.3.10)$$

O valor de V_e é referente ao potencial de interação elétron-elétron do sistema real, e o termo que é tomado como uma integral é a forma clássica para atribuir a energia de repulsão intereletrônica, supondo que os elétrons sejam distribuídos de forma contínua, e desta forma as proporções de cargas tornam-se homogêneas dada a densidade eletrônica ρ . E, por fim, r_{12} será a distância entre dois pontos em coordenadas cartesianas, sendo

necessário, conforme já pronunciado, a inclusão da constante $\frac{1}{2}$ antes da integração para que não tenhamos dupla contagem de repulsão eletrônica. Portanto, substituindo as considerações de Kohn e Sham, teremos a nova equação 3.2.3.11 com suas particularidades a serem discutidas a seguir.

$$E_0 = \int \rho(r)v(r)dr + T_s[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + \Delta T[\rho] + \Delta V_e[\rho] \quad (3.2.3.11)$$

Para tanto, conforme já era esperado, os funcionais $\Delta T[\rho]$ e $\Delta V_e[\rho]$ serão desconhecidos, sendo definidos como o funcional da energia de troca e correlação $E_{xc}[\rho]$ conforme a equação 3.2.3.12.

$$E_{xc}[\rho] = \Delta T[\rho] + \Delta V_e[\rho] \quad (3.2.3.12)$$

Dessa forma o funcional da energia de troca e correlação $E_{xc}[\rho]$, inclui o termo de interação elétron-elétron de correlação, devido ao termo $\Delta T[\rho]$ que representa a energia correlação cinética dos elétrons, $\Delta V_e[\rho]$ representa a energia de correlação Coulombica devido a energia de troca obtida devido a função de onda ser antissimétrica, e por último no termo $\frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2$ teremos a correção da auto-interação. Em sequência, poderemos rearranjar a energia total do sistema no estado fundamental dado pela equação 3.2.3.13.

$$E_0 = \int \rho(r)v(r)dr + T_s[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho] \quad (3.2.3.13)$$

Se a densidade eletrônica para os sistemas real e utópico são iguais, poderemos escrever que a função de onda obtida com um determinante de Slater, será dada pela equação 3.2.3.14, e a definição de cada termo associado a equação 3.2.3.13 será dada pelas equações 3.2.3.15-16, e tornaremos a reescrever a energia do sistema real no estado fundamental E_0 conforme a equação 3.2.3.17.

$$\rho = \sum_{i=1}^N |\psi_i^{\text{KS}}|^2 \quad (3.2.3.14)$$

$$\int \rho(r)v(r)dr = - \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} \int \rho(r)dr \quad (3.2.3.15)$$

$$T_s[\rho] = \sum_{i=1}^N \left\langle \psi_i^{\text{KS}} \left| -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right| \psi_i^{\text{KS}} \right\rangle \quad (3.2.3.16)$$

$$E_0 = - \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} \int \rho(r)dr + \sum_{i=1}^N \left\langle \psi_i^{\text{KS}} \left| -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right| \psi_i^{\text{KS}} \right\rangle + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{\text{xc}}[\rho] \quad (3.2.3.17)$$

Agora, o objetivo será propor a otimização dos orbitais de KS, uma vez que o funcional de energia total do sistema está montando, conforme a equação 3.2.3.17. Logo, pelos teoremas de Hohenberg e Kohn é garantido que vigora o princípio variacional, de modo a permitir a energia seja maior ou igual do sistema real, e uma vez a energia é determinada, todas as outras propriedades dos sistemas são obtidas como consequência.

Finalmente, se faz necessário a montagem de um ciclo auto-consistente para resolução dos orbitais de KS, de modo a manter semelhante à forma esquemática do método HF. Para estes critérios serem satisfeitos, serão montadas as equações 3.2.3.18-20.

$$\langle \psi_i^{\text{KS}} | \psi_j^{\text{KS}} \rangle = \delta_{ij} \quad (3.2.3.18)$$

$$v(r) = - \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} + \int \frac{\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} + v_{\text{xc}}(r) \quad (3.2.3.19)$$

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_A - r_1|} + \int \frac{\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} + v_{xc}(r) \right] \psi_i^{KS} = \varepsilon_i^{KS} \psi_i^{KS} \quad (3.2.3.20)$$

Na equação 3.2.3.18 são considerados os critérios de função de onda KS monoelétrica, que deverá atender o formato de ortonormalidade, e para que isso ocorra, o delta de Kronecker δ_{ij} deverá aparecer do critério das funções de onda. Em seguida, a equação de Schrödinger (equação 3.2.3.8) será resolvida com as adaptações do Hamiltoniano de KS da equação 3.2.3.7, e o potencial efetivo $v(r)$ poderá ser expressado conforme a equação 3.2.3.21, resultando na forma de reescrever a aplicação do Hamiltoniano no sistema visto na equação 3.2.3.22, extraíndo as energias dos orbitais de KS.

$$v(r) = - \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_A - r_1|} + \int \frac{\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} + v_{xc}(r) \quad (3.2.3.21)$$

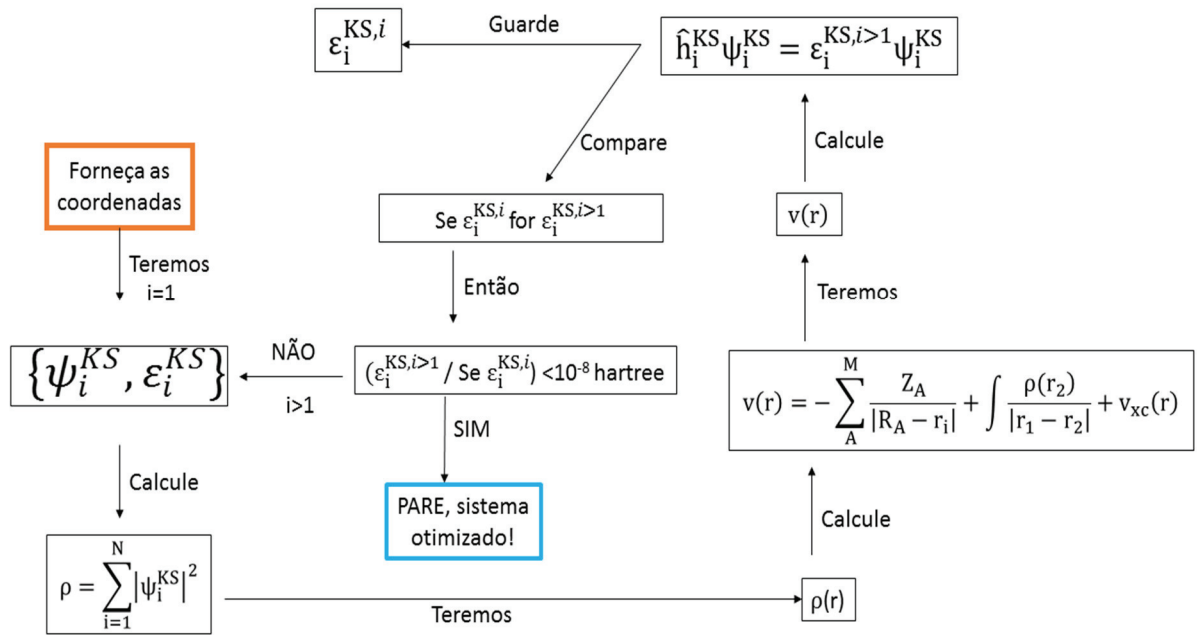
$$\left[-\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_A - r_1|} + \int \frac{\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} + v_{xc}(r) \right] \psi_i^{KS} = \varepsilon_i^{KS} \psi_i^{KS} \quad (3.2.3.22)$$

$$v_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} \quad (3.2.3.23)$$

Conforme já afirmado, $v_{xc}(r)$ é o potencial de troca e correlação, definido como a derivada do funcional da energia de troca e correlação, como denotado na equação 3.2.3.23.

Finalizando o esquema representado pela proposta Kohn-Sham autoconsistente – KS-SCF (*Kohn Sham – Self Consistent Field*), nas equações escrita 3.2.3.7, 3.2.3.14 e 3.2.3.19 está desenvolvido todo ciclo de convergência energética pelo método DFT, pois o potencial efetivo $v(r)$, dependerá da densidade eletrônica $\rho(r)$. Este processo pode ser ilustrado na Figura 3.2.3.1.

Figura 3.2.3.1. Algoritmo de resolução numérica em cálculos DFT.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Existem vastos tipos de funcionais encontrados na literatura, nos quais são denominados de LSDA (*Local Spin-Density Approximation*), GGA (*Generalized Gradient Approximation*) e ainda os meta-GGA. No entanto, cada funcional demonstra-se específico para cada tipo de propriedade que se deseja extrair do sistema. O foco do presente trabalho foi utilizar os funcionais híbridos que farão conexão adiabática para descrição da densidade eletrônica com elétrons não interagentes, conforme será descrito nas equações 3.2.3.24-26.

$$E_{xc}[\rho] = \int_0^1 d\lambda \frac{\partial F_\lambda[\rho]}{\partial \lambda} - J[\rho] \quad (3.2.3.24)$$

$$F_\lambda[\rho] = \langle \Psi_\rho^\lambda | \hat{T} + \lambda \hat{V}_e | \Psi_\rho^\lambda \rangle \quad (3.2.3.25)$$

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r - r'|} dr dr' \quad (3.2.3.26)$$

A incógnita λ é referente ao tipo de sistema utilizado, de modo a manter $\lambda=0$ se no sistema, os N elétrons não interagem, e para $\lambda=1$, todos se interagem, atendendo a restrição de sempre permanecer constante o valor da densidade eletrônica para qualquer λ . Com isso teremos conexão adiabática direta com o funcional de troca e correlação, via função da média do buraco de troca-correlação $\bar{\rho}_{xc}(r, r')$:

$$E_{xc}[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{1}{|r - r'|} \rho(r) \bar{\rho}_{xc}(r, r') dr dr' \quad (3.2.3.27)$$

Ou seja, poderemos ter a energia de troca-correlação como uma interação clássica de Coulomb, perfeitamente descritiva na equação anterior, garantindo que nunca haverá presença simultânea de dois ou mais elétrons na mesma região espacial. Para abordar esta metodologia, o funcional escolhido foi o funcional híbrido de 3 termos de Becke, conhecido como B3LYP (BECKE, 1993) para reportar as geometrias moleculares, seguido de correção energética de longo alcance com os funcionais CAM-B3LYP (YANAI, 2004) e LC- ω PBE (VYDROV, 2006).

3.2.4. Funções de bases atômicas

Conforme já descrito, de forma não exploratória nas seções anteriores, as funções de onda que representam sistemas moleculares podem ser dadas pela CLOA (Combinação Linear de Orbitais Atômicos) (LEACH, 2001). Portanto, é necessário aprofundar um pouco no formalismo que aborda a notação e definição de funções de base que foram utilizadas no presente trabalho, já que todas as propriedades do sistema estão intimamente ligadas pelo perfil destas funções matemáticas.

As funções de base serão denotadas conforme é mostrado nas equações 3.2.4.1-2, sendo definidas de funções de *Slater (STO, Slater Type Orbitals)*, e *Gaussianas (GTO, Gaussian Type Orbitals)*, respectivamente.

$$\chi_{\zeta, n, l, m}(r, \theta, \varphi) = N Y_{l, m}(\theta, \varphi) r^{n-1} e^{-\zeta r} \quad (3.2.4.1)$$

$$\chi_{\zeta, n, l, m}(r, \theta, \varphi) = NY_{l, m}(\theta, \varphi)r^{2n-2-1}e^{-\zeta r^2} \quad (3.2.4.2)$$

Estas funções são possíveis de se expressar se as considerações matemáticas forem dadas em coordenadas esféricas. Para ambas equações anteriores, N é a constante de normalização, n , l e m serão os números quânticos principal, angular e magnético, respectivamente, $Y_{l, m}$ é uma função esférica harmônica, e ζ será o expoente que impõe a largura da base da função radial, portanto, é o limitante do alcance da centralização da função. Para realização de considerações de sistemas maiores, os cálculos envolvendo funções do tipo Slater se tornam mais custozos para sistemas metálicos envolvendo ligantes muito volumosos, por apresentarem múltiplos centros, e desta forma, a preferência é adotar funções de base Gaussianas (LEACH, 2001).

Independentemente do tipo de metodologia utilizada, seja de primeiros princípios ou DFT, o emprego de um conjunto de funções de bases muito grande fará com que o resultado demore consideravelmente. Com isso, para redução do tempo computacional, é utilizado funções do tipo Gaussianas contraídas φ_i , escritas conforme a equação 3.2.4.3.

$$\varphi_i = \sum_{\beta=1}^{\alpha} C_{\beta} \chi \quad (3.2.4.3)$$

Sendo α o número de funções utilizadas, C_{β} os coeficientes de expansão da função contraída, e χ representa o tipo de função utilizada com a denominação de funções primitivas.

Classes de funções de base de Pople (SZABO, 1996) são muito usadas no meio científico, e possuem o formato de notação seguindo a maneira K-nlmG, sendo K as primitivas usadas para representação dos elétrons de caroço (fora do nível de valência), a letra G designa a utilização de funções φ_i GTO, e as letras nlm serão para representação das funções do nível de valência. Em exemplo, a função 6-31G representa uma função de base de camada de valência estendida de contração, conforme ilustrado na Figura 3.2.4.1.

Figura 3.2.4.1. Esquema de contração para a função de base de Pople 6-31G.

$$\begin{array}{l}
 \left. \begin{array}{l}
 \varphi_1 = \sum_{i=1}^6 C_i \chi_i \\
 \varphi_2 = \sum_{i=7}^9 C_i \chi_i \\
 \varphi_3 = \chi_{10}
 \end{array} \right\} \text{6-31G}
 \end{array}$$

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Sabendo desta notação, descreveremos como base mínima (single- ζ) para as bases que representam o sistema de forma mais simples possível, de modo a conter apenas uma primitiva para descrição de um orbital. Como exemplo disso, tomemos o átomo de flúor para descrevê-lo apenas com 1s, 2s, 2p_x, 2p_y e 2p_z, ou seja, serão necessárias o total de 5 funções no mínimo. Contudo, para descrição de eventos flexíveis na nuvem eletrônica, tais como problemas envolvendo cinética reacional, estas funções não são satisfatórias para obtenção de resultados concordantes com dados experimentais. Para isso, a alternativa válida para estes tipos de casos é incrementar mais de uma função na descrição de um dado orbital atômico, ou seja, são as chamadas funções *double- ζ* (duplo zeta). No caso das funções de Pople, teremos as conhecidas *split-valence* (duplo zetas de valência), onde existe a descrição explícita para a valência do sistema simbolizada por dois números informados após a notação da quantidade de primitivas. A exemplo disso, observando a Figura 3.2.4.1 na qual é abordada a função duplo zeta de valência 6-31G, é evidente a combinação de 6 primitivas semelhantes φ_i para o core (elétrons internos) onde a diferenciação será apenas no valor do expoente ζ , e para os elétrons de valência, teremos mais duas combinações de funções distintas, a primeira com três funções e a segunda com uma, explicitamente demonstrado nos somatórios (SZABO, 1996).

As funções de polarização serão funções adicionadas para incrementar o orbital mais externo, de modo a proporcionar maior momento angular (maior número quântico azimutal), e conseqüentemente oferecer maior descrição na ligação química. Logo, para elementos que terminem com a distribuição 2p, como C, O e N, a função acrescentada seria referente ao orbital d de modo a alongar os orbitais ligantes p de valência. Para impor

esta consideração, adota-se o símbolo entre parênteses da função que se deseja utilizar, 6-31G(d), por exemplo.

Outras funções também desejadas na realização de cálculos com maior confiabilidade, serão as funções difusas, que nada mais são que funções com pequeno valor para o expoente ζ , simbolizadas com o incremento do símbolo de adição (+) antes da letra G, ou seja, 6-31+G.

Quando o expoente da função é muito pequeno, o decaimento das gaussianas demonstram-se com menor declínio frente sua centralização, ou seja, terão maior amplitude na descrição da ligação, ou seja, região de equilíbrio, pois são mais dispersas frente ao núcleo, desta forma, são ideais na descrição de interações fracas e íons. Desta forma, nos cálculos quânticos de ponto único (*single point*) foi adotado a função 6-31+G(2df), buscando coerências com a literatura (PASCHOAL, 2012) na descrição energética, e a função 6-31G(d) foi adotada para otimização estrutural.

3.2.5. Potencial efetivo de caroço – ECP

Quando existe algum elemento no sistema abordado que porta uma grande quantidade de elétrons, estes podem ser considerados não tão expressivos para o perfil de algumas propriedades desejadas. A esta camada portadora de elétrons mais interna é definida como caroço (*core*), onde facilmente podemos destacar os metais de transição como característica marcante na descrição de um caroço demasiadamente grande. Uma forma que visa abordar esta região atômica mais interna, e com redução de custo computacional são os chamados *pseudo*-potenciais de caroço, ou ECPs (*Effective Core Potentials*). Neles, são considerados apenas os elétrons de valência de forma explícita, e para os orbitais do caroço, o potencial ajustado possui um formato de expansão em gaussianas com dependência da distância r , conforme é demonstrado na equação 3.2.5.1.

$$U_{\text{ECP}}(r) = \sum_k d_k r^{n_k} e^{-\zeta_k r^2} \quad (3.2.5.1)$$

O valores de d_k , n_k , e ζ_k serão determinados pelo método de mínimos quadrados, e serão dependentes do momento angular. E, para usar a equação anterior, geralmente consideramos como região de valência a penúltima e a última camada, e os demais com o potencial efetivo. No caso, para a presente tese, foram realizados cálculos abordando o átomo de platina, que possuirá sua distribuição eletrônica geométrica terminando em $5s^2 5p^6 5d^9 6s^1$, ou seja, considerando 18 elétrons explícitos no nível reativo. Logo, como o ECP LAN2DZ (ANDREA, 1990) visa descrição da camada de valência tratando os elétrons como uma função duplo- ζ , esta foi a escolha dada para o átomo de Pt que das estruturas dos complexos metálicos (HAY, 1985). E, para correção energética de ponto único, foi utilizado o ECP SDD ($\zeta_s=0,0075$; $\zeta_p=0,0130$; $\zeta_d=0,0250$; $\zeta_f=0,9804$), pois a literatura aponta bons resultados em cálculos de muita sensibilidade para descrição de leis de velocidades (BURDA, 2000; BERGNER, 1993).

3.2.6. Modelo de contínuo de polarização – PCM

Geralmente, em cálculos de mecânica quântica que visam descrever propriedades cinéticas e termodinâmicas de forma mais exata, é necessário considerar na resolução do Hamiltoniano algo que permita relatar a presença do solvente de forma implícita. Será descrito agora, portanto, como abordar este tipo de consideração, de maneira que o solvente seja dado por um meio contínuo, e representado por uma constante dielétrica ϵ informada. Para tal, imaginemos a elaboração de uma superfície polarizada ditada pela constante dielétrica do meio, e em seguida a imersão do soluto dentro desta superfície (MIERTUŠ, 1981).

É construído uma cavidade no dielétrico, e o soluto será inserido dentro deste buraco, e posteriormente fixado por em distanciamento limitado, e, portanto, criando uma interação entre meio dielétrico e soluto de modo a perturbar a distribuição de cargas atômicas, e reorientando o momento dipolar μ . Com esta reorientação, teremos um decréscimo da energia total do sistema que advém da interação entre soluto e solvente, interação esta que é conhecida como Campo de Reação Auto-Consistente (SCRf – *Self Consistent Reaction Field*), que dará origem ao Modelo Contínuo Polarizável (PCM – *Polarizable Continuum Model*).

A descrição da desenvoltura do PCM é dada pelas esferas Onsager centralizada em cada átomo da molécula-modelo, admitindo que o raio desta esfera seja 20% maior que o raio de van der Waals de cada átomo.

Assim, o objetivo final deste método será encontrar o valor do potencial V_{int} , conforme é demonstrado nas sequências de equação 3.2.6.1-3, de maneira a adicionar ao Hamiltoniano molecular da equação de Schrödinger, e posteriormente fornecer uma nova densidade eletrônica mais condizente com a realidade.

$$Q_k = \left[\frac{(\epsilon_r - 1)}{4\pi\epsilon_r} \right] A_k \nabla \varphi_{in}(r_k) \cdot n_k \quad (3.2.6.1)$$

$$\varphi_\sigma(r) = \sum_k \frac{Q_k}{|r - r_k|} \quad (3.2.6.2)$$

$$V_{\text{int}} = - \sum_i \varphi_\sigma^0(r_i) + \sum_\alpha Z_\alpha \varphi_\alpha^0(r_\alpha) \quad (3.2.6.3)$$

Q_k , A_k , e r_k serão as representações de cada carga do sistema, as áreas formadas por estas e com isso, teremos o ponto onde estão localizadas as cargas, respectivamente. A simbologia $\nabla \varphi_{in}$ será o gradiente do potencial elétrico dentro de cada cavidade e n_k será a orientação do gradiente, ditado por um vetor unitário, perpendicular à superfície da cavidade, sendo então resolvido os valores de cargas em cada ciclo de interação.

A partir de Q_k , teremos os termos dos valores de potencial elétrico $\varphi_\sigma(r)$ devido a polarização do meio contínuo sobre o sistema. Para cada carga em torno desta superfície teremos novos valores de $\varphi_\sigma(r)$, sendo necessário um somatório para cada elétron e cada núcleo, relacionados pelas letras i e α , respectivamente. Com cada somatório, teremos os valores de interação soluto-solvente V_{int} que será adicionado ao Hamiltoniano, contabilizando assim a nova densidade eletrônica polarizada para a resolução dos orbitais moleculares.

Desta forma, vários modelos de solvatação contínua destacam-se na literatura por justamente considerar um dielétrico para polarização do solvente, sem a necessidade casual de inserção de moléculas de solventes explicitamente no modelo abordado, sendo fundamentais para o estudo de espécies carregadas. A tese utiliza o modelo PCM (MENNUCCI, 2007) com o formalismo IEFPCM (SCALMANI, 2010). A constante dielétrica da água foi considerada para todos os cálculos de mecânica quântica no valor de $\epsilon = 78,3553$. A escala das esferas atômicas para construção da cavidade de fora foi adotada com o valor de 1,10 (valor padrão do *software* GAUSSIAN 09® (FRISCH, 2009) utilizado em todas etapas envolvidas com mecânica quântica.

3.2.7. Tópicos para abordagem do estado de transição – TS

Para falarmos de cinética reacional, o imediato destaque do assunto converge para os trabalhos de Arrhenius, no qual pela primeira vez vincula a temperatura em que se encontra o sistema com o que foi definido de Energia de Ativação. O principal foco desta aproximação está em existir uma quantidade de energia mínima que o sistema necessite utilizar para iniciar a reação desejada.

Apenas no século XX, precisamente em 1935, Eyring (EYRING, 1935; ALBERTY, 1987) consegue elaborar todo formalismo matemático para o que foi intitulado de Teoria do Estado de Transição, ou Teoria do Complexo Ativado, que considera a espécie impossível de ser detectada com protocolos experimentais, de maneira que sempre esteja localizada no ápice da hipersuperfície de energia potencial, com função sobre a coordenada reacional, ou seja, encontraremos o Estado de Transição (TS) quando a equação 3.2.7.1 for satisfeita.

$$\frac{\partial^2 E}{\partial r^2} = K_{eq}^{\#} \quad (3.2.7.1)$$

Como sabemos que este ponto será ponto de máximo, o valor do ponto ω será negativo. A seguir, descreveremos a sequência para encontrar a equação primordial do trabalho, em relação aos cálculos de mecânica quântica.

Dado um sistema reacional qualquer com espécies A e B dadas como reagentes, passando por um estado de transição TS, de maneira que cheguem no produto P, poderemos escrever as equações 3.2.7.2-3.



$$V = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] \quad (3.2.7.3)$$

Para o processo de conversão de reagentes para o produto, dado na equação 3.2.7.2, teremos a formulação da Lei de Velocidade (Lei cinética), conforme a equação 03 ilustra, de tal forma que poderemos chegar na constante de equilíbrio que vincula o processo de transformação dos reagentes A e B no estado de transição TS, através das funções de partições q de cada espécie da reação, conforme a equação 3.2.7.4.

$$K_{TS}^{\#} = \frac{\frac{[TS^{\#}]}{C_0}}{\frac{[A]}{C_0} \frac{[B]}{C_0}} = \frac{[TS^{\#}]C_0}{[A][B]} = \frac{\left(\frac{q^{\#}}{V}\right) C_0}{\left(\frac{q_A}{V}\right) \left(\frac{q_B}{V}\right)} \quad (3.2.7.4)$$

Podemos definir C_0 de concentração padrão (1 mol L^{-1}), $K_{TS}^{\#}$ será a constante de equilíbrio do processo descrito anteriormente, e os valores de q_A , q_B e $q^{\#}$ serão as funções de partição para A, B e TS, respectivamente.

Conforme é demonstrado na equação 01, existirá dependência na conversão dos reagentes para o produto P, de maneira que podemos também escrever outra lei cinética envolvendo o estado de transição.

$$\frac{d[P]}{dt} = v_{TS} [TS^{\#}] \quad (3.2.7.5)$$

Ou seja, a equação 3.2.7.5 demonstra que a taxa de formação para o produto P poderá ser dada pelo produto da frequência com que passa o estado de transição TS pelo ápice da curva de hiperpotencial com sua concentração, e como já foi possível de perceber, ao agrupar as equações 3.2.7.3, 3.2.7.4 e 3.2.7.5, teremos a nova consideração dada pela equação 3.2.7.6, para encontrar a constante de velocidade k, e conseqüentemente, a partir de uma série de considerações abordadas no formalismo de termodinâmica estatística via funções de partição translacionais, é possível de chegar na equação 3.2.7.7, conhecida como equação de Eyring.

$$k = \frac{v_{TS} K_{TS}^{\#}}{C_0} \quad (3.2.7.6)$$

$$k = \frac{k_B T}{h C_0} e^{-\frac{\Delta G^{\#}}{RT}} \quad (3.2.7.7)$$

Na equação 3.2.7.7, é demonstrado o formalismo de Eyring para conectar a temperatura T, a energia livre de Gibbs de ativação do sistema $\Delta G^{\#}$, a partir da constante de velocidade reacional k encontrada, e dos valores de k_B , h e R que serão as respectivas constantes de Boltzman, Planck e dos gases ideais, com o valor da concentração padrão C_0 já definida.

A equação de Eyring foi necessária tanto para os cálculos de energia livre de barreiras reacionais estudadas tanto do ponto de vista teórico, quanto experimental, sendo importante ressaltar que qualquer erro na barreira da ordem 1 kcal mol⁻¹ repercutirá em um erro de $\pm 10^1$ na constante de velocidade k, pois a relação de Eyring é exponencial em relação as variáveis medidas.

Tecnicamente, conforme foi relatado no início desta secção na equação 3.2.7.1, saberemos que estamos diante de um estado de transição quando o valor de ω for imaginário. Pois, conforme sabemos, para a frequência de um oscilador, teremos a equação 3.2.7.8.

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_{eq}^{\#}}{\mu}} \quad (3.2.7.8)$$

Onde v é a frequência do oscilador, $k_{eq}^{\#}$ será a constante intrínseca de oscilação harmônica e μ será a massa reduzida. Desta forma, quando a derivada segunda da energia potencial, em relação a coordenada de reação for negativa, conforme é demonstrada na equação 3.2.7.1, estaremos no ponto de máximo, ou seja, no estado de transição em questão, e conseqüentemente, ao inserirmos o valor de ω na equação 3.2.7.8, teremos um valor de frequência imaginária v , e portanto, caracterizando o estado de transição de forma específica.

3.3. METODOLOGIA CLÁSSICA

3.3.1. Ancoragem molecular – *Docking* Molecular

Para descrição do modo de reconhecimento molecular entre receptor e um substrato alvo, o uso das técnicas de ancoramento molecular (*docking*) se fazem de grande valia, onde podemos destacar o primeiro *software* específico o pacote DOCK, desenvolvido por Kuntz e colaboradores (KUNTZ, 1982).

Sabendo do perfil das interações intermoleculares que o sítio receptor lança sobre o composto alvo, provavelmente, haverá relação direta com a resposta biológica exercida deste ancoramento molecular. Esta visão de recepção pode ser modelada pela metodologia de *Docking Molecular*, e devido a sua fácil execução procedimental, com amparo computacional muito proveitoso em termos de predição estrutural, com a respectiva correspondência energética da pose gerada no sítio proteico, esta técnica se torna muito visada para realização da predição estrutural entre receptor e ligante (LEACH, 2001; CRAMER, 2006; MORGON, 2007).

Não só na área acadêmica é utilizado este tipo método, também na indústria biotecnológica e farmacêutica fazem proveito, pois os modelos gerados podem ser comparados com coletâneas de dados já dispostos na literatura, e assim, realizar o que se

chama de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), sendo uma comparação de recepção molecular através da triagem energética obtida entre o receptor proteico escolhido e os ligantes escolhidos através de diversas propostas disponíveis na literatura, encontrados em um banco de dados, ou seja, é uma alternativa versátil para o desenho racional de novos potenciais fármacos baseando-se no sítio do receptor.

Para realização da triagem molecular, também conhecida por ranqueamento, o critério de aceitação ou negação para uma pose estrutural do ligante, no sítio receptor, é utilizada uma função avaliação (função *scoring*) (LEACH, 2001), que para o presente trabalho foi adotada a função CHEMSCORE (ELDRIDGE, 1997), que se classifica como função puramente empírica. Esta denominação advém da validação empírica frente a uma proteína modelo, e um banco de dados com energias de ligação conhecidas. Desta forma, os pesos para cada consideração na energia de ligação ΔG_{BIND} serão obtidos de ajustes puramente matemáticos (LEACH, 2001). A seguir, na equação 3.3.1.1, são demonstradas estas considerações.

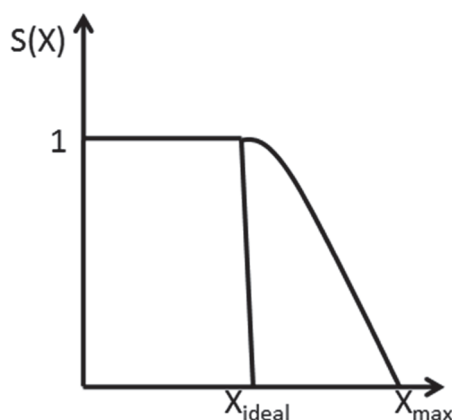
$$\Delta G_{\text{BIND}} = \Delta G_0 + \sum_i S_i G_i \quad (3.3.1.1)$$

A equação anterior é o formato obtido para a CHEMSCORE, onde ΔG_0 será o mínimo obtido da linearização inicial da parametrização do modelo de montagem desta função, os valores para cada G_i serão pesos para a recepção do substrato no sítio escolhido, ou seja, é um número que pondera a possibilidade das contribuições de ligações hidrogênio, interação entre metal-ligante, contribuições lipofílicas, iônicas, rotacionais, e demais outras. E, por fim, S_i designa as funções de blocos, representadas na equação 3.3.1.2.

$$S(x) = \begin{cases} 1, & \text{se } X_{\text{encontrado}} < X_{\text{ideal}} \\ 1 - \frac{X_{\text{max}} - X_{\text{encontrado}}}{X_{\text{max}} - X_{\text{ideal}}}, & \text{se } X_{\text{ideal}} \leq X_{\text{encontrado}} \leq X_{\text{max}} \\ 0, & \text{se } X_{\text{encontrado}} > X_{\text{max}} \end{cases} \quad (3.3.1.2)$$

A Função Si é uma função de blocos dependente da posição X, ou seja, pode ser dada como S(X), cuja a restrição deve-se aos valores limites de distância parametrizados (X_{max}). Em cima desta função, lança-se o que seria ideal para os valores predispostos (X_{ideal}), e os valores de $X_{\text{encontrado}}$ serão depurados pelo algoritmo de busca estrutural adotado, no caso, foi utilizado o algoritmo Lamarckiano. Desta forma, o critério de aceitação imediato da pose estrutural obtida se dará quando a distância encontrada for menor que a ideal previamente disposta no *software*. Caso esta pose não atenda esta exigência, teremos uma normalização de resultado, onde o valor limite será automaticamente arremetido, zerando ou não a função. E, de forma alguma, serão aceitas as poses que as distâncias se destoam devido ao valor encontrado ser maior que o valor máximo. De forma mais clara, na Figura 3.3.1.1 é possível traçar o perfil gráfico de comportamento de Si, em função dos valores de intervalos.

Figura 3.3.1.1. Comportamento da função Si para os valores máximo e de idealidade no ranqueamento do algoritmo escolhido.



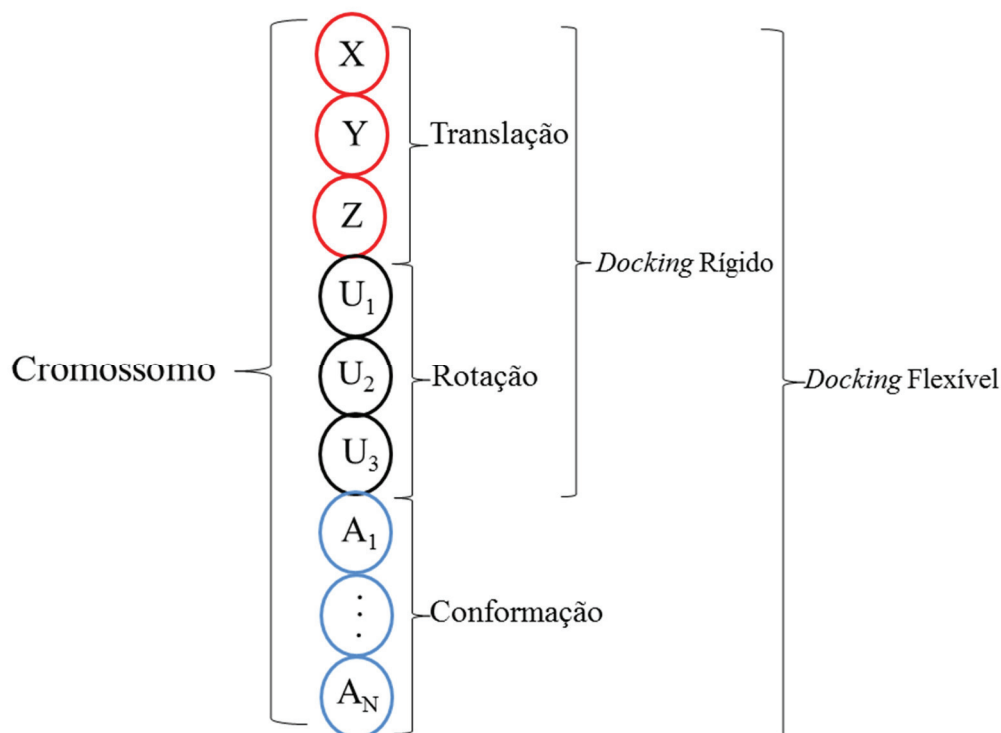
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

3.3.2. O algoritmo lamarckiano

Como já foi possível de perceber, as estruturas geradas pela função de *scoring* S_i são conhecidas pelo nome de pose, e destas poses são calculados os valores de energia ΔG_{BIND} e, posteriormente, toma-se a comparação energética para ranqueamento conforme é solicitado pelo operador. No entanto, para gerar estas poses e obter os valores de $X_{\text{encontrado}}$, o algoritmo genético Lamarckiano (LA) se faz necessário (MORGON, 2007), e sua desenvoltura está na arte das suas operações de busca de novas possíveis posições.

As poses geradas serão obtidas basicamente por três tipos de operações matemáticas denominadas de operações genéticas, que necessitam das informações estruturais do ligante em um alocamento vetorial momentâneo, conforme se demonstra na Figura 3.3.2.1.

Figura 3.3.2.1. Esquemática da definição de um cromossomo para cálculo de poses.



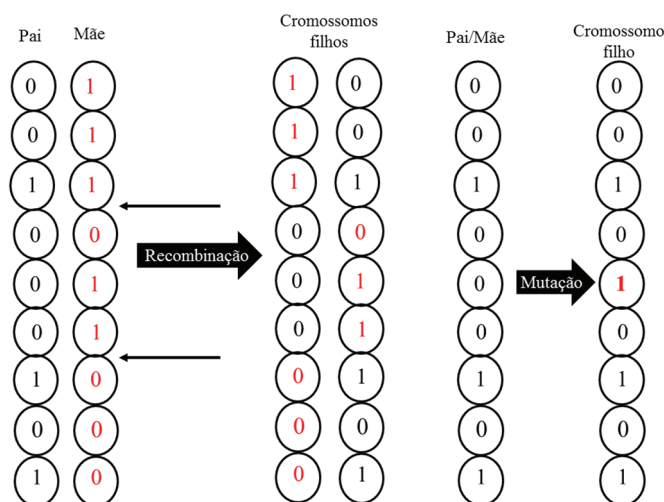
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Ou seja, conforme é descrito na figura anterior, cada informação de um referencial é alocada em um *locus* cromossomal, de modo a operar com o deslocamento do ligante, com sua rotação, bem como sua orientação conformacional. Guardando estas informações, poderemos tratar o *docking* de forma rígida, na qual somente consideramos a translação e rotação do substrato dentro da margem do sítio selecionado, ou de forma flexível, quando a análise conformacional do ligante também é considerada.

Com estas informações definidas, é possível aplicar as operações genéticas: acasalamento, recombinação e mutação. O acasalamento é a operação que limita o tamanho populacional previamente escolhido no início do cálculo, basicamente escolhe duas poses para se replicarem, gerando apenas dois filhos, não havendo a necessidade, portanto, de se ilustrar tal operação devido sua simplicidade, fato que não pode ser afirmado para as outras demais operações a serem definidas a seguir, ilustradas na Figura 3.3.2.2.

A recombinação, também conhecida como *crossing over*, será a mistura entre dois cromossomos iniciais denominados de pai e mãe, para formação de dois cromossomos novos, ditos de cromossomos filhos. Esta estratégia tem a finalidade de miscigenar o máximo de informações possíveis entre cada indivíduo da população para cálculos de energia posterior.

Figura 3.3.2.2. Ilustração das operações genéticas denominadas como recombinação e mutação.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

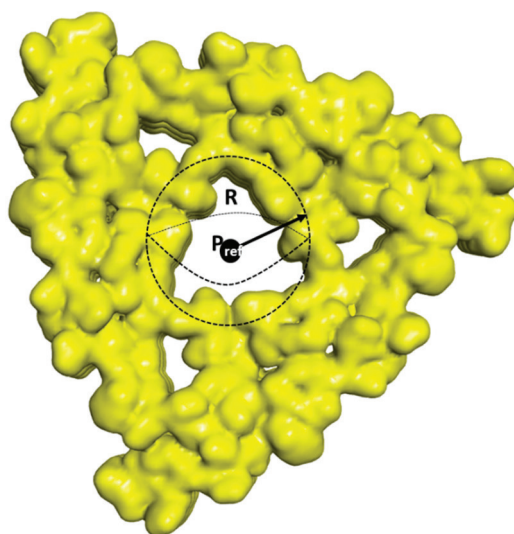
A mutação possui o propósito de aleatoriamente, frente as condições iniciais escolhidas, trocar em um único elemento de vetor pela sua defasagem, conforme é ilustrado na figura anterior, onde no *locus* de rotação troca a coordenada central.

Para padronização do valor de energia com a pose inicial, há a necessidade de avaliar uma variável de corte de dispersão que permita considerar o valor da pose encontrada, caso haja muita divergência com o valor inicial da estrutura de partida. A esta variável chamamos de RMS (*Root Mean Square*), ou raiz do valor quadrático médio, que pode ser definida conforme a equação 3.3.2.1.

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (P - P_i)^2}{N - 1}} \quad (3.3.2.1)$$

Onde, P é a posição cartesiana média de cada átomo que foi obtida, P_i é cada posição e N é o total de átomos do sistema. Desta forma, é muito convincente se um resultado de RMS (DE SOUSA, 2012) for menor que 2,5 Å, para validação do protocolo de *docking molecular*. Opção esta que pode ser selecionada diretamente no *software*, de modo que toda estrutura obtida tenha valor menor que 2,5 Å.

Figura 3.3.2.3. Escolha de Grid para a estrutura Aβ(1-40) estudada.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Com todas as operações definidas, o restante será a definição da grade do sítio de recepção molecular (Grid) (MORGON, 2007). Para isso, teremos um átomo, ou ponto de referência que deve ser dado em torno do sítio de interesse, de modo a manter a percepção da função de *scoring* por cada átomo do ligante que seja semelhante. Para o trabalho, foi adotado como referência, o centroide de coordenadas cartesianas (-8,64; -6,08; 107,83) da estrutura A β (1-40) código pdb 2M4J, conforme esquematizada na Figura 3.3.2.3, a qual foi atribuída raio de busca de Grid esférico de 15,0 Å, e das poses geradas com valores de ΔG_{BIND} mais negativos foram submetidas para o processo de estudo de interações com a metodologia de Dinâmica Molecular (MD), frente ao Campo de Força AMBER escolhido.

3.3.3. O campo de força AMBER

Da tentativa de abordar sistemas que portam grandes quantidades de átomos, nos quais não existe a possibilidades de abordagem puramente quântica, surge os campos de força moleculares. Este termo vem o propósito de montar uma biblioteca na qual contenha informações de parâmetros previamente definidos de modelos de distâncias e ângulos mínimos, constantes harmônicas de oscilações e interações coulombicas para cada tipo de átomo que são considerados idênticos para sistemas maiores.

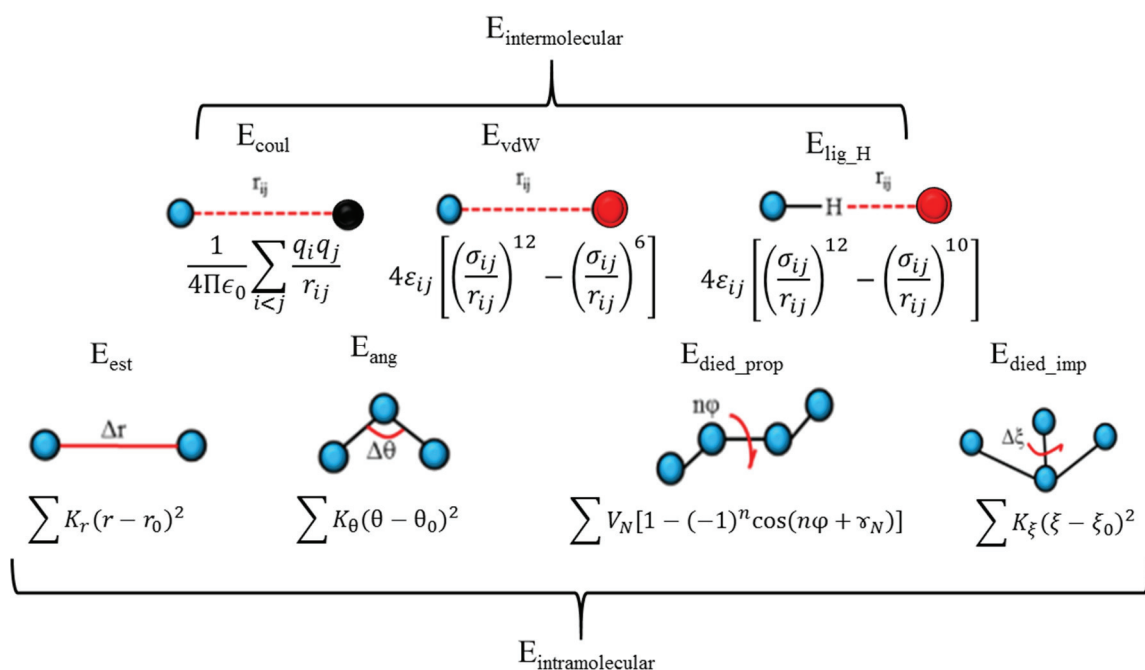
Portanto, para cada tipo de átomo (*atom type*) é resguardado um arquivo que em conjunto para uma classe de biomoléculas específicas, formarão o que é chamado de Campo de Força. No presente estudo, foi utilizado o Campo de Força AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) (AMBER12, 2008; PEARLMAN, 1995; WEINER, 1984) que possui sua descrição para o cálculo da energia potencial E conforme é dado na equação 3.3.3.1 a seguir, e que será melhor ilustrado com a Figura 3.3.3.1.

$$E = E_{\text{est}} + E_{\text{ang}} + E_{\text{died_prop}} + E_{\text{died_imp}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{coul}} + E_{\text{lig_H}} \quad (3.3.3.1)$$

Para todos os termos de oscilações (os quatro primeiros), também conhecidos como termos de interação intramolecular, teremos as considerações de oscilação harmônica, sendo o termo E_{est} referente as oscilações de estiramentos de ligações, E_{ang}

será a representação das deformações angulares, $E_{\text{died_prop}}$ e $E_{\text{died_imp}}$ serão para as deformações de ângulos diedros próprios e impróprios respectivamente. Para os termos intermoleculares, E_{vdW} representa as interações de van der Waals, E_{coul} reporta as interações carregadas e $E_{\text{lig_H}}$ para as interações de hidrogênio, conforme se esclarece a seguir, com a descrição quantitativa de cada termo independente da equação 3.3.3.1.

Figura 3.3.3.1. Esquema da obtenção da energia potencial total E obtida através das considerações implementadas no campo de força AMBER.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Para a consideração intramolecular, todos os subscritos de zero representam os valores para distâncias e ângulos em estado de equilíbrio oscilatório, onde as constantes de força K_r , K_θ , V_N e K_ξ serão as constantes de equilíbrio para estiramento, deformação angular, deformação de diedros de forma própria e imprópria, respectivamente. E, para os termos que descrevem o carácter energético intermolecular, as letras i e j representam átomos distintos, onde teremos dependência com q que é referente as cargas atômicas atrativas ou repulsivas, ϵ e σ sendo respectivas larguras e profundidades de poços de potencial, e r , que será a distância interatômica.

Com o formato de energia elucidado, para vincular a energia com dependência temporal, basta considerar a equação 2 que vincula a força total do sistema como dependente da variação da energia potencial total no espaço. Portanto, para consideração de evolução estrutural temporal, deveremos integrar as equações de Newton de forma numérica.

$$-dE = F(t)dS \quad (3.3.3.2)$$

Onde $F(t)$ será a força submetida a uma partícula em um determinado espaço S qualquer, de forma que a Mecânica Newtoniana que apresenta a característica primordial de não vincular todos as partículas simultaneamente, atenda a segunda lei de Newton expressa a seguir na equação 3.3.3.3, que irá sobre a partícula de massa m certa aceleração resultante.

$$\frac{d^2x}{dt^2} = \frac{F(t)_{xi}}{m_i} \quad (3.3.3.3)$$

3.3.4. Dinâmica Molecular – DM

Como já observado na secção anterior, se sabemos o perfil do campo de força, por hora já parametrizado, serão previsíveis as posições e velocidades de cada partícula através da integração das equações de Newton, de modo que a velocidade seja a peça chave para o cálculo da energia cinética k , através da equação 3.3.4.1.

$$k = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (3.3.4.1)$$

Onde, N será o total de átomos considerados com suas respectivas individuais massas m_i e velocidades v_i . Desta forma, conhecidas as posições e velocidades em cada instante teremos o que chamamos de trajetória determinística, nome caracterizado pelo método de simulação via Dinâmica Molecular (DM).

No entanto, para solucionar cada valor de posição e velocidade se faz necessário considerar um esquema de integração numérico, no qual em cada passo de integração δt (*time step*) já previamente informado como contador de *looping*, e desta forma teremos a resolução da posição r e da velocidade v . Se realizarmos a expansão de Taylor em torno da coordenada referencial de cada partícula de modo que seja considerado $r(t \pm \delta t)$, poderemos obter a equação 3.3.4.1, e como consequência, a velocidade será computada pela variação ocorrida no deslocamento entre $r(\delta t)$ e $r(t + \delta t)$ para o intervalo de tempo $t = n \delta t$ considerado, onde n será a quantidade de *looping* no cálculo de cada $r(t + \delta t)$. Este método descrito é chamado de Verlet-velocidade (*Velocity-Verlet*) (VERLET, 1967), no qual poderemos expressar cada posição atômica conforme a equação 3.3.4.1 já mencionada.

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + \frac{F(t)}{m} \delta t^2 \quad (3.3.4.2)$$

No entanto, para o *software* utilizado no trabalho, a implementação de integração numérica como função do *time step* δt , no cálculo de deslocamento será conforme o algoritmo do Pulo do Sapo (*Leap-Frog*), equações 3.3.4.3-4, que surge da modificação do Algoritmo de Verlet, por conseguir melhor precisão que o anterior, que será comentado a seguir.

$$v\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) = v\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) + a(t) \delta t \quad (3.3.4.3)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + v\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) \delta t \quad (3.3.4.4)$$

No método de *Leap-Frog*, conforme é facilmente perceptível, para cada valor de distância obtida, a velocidade será dada no meio do deslocamento, uma vez que para $t = 0$ ps, teremos primeiramente o cálculo de $v(\delta t/2)$ que será variável para o cálculo de $r(\delta t)$. Ou seja, a velocidade é dada no meio entre $r(\delta t)$ e $r(t + \delta t)$, e é calculada acima dos deslocamentos, fato que pode ser facilmente arremetido para o nome do método.

No caso de sistemas portando alta frequência oscilatória como é o caso de oscilações do tipo C-H, teremos valores da ordem de 10 fs, a idealidade da apuração numérica das equações de integração será com valores de δt muito pequenos, pelo menos dez vezes menor, ou seja, 1 fs o valor perfeito escolhido, o que restringe o seu emprego pelo alto custo computacional (MORGON, 2007).

Uma saída para se tratar sistemas de biomoléculas de grande porte seria fixar estes tipos de vibrações preservando os valores de equilíbrios considerados com relação as posições, ângulos e ligações. Esta é a descrição do algoritmo de SHAKE (MORGON, 2007), que fará exatamente o que foi pronunciado de maneira computacional dentro de um somatório ao inserir uma força f_{ij} externa para cada tipo de ligação considerada como vibração intensa, com período de oscilação acima de 10 fs através da equação 3.3.4.5.

$$\frac{d^2x}{dt^2} m = F(t)_{xi} + \sum_{i \neq j}^N f_{ij}(t) \quad (3.3.4.5)$$

Com a equação 3.3.4.5, é possível aplicar para grandes sistemas que necessitem destas considerações, tais como proteínas e carboidratos, o que fará no ganho demasiado de tempo computacional, pois este truque permite aplicar 2 fs para os valores de δt , e com isso, reduzir pela metade o tempo de simulação.

3.3.5. Condições periódicas de contorno

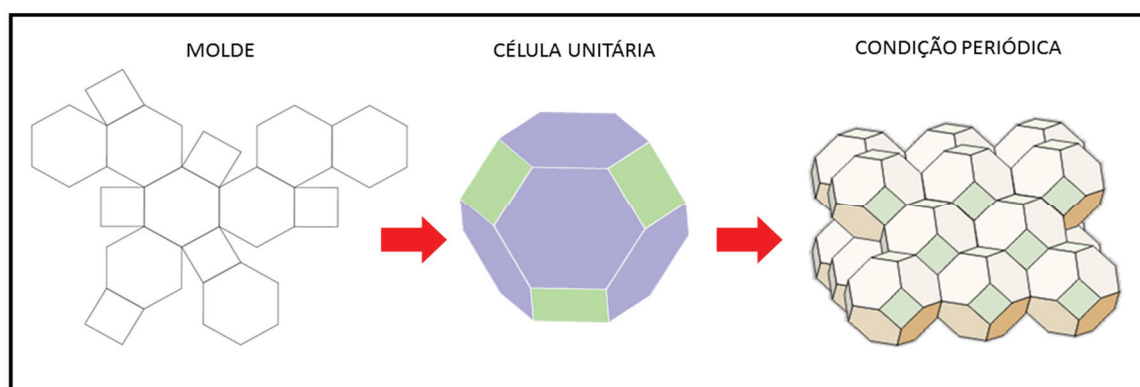
Para inclusão de solventes de forma explícita, onde na presente tese foram consideradas moléculas de água, foi necessário incluir nas considerações de cálculos as condições periódicas de contorno.

Com estas considerações, teremos a inclusão do modelo TIP3P, de modo que no decorrer da simulação, caso um átomo saia da caixa, sua imagem na face oposta, a qual esteja com a mesma velocidade de saída, possa retornar para o interior da mesma. Desta forma, fica muito evidente o porquê de serem consideradas caixas de formatos cúbicos, pois é muito mais claro e evidente observar estes fenômenos de espelhamento.

Para inclusão destas condições, é necessário considerar uma distância limite, chamado de raio de corte (*cutoff*) para truncar a extensão do potencial, até este valor limite fornecido. Tecnicamente, o que é feito é considerar uma largura R de célula unitária, na qual na sua metade $R/2$ ($8 - 10 \text{ \AA}$) seja o limite de atuação de um potencial esférico.

Para sistemas maiores, o emprego de caixas cúbicas é muitas vezes inviável, pois seu tamanho teria que ser muito expressivo para que não ocorra percepção de um soluto por outro, com isso, deve-se por obrigação considerar o tamanho da caixa cúbica demasiadamente grande e desta medida muito mais moléculas de solventes são incluídas para resolução das equações de Newton, e conseqüentemente, tornando o cálculo muito oneroso. A alternativa nestes tipos de situações é adotar condições periódicas no formato de um octaedro truncado, Figura 3.3.5.1, que se assemelha muito com o uma esfera, e com isso, as moléculas que estariam muito longe do soluto deixarão de existir, o que implica na redução expressiva no tempo de computação.

Figura 3.3.5.1. Octaedro truncado em célula unitária para expansão de condições periódicas de contorno.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Mas, o que pode passar despercebido nestas considerações é o valor de cutoff ser inapropriado no tratamento de longo alcance em interações coulômbicas, por exemplo que decai no quadrado da distância, o que resultaria num efeito de borda acentuado.

Para isso, destacam-se vários métodos que consistem em somar as interações de longo alcance sobre diferentes configurações dentro da periodicidade do sistema incluindo as imagens obtidas na simulação. Dentre eles, as somas de Ewald com o formato PME (*Particle Mesh Ewald*) (MORGON, 2007) é um dos mais viabilizados em programas de Dinâmica Molecular (DM), tais como o software AMBER utilizado para resolução dos sistemas dinâmicos na presente proposta.

3.3.6. A descrição da técnica MM-PBSA

Para se calcular as energias de energia livre de ligação ΔG_{lig} a partir de um número finito de estruturas representativas obtidas da simulação de DM, é preciso utilizar as equações de Poisson-Boltzman, conforme será descrito a seguir, sendo representado pelas sequências de equações 3.3.6.1-5.

$$\Delta G_{lig} = E + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (3.3.6.1)$$

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{n-pol} \quad (3.3.6.2)$$

$$\Delta G_{PB} = \frac{1}{2} \sum_i (\varphi_i^{78} - \varphi_i^1) \quad (3.3.6.3)$$

$$\nabla \varepsilon(r) \nabla \varphi(r) - k' \varphi(r) = -4\pi\rho(r) \quad (3.3.6.4)$$

$$\Delta G_{n-pol} = \beta + \gamma(A) \quad (3.3.6.5)$$

Conforme é descrito na equação 3.3.6.1, para se determinar ΔG_{lig} teremos que considerar primeiramente o cálculo da energia total do sistema (E) em formalismo clássico, dado pelo campo de força escolhido (no caso, o campo de força AMBER já supracitado) (AMBER12, 2008; KOLLMAN, 2000).

As contribuições entrópicas devido as movimentações moleculares podem ser aproximadas de forma bem convincente por análise de modos normais de vibração, o que é extremamente custoso em tempo computacional, sendo, portanto, desprezado nos cálculos de MM – PBSA (KOLLMAN, 2000).

Já, para o termo da contribuição de solvatação ΔG_{solv} teremos que primeiramente supor raio de corte infinito, e com isso será considerado todos os tipos de interações intermoleculares. Todas as moléculas de solvente e os contra íons utilizados serão retiradas, e as estruturas dos solutos serão inseridas em um meio dielétrico dado pela constante dielétrica ϵ . Com isso, é possível perceber na equação 3.3.6.2 que a contribuição de solvatação necessitará de um termo via formalismo de Poisson-Boltzman ΔG_{PB} , que precisará de uma referência de potencial eletrostático ϕ em dois meios de referência, sendo ϕ^1 no vácuo, e ϕ^{78} em água. Mas, para calcular este termo necessitaremos da equação 4, que faz o uso das constantes dielétricas do meio contínuo adotado, informado pelos valores de ϵ . Os usos dos valores invertidos de comprimentos da aproximação Debye-Hückel serão dados por k' , e o valor das densidades de cargas atômicas será informado por ρ . E, com isso, percebemos que todas estas variáveis possuem dependência de referencial de distâncias r frente ao centro atômico considerado. Já, para o termo de energia não-polar ΔG_{n-pol} , os valores de β e $\gamma(A)$, serão obtidos de forma experimental, com os valores de A dados pela área de penetração acessível do solvente considerado, no nosso caso água.

Com estas descrições, finalmente é possível de ser calculado o valor da energia livre de ligação do complexo resultante ΔG_{lig}^{RES} , dado pela equação 3.3.6.6, onde todas as considerações de cálculos são as mesmas descritas nas equações 3.3.6.1-5.

$$\Delta G_{lig}^{RES} = \Delta G_{lig}^{COM} - \Delta G_{lig}^{Prot} - \Delta G_{lig}^{LIG} \quad (3.3.6.6)$$

Onde $\Delta G_{\text{lig}}^{\text{COM}}$, $\Delta G_{\text{lig}}^{\text{Prot}}$ e $\Delta G_{\text{lig}}^{\text{LIG}}$ serão os cálculos das energias livres do complexo proteína-substrato, da proteína isolada e do ligante isolado, respectivamente, sendo necessário destacar que para o trabalho, apenas uma trajetória de produção foi considerada para ser retirado no mínimo 15 estruturas para os cálculos de $\Delta G_{\text{lig}}^{\text{RES}}$.

3.4. ESQUEMA METODOLÓGICO

Dada a complexidade do sistema, foi necessário conhecer de forma detalhada como é a estrutura do agregado amiloide, de modo que fosse escolhido um modelo já relatado na literatura. No caso, o código pdb 2M4J foi considerado, o qual possui 9 estruturas de amiloide via ressonância nuclear, com 40 resíduos de aminoácidos (AA), e um total de 5391 átomos. Este sistema, quando simulado, foi imerso em moléculas de H₂O (6000 aproximadamente), tratadas de maneira explícita em conjunto com os ligantes, ou seja, cada simulação atômica “não admite erros”, pois são muito custosas em tempo computacional.

Saber ao exato que tipo de modelo é necessário para representar quantitativamente os resultados experimentais obtidos da literatura, tanto em termos de simulação de complexos metálicos, quanto em termos de estruturas de agregados maiores, foi uma das questões muito difíceis de responder. A dificuldade inicial foi grande, pois não havia nenhum trabalho em que se abordasse qual é a estabilidade e a reatividade de cada aminoácido do peptídeo β -amiloide frente a coordenação metálica. O único indicativo de ocorrência reacional era dado por Ma e Brahmam, fornecendo que sítios de HIS, LYS e GLU eram alvejados. Entretanto, estudar computacionalmente processos envolvendo a cinética reacional não é de grande confiabilidade, se não existem resultados experimentais para comparação e validação de barreiras de ativação.

Assim sendo, foi sintetizado um complexo modelo denominado de pt01, para que em um segundo momento fosse alvejado com moléculas de H₂O e HIS, utilizando considerações fisiológicas para obtenção da cinética reacional e comparação com os modelos teóricos.

Com este resultado, foi elaborado a descrição quântica que reproduzisse o resultado experimental encontrado. E, em seguida, na terceira etapa, teve-se o ideal de

traçar a reatividade e estabilidade de cada aminoácido que fosse potencial alvo de complexos metálicos, considerando estado zwitteriônico. Todos os cálculos nesta etapa foram obtidos com o *software* GAUSSIAN 09®.

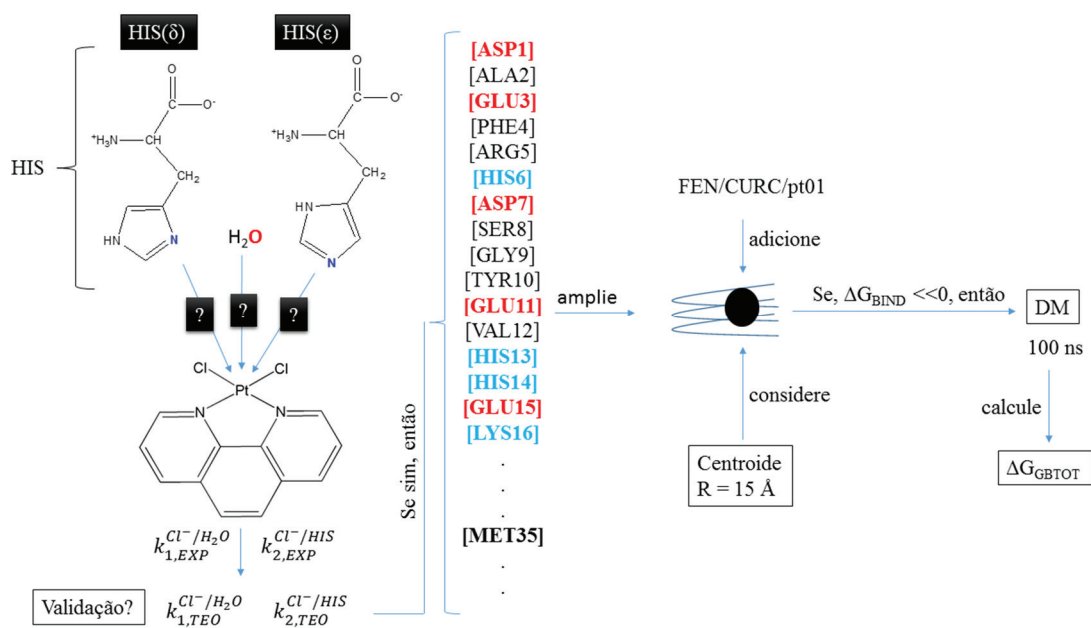
Em contrapartida, para simular o mais próximo possível das considerações *in vitro*, foi mapeado o perfil das interações ocorridas entre agregados de amilóide e os ligantes derivados da fenantrolina (ofen) e curcumina (cur), de maneira que os resultados fossem apurados com um grau de aproximação mais realística com os experimentos.

Foi adotado um protocolo sequencial de triagem, no qual foi escolhido apenas uma estrutura de receptor-ligante utilizando o *software* GOLD® para a realização de *docking molecular* obtendo as poses de ΔG_{BIND} mais negativo, e com isso, dar início aos cálculos de DM.

Com as estruturas ranqueadas, foi proposto na quinta etapa, um protocolo de simulação de DM, o qual constou de curta minimização de geometria com mecânica molecular no campo de força AMBER, seguida de aquecimento onde as temperaturas iniciais partiram de 5 K para 50 K e estabilizadas por 1ns, em regime NPV. Em seguida, houve elevação direta de temperatura para 300 K mantendo-se constante em regime NPT, com etapa de produção totalizada por 100,0 ns. Ao final do processo, a energia de interação dada pela metodologia MM-PBSA (ΔG_{GBTOT}) foi calculada com 10 poses do regime de produção.

O fator de integração δt adotado foi 2,0 fs, devido a utilização do algoritmo de SHAKE. E, por último, o complexo pt01 foi parametrizado considerando cargas MK e aproximações harmônicas, via cálculos de *scan* de ligações e ângulos, com as mesmas propostas metodológicas quânticas já supracitadas, com o objetivo de simular conjuntamente com os agregados, onde estes valores foram inclusos em uma biblioteca (*UNIT*) para leitura do *software* AMBER12. No intuito de deixar o mais claro possível sobre as propostas metodológicas adotadas, cada etapa na proposta é exemplificada na Figura 3.4.1.

Figura 3.4.1. Esquema metodológico abordado para execução do trabalho.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. EXPERIMENTO

Como já relatado, não existem dados na literatura que fornecessem indícios de cinética reacional para o sistema de complexos estudados. Portanto, a presente tese aborda a síntese e caracterização do complexo pt01, no intuito de se obter as constantes de velocidades experimentais, através dos sinais de absorção molecular (ABS), para validação de protocolo de simulação computacional, utilizando cálculos de DFT.

Primeiramente, foram necessários comparar as estruturas DFT teóricas com as estruturas em estado sólido, obtidas por difração de raio-X (GRZESIAK, 2007; GABALLA, 2003), conforme a Tabela 4.1.1, de maneira a prever até que ponto o desvio pode ser considerado significativo com o nível de teoria estudado. Para grande satisfação, os dados estruturais se desviaram aproximadamente 5% com o valor das estruturas cristalográficas, ou seja, em relação aos dados estruturais obtidos, todos poderão ser considerados como descritores exatos. A motivação para a utilização do nível de teoria descrito na tabela a seguir, se deve aos resultados obtidos, de forma muito interessante na literatura, sobre complexos de platina com ligantes similares aos aqui apresentados. Tanto na literatura, quanto no presente trabalho, utilizando a mesma função de base com o mesmo tipo de pseudo-potencial apresentaram desvios de aproximadamente 5% na esfera de coordenação (Paschoal, 2012) .

Tabela 4.1.1. Valores experimentais (em parênteses) e teóricos para pt01 e pt02. Os dados experimentais são reportados em estruturas cristalinas e os valores teóricos foram obtidos ao nível B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d), em meio aquoso utilizando aproximação IEFPCM ($\epsilon=78,4$).

	Ligações / Å			Ângulos / graus		
	Pt-N	Pt-Cl	N-Pt-N	N-Pt-Cl	Cl-Pt-Cl	Error / %
pt01	2,025	2,391	80,70	94,51	90,26	5.4
	(2,005)	(2,292)	(81,46)	(93,43)	(90,72)	
pt02	2,048	2,393	80,25	94,91	89,90	4.4
	(2,028)	(2,295)	(81,32)	(94,37)	(90,49)	

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.1.1. Caracterização do complexo [Pt(ofen)Cl₂]- pt01

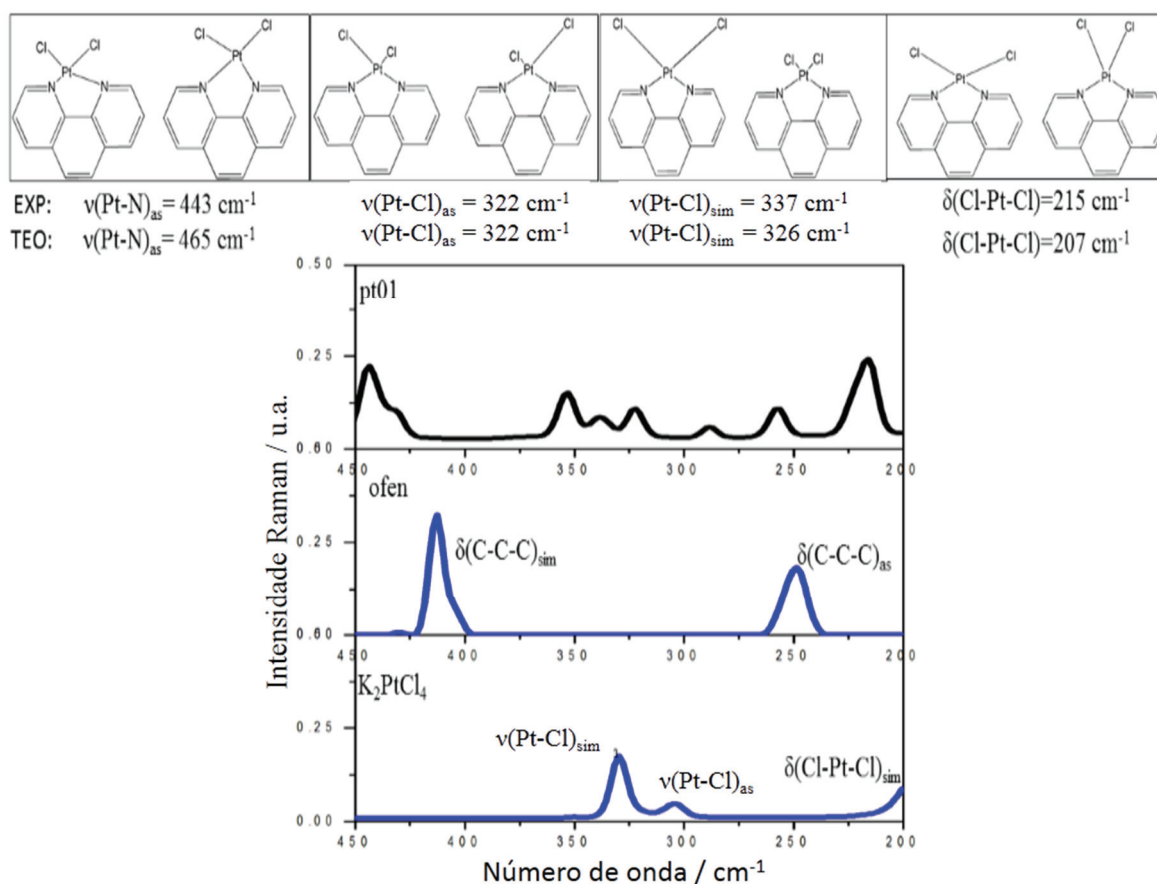
Para caracterização de pt01, foi utilizado a espectroscopia Raman com a intenção de comprovar estiramentos e deformações específicas de cada modo normal de vibração. Cada tipo de movimentação, conforme é demonstrada na Figura 4.1.1.1, foi tomada como um marco de evidência de coordenação metálica, visto concordância com a apuração dos cálculos ao nível de teoria já descrito.

É possível ver claramente nos espectros que há surgimento de uma nova banda na região de 445 cm⁻¹, possuindo valor exato de $\nu(\text{Pt-N})_{\text{as}} = 443 \text{ cm}^{-1}$ (teo: 465 cm⁻¹), sendo o sinal conclusivo para relacionar a coordenação metálica ocorrida entre nitrogênio e platina. De maneira semelhante, os modos de deformação presentes no anel, permanecem na estrutura do complexo formado, logicamente com certo valor de deslocamento do número de onda, o que também evidencia mudança no período de oscilação ditado pelo aumento de massas molares pelo vínculo com a esfera de coordenação.

E, por fim, os modos normais que evidenciam a permanência da platina coordenada com cloreto serão os estiramentos $\nu(\text{Pt-Cl})$ na região de 320 – 340 cm⁻¹ em conjunto com o modo tesoura dado pela deformação angular no plano $\delta(\text{Cl-Pt-Cl})$, na região de 200 cm⁻¹. No intuito de verificação da pureza da amostra sintetizada de pt01, a

análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) para determinação da fórmula mínima estrutural foi calculada para $C_{12}H_8Cl_2N_2Pt$, recebendo os valores de C: 32,30%; H: 1,81%; N: 6,28%, cujo os valores experimentais encontrados foram comparáveis, dados por C: 31,6%; H: 1,76%; N: 6,04%.

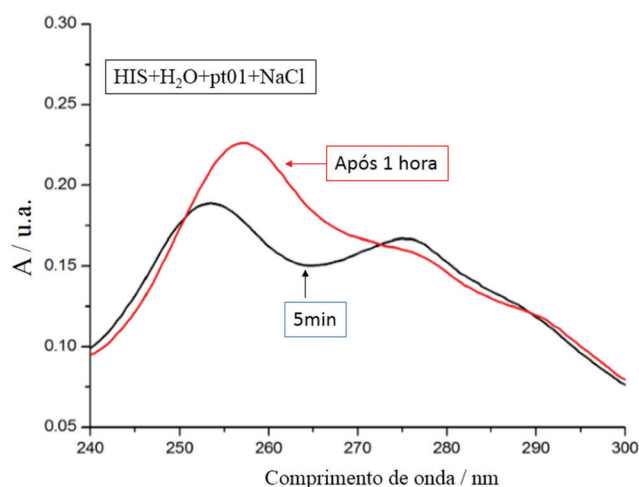
Figura 4.1.1.1. Espectros de espalhamento Raman utilizados como evidências de coordenação metálica para apuração da síntese de pt01.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Para executar as análises de decaimento de ligante pt01 em função do tempo, foi necessário a escolha de uma região de absorção, que se mostrasse bem característica para cada tipo de circunstância de estudo, seja para estudo de hidrólises, seja para estudo de substituição por HIS. Desta forma, um experimento inicial foi dado como marco para as apurações, conforme é demonstrado na Figura 4.1.1.2 a seguir.

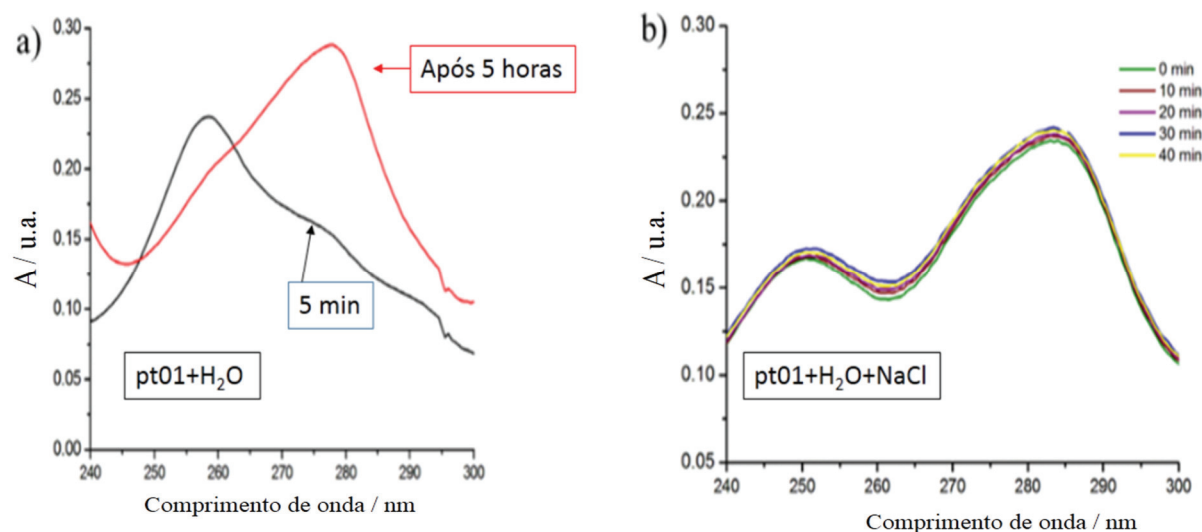
Figura 4.1.1.2. Espectro de absorção no UV-vis para o experimento de mistura reacional entre HIS/H₂O/pt01/NaCl (já descrito na seção metodológica), para determinação da banda de maior sensibilidade.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Ou seja, através do espectro acima observado, na região de 252 nm é demonstrado maior sensibilidade para a reação lançada, pois existe maior inclinação de absorção em tal comprimento de onda, quando se trata de um processo de troca do tipo Cl/HIS, haja vista que a quantidade de NaCl irá suprimir a hidrólise do processo. Pode-se notar facilmente, que o perfil do espectro demonstra a maior absorção do produto formado, de modo que o novo sinal de absorção se sobressaia frente ao sinal anterior.

Figura 4.1.1.3. a) Espectro experimental de absorção na região UV-vis para investigação da banda de evidência dos processos de solvólise. b) Espectro experimental de absorção UV-vis para a confirmação da supressão da solvólise com adição de NaCl.



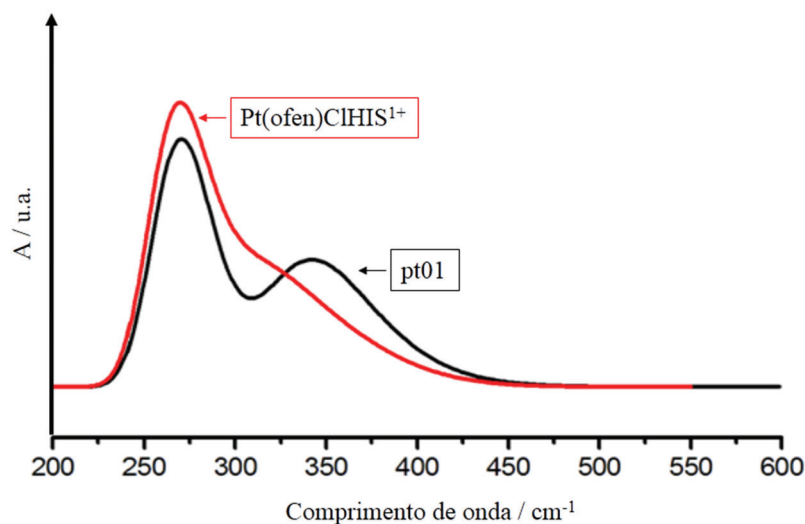
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Adotando a mesma estratégia de inspecionar a região para verificar a cinética reacional, foi realizado um segundo experimento modelo, novamente para verificação de sinal espectroscópico padrão. Como resultado, é possível perceber na Figura 4.1.1.3a, que as bandas para análise são coincidentes em mesmo comprimento de onda, no entanto, para o processo de trocas pela substituição de cloreto por água, do tipo $\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}$, teremos o decaimento da onda em 252 nm. E, para confirmar que de fato há supressão de ataque de moléculas de água quando é adicionado NaCl, em um terceiro experimento, foram adicionadas as mesmas quantidades de pt01, H_2O e NaCl. Como resultado, surge a Figura 4.1.1.3b, que demonstra claramente que o processo foi possível de ser suprimido com esta quantidade de sal adicionado, pois as absorções permanecem inalteradas durante o tempo de experimento.

Fica evidente que nos processos de solvólise, a banda em 252 nm que desaparece com o tempo de reação, é destinada a perda de Cl^- pelo ataque de água, contudo, para atribuição das absorções do processo de troca de cloreto por HIS isso não é tão evidente, por estar na mesma região de escolha. Logo, o espectro de absorção para a espécie pt01 e para o composto monossustituído com HIS foram gerados, acrescentado tão bom acordo com o experimento que ao depararmos com a Figura 4.1.1.4, obtida por cálculos

DFT, é possível se confundir com a Figura 4.1.1.2, pois ambas se demonstram praticamente idênticas. Com isso, a escolha da banda utilizada como sonda, na região de 252 nm, fica evidente.

Figura 4.1.1.4. Espectro teórico de absorção, utilizado para caracterizar as transições do experimento.

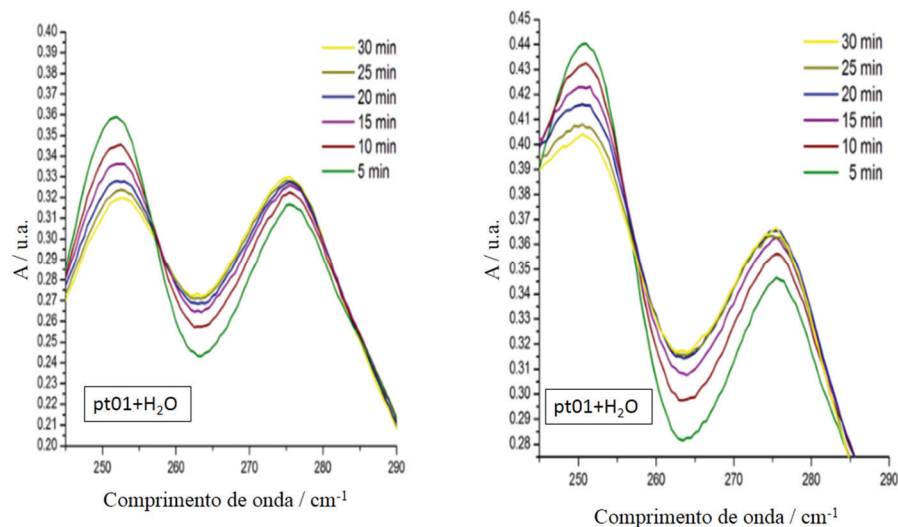


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.1.2. Análises cinéticas com validação de protocolo de simulação

Com o experimento otimizado, conforme descrito na secção metodológica, foi possível de se extrair em duplicata os espectros de absorção para o ataque solvolítico (Figura 4.1.2.1), onde os valores obtidos para o comprimento de onda máximo escolhido ($\lambda_{\max} = 252$ nm) puderam ser monitorados por meia hora (1800 segundos), a partir da leitura da primeira alíquota, e devidamente agrupados e tratados na Tabela 4.1.2.1.

Figura 4.1.2.1. Experimento para obtenção de $k_{1,EXP}$. Espectros experimentais de absorção para solvólise.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

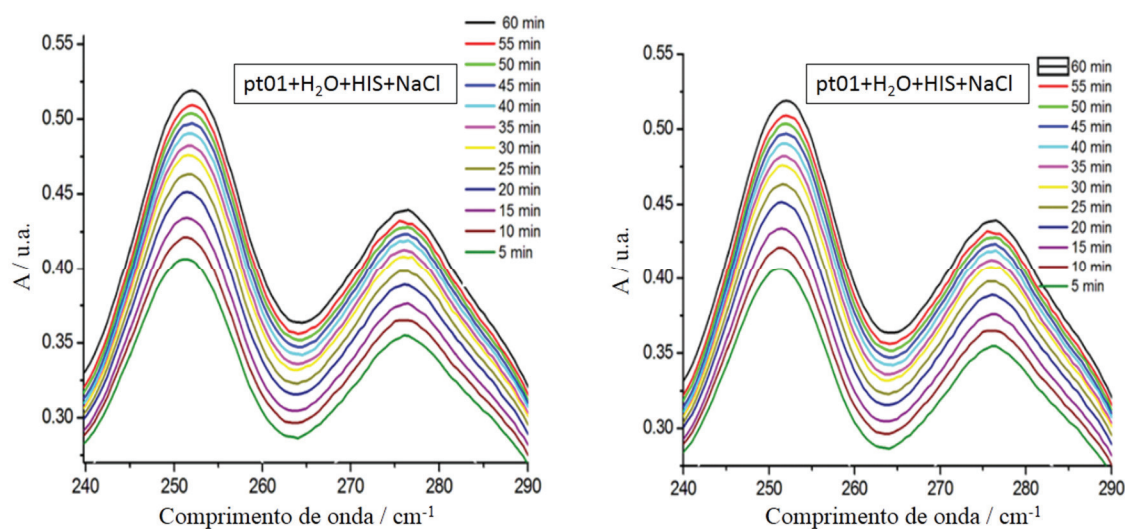
Tabela 4.1.2.1. Dados experimentais das absorções máximas para os espectros da mistura reacional de solvólise, para obtenção do valor de $k_{1,EXP}$, com referência no comprimento de onda em 252 nm.

Tempo / s	A / u.a.		A / A ₀		ln (A/A ₀)	
300	0,44037	0,35896	0,982606	0,961611322	0,01755	-0,03914
600	0,43271	0,34518	0,959875	0,936956764	0,04095	-0,06512
900	0,42270	0,33633	0,944274	0,914057277	0,05734	-0,08986
1200	0,41583	0,32811	0,923701	0,900880321	0,07937	-0,10438
1500	0,40677	0,32338	0,916071	0,889319144	0,08766	-0,11730

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Para encontrar o valor de $k_{2,EXP}$, foi realizado o monitoramento por aproximadamente 1 hora (3000 s), da banda também com valor máximo em 252 nm, e a mistura reacional foi adicionado NaCl para evitar a hidrólise, que poderia ser competitiva com o a substituição por HIS. Os espectros da Figura 4.1.2.2 ilustram o processo descrito, e a partir do recolhimento dos valores de absorção, foi possível também agrupar os dados na Tabela 4.1.2.2.

Figura 4.1.2.2. Dados experimentais das absorções máximas para os espectros da mistura reacional envolvendo pt01, H₂O, HIS e NaCl, para obtenção do valor de $k_{2,EXP}$, com referência no comprimento de onda em 252 nm.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Tabela 4.1.2.2. Dados experimentais obtidos do monitoramento da absorção máxima para a reação de troca do tipo Cl/HIS para obtenção do valor de $k_{2,EXP}$, adotando como referência em 252 nm.

Tempo /s	A	A	A/A ₀	A/A ₀	ln(A/A ₀)	ln(A/A ₀)
300	0,40536	0,405363	1,218878	1,218877	0,197931	0,19793
600	0,41994	0,419941	1,257568	1,257568	0,229180	0,229179
900	0,43327	0,433271	1,307753	1,307752	0,268310	0,268309
1200	0,45056	0,450561	1,344121	1,344126	0,295740	0,295744
1500	0,46309	0,463093	1,379996	1,379995	0,322081	0,32208
1800	0,47545	0,475451	1,39953	1,399529	0,336136	0,336135
2100	0,48218	0,482181	1,423388	1,423471	0,353040	0,353098
2400	0,49040	0,490430	1,442661	1,442660	0,366489	0,366488
2700	0,49704	0,497041	1,462456	1,462458	0,380117	0,380118
3000	0,50386	0,503862	1,478217	1,478215	0,390836	0,390835

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Com os dados de $\ln(A/A_0)$ em função do tempo de reação demonstrados nas Tabelas 4.1.2.1-2, e sabendo que a lei de Lambert-Beer (equação 4.1.2.1), pode ser atendida quando os valores de absorção são menores que 1, é possível obter a linearização dos dados experimentais, de modo que a inclinação da reta seja o valor da constante cinética observada para o processo descrito.

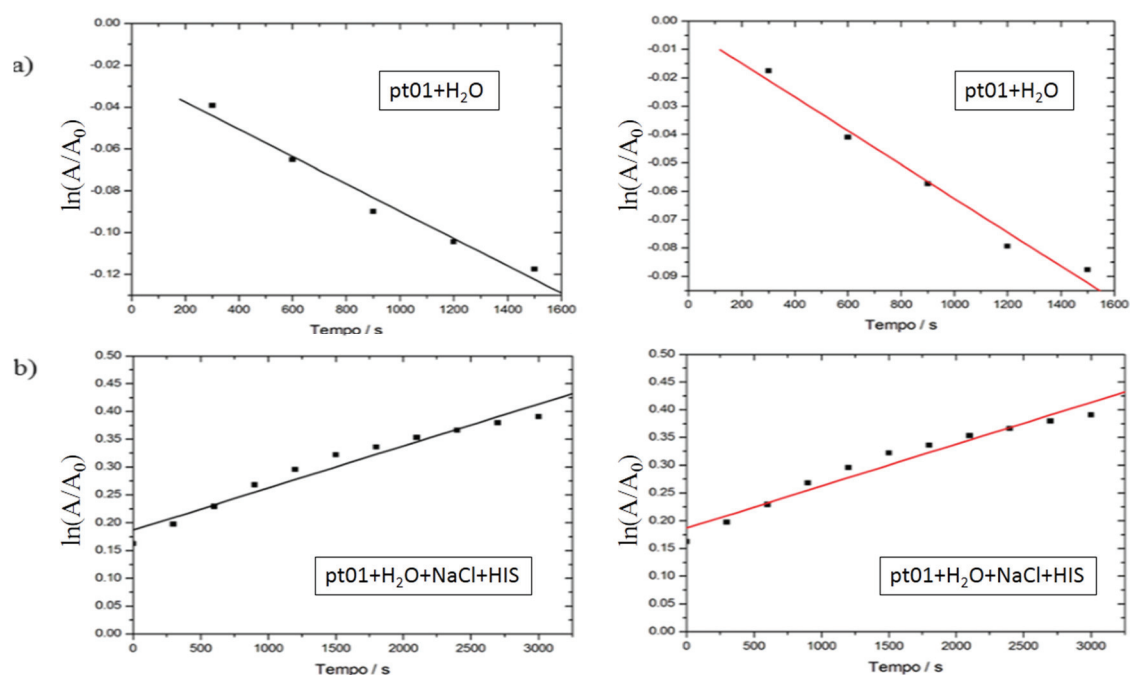
$$A = \epsilon bC \quad (4.1.2.1)$$

$$k_{obs} = k_{1,EXP} + k_{2,EXP} [HIS] \quad (4.1.2.2)$$

$$k_{2,EXP} = \frac{k_{OBS}}{[HIS]} \quad (4.1.2.3)$$

Na equação 4.1.2.1, temos que a absorção A é dependente de ϵ , b e C , onde ϵ é absorvitividade molar do composto, b é o caminho óptico percorrido pelo feixe de luz incidido sobre a amostra contida no espectrômetro, e C é a concentração molar da amostra. Observando a equação 4.1.2.2, já demonstrada na secção metodológica, será possível de se obter $k_{1,EXP}$ quando $[HIS]=0$, pois assim teremos $k_{obs}=k_{1,EXP}$. Para obtenção de $k_{2,EXP}$, será dada quando $[NaCl]=5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e com isso, $k_{obs}=k_{2,EXP} [HIS]$, ou seja, $k_{2,EXP}$ poderá ser dada através da equação 4.1.2.3 descrita. Na Tabela 4.1.2.3, são demonstrados todos os resultados obtidos dos espectros linearizados, com evolução temporal, demonstrando todos os valores de k_{obs} encontrados, e conseqüentemente, os valores de energia livre de ativação tanto do processo de hidrólise quanto para o processo de substituição de Cl^- por HIS . A Figura 4.1.2.3 traz os resultados de $\ln(A/A_0)$ versus tempo usada para montar a Tabela 4.1.2.3.

Figura 4.1.2.3. Ajuste linear para os logaritmos das absorções monitoradas no tempo, para cada mistura reacional demonstrada em cada gráfico.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Tabela 4.1.2.3. Resultados experimentais e calculados para o perfil cinético (T=345 K) da reação entre pt01 com H₂O (k₁) e HIS (k₂).

Hidrólise	Ensaio	Ajuste linear	k ₁ ×10 ⁻⁵ / s ⁻¹	⟨k ₁ ⟩×10 ⁻⁵ / s ⁻¹	ΔG ₁ [#] (kcal mol ⁻¹)
	1	ln(A/A ₀)=-2,98×10 ⁻³ -5,9×10 ⁻⁵ t (N=5, R=0,99, σ=0,000005)	5,9	(6,2±0,4)	26,94
	2	ln(A/A ₀)=-2,45×10 ⁻² -6,5×10 ⁻⁵ t (N=5, R=0,99, σ=0,000006)	6,5		
		B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d)			23,25
		L1: CAM-B3LYP/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//			24,59
		L2: LC-ωPBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//			25,54
Cl ⁻ /HIS	Ensaio	Ajuste linear	k _{obs,2} ×10 ⁻⁵ / s ⁻¹	⟨k ₂ ⟩×10 ⁻² / M ⁻¹ s ⁻¹	ΔG ₂ [#] (kcal mol ⁻¹)
	1	ln(A/A ₀)=1,87×10 ⁻¹ +7,6 x 10 ⁻⁵ t (N=12, R=0,98, σ=0,000005)	7,6	52,8	20,73
	2	ln(A/A ₀)=1,66×10 ⁻¹ +7,2 x 10 ⁻⁵ t (N=12, R=0,98, σ=0,000005)	7,2		
			(7,4±0,3)		
		B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d)			ε: 20,30 [δ: 20,45]
		L1: CAM-B3LYP/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//			ε: 20,71 [δ: 20,86]
		L2: LC-ωPBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//			ε: 20,74 [δ: 20,23]

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Como é possível de se observar, na Tabela 4.1.2.3, são apontados os valores para as constantes de velocidade, que de posse do formalismo de Eyring, foi possível de se obter as energias de barreira nos valores de 26,94 e 20,73 kcal mol⁻¹, para hidrólise e ataque de HIS, respectivamente.

Estes resultados que foram os padrões de comparação teórica para correção energética com outros funcionais adotados, utilizando incrementos de funções difusas e polarizadas. Quando adotados as correções energéticas, o valor da barreira consegue

passar de 23,25 para 25,54 kcal mol⁻¹ para a hidrólise, estando em comum acordo com os resultados experimentais errando apenas 1,4 kcal mol⁻¹, correspondente a 5,0 % de erro.

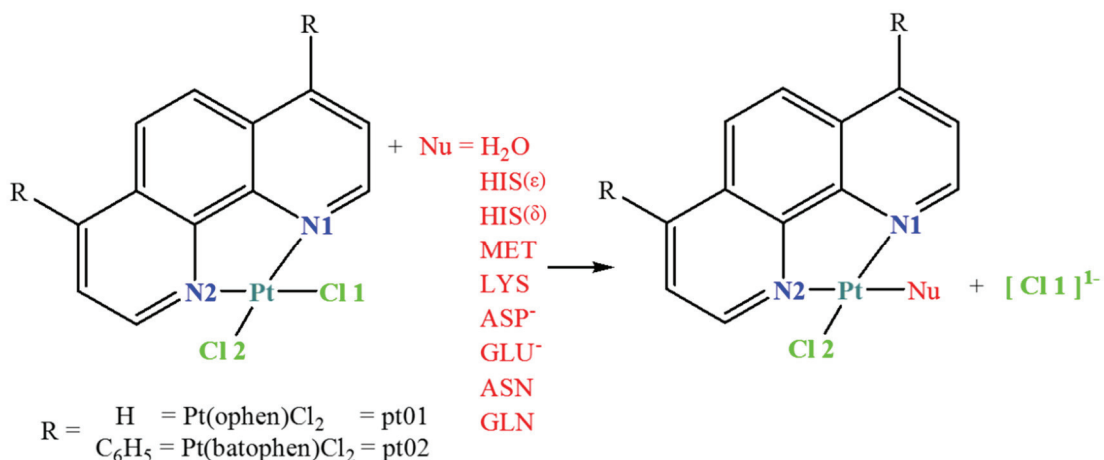
Já para o valor da constante $k_{2,TEO}$, os valores calculados em ambas as bases escolhidas, e utilizando tanto o funcional híbrido B3LYP, quanto os funcionais de CAM-B3LYP e LC- ω PBE, os resultados serão HIS(ϵ) : 20,30, 20,71 e 20,74 kcal mol⁻¹, respectivamente, e para HIS(δ): 20,45, 20,86 e 20,23 kcal mol⁻¹, respectivamente. Ou seja, conforme era previsto, como as formas zwitteriônicas foram consideradas nos cálculos e no experimento (HIS, $pK_a = 6,10$), teremos predominância da espécie HIS(ϵ), haja vista tamanha concordância de exatidão nos resultados obtidos, onde o erro foi de apenas 0,1 kcal mol⁻¹, correspondendo a 0,5 % na barreira calculada.

Com o protocolo de simulação validado, o qual demonstrou que o efeito da base é muito mais pronunciável quando comparado com o funcional de longo alcance, a mesma foi mantida para os demais cálculos de barreiras juntamente com o funcional LC- ω PBE, onde o objetivo foi traçar o perfil de estabilidade e reatividade para todos os potenciais AA que constituem a estrutura das espécies A β .

4.2. ANÁLISE DA REATIVIDADE E DA ESTABILIDADE DOS AA

Com os valores teóricos para as barreiras de troca de cloreto por H₂O e HIS devidamente validadas com experimento, o mesmo protocolo de simulação foi utilizado para obter todas as reações, ilustradas conforme a Figura 4.2.1. É necessário ressaltar novamente que todos os AA estudados foram baseados na estrutura das espécies A β .

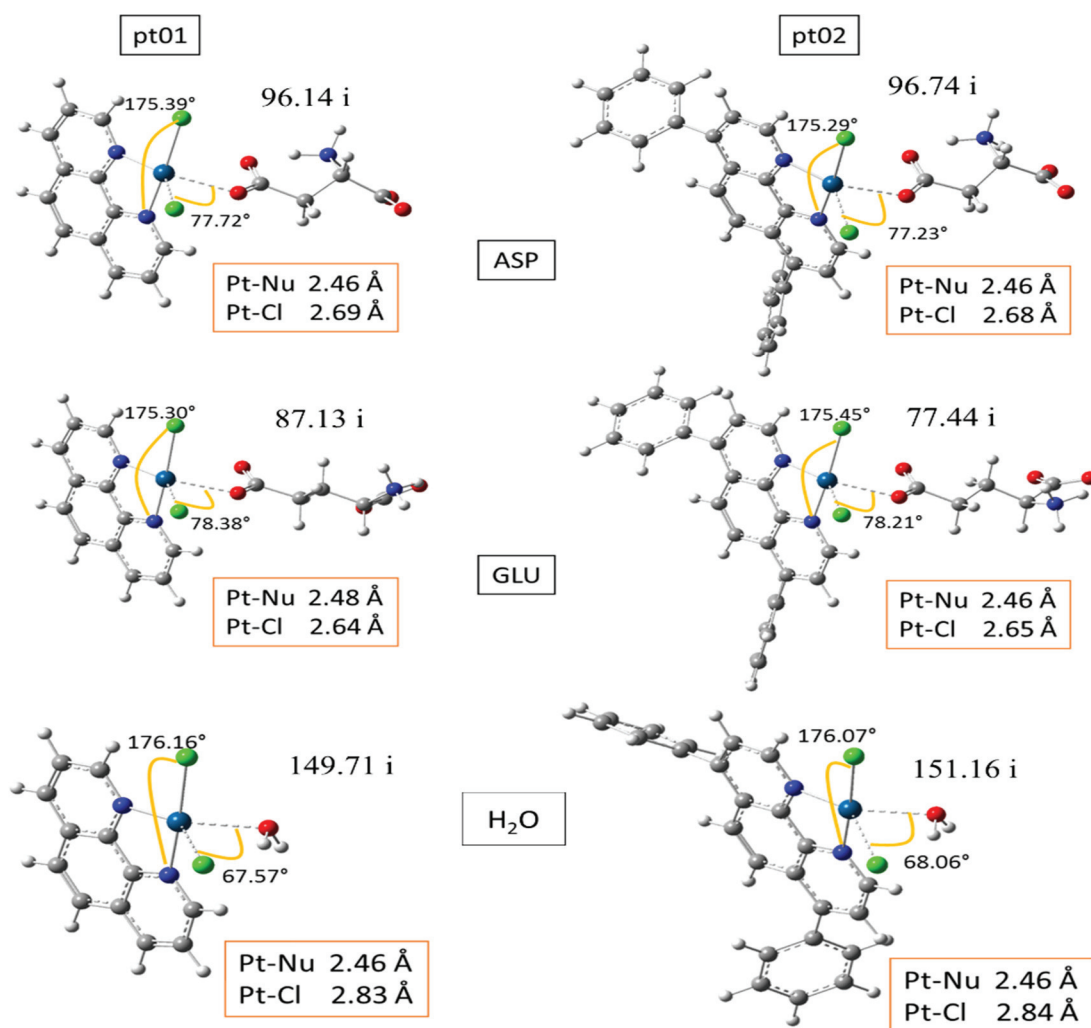
Figura 4.2.1. Esquema de reações estudadas para verificação de reatividade e estabilidade.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Em todas as reações, foram propostas etapas de troca do tipo Cl⁻/Nu passando por um estado de transição TS, conforme é ilustrado nas Figuras 4.2.2-4, para serem posteriormente caracterizadas as estruturas geradas, com a confirmação de apenas uma frequência imaginária. Como resultado já relatado na literatura, para o ângulo formado da orientação de entrada ∠Nu-Pt-Cl teremos valores muito variáveis, que irão se fixar de acordo com o tamanho do grupo adjacente caracterizando-se como volumoso, ou não. De forma clara, isso é possível de destacar na Figura 4.2.2, onde teremos as trocas de cloreto por Nu oxigenados. Para os resíduos de ASP e GLU teremos ângulos entre 77-78°, enquanto para a entrada de água, teremos a redução de 10 unidades desta medida, variando entre 67-68°. Estas considerações são as mesmas independente se o complexo possui menor (pt01) ou maior volume (pt02).

Figura 4.2.2. Estado de transição para Nu oxigenados.

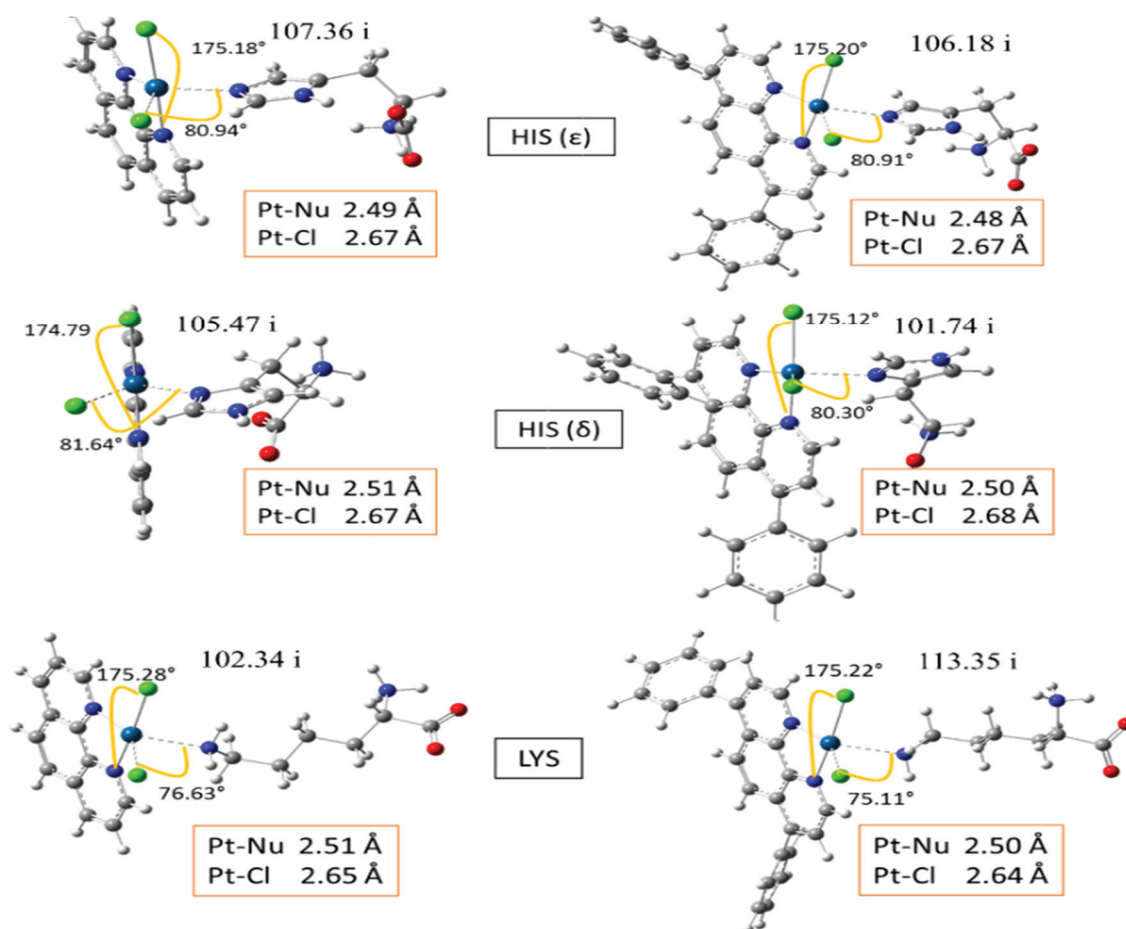


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Observando o perfil dos TS, percebemos que os maiores valores de \angle Nu-Pt-Cl serão dados pela entrada de MET (aprox. 81°), em seguida, teremos valores semelhantes e intermediários entre HIS, LYS, ASP e GLU (aprox. 78°), e por fim teremos os menores valores dados pela entrada de H₂O, ASN e GLN (aprox. 69°), (ver Figuras 4.2.2-4). Observando o perfil das distâncias encontradas para cada TS, é possível notar que todas as distâncias Pt-Nu estão em aproximadamente 2,5 Å, exceto para o estado de transição formado com a MET que possui um valor de 2,7 Å, destoante dos demais. E, por fim, todas as distâncias Pt-Cl para todas estruturas agrupam-se em aproximadamente 2,7Å, em contrapartida, para os resíduos ASN, GLN e H₂O teremos em média o valor 2,9 Å.

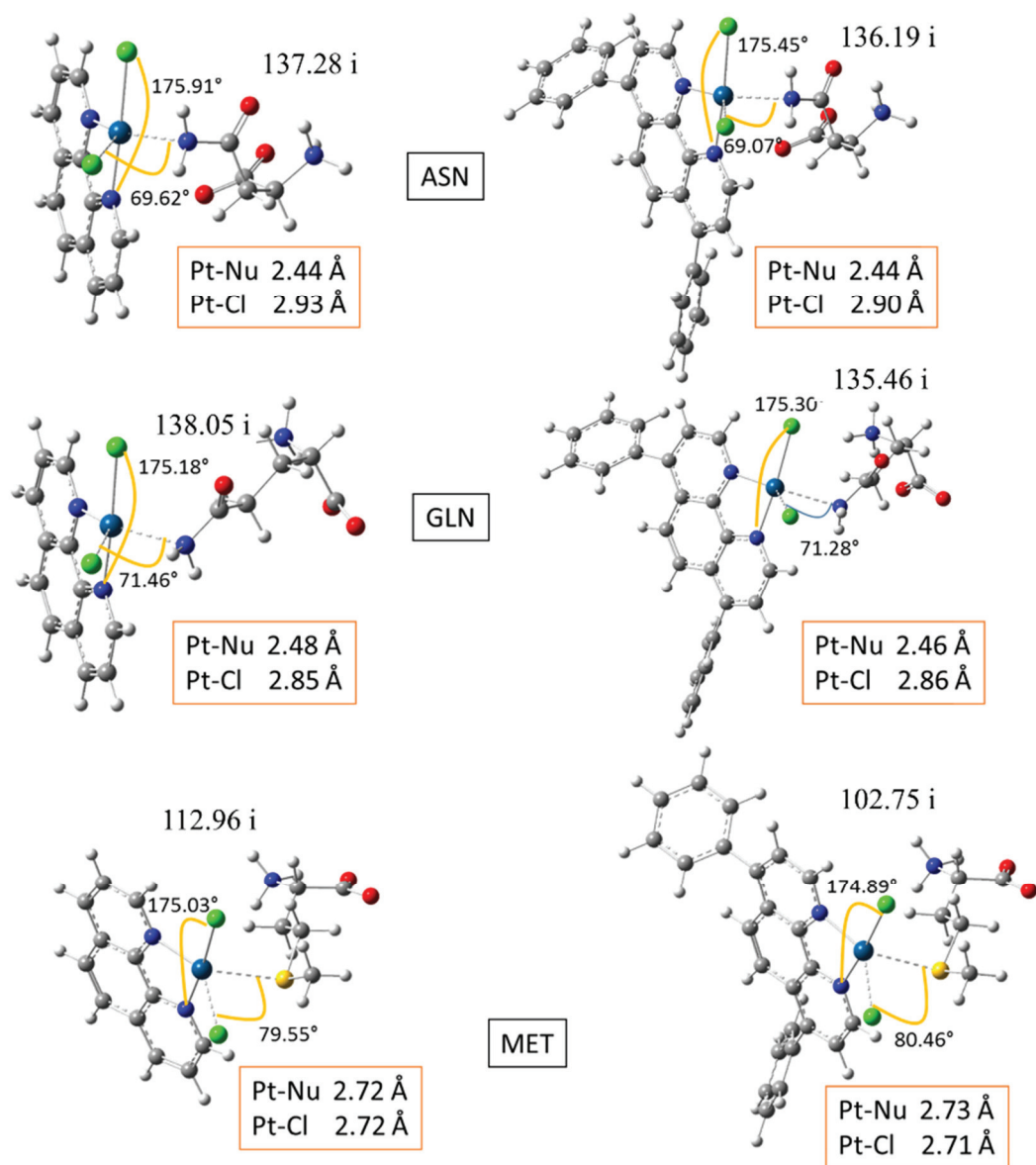
Esta pequena variação na distância pode a primeira impressão aparentar irrelevante, mas o alto valor do ângulo $\angle \text{Nu-Pt-Cl}$ e da distância Pt-Nu implicarão diferentes conclusões nas barreiras reacionais. Para verificação destas considerações, é necessário observar a Tabela 4.2.1. Todos resultados de distâncias encontrados para as espécies intermediárias e estados de transição, encontram-se nas Figuras 4.2.5a para os complexos envolvendo pt01, e em 4.2.5b, para pt02.

Figura 4.2.3. Estados de transição para HIS, em ambas formas tautoméricas e para LYS.



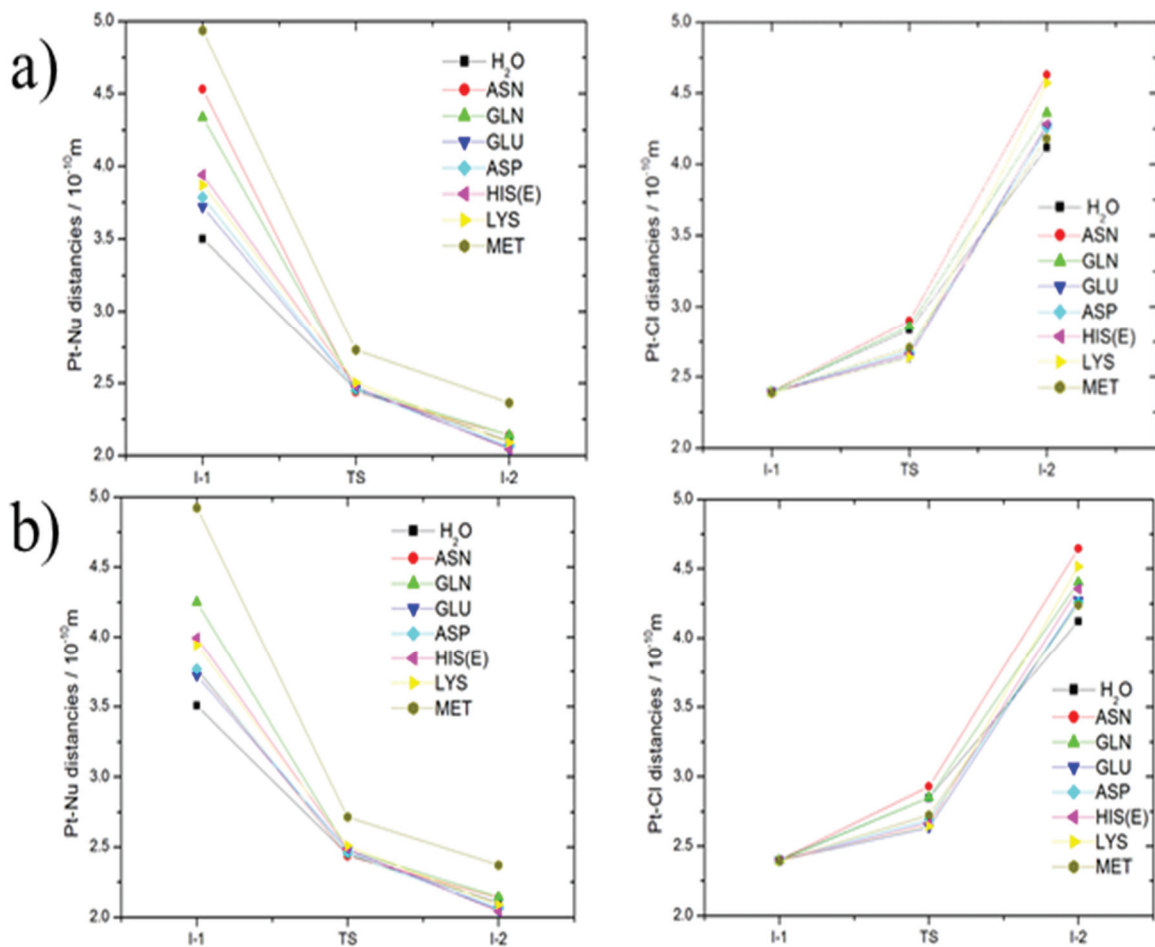
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 4.2.4. Estados de transição para ataques de ASN, GLN e MET.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 4.2.5. Distâncias mapeadas na esfera de coordenação para todas as estruturas obtidas.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Tabela 4.2.1. Cálculos de propriedades cinéticas e termodinâmicas a 298,15 K das reações entre complexos com cada AA utilizando o nível LC- ω PBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//, em meio aquoso utilizando aproximação IEFPCM ($\epsilon=78,4$).

Complexos	AA	ΔH^\ddagger kcal mol ⁻¹	ΔG^\ddagger kcal mol ⁻¹	k / s ⁻¹	ΔH_R kcal mol ⁻¹	ΔG_R kcal mol ⁻¹
pt01	MET	17,115	17,986	4,1x10 ⁻¹	-2,150	-2774
	LYS	15,367	18,110	3,3x10 ⁻¹	-10,965	-8,915
	HIS(δ)	16,941	18,683	1,3x10 ⁻¹	-9,694	-8,511
	HIS(ϵ)	17,001	20,153	1,1x10 ⁻²	-9,952	-7,706
	GLU	16,967	20,176	1,0x10 ⁻²	-7,532	-7,274
	ASP	20,124	20,438	6,5x10 ⁻³	-1,374	-3,157
	H ₂ O	23,330	25,290	1,8x10 ⁻⁶	4,089	4,855
	ASN	28,637	30,107	5,3x10 ⁻¹⁰	12,828	15,022
pt02	GLN	26,403	31,445	5,5x10 ⁻¹¹	8,839	12,263
	MET	17,251	18,122	3,2x10 ⁻¹	-2,129	-2,753
	LYS	15,408	18,152	3,1x10 ⁻¹	-11,1384	-9,089
	HIS(δ)	17,210	18,952	7,9x10 ⁻²	-10,637	-9,454
	HIS(ϵ)	16,961	20,113	1,1x10 ⁻²	-9,886	-7,640
	GLU	16,920	20,129	1,1x10 ⁻²	-7,500	-7,242
	ASP	20,137	20,451	6,3x10 ⁻³	-1,461	-3,245
	H ₂ O	25,070	25,573	2,6x10 ⁻⁶	3,807	4,073
ASN	28,581	30,050	5,8x10 ⁻¹⁰	12,599	14,793	
GLN	26,407	31,449	5,5x10 ⁻¹¹	9,954	13,378	

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Conforme foi relatado, para cada grupo de ângulos e distâncias que puderam ser agrupados, e foram obtidas considerações nos cálculos de barreira de forma muito interessante. Estes resultados estão dispostos na Tabela 4.2.1, onde vale ressaltar os valores obtidos para as barreiras encontradas para MET.

Para ambos complexos em que MET é o nucleófilo, notamos que a barreira é menor comparada as demais espécies (pt01: 17,9; pt02: 18,1 kcal mol⁻¹), enquanto nos resíduos LYS, HIS, GLU e ASP, os valores se encontram entre 18,1 – 20,4 kcal mol⁻¹, intervalo este que não é repetido quando as reações envolvem H₂O, ASN e GLN, pois há um reajuste mínimo de 5 kcal mol⁻¹ em relação a barreira do resíduo de ASP (25,5 – 31,2 kcal mol⁻¹), e com isso, estes valores se tornaram expressivamente maiores de modo a diminuir consideravelmente a constante de velocidade. Logo, para a apuração da reatividade é possível propor a ordem MET>LYS>HIS>GLU>ASP>H₂O>ASN>GLN, ou seja, da mesma sequência em que se encontram as colunas da Tabela 4.2.3, observando de cima para baixo.

Em termos de estabilidade, existe a preferência por estabilidade nos resíduos de LYS (pt01: -8,915; pt02: -9,089 kcal mol⁻¹) e HIS [pt01: (δ -8,511), (ϵ -7,706); pt02: (δ -9,454), (ϵ -7,640) kcal mol⁻¹] em comparação ao resíduo de MET (pt01: -2,774; pt02: -2,753 kcal mol⁻¹). Com isso, já é possível assumir que o sítio de MET35 não é preferencialmente alvejado, conforme é especulado na literatura (BARNHAM, 2008).

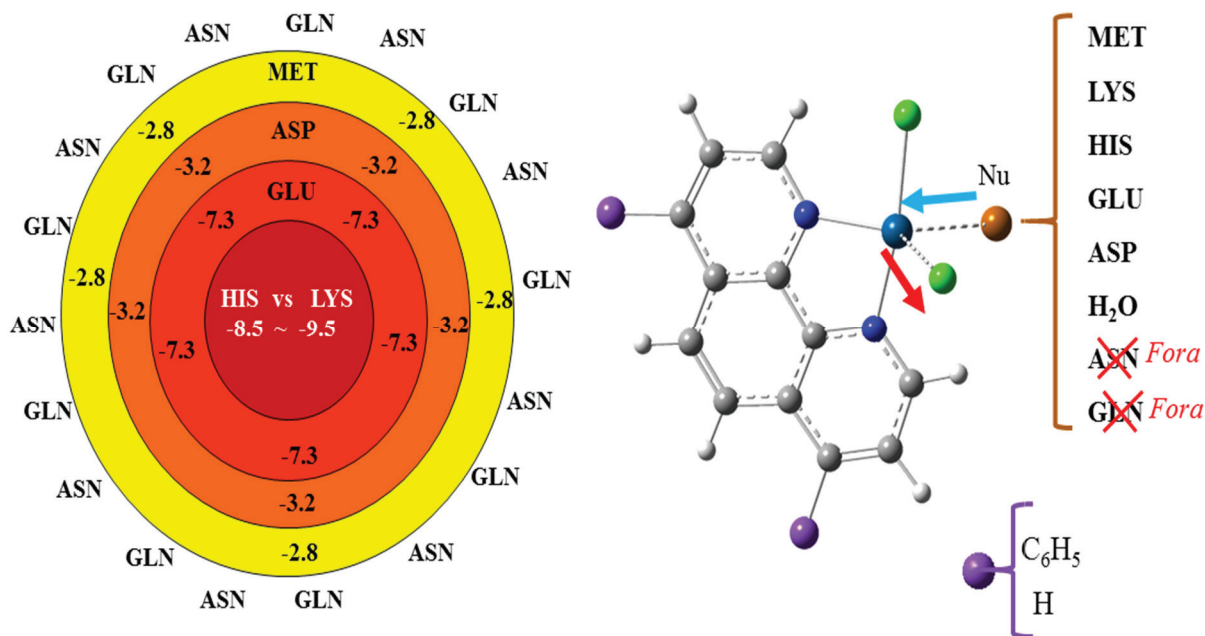
Reagrupando as constantes de velocidade, em unidades de 10⁻¹ s⁻¹, teremos os valores por ordem decrescente com MET (3,2 – 4,1), LYS (3,1 – 3,3), HIS(δ : 0,8 – 1,3) e HIS(ϵ : 0,1 – 0,1) podemos destacar conforme esperado pelo princípio de Person, a MET demonstrou ser mais cineticamente favorável, em seguida LYS, e posteriormente HIS.

Os ataques mais exoérgicos são para os resíduos de LYS, HIS e GLU são tão negativos que os demais resíduos, que se fosse possível idealizar um “alvo molecular” o qual seria o próprio A β (1-42), e se pudéssemos lançar “dardos de platina”, com certo grau de precisão e exatidão, acertaríamos no meio do peptídeo, entre os sítios HIS13 – HIS14 – GLU15 – LYS16, conforme é possível esquematizar no diagrama apontado na Figura 4.2.6.

Também poderíamos perceber que quase nunca os resíduos de MET seriam alvejados, pois estariam nas bordas do alvo, seguido dos resíduos de ASP. E, como era de se esperar, para ASN e GLN nunca serão acertados, em contraste, H₂O só irá conseguir

acertar o alvo devido a quantidade excessiva possível de ser encontrada em sistemas biológicos. Ou seja, por mero ganho em prevalência de quantidade, a molécula de água fará seu ataque nos complexos.

Figura 4.2.6. Montagem de um alvo para análise de preferência de AA- Aβ.



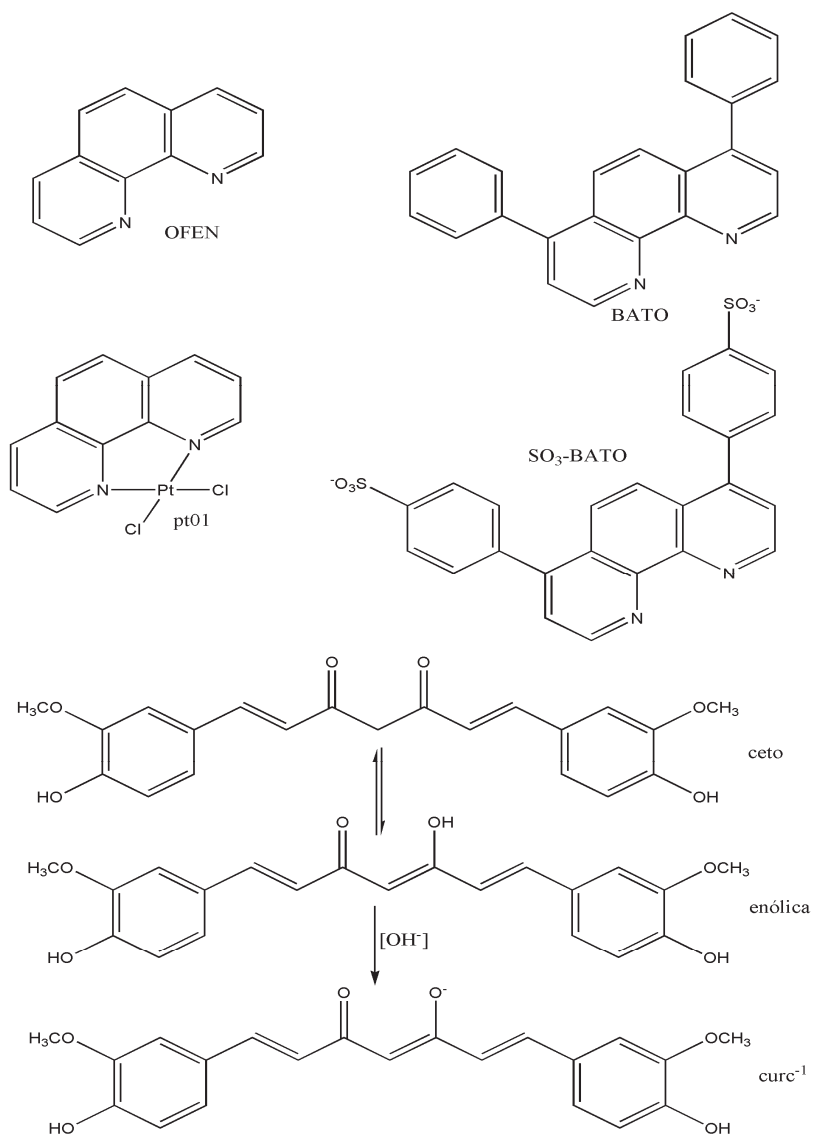
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.3. MODELAGEM MOLECULAR DE AGREGADOS COM SUBSTRATOS

Nesta fase, os resultados foram obtidos utilizando modificações em ligantes orgânicos, derivados de fenantrolina (OFEN), batofenantrolina (BAT), curcumina (CUR) com isômeros tautoméricos, e pt01 (ver Figura 1), seguindo de docagem no centroide do sistema de 9 peptídeos (9PEP) com a função de *scoring* CHEMSCORE, para posterior análise de trajetória por 100,0 ns, utilizando aproximadamente 6000 moléculas de H₂O como solvente explícito. No entanto, como o campo de força AMBER não possui parâmetros para as ligações Pt-Cl e Pt-N, e tão pouco os parâmetros para ângulos ∠N-Pt-Cl, ∠N-Pt-N e ∠Cl-Pt-Cl, foi necessário parametrizar e validar o sistema pt01, para depois simular com os modelos de agregados maiores. O objetivo desta etapa foi descrever como ocorrem as interações do receptor pelo ligante quando os mesmos forem submetidos as

porções hidrofóbicas do peptídeo, ou seja, quando os compostos atacarem o meio do modelo.

Figura 4.3.1. Compostos que foram utilizados na etapa de *docking molecular*, e posteriormente simulados por 100,0 ns.

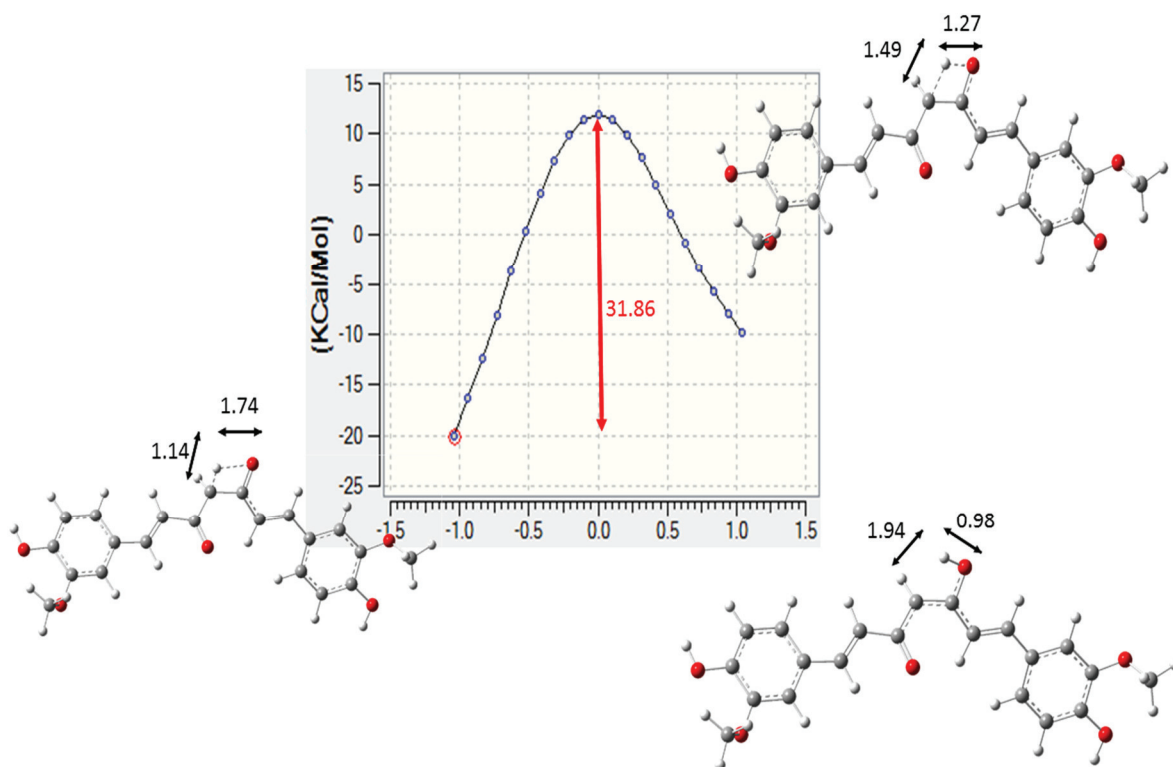


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.3.1. Detalhes dos modelos de curcumina (CUR)

Nos sistemas de estruturas ceto-enólico de CUR ($pK_{a,1}=7,8$), ambas em carácter neutro são possivelmente encontradas em pH fisiológico. Para verificação da influência da estabilidade frente ao arranjo inicial considerado, foi proposto um estado de transição que conecta a modificação entre as formas ceto e enólicas de CUR, utilizando a mesma metodologia quântica já mencionada, sendo encontrado valor de $31,86 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a barreira de desprotonação da forma cetônica para a forma enólica, repercutindo em constante de velocidade calculada $2,74 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, e analisando a termodinâmica do processo, a estrutura ceto é mais estável 10 kcal mol^{-1} em comparação com a estrutura enólica (ver Figura 4.3.1.1). Para efeito de análise exploratória, ambas moléculas foram adotadas para docagem e submetidas à DM, e também incluído a primeira estrutura desprotonada de CUR, definida por cur^{-1} .

Figura 4.3.1.1. Comparação energética na preferência de estado entre as estruturas de CUR com tautomerismo ceto-enólico, destacando as distâncias obtidas entre a passagem do próton do carbono beta para a carbonila adjacente.



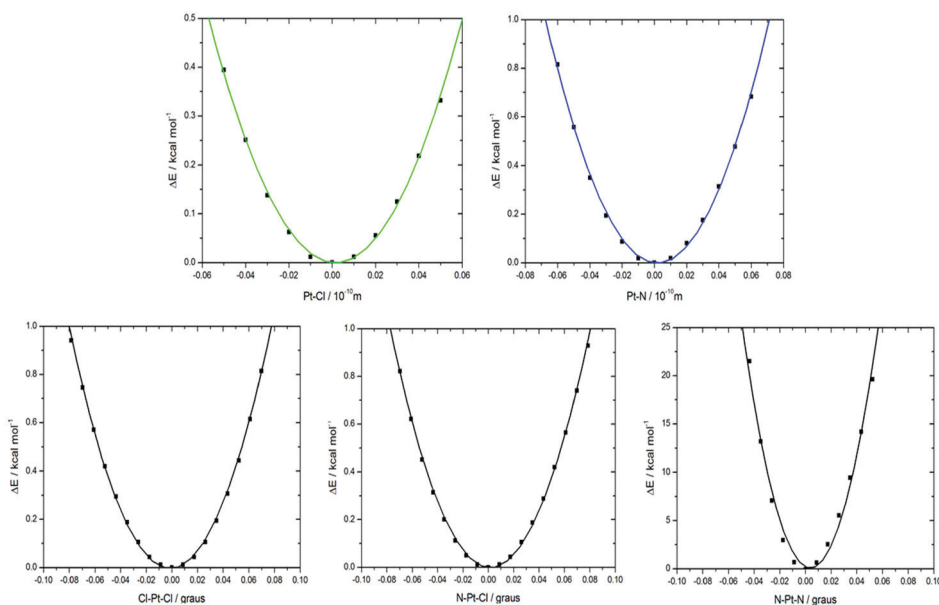
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.3.2. Detalhes na parametrização de pt01

Conforme descrito, o objetivo de obter os parâmetros para pt01 é poder simular o comportamento deste complexo quanto se depara com um agregado do tipo A β . Para isso, utilizando a mesma metodologia quântica descrita, foi realizado um cálculo de *scan* para as distâncias Pt-N, Pt-Cl, e para os ângulos \angle N-Pt-Cl e \angle Cl-Pt-Cl.

As curvas de energia potencial foram obtidas por leves variações positivas e negativas em torno da região de equilíbrio apontada pelos cálculos de otimização de geometria. As parábolas foram centralizadas no marco zero do eixo das abcissas para que a curvatura possa ser definida como a constante de equilíbrio de um oscilador harmônico. Os cálculos foram considerados de forma rígida, onde os cálculos de distâncias contiveram 6 pontos com fator de escala 0,01 Å para cada direção, e para os ângulos totalizam 9 pontos com fator de 0,05°. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 4.3.2.1, e as constantes de equilíbrio calculadas se encontram na Tabela 4.3.2.1. Este ajuste metodológico foi semelhante a parametrização adotada por Marcial e colaboradores (MARCIAL, 2012), onde foi parametrizado a esfera de coordenação em torno de um átomo de zinco metálico.

Figura 4.3.2.1. Parametrizações da esfera de coordenação de pt01.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Tabela 4.3.2.1. Constantes de equilíbrio obtidas dos cálculos de scan a serem utilizadas na simulação de pt01, em meio aquoso utilizando aproximação IEFPCM ($\epsilon=78,4$).

<i>Parâmetro</i>	$d_{eq} / \text{Å}$	$\frac{keq}{2} / kcal\ mol^{-1}$ Å^{-2}	<i>R</i>
<i>Pt-Cl</i>	2,391	73,20	0,998
<i>Pt-N</i>	2,025	104,09	0,998

<i>Parâmetro</i>	d_{eq} / graus	$\frac{keq}{2} / kcal\ mol^{-1}$ rad^{-2}	<i>R</i>
$\angle Cl-Pt-Cl$	90,26	80,46	0,998
$\angle N-Pt-Cl$	94,51	80,18	0,999
$\angle N-Pt-N$	80,70	4440,35	0,972

Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O que pode ser notado de imediato é o tamanho da constante para deformação do ângulo $\angle N-Pt-N$, o valor da constante é demonstrado tão alto, que alterar este ângulo se faz necessário desestabilizar a otimização de um quelato, fato este que também pode ser notado para a constante de estiramento Pt-N com valor 30% mais expressivo que a constante para Pt-Cl.

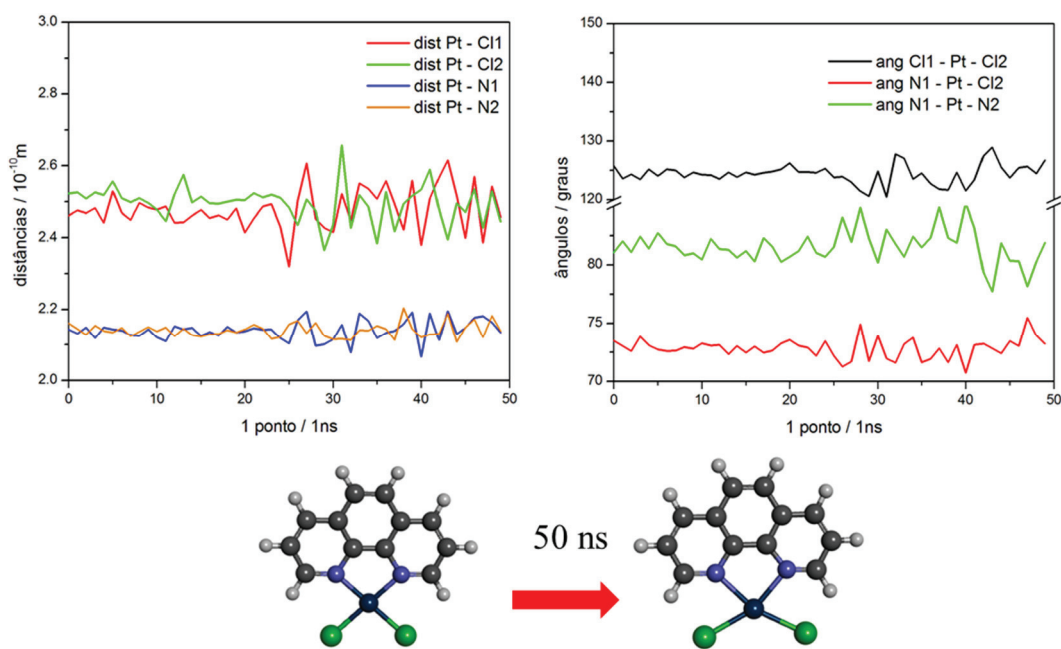
Com os parâmetros calculados, um teste inicial de validação do modelo pt01 foi dado com 50,0 ns em temperatura de 300 K, em meio de 500 moléculas de H₂O, salvando 1 estrutura para cada 1 ns. Os termos de Lennard – Jones para o átomo de platina foram 3,6590 e 1,0550 para σ e ϵ , respectivamente, conforme a literatura recomenda (LOPES, 2010).

Durante toda a DM, as distâncias Pt-N são mantidas constantes em torno de 2,15 Å e para Pt-Cl em aproximadamente 2,49 Å, o acorda com os dados de difração de raio-

X (ver Tabela 4.1.1), tanto com os resultados cristalográficos (Pt-N: 2,01; Pt-Cl: 2,29), quanto nos resultados encontrados na otimização de geometria em meio dielétrico (Pt-N: 2,02; Pt-Cl: 2,39).

Para os ângulos, as considerações não são semelhantes, pois foi evidenciado o efeito do solvente explícito durante toda a trajetória, haja vista mudança de 25% nos valores antes otimizados, onde pt01 permanece durante toda simulação com valores de $\angle\text{Cl-Pt-Cl}$ obtusos em aproximadamente $124,72^\circ$, e os valores de $\angle\text{N-Pt-Cl}$ tendem a valores agudos ($73,11^\circ$), ou seja, as moléculas de água interagem com os ligantes cloretos ampliando a movimentação tesoura $\angle\text{Cl-Pt-Cl}$, e como não foi intencionado fixar as distâncias Cl-Cl da esfera de coordenação, as movimentações tiveram o máximo de graus de liberdade possíveis. Todas estas considerações podem ser resumidas observando a Figura 4.3.2.2.

Figura 4.3.2.2. Validação das distâncias obtidas do modelo pt01 em solvente explícito.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

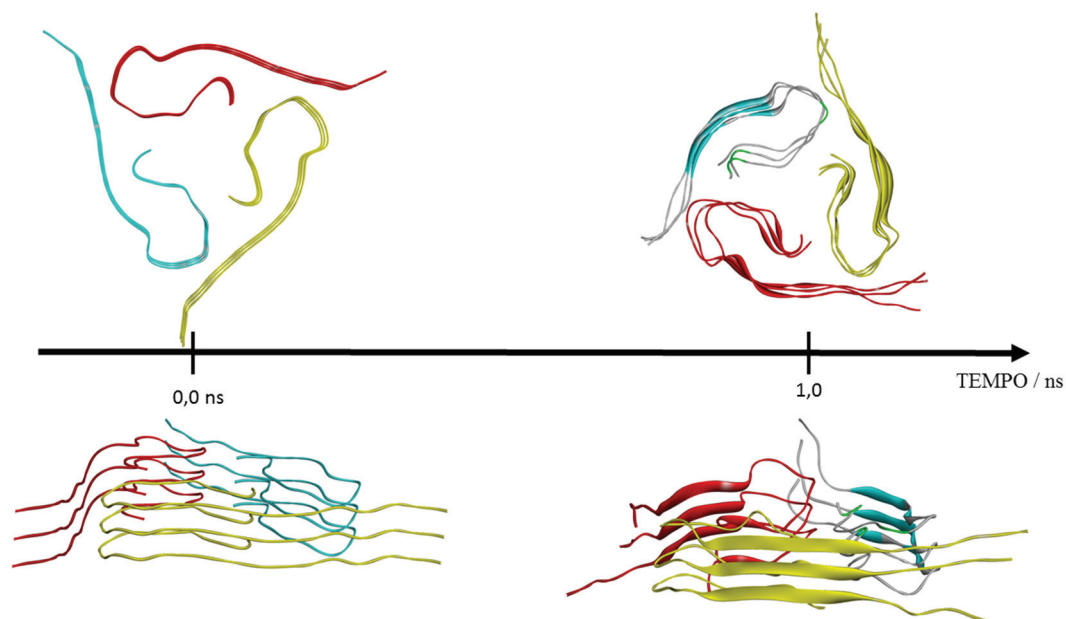
4.4. MODELO AGREGADO 9PEP ISOLADO

No ato da simulação de sistemas grandes, tais como macro proteínas em formato dimérico ou em trímeros, as interações de hidrogênio e dipolares devem ser muito bem representadas desde o início da escolha da proposta estrutural, pois qualquer mudança brusca de geometria pode desencadear uma série de interpretações equivocadas, se o sistema não estiver totalmente relaxado durante um extenso tempo de produção.

Em contrapartida, é necessário adotar um protocolo de simulação padrão para ser empregado para todas as estruturas, e neste deve conter não só o tempo mínimo de simulação de modo que haja convergência para os valores de RMS, mas também deve ser representativo em termos de possíveis estruturas encontradas ao longo da simulação. Portanto, as considerações para simulação de DM foram baseadas em trabalhos já propostos pelo grupo, onde o fator de integração de 2,0 fs escolhido de forma proposital para se utilizar o algoritmo de SHAKE, onde novas considerações propuseram uma nova forma de simular estes tipos de sistemas (DE SOUSA, 2012).

O código pdb adotado para avaliação da estabilidade destes possíveis inibidores de agregação foi 2M4J, modelo constituído de 9 fitas peptídicas, denominado de 9PEP conforme já pronunciado, no qual suas posições são semelhantes ao formato de um triângulo, onde cada três fitas estão paralelas por três vezes, conforme é demonstrado após 1,0 ns de aquecimento de 5 K até 300 K, conforme ilustra a Figura 4.4.1.

Figura 4.4.1. Estrutura obtida após etapa de aquecimento por 1,0 ns, partindo de 5 K para 300 K, sob a proposta de simulação empregada na tese.

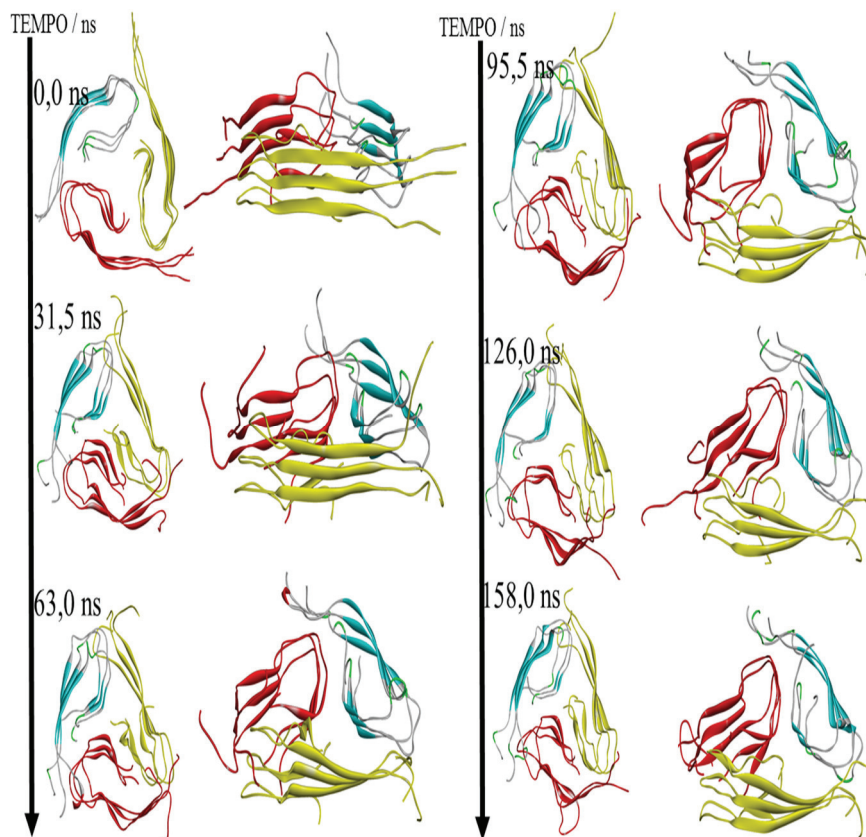


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Para validar o protocolo empregado na DM, foram realizados dois ensaios modelos para estágios de produção, onde um deles foi empregado com longa rampa de aquecimento conforme a literatura recomenda para este tipo de sistema, para somente depois evoluir em 300 K, por 100,0 ns em regime de produção.

A outra proposta de protocolo, ilustrada nas Figuras 4.4.1-2, foi iniciada com mesma estrutura inicial antes utilizada, entretanto o aquecimento inicia em 5 K até 300 K, por 1,0 ns, sem rampa de aquecimento, seguindo de estabilização de temperatura por 100,0 ns em 300 K. Este protocolo que se mostrou proveitoso para as considerações de tempo de computação e simplicidade metodológica, e portanto foi o adotado para análise de resultados.

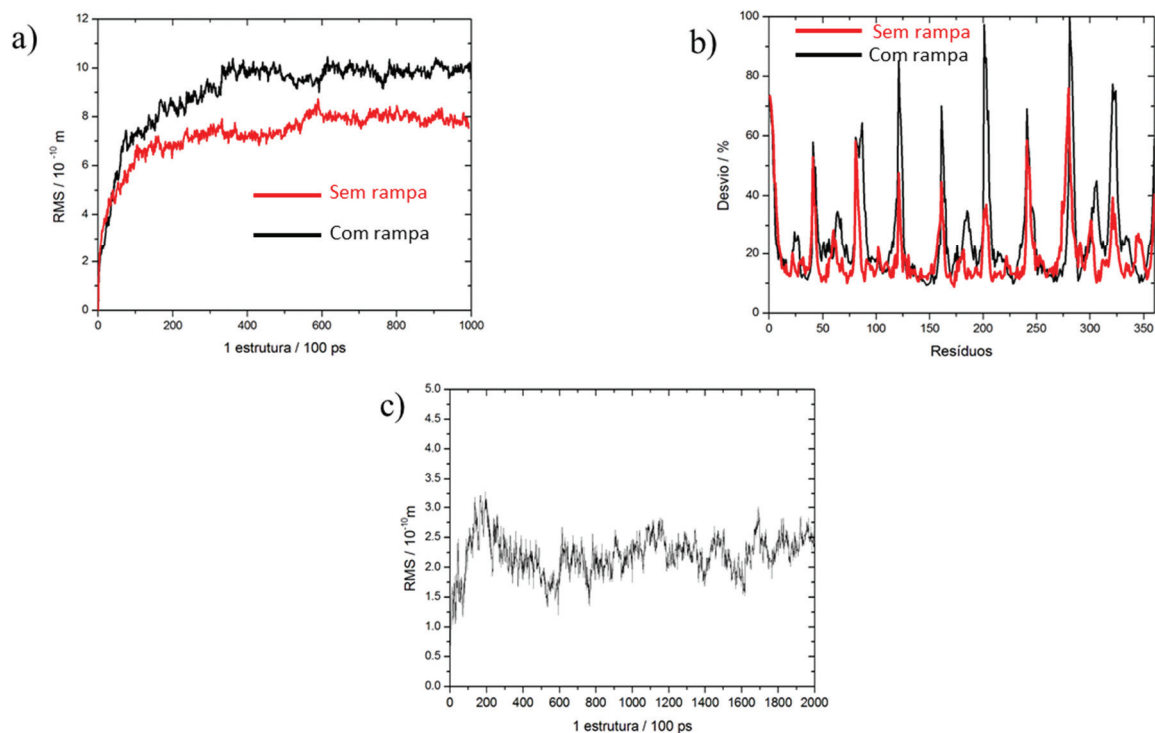
Figura 4.4.2. Imagens da simulação de 9PEP, em H₂O explícitas por 160,0 ns, com perspectiva de 90 graus de uma imagem em relação a outra.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

O monitoramento dos valores de RMS (ver Figura 4.4.3a) foram dados para ambas considerações de modelos adotados, onde foi possível concluir que não há convergência estrutural antes do tempo de simulação ser maior que 60,0 ns, pois antes desta escala temporal, os agregados não convergem para uma geometria de equilíbrio.

Figura 4.4.3. a) Valores de RMS de todos os átomos do sistema. b) Valores de RMF relativos para cada fita peptídica. c) RMS da região central dos peptídeos [TYR10-...-ALA30].



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Observando o perfil de RMS com e sem o emprego de rampa de aquecimento, é possível perceber que o tempo de simulação mínima não é alterado, todavia a não utilização da rampa mostrou-se com desvio menor de aproximadamente $3,0 \text{ \AA}$, em relação a simulação com a rampa. Em termos de tempo computacional, uma trajetória dependente de aquecimento lento será mais custosa comparada a simulação sem sua utilização.

Observando o perfil relativo de RMF na Figura 4.4.3b, foi notado que a movimentação com maior grau de flexibilidade (60 – 100 %) é acometida pelas bordas do peptídeo, e não pela região central, que em detrimento permanece invariante, possuindo flexibilidade de aproximadamente 20%, onde é referenciado rigidez nas mesmas regiões constadas, e por isso, preferência em coordenação metálica (JONES, 2015). Lembrando que para cada 40 resíduos (observados no eixo das abcissas) teremos uma nova fita peptídica, pois o perfil de RMF é facilmente descrito de modo a conter um

pico muito acentuado, indicando que naquele ponto é a extremidade C ou N – terminal do peptídeo.

Para confirmar as hipóteses mencionadas, foi realizado uma simulação com 200,0 ns (ver Figura 4.4.2c), nas mesmas condições, onde apenas a parte central [TYR10-...-ALA30] foi utilizada para analisar os valores de RMS, onde as considerações procedem, e desta forma, o esquema de simulação adotado foi idêntico para os demais sistemas agregados.

4.5. MODELOS AGREGADOS DERIVADOS DE CURCUMINA (CUR)

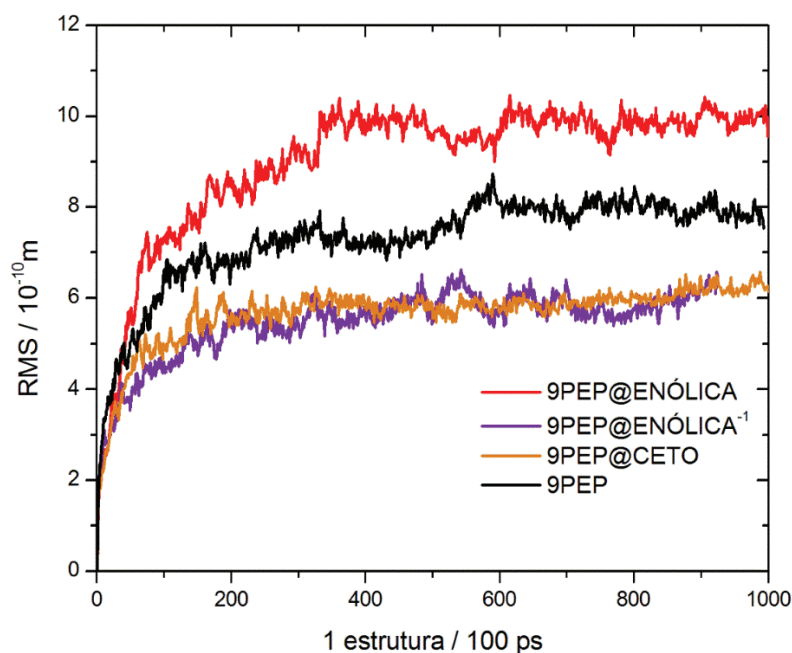
Das poses de CUR, definidas de ceto (estrutura dicetônica), enólica (forma enólica adjacente a uma cetona) e curc^{-1} (forma enólica desprotonada na carbonila central) pudemos realizar a triagem computacional via metodologia de *docking molecular*, onde foram obtidos os valores muito semelhantes de ΔG_{BIND} , -21,94 e -21,06 kcal mol⁻¹ respectivamente para as estruturas enólicas e curc^{-1} , e foi conferido o valor de -17,26 kcal mol⁻¹ para a forma ceto.

A depuração da trajetória através dos valores de RMS tornaram-se fundamentais para nortear acontecimentos ocorrido durante todo percurso de DM. A Figura 4.5.1 evidencia a compactação estrutural por parte dos nove peptídeos estudados. Caso a molécula de curcumina esteja na sua forma 10 kcal mol⁻¹ mais estável (forma ceto) investigada via B3LYP/6-31G(d), os efeitos estruturais serão praticamente irrelevantes, resultados estes comparáveis ao modelo curc^{-1} , pois ambos possuem valores de RMS mais reduzidos análogos aos valores de RMS da estrutura 9PEP isoladamente simulada.

A constatação anterior não é repetida quando evoluímos a molécula no seu formato enólico, em que os valores de RMS se reajustam com mais 3 Å em média, comparados com a compactação inicial do modelo 9PEP. Estes altos desvios foram causados da ligação de hidrogênio de amplitude de 2,5 Å localizada entre o resíduo de SER26 com o oxigênio carbonílico do resíduo de GLU22, onde ambos resíduos estão localizados na segunda fita peptídica do modelo. Este efeito começa a tomar força no período de 75,0 ns (sinalizada pela seta verde, na Figura 4.5.2a), onde cada quintil de simulação foi ilustrado.

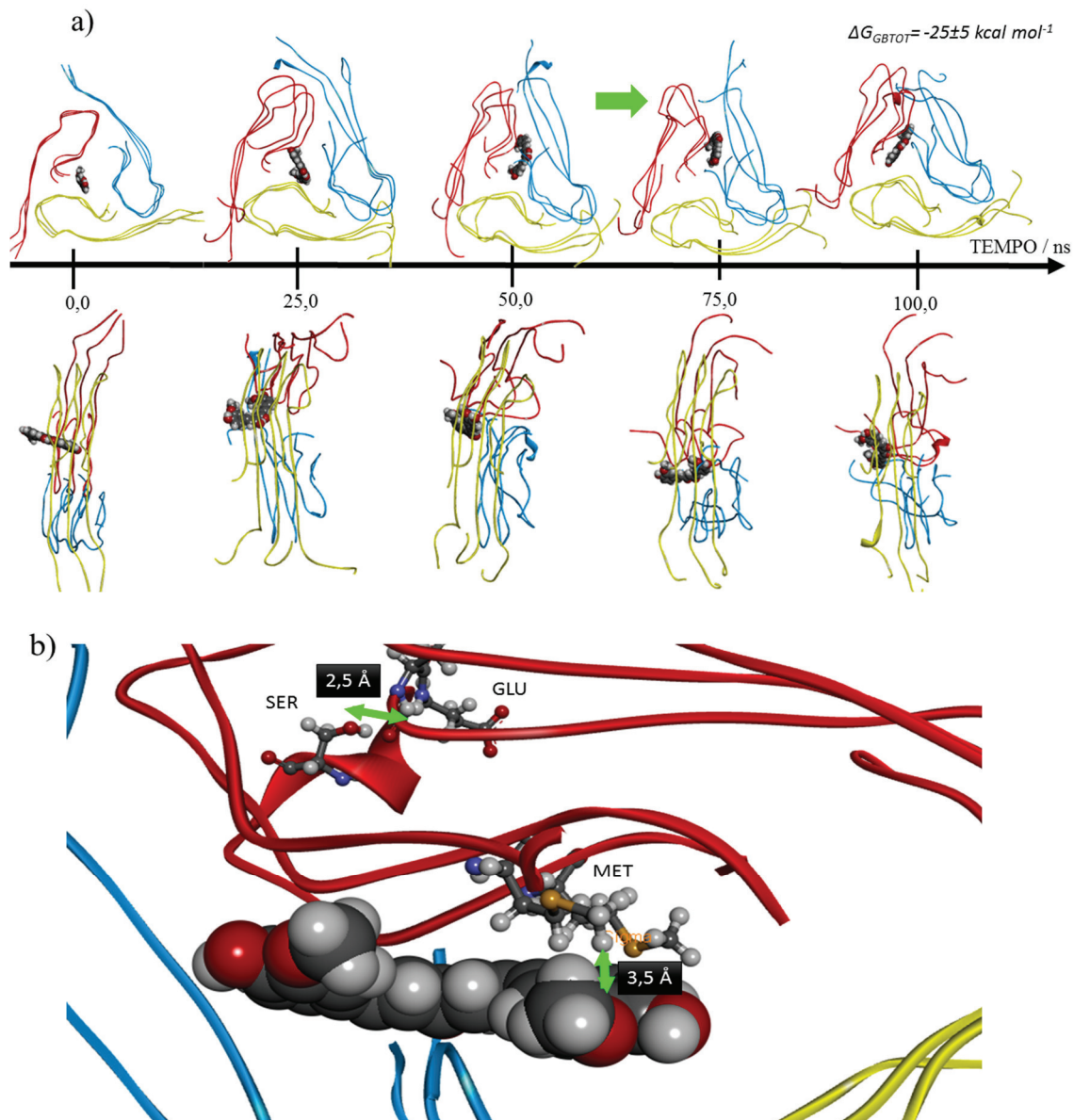
Esta consequência alostérica foi possível pela interação hidrofóbica C-H... π , com alcance médio de 3,5 Å localizada entre o resíduo de MET35 da primeira fita peptídica com um anel aromático da curcumina (enólica) (ver Figura 4.5.2b). Ou seja, apenas a região central, simbolizadas pelas fitas em vermelho originando a segunda, quinta e oitava fitas peptídicas serão fortemente afetadas estruturalmente, facilmente notado pela análise de RMF conforme a Figura 4.5.3.

Figura 4.5.1. Valores de RMS encontrados para os agregados derivados de CUR.



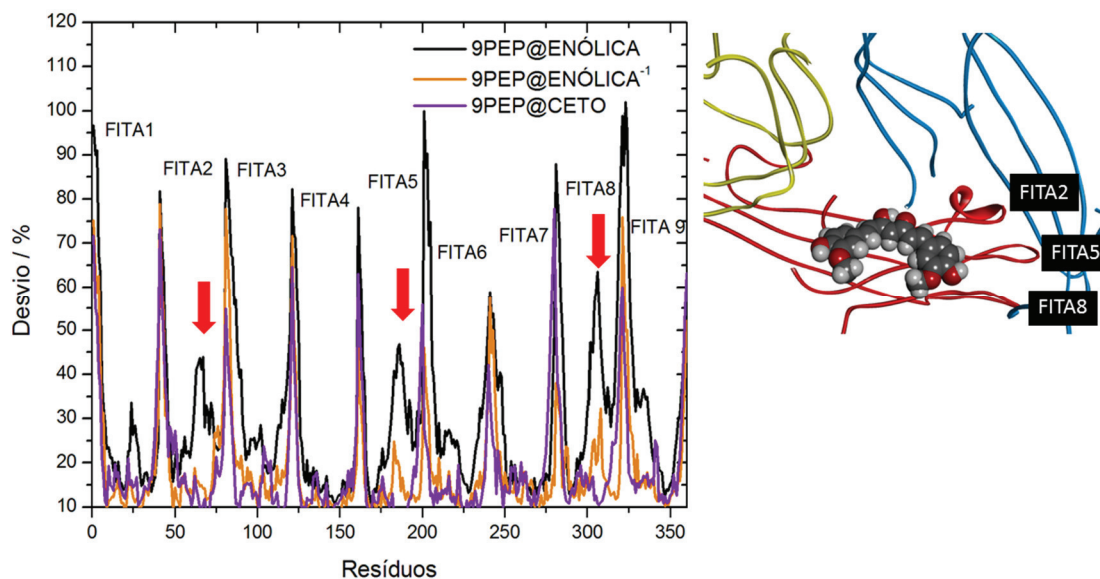
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 4.5.2. a) Quintil das estruturas geradas, evidenciando o efeito alostérico pela seta verde. b) Estrutura ampliada para a última pose de 100,0 ns demonstrando cada interação envolvida.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 4.5.3. Alta motilidade da região hidrofóbica das fitas 2, 5 e 8, devido a inserção da estrutura enólica da curcumina.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Com o diagrama anterior fica evidente que existe uma forte relação da recepção do ligante alocado no centroide da estrutura com a respectiva resposta de flexibilidade da região, pois esta região antes estaria muito compactada, conforme já visto nos desvios apontados na Figura 4.4.3b.

Dos valores mais negativos de ΔG_{GBTOT} , a conformação enólica ($-25 \pm 5 \text{ kcal mol}^{-1}$) apresentou um notório destaque comparada ao formato cetônico ($-13 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$) e aniônico dado por curc^{-1} ($-12 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$), diferenciando-se por aproximadamente 10 kcal mol^{-1} .

Portanto, a contribuição na perturbação intrapeptídica é muito sensível a qualquer tipo de interação supramolecular com ligantes derivados da curcumina em que preferencialmente o ligante de melhor escolha para eventos de desagregação será na forma enólica, bastando uma mudança estrutural da ordem de $3,5 \text{ \AA}$ em uma região puramente hidrofóbica da extremidade do peptídeo para implicar em uma brusca deformação da estrutural inicial. Percebemos estas afirmações com as fitas 2, 5 e 8 com seus maiores desvios nas regiões centrais (45 – 65 %, ver Figura 4.5.3), região esta que antes não passava de 30 – 40 %, quando o modelo 9PEP foi isoladamente simulado.

4.6. MODELOS AGREGADOS DERIVADOS DE FENANTROLINA

Nestes sistemas, os resultados obtidos foram de fundamental importância para entender o mecanismo de interação de ligantes derivados de ofen e complexos metálicos do tipo pt01, quando interagem com o receptor 9PEP na região central. Para tanto, inicialmente os compostos foram triados com *docking* molecular conforme já descrito na secção metodológica, e as estruturas com os menores ΔG_{BIND} (ofen: -23,90; pt01: -21,64; bato: -26,12; SO3_bato: -24,85 kcal mol⁻¹) foram escolhidas para dar início as simulações de DM.

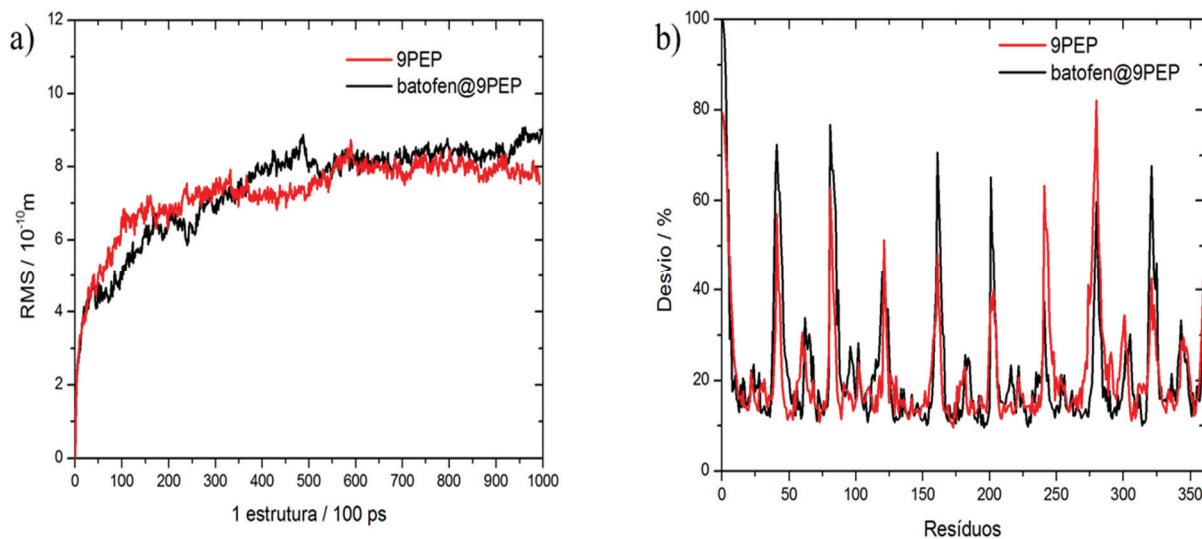
Submetendo os agregados com os ligantes, e após a realização da etapa de produção, percebeu-se que cada estrutura teve um comportamento completamente distinto, portanto, no intuito de apresentar melhor os resultados, o sistema 9PEP@bato e 9PEP@SO3_bato serão apresentados separados dos sistemas 9PEP@ofen e 9PEP@pt01.

4.6.1. Modelos 9PEP@bato e 9PEP@SO3_bato

No sistema envolvendo o ligante batofenantrolina (9PEP@bato), os valores de RMS demonstraram-se muito semelhantes aos obtidos com a estrutura 9PEP isolada, de modo a não ser possível verificar rearranjo estrutural entre elas, conforme trata na Figura 4.6.1.1a, onde apenas um micro efeito alostérico de forma sutil ocorre no período de aproximadamente 25,0 ns, implicando em leve desvios estruturais, mas não o suficiente para deflagrar um notável efeito de descompactação, que seria desejado (ver Figura 4.6.1.1b).

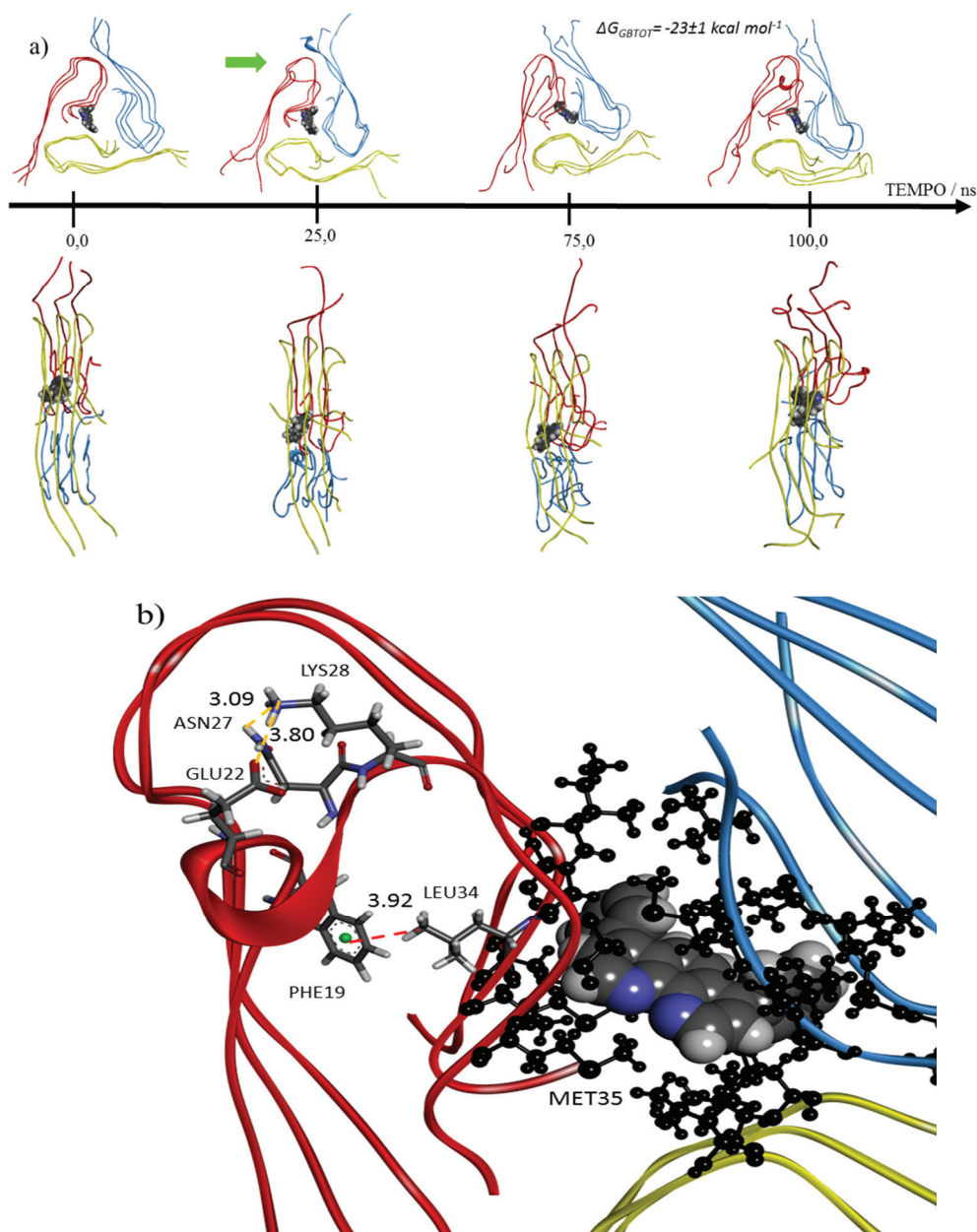
Cada efeito recorrente em um sistema macroestrutural é válido para implicar em desvios de comportamento ideal. O que é facilmente percebido quando na Figura 4.6.1.1a há um declínio do RMS no intervalo de 5,0 ns até aproximadamente 30,0 ns, e como consequência, o sistema tenta se reorganizar de modos que haja o melhor reconhecimento molecular possível após inserção do ligante entre o intervalo de 30,0 ns até 60,0 ns.

Figura 4.6.1.1. a) Monitoramento de RMS entre as estruturas 9PEP e 9PEP@bato. b) Desvios percentuais comparados entre a estrutura 9PEP@bato e isolada.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 4.6.1.2 a) Quartis das estruturas geradas para 9PEP@bato, evidenciando o efeito alostérico pela seta verde. b) Estrutura ampliada para a última pose de 100,0 ns demonstrando cada interação envolvida.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

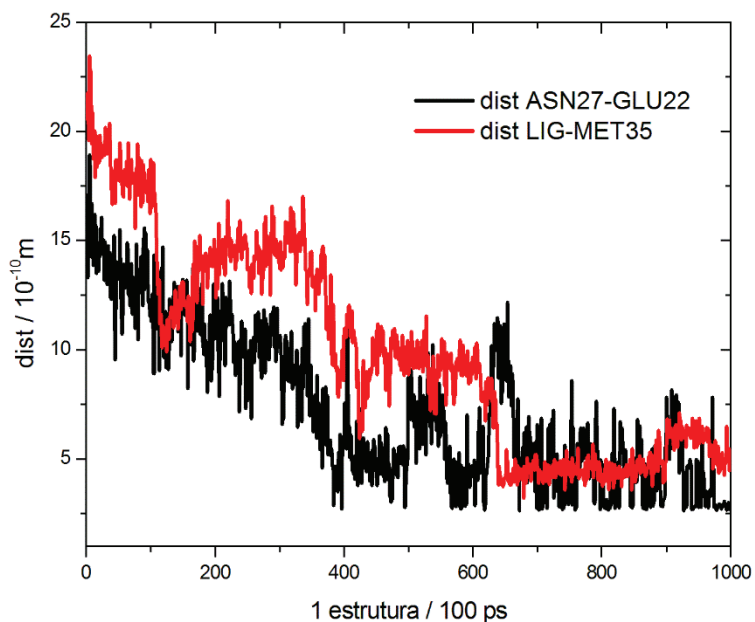
Conforme já mencionado, a forma de recepção do ligante no sítio proporciona um efeito sutil no novo padrão de reconhecimento molecular. Novamente, a MET35 realiza interações do tipo C-H... π com os anéis aromáticos, com distâncias variantes entre 3,0 – 3,5 Å. A medida que esta aproximação ocorre, os sítios GLU22 tende a se aproximar do

resíduo ASN27 (ver Figura 4.6.1.3), e assim uma ligação de hidrogênio de caráter fraco entre 2,5 – 3,0 Å é formada como consequência da proximidade entre os resíduos de PHE19 e LEU34.

Ocorre todo um efeito cascata para agrupar a região central da segunda fita, de maneira que o resíduo de LYS28 realize ligação de hidrogênio simultaneamente com ASN27 e GLU22 para realizar uma espécie de “dobra molecular de ligação de hidrogênio”, resultando em um valor de ΔG_{GBTOT} muito semelhante ao obtido no *docking*, (DM: -23 ± 1 , *docking*: $-26,12 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Embora as regiões das fitas sejam simétricas, algo interessante de ilustrar é a espontaneidade do ligante na região hidrofóbica do agregado, pois conforme as Figuras 4.6.1.2 e 4.6.1.3 apontam, o ligante se encontra 19,5 Å mais perto do resíduo de MET35 ao final da DM, novamente para realização de interações C-H... π .

Figura 4.6.1.3. Monitoramento da distância entre o ligante batofenantrolina e o resíduo MET35, mediando ligação de hidrogênio entre ASN27 e GLU22.



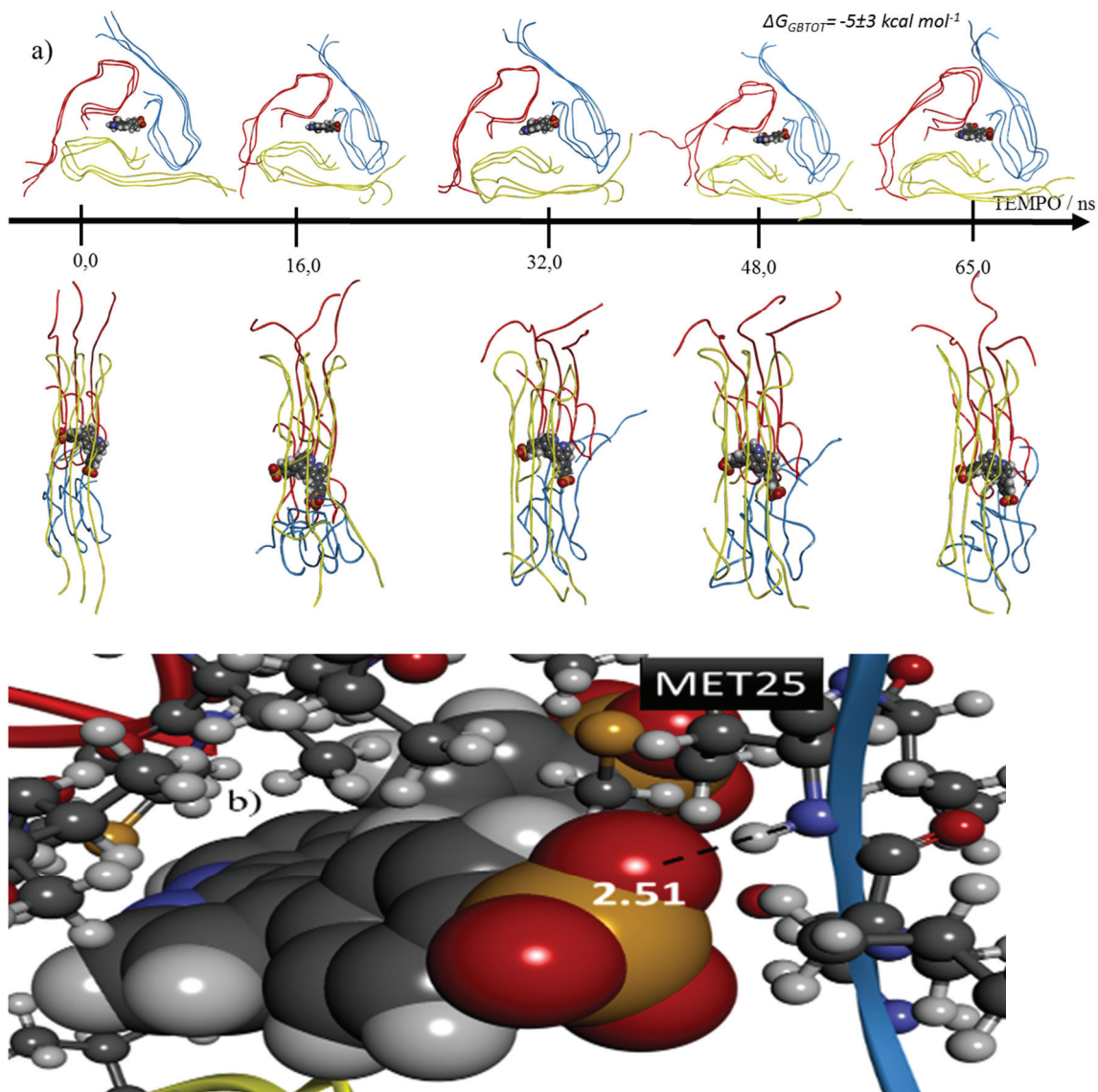
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Para o modelo 9PEP@SO3_bato, as observações são completamente distintas, pois o ligante se adere a uma distância de aproximadamente 2,5 Å com a amida do mesmo

resíduo de MET35 (ver Figura 4.6.1.4), pois os grupos sulfonatos realizam ligações de hidrogênio neste resíduo. Consequentemente, isso impede que o ligante tenha flexibilidade, e assim, não dispara efeito alostérico, o que repercutirá em redução dos desvios ao longo da trajetória dados por RMS e RMF (Figura 4.6.1.5).

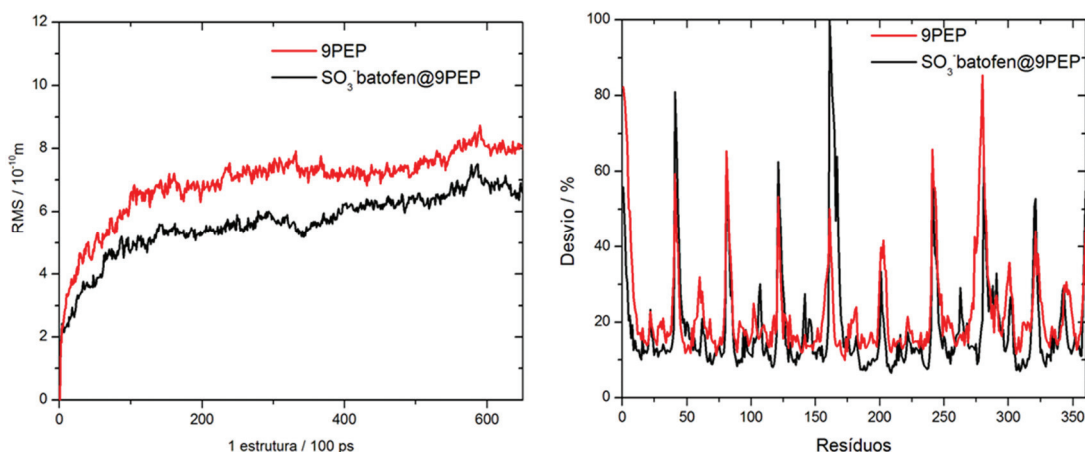
Logo, a estrutura SO3_bato, ao contrário do que era desejado, tende a reduzir os desvios de regiões centrais, o que não caracteriza um potencial candidato para eventos desaglomerativos do peptídeo amiloide, implicando em um ΔG_{GBTOT} consideravelmente menos expressivo comparado ao valor obtido pelo ligante batofenantrolina (bato: -23 ± 1 ; SO3_bato: -5 ± 3 kcal mol⁻¹). Como este efeito contrário foi observado antes de 100,0 ns finais, a etapa de produção foi interrompida com 65,0 ns.

Figura 4.6.1.4 a) Trajetória monitorada para SO₃_bato por 65,0 ns. b) Ligação de hidrogênio formada pelo ligante com MET35.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 4.6.1.5. Valores de RMS e desvios ao longo da trajetória de 65,0 ns.

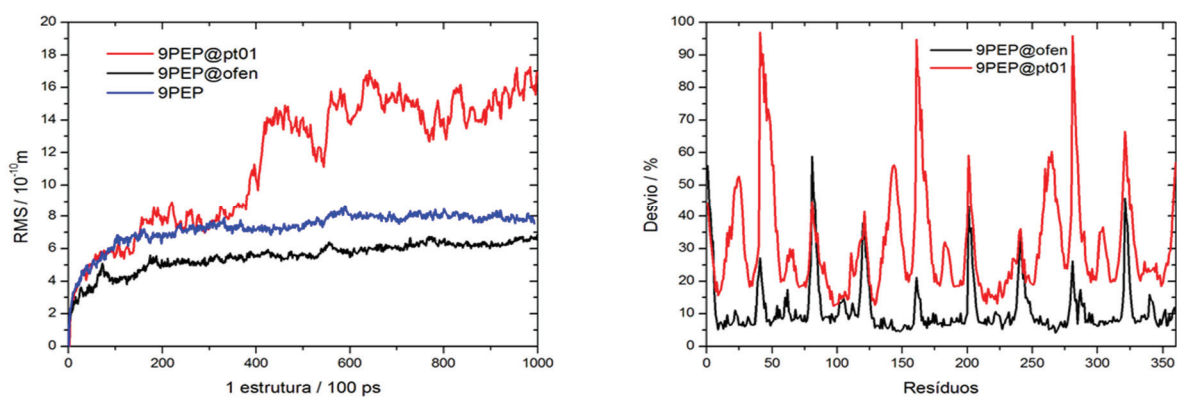


Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

4.6.2. Modelos 9PEP@ofen e 9PEP@pt01

Aqui encontra-se o ápice do tipo de efeito alostérico que o sistema manifesta em torno da interação dos ligantes com os resíduos de MET35. Assim como no modelo SO3_bato, do monitoramento da fenantrolina, apresentam uma forma estrutural mais compacta, demonstrado na Figura 4.6.2.1, pelos valores reduzidos de RMS e RMF, comparados a estrutura 9PEP isolada. O valor de ΔG_{GBTOT} foi semelhante as estruturas obtidas por *docking* (DM: -20 ± 3 ; *docking*: $-23,90 \text{ kcal mol}^{-1}$).

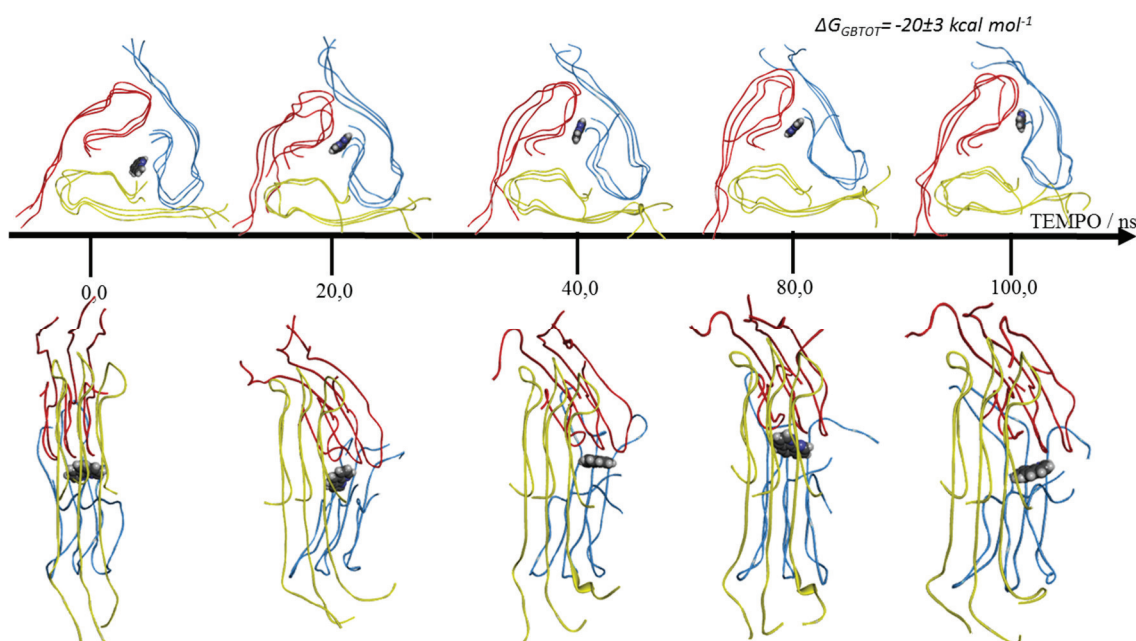
Figura 4.6.2.1. Monitoramento de RMS e RMF para as estruturas de ofen e pt01.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Em termos de respostas entre receptor e substrato, a flexibilidade alcançada por este ligante é tamanha que permitiu o deslocamento de uma porção para outra do receptor, de modo a interagir com os resíduos hidrofóbicos da segunda, quinta e oitava fita (em vermelho), fato ilustrado na Figura 4.6.2.2, semelhantes a curcumina, em seu estado enólico. Esta locomoção permite que o ligante ofen rotacione, gerando efeito contrário no agregado, onde este tenta suprimir este efeito nas fitas 2, 5 e 8 que tendem a torcer em sentido anti-horário de forma sutil, conforme visto na Figura 4.6.2.2.

Figura 4.6.2.2. Monitoramento estrutural do arranjo 9PEP@ofen



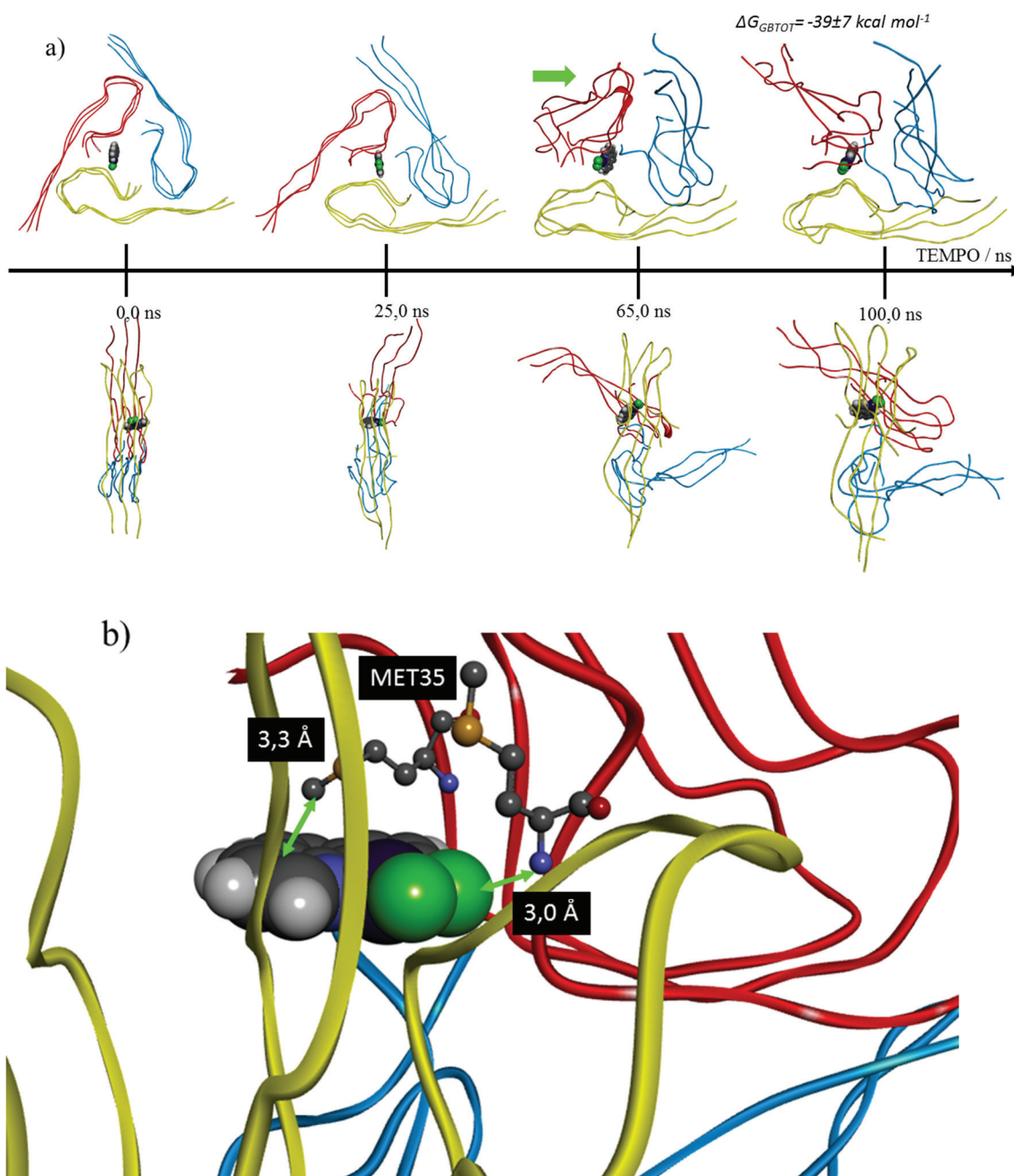
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Antes já visualizado na Figura 4.6.2.1, o valor de RMS para pt01 é totalmente diferente que qualquer outra estrutura proposta por esta tese, possuindo valores da ordem de 80% maiores comparados a estrutura de equilíbrio 9PEP isolada, o que indica que um forte evento de reorganização estrutural para relaxação do sistema ocorreu.

Esta movimentação acarreta em desvios de 25 – 62% na região central do peptídeo, comparados ao sistema 9PEP@ofen, ou seja, a movimentação é consideravelmente expressiva. Tamanha movimentação pode ser melhor compreendida

com a Figura 4.6.2.3, com o monitoramento das estruturas ao longo do tempo de simulação.

Figura 4.6.2.3. a) Estruturas obtidas pelo sistema 9PEP@pt01 ao longo de 100,0 ns. b) Ampliação das interações ocorridas no sítio de recepção para pt01.



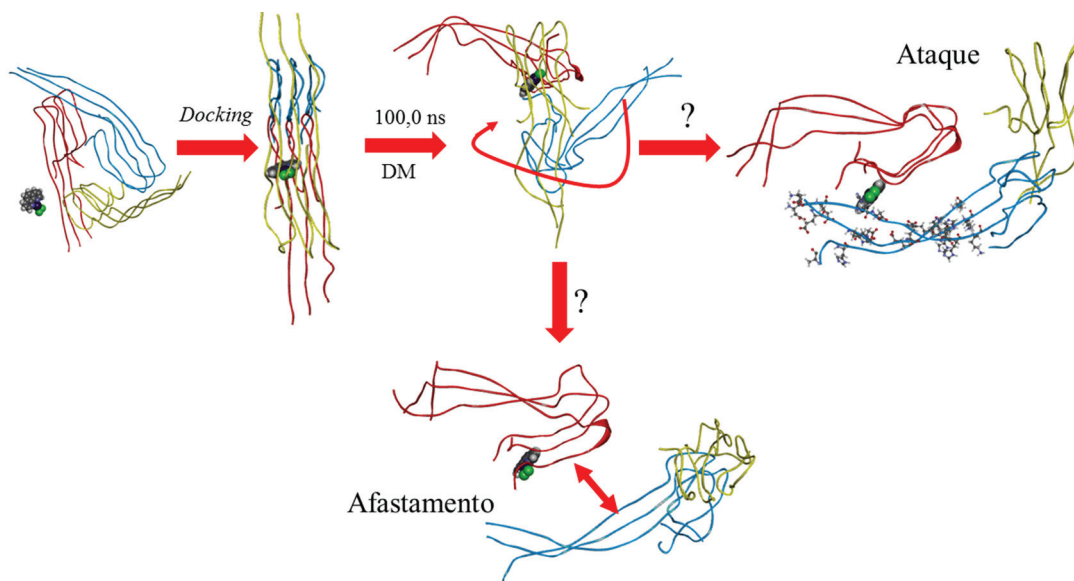
Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

Da movimentação gerada pelo ângulo $\angle\text{Cl-Pt-Cl}$, onde os cloretos realizam interação dipolar da ordem de 3,0 Å com a amida presente da ligação peptídica do grupamento MET35, teremos o impulso necessário para rotacionar em 90 graus as fitas paralelas 2, 5 e 8, onde se insere o complexo pt01. Com isso, é notório que o arranjo inicial ditado por este novo ancoramento molecular se desfaz completamente, acarretando em um novo mínimo local muito mais favorável 19 kcal mol⁻¹, comparado ao modelo 9PEP@ofen ($\Delta G_{\text{GBTOT}} = -39 \pm 7$ kcal mol⁻¹), e novamente o resíduo de MET35 adjacente interage C-H... π com o anel fenantrolínico.

A literatura (MATTSON, 2008; MA, 2011; TURNER, 2016) aponta que o ponto crucial para iniciar a recepção dos complexos derivados da fenantrolina com platina(II) no estágio de desaglomeração seria o empacotamento tipo π entre anéis aromáticos de resíduos de fenilalanina (PHE4, PHE19 e PHE20) e complexo, no entanto percebemos um efeito inédito. Interações do tipo C-H... π entre MET35 e anel aromático, e interações com os ligantes cloretos, também contribuem para a roptura da estrutura de partida do modelo 9PEP, mesmo sem a coordenação metálica em estágio inicial.

Ou seja, o papel da platina para colapsar a estrutura inicial se mostra de suma importância, pois a estabilidade consegue ser mais pronunciada em mais 19 kcal mol⁻¹ no arranjo final formado, comparada simulação do ligante sozinho (ofen). Com isso, é proposto o início do estágio de ataque do complexo pt01 quando este ancorar no centroide, conforme será explicado na Figura 4.6.2.4, onde o complexo se insere, após aproximadamente 70,0 ns ocorre uma evolução estrutural da ordem de 90 graus entre as fitas, iniciando a reestruturação dos agregados.

Figura 4.6.2.4. Esquema de proposta de desaglomeração através do complexo pt01.



Fonte: ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR.

As simulações de DM permitiram encontrar o início da desestruturação dos peptídeos com suas nove fitas, envolvendo o processo inicial de *docking* e relaxação estrutural por 100,0 ns. Todavia, saber ao certo qual tipo de arranjo os agregados irão compor, não foi possível de verificar no tempo de simulação adotado, pois existem duas possibilidades para o final de uma nova simulação: um estágio de aproximação entre as fitas permitindo contato entre os resíduos de HIS, ou o afastamento entre as fitas de modo a eclodir o arranjo inicial.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram obtidas em caráter experimental as constantes de velocidades, e as respectivas barreiras de energia livre, possuindo bons acordos com o nível de teoria descrito (solvólise, experimento 26,94; teoria 25,54 kcal mol⁻¹; substituição Cl⁻/HIS, experimento 20,73; teoria 20,74 kcal mol⁻¹), antes não pronunciados na literatura, todavia comparáveis com dados experimentais para sistemas análogos (MILLER, 1989).

Foi proposto com êxito um protocolo de simulação quântica entre os aminoácidos alvos do peptídeo amiloide com os complexos de platina pt01 e pt02, onde a ordem de reatividade entre os nucleófilos foi dada da seguinte forma: MET > LYS > HIS, sendo que em termos de estabilidade, os resíduos de LYS e HIS foram os mais significativos.

Os resultados de docking molecular em conjunto com o protocolo de DM se mostraram eficazes no tratamento de triagem via menor ΔG_{BIND} frente as energias de ΔG_{GBTOT} a um nível de confiabilidade considerável.

Das curcuminas, a estrutura com maior probabilidade de eficácia na desestruturação do agregado foi a forma enólica, demonstrando valores mais negativos para ΔG_{GBTOT} e repercutindo em novo arranjo estrutural com a evolução da DM. Já as estruturas de 9PEP com as fenantrolinas foram totalmente particulares para cada tipo de ligante, levando destaque ofen e SO3_bato que praticamente não alteram os valores de RMS dos agregados, quando comparados com a estrutura isolada, pois o ligante ofen falta volume para aumentar a possibilidade de interação com os resíduos do peptídeo e SO3_bato realiza uma ligação de hidrogênio que inativa a mobilidade do ligante frente ao centroide de recepção do agregado.

Para bato, ocorre as mesmas considerações dadas para a estrutura enólica da curcumina. Existe o mesmo tipo de ligação entre os anéis aromáticos e o resíduo de MET35, implicando em eventos sutis de rearranjo estrutural, repercutindo em alta estabilidade para ambas estruturas, com os valores de -23 e -25 kcal mol⁻¹, para a estrutura enólica e batofenantrolínica, respectivamente.

E, por fim, o complexo de pt01 demonstrou muita eficiência para desempacotar o arranjo das nove fitas, onde o final da simulação demonstra um valor muito negativo para ΔG_{GBTOT} comparado a todas as outras estruturas obtidas, e os valores de RMS foram tão

altos que mudaram completamente o arranjo inicial do modelo 9PEP. É proposto pt01 ser um eficaz agente contra aglomeração dos peptídeos β -amilóide, mesmo sem requerer coordenação metálica nos resíduos de HIS, LYS e GLU.

A proposta permitiu investigar a fundo o início da aglomeração do peptídeo, e qual resíduo é preferencial para coordenação metálica. Para pesquisas futuras, seria interessante aumentar o tempo de simulação da DM. Pois, se por consequência, na trajetória ocorrer aproximação de pt01 nos resíduos de LYS, HIS, GLU ou ASP, a simulação com a parametrização das ligações destes resíduos, diretamente ligados na platina, poderia ter um efeito de desagregação muito maior nos agregados estudados.

E, como já foi possível perceber o comportamento e a influência do complexo pt01 para estes estágios de aglomerações iniciais, a síntese e a caracterização de pt02 (complexo com o ligante batofenantrolina), juntamente com os cálculos de DM, serão bem vindos para propor o efeito da hidrofobicidade do ligante no agregado receptor.

5.1.PRODUÇÃO CIENTÍFICA

5.1.1. Trabalhos apresentados em eventos

Theoretical study of a Michael reaction involved with Alzheimer's disease

Willian Tássio Gomes Novato, Luiz Antônio Sodré Costa, Wagner Batista de Almeida, Hélio Ferreira dos Santos

XXXVIII Congresso f Theoretical Chemists of Latin Expression (QUITEL), 2012, Natal, RN, Brasil.
Apresentação de Pôster.

Estudo teórico do mecanismo de ataque de potenciais novos compostos anti-Mal de Alzheimer

Willian Tássio Gomes Novato, Luiz Antônio Sodré Costa, Hélio Ferreira dos Santos

XXVII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG (ERSB), 2013, São João Del Rey, MG, Brasil.

*Apresentação de Pôster **premiada** com menção honrosa na área de Físico-Química e Química Teórica.*

Kinetics analysis for the ligand exchange reaction of his with a Pt(II) complex: an important step towards inactivating the betaamyloid aggregates

Willian Tássio Gomes Novato, Luiz Antônio Sodré Costa, Hélio Ferreira dos Santos

X Congresso of the World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC), 2014, Santiago, Chile.

Apresentação oral

5.1.2. Artigo publicado como resultado da tese

Reaction between the Pt(II)-complexes and the amino acids of the β -amyloid peptide

Willian T.G. Novato, Pedro Henrique F. Stroppa, Adilson D. Da Silva, Naiara P. Botezine, Flávia C. Machado, Luiz Antônio S. Costa, Hélio F. Dos Santos

Chemical Physics Letters, 2017, 667, 4-8.

5.1.3. Artigo não relacionado com a tese publicado no período

Platinum(II) complexes containing long-chain hydrophobic N -alkyl-diamine ligands: Synthesis, characterization, molecular modeling, and cytotoxic activity

Tatiane Teixeira Tavares, Glauca Franco Teixeira, Carolina Mauad Lopes, Willian Tássio Gomes Novato, Heveline Silva, Míriam Teresa Paz Lopes, Mauro Vieira De Almeida, Richard Michael Grazul, Hélio Ferreira Dos Santos, Ana Paula Soares Fontes

Journal of Inorganic Biochemistry, 2012, 115, 13-19.

REFERÊNCIAS

- ALBERTY, R. A. **PHYSICAL CHEMISTRY**. 7. Ed., JOHN WILEY & SONS, Inc., 1987.
- ALÍ-TORRES, J. *et al.* Three Dimensional Models of Cu²⁺-A β (1–16) Complexes from Computational Approaches, **JACS**, v. 133, n. 38, p. 15008-15014, 2011.
- AMBER12. University of California, San Francisco.: D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zang, K. M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, and P. A. Kollman 2008.
- ANDREA, D. *et al.* Energy-adjusted ab initio pseudopotentials for the second and third row transition elements. **Theor. Chem. Acc.**, v. 77, n. 2, p. 123-141, 1990.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016, Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> . Acesso em 13/12/2016.
- AGNIHOTRI, N. *et al.* Scavenging Mechanism of Curcumin Toward the Hydroxyl Radical: A Theoretical Study of Reactions Producing Ferulic Acid and Vanillin, **J. Phys. Chem. A**, v. 115, n. 49, p. 14221–14232, 2011.
- BARNHAM, K. J. *et al.* Platinum-based inhibitors of amyloid- β as therapeutic agents for Alzheimer's disease. **PNAS**, v. 105, n. 19, p. 6813–6818, 2008.
- _____. Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 222-228, 2008.
- BECKE, A. D. *et al.* Density functional thermochemistry. III. The role of exact Exchange. **J. Chem. Phys.**, v. 98, n. 7, p. 5648, 1993.
- BERGNER, A. *et al.* Ab initio energy-adjusted pseudopotentials for elements of groups 13–17. **Mol. Phys.**, v. 80, n. 6, p. 1431-1441, 1993.
- BORA, R. P. *et al.* Elucidations of insulin degrading enzyme catalyzed site specific hydrolytic cleavage of amyloid β peptide: a comparative density functional theory study. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 15, n. 4, p. 485-495, 2010.
- BURDA, J. V. *et al.* Hydration of *cis*- and *trans*-platin: A pseudopotential treatment in the frame of a G3-type theory for platinum complexes. **J. Chem. Phys.**, v. 113, n. 6, p. 2224, 2000.

- CARAGOUNIS, A. *et al.* Differential modulation of Alzheimer's disease amyloid β -peptide accumulation by diverse classes of metal ligands. **Biochem. J.**, v. 407, p. 435–450, 2007.
- CAVALCANTI, J. L. S. *et al.* Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 48, n. 4, p. 21-29, 2012.
- CHVAL, Z. *et al.* Pentacoordinated transition states of cisplatin hydrolysis—ab initio study. **Comp. Theor. Chem.**, v. 532, n. 1–3, p. 59-68, 2000.
- COLLIN, F. *et al.* Pt(II) compounds interplay with Cu(II) and Zn(II) coordination to the amyloid- β peptide has metal specific consequences on deleterious processes associated to Alzheimer's disease. **Chem. Commun.**, v. 49, n. 21, p. 2130-2132, 2013.
- DE FALCO, A. *et al.* Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Quim. Nova**, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016.
- DE SOUSA, F. B. *et al.* Superstructure based on β -CD self-assembly induced by a small guest molecule. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 14, n. 6, p. 1934-1944, 2012.
- DJEKOVIC, A. *et al.* Kinetics and mechanism of the reactions of Au(III) complexes with some biologically relevant molecules, **Dalton Trans.**, v. 41, n. 13, , p. 3633-3641, 2012.
- ELDRIDGE, M. D. *et al.* Empirical scoring functions .1. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **J. Comput. Aided. Mol.**, v. 11, n. 5, p. 425-445, 1997.
- EYRING, H. *et al.* The Activated Complex in Chemical Reactions. **J. Chem. Phys.**, v. 3, n. 2, p. 107–115, 1935.
- FDA. Food and Drug Administration, 2016, Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em 02 março 2016.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer, **Rev. Psiq. Clín.**, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.
- FRISCH, M. J. *et al.* Gaussian 09, Wallingford – CT: Gaussian Inc, 2009.
- GABALLA, A. *et al.* Ligand Substitution Reactions on Aquapentachloro- and Hexachloroplatinic Acid - Synthesis and Characterization of Tetrachloroplatinum(IV) Complexes with Heterocyclic *N, N* Donors. **Z. Annorg. Allg.**, v. 629, n. 4, p. 703-710, 2003.
- GRZESIAK, A. L. *et al.* Selection and Discovery of Polymorphs of Platinum Complexes Facilitated by Polymer-Induced Heteronucleation. **Inorg. Chem.**, v. 46, n. 2, p. 453-457, 2007.
- GUIMARÃES, M. R. M. *et al.* Vitamina E e função cognitiva: Uma revisão de literatura, **Rev. Neurocienc.**, v. 18, n.2, p. 249-255, 2010.

HAMLEY, I. W. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization. **Chem. Rev.**, v. 112, n. 10, p. 5147-5192, 2012.

HAY, P. J. *et al.* *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. **J. Chem. Phys.**, v. 82, n. 1, p. 299, 1985.

_____. *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. **J. Chem. Phys.**, v. 82, n. 1, p. 299, 1985.

HEBERT, L. E. *et al.* Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using 2010 census. **Neurology**, v. 80, n. 10, p. 1778-1783, 2013.

HOEFGEN, S. *et al.* The Amyloid Precursor Protein Shows a pH-Dependent Conformational Switch in Its E1 Domain. **J. Mol. Biol.**, v. 427, n. 2, p. 433-442, 2015.

[HUREAU](#), C. *et al.* Platinoid complexes to target monomeric disordered peptides: a forthcoming solution against amyloid diseases? **Dalton Trans.**, v. 43, n. 11, 2014.

IAB. Instituto Alzheimer Brasil, 2016. Disponível em:
<http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/demencias-detalhes-Instituto_Alzheimer_Brasil/33/entendendo_a_doenca_de_alzheimer_da_atraves_de_estudos_realizados_com_populacoes_epidemiologia>. Acesso em 02 março 2016.

JONES, M. R. *et al.* Modulation of the A β peptide aggregation pathway by KP1019 limits A β -associated neurotoxicity. **Metallomics**, v. 7, n. 1, 2015.

KENCHE, V. B. *et al.* Development of a platinum complex as an anti-Amyloid agent for the therapy of Alzheimer's Disease. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 52, n. 12, p. 3374-3378, 2013.

KUNTZ, I. D. *et al.* A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.

LEE, S. *et al.* The E2 Domains of APP and APLP1 Share a Conserved Mode of Dimerization. **Biochem.**, v. 50, n. 24, p. 5453-5464, 2011.

LEACH, A. R. MOLECULAR MODELING: Principles and Applications. 2. Ed. Dorchester: Pearson, 2001.

LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. 6. Ed. New York: Pearson, 2009.

KOLLMAN, P. A. *et al.* Calculations structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. **Acc. Chem. Res.**, v. 33, n. 12, p. 889-897, 2000.

STÖHR, M.; KRAUS, R. **Introdução À Neurofisiologia Clínica - Emg - Eeg - Potenciais Evocados**, 1. Ed. Brasil, ED. Atheneu, 2009.

LOPES, J. F. *et al.* An Investigation of the BSSE Effect on the Evaluation of Ab Initio Interaction Energies for Cisplatin-Water Complexes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 5, p. 887-896, 2010.

LOVELL, M. A. *et al.* Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques, **J. Neurol. Sci.**, v. 158, n. 1, p. 47-52, 1998.

LÜHRS, T. *et al.* 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils. **PNAS**, v. 102, n. 48, p. 17342-17347, 2005.

LU, J. *et al.* 40-residue beta-amyloid fibril derived from Alzheimer's disease brain. **Cell**, v. 154, n. 6, p.1257-1268, 2013.

MA, G. *et al.* Identification of [PtCl₂(phen)] binding modes in amyloid- β peptide and the mechanism of aggregation inhibition. **Chem. Eur. J.**, v. 17, n. 41, p. 11657-11666, 2011.

_____. PtCl₂(phen) disrupts the metal ions binding to amyloid- β peptide. **Metallomics**, v. 5, n. 7, p. 879-887, 2013.

MARCIAL, B. L. *et al.* Chemically Modified Tetracyclines as Inhibitors of MMP-2 Matrix Metalloproteinase: A Molecular and Structural Study. **J. PhysChem B**, v. 116, n. 46, p. 13644-13654, 2012.

MARKESBERY, M..A. *et al.* Four-Hydroxynonenal, a Product of Lipid Peroxidation, is Increased in the Brain in Alzheimer's Disease , **J. Neurol. Sci.**, v. 19, n.1, p.33-36, 1998.

MATTSON, M. P. Pathways Towards and Away from Alzheimer's Disease. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 631-639, 2004.

MENNUCCI, B.; CAMMI, R. **Continuum Solvation Models in Chemical Physics: From Theory to Applications**. Chischester: Wiley, 2007.

MIERTUŠ, S. *et al.* Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilizaion of Ab Initio Molecular Potentials for the revision of Solvent Effects. **Chem. Phys.**, v. 55, p. 117-129, 1981.

MILLER, S. E. *et al.* The hydrolysis products of *cis*-diamminedichloroplatinum(II). I. The kinetics of formation and anation of the *cis*-diammine(aqua)chloroplatinum(II) cation in acidic aqueous solution. **Inorg. Chim. Acta**, v. 161, n. 1, p. 131-137, 1989.

_____. The hydrolysis products of *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) 2. The kinetics of formation and anation of the *cis*-diamminedi(aqua)platinum(II) cation. **Inorg. Chim. Acta**, v. 166, n. 2, p. 189-197, 1989.

MILLER, Y. *et al.* Polymorphism in Alzheimer A β Amyloid Organization Reflects Conformational Selection in a Rugged Energy Landscape. **Chem. Rev.**, v. 110, n. 8, p. 4820-4838, 2010.

MORGON, N.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1. Ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

MOURÃO JUNIOR, C. A.; ABRAMOV, D. **Fisiologia Essencial**. 1. Ed. Brasil, ED. Guanabara Koogan, 2010.

NAMRATHA, K. *et al.* Antioxidant and Anticancer effects of curcumin – A Review. **J. Altern. Complement. Med.**, v. 3, n. 2, p.136-143, 2013.

O'BRIEN, R. J. *et al.* Amyloid Precursor Protein Preprocessing and Alzheimer's Disease, **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 34, p. 185-204, 2011.

ONU. Organização das Nações Unidas, 2016, Disponível em: < <https://nacoesunidas.org/oms-expectativa-de-vida-sobe-5-anos-de-2000-a-2015-no-mundo-mas-desigualdades-persistem/> > . Acesso em 28 de maio de 2016.

PASCHOAL, D. *et al.* The role of the basis set and the level of quantum mechanical theory in the prediction of the structure and reactivity of cisplatin. **J. Comp. Chem.**, v. 33, n. 29, p. 2292-2302, 2012.

PEARLMAN, D. A. *et al.* AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules, **Comp. Phys. Com.**, v. 91, n. 1-3, p. 1-41, 1995.

PETRONILHO, E. C. *et al.* Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **RMCT**, v. 28, 3º trim., p. 1-14, 2011.

PERCZEL, A. *et al.* Dead-end street of protein folding: Thermodynamic rationale of amyloid fibril formation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, n. 48, p. 14959-14965, 2007.

PRICE, J. H. *et al.* Palladium(II) and Platinum(II) Alkyl Sulfoxide Complexes. of Sulfur-Bonded, Mixed Sulfur- and Oxygen-Bonded, and Totally Oxygen-Bonded Complexes. **J. Inorg. Chem.**, v. 11, n. 6, p. 1280-1284, 1972.

Radanovic, M.; KATO-NARITA, E. **Neurofisiologia Básica Para Profissionais da Área da Saúde**, 1. ed., Brasil, Ed. Atheneu, 2016.

SCALMANI, G. *et al.* Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. **J. Chem. Phys.**, v. 132, n. 11, p. 114110, 2010.

SCOTT, J. D. *et al.* Discovery of the 3-Imino-1,2,4-thiadiazinane 1,1-Dioxide Derivative Verubecestat (MK-8931)—A β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. **J. Med. Chem.** 59, n. 23, p.10435-10450, 2016.

SHEN, L. *et al.* How does curcumin work with poor bioavailability? Clues from experimental and theoretical studies, **Sci. Rep.**, v. 6, n. 20872, p. 1-10, 2016.

STRELTSOV, V. A. *et al.* Structural insights into the interaction of platinum-based inhibitors with the Alzheimer's disease amyloid- β peptide. **Chem. Commun.**, v. 49, n. 97, p. 11364-11366, 2013.

SUGIMOTO, H. *et al.* Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor, **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 89, n. 1, p. 7 – 20, 2002.

SZABO, A. *et al.* **MODERN QUANTUM CHEMISTRY – Introduction to Advanced electronic structure theory**, 3. Ed, New York, ED. Dover, 1996.

TOMASELLI, S. *et al.* The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's A β -(1-42) peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. **ChemBioChem.**, v. 7, n.2, p. 257-267, 2006.

TURNER, M. *et al.* Modeling of Platinum-Aryl Interaction with Amyloid- β Peptide. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 12, n. 3, p. 1385-1892, 2016.

VALENSIN, D. *et al.* Metal compounds as inhibitors of β -amyloid aggregation. Perspectives for na innovative metallotherapeutics on Alzheimer's disease. **Coord. Chem. Rev.**, v. 256, n. 19-20, p. 2357-2366, 2012.

VERLET, L. *et al.* Computer experiments on classical fluids .i. Thermodynamical and properties of lennard-jones molecules. **Phys. Rev.**, v. 159, n. 1, p. 98, 1967.

VIEGAS F. P. D., *et al.* Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicação do Processo Neuroinflamatório. **Rev. Virt. Quím.**, v. 3, n. 4, 286-306, 2011.

VYDROV, O. A. *et al.* Assessment of a long-range corrected hybrid functional. **J. Chem. Phys.**, v. 125, n. 23, p. 234109, 2006.

WANG, X. *et al.* Inhibitory action of macrocyclic platinumiferouschelators on metal-induced A β aggregation, **Chem. Sci.**, v. 3, n. 4, p. 1304-1312, 2012.

WEINER, S. J. *et al.* A new force-field for molecular mechanical simulation of nucleic-acids and proteins. **JACS**, v. 106, n. 3, p.765-784, 1984.

YANAI, T. *et al.* A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). **Chem. Phys. Lett.**, v. 393, n. 1-3, p. 51-57, 2004.

APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE A TESE



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Research paper

Reaction between the Pt(II)-complexes and the amino acids of the β -amyloid peptide
 Willian T.G. Novato^a, Pedro Henrique F. Stroppa^b, Adilson D. Da Silva^b, Naiara P. Botezine^c, Flávia C. Machado^c, Luiz Antônio S. Costa^a, Hélio F. Dos Santos^{a,*}
^a Núcleo de Estudos em Química Computacional (NEQC), Departamento de Química – ICE, Universidade Federal e Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

^b Núcleo Multifuncional de Pesquisas Químicas (NUPEQ), Departamento de Química – ICE, Universidade Federal e Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Grupo de Química Inorgânica Supramolecular (GQUIS), Departamento de Química – ICE, Universidade Federal e Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 August 2016

In final form 15 November 2016

Available online 16 November 2016

Keywords:

Pt(II)-complexes

Alzheimer

Amyloid

DFT

ABSTRACT

Reaction between [Pt(o phen)Cl₂] and HIS was monitored and the solvolysis (k_1) and Cl/HIS ligand exchange (k_2) rate constants obtained. The k_1 and k_2 were $(6.2 \pm 0.4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and $52.8 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. The corresponding calculated values were $47.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and $52.2 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in agreement with the experiment. Calculations were used to establish the reactivity order for a set of amino acids: MET ~ LYS ~ HIS(ϵ) > GLU ~ ASP >> ASN ~ GLN. In spite of the similar reactivity among MET, LYS and HIS, the thermodynamics suggests the reactions with LYS and HIS more favorable than with MET. Therefore, N-containing amino acids should be potential targets of Pt(II)-complexes in β -amyloid.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The life expectancy increase in the world population raises the demand for studies about diseases directly affecting the neural capacity of people, depending on genetics and lifestyle [1,2]. Thus, the Alzheimer Disease (AD), among other prominent diseases, nowadays calls the interest of the scientific community. This syndrome is featured by different high-complexity manifestation stages [2]. The Amyloid Protein Precursor (APP) segmentation by the β and γ -secretase enzymes is the starting point [2]. This proteolysis is more frequent in specific brain regions responsible for the recent memory in AD patients such as the hippocampus and the prefrontal cortex [2]. There is an excess of β -amyloid peptides ($A\beta$), which are composed of 40–43 amino acid (AA) residues, after the biocycle starts. Some of these residues are potential sites for nucleophilic attack [3–6]. Fig. 1 shows an experimental model of the $A\beta(1-42)$ reported by Tomaselli and co-workers [7], the structure represents a mean arrangement observed in aqueous solution.

The $A\beta$ is predominantly constituted of 40 and 42 AAs, with considerable amounts of Zn(II), Fe(III) and Cu(II) in the advanced AD stage, which are coordinated to 1–16 residues in the hydrophilic motif. Moreover, the bioaccumulation of $A\beta$ in the synaptic clefts triggers different neurotoxic events. According to some

in vitro studies, the formation of $A\beta$:Cu and $A\beta$:Fe adducts in the cerebral environment might lead to the excess of peroxy and hydroxyl free radicals [2–5]. These free radicals act on the oxidative stress in the cell membrane and induce the formation of neurotoxic species such as the 4-hydroxy-nonenal aldehyde (4HNE), which is responsible for deactivating many cellular proteins [2,3]. On the other hand, the $A\beta$:Zn adduct leads to the formation of insoluble peptide aggregates, which precipitate between the synaptic clefts and lead to the excessive bioaccumulation of $A\beta$. This series of events is called “amyloid cascade” [2,5].

There is a series of residues such as HIS, LYS, ASP, GLU, ASN, GLN and MET likely to be targeted by metal-based compounds in the $A\beta$ peptide. The inhibition of $A\beta$ sites by inert centers (such as Pt) has been considered a possible therapeutic route in the search for new compounds with potential anti-AD activity [6,8–12]. Barnham and co-workers [6,13] conducted an intense research involving Pt(II)-complexes and used aromatic ligands such as o-phenanthroline (o phen) and bathophenanthroline (batophen), which provide promising dispersive effect [6,13]. Their results suggest the Pt binding to different residues, mainly HIS. Ma and Collin [9–11] showed that HIS6:HIS14 and GLU11:HIS13 are the main $A\beta$ interaction sites for platinum complexes. Turner and co-workers [14] proposed the coordination at HIS6-HIS13 and HIS6-HIS14 using DFT calculations and molecular dynamics simulation. The HIS was taken as the main coordination site for Pt complexes based

* Corresponding author.

E-mail address: helio.santos@ufjf.edu.br (H.F. Dos Santos).

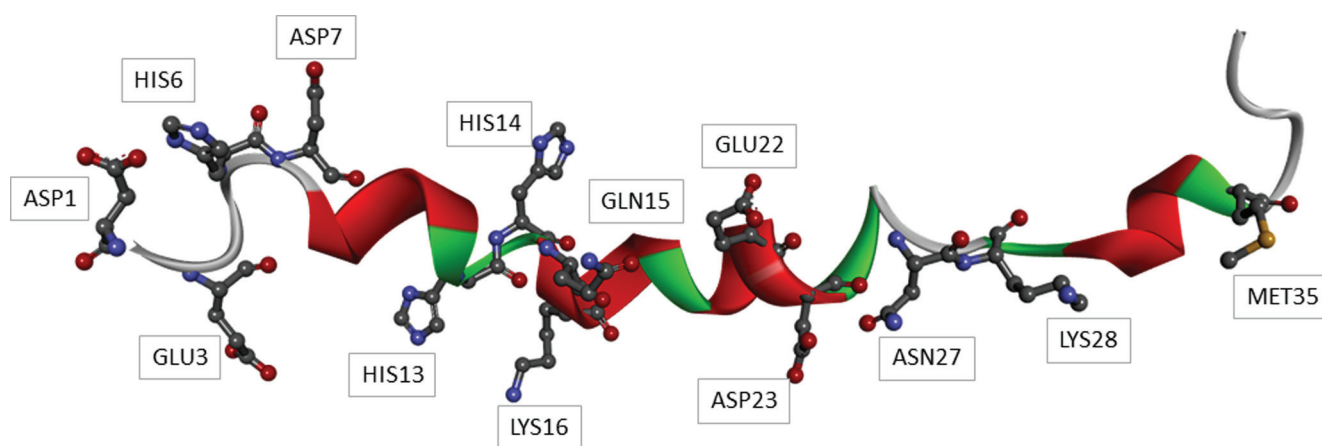


Fig. 1. Experimental structure of Aβ(1–42) obtained from PDB code 1Z0Q [7]. The potential metal-binding sites are represented as ball-sticks.

on these previous studies; however, the need of representing the process on quantitative basis remains.

The reactions between the [Pt(ophen)Cl₂] (pt01) and [Pt(batophen)Cl₂] (pt02) complexes and the AA found in the Aβ structure were investigated in the present study, providing the structures of the reactive species, as well as the thermodynamic and kinetic parameters. An experimental kinetic analysis of the ligand exchange process involving the pt01 complex and the HIS was conducted in order to validate the used computational protocol.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

All reagents and solvents were used without further purification. The UV–Vis spectra were recorded using a Shimadzu PC 1601 spectrometer, in the region 200–400 nm, in quartz cuvettes of 1 cm. The Raman spectra were obtained in a Bruker RFS100 FT-Raman instrument equipped with a germanium detector refrigerated through liquid nitrogen, excitation at 1064 nm from a Nd:YAG laser in the range 4000 to 50 cm⁻¹ and spectral resolution 4 cm⁻¹, 256 scans, on average, and power 40 mW. The elemental analyses (C, H and N) were performed in a Perkin-Elmer 2400 elemental analyzer.

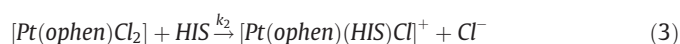
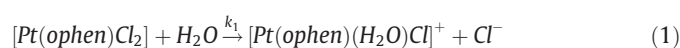
2.2. Synthesis of [Pt(ophen)Cl₂] complex (pt01 – Scheme 1)

The complex pt01 was obtained from [Pt(DMSO)₂Cl₂] (0.1 mmol) and ophen (0.1 mmol) in 20 mL of methanol, according to Price and co-workers [15]. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The product was filtered and washed in methanol and it generated a yellow solid in 76% yield.

pt01: yellow solid. Raman (ν_{\max} in cm⁻¹): 215 δ (ClPtCl); 322 ν_s (PtCl); 337 ν_{as} (PtCl); 443 ν (PtN). Anal. Calc. for [C₁₂H₈Cl₂N₂Pt]: C, 32.30%; H, 1.81%; N, 6.28%. Found: C, 31.6%; H, 1.76%; N, 6.04%.

2.3. Kinetic measurements

The reaction between [Pt(ophen)Cl₂] (pt01) and HIS in aqueous solution follows complex multistep reactions where H₂O and HIS act as nucleophiles. Consecutive processes, as represented in Eqs. (1) and (2), can compete with the parallel reaction shown in Eq. (3).



The kinetic scheme represented by Eqs. (1)–(3) is example of complicated rate equations, for which there is no general explicit mathematical treatment. Therefore, in order to simplify the kinetic analysis, processes (1) and (3) was investigated separately avoiding the consecutive step (2). Firstly, only the solvolysis (1) was considered when 2.40 mL of the solution 0.5 mmol/L of pt01 was added to 57.6 mL of ethanol and diluted to the total volume of 80 mL using deionized water (note that [HIS] = 0 and the reaction (2) is avoided). The flask containing the reaction mixture was stirred for 30 min. under reflux temperature 345 K. This temperature was set up instead of normal body temperature (310 K) in order to speed up the process allowing the analysis at affordable time. The rate equation is given in Eq. (4) where the concentration of pt01 complex was monitored by measuring the absorbance (A) at constant wavelength 252 nm.

$$v = k_{obs,1}[\text{Pt}(\text{ophen})\text{Cl}_2] \cdot k_{obs,1} = k_1 \quad (4)$$

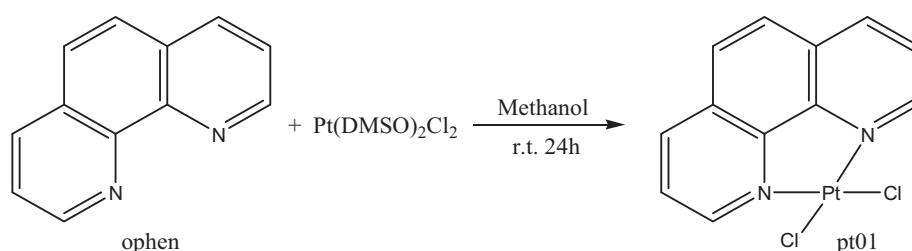
The HIS was added in the ratio [HIS]:[pt01] = 8 in the second experiment, which was supposed to set up the process at pseudo-first-order condition. Moreover, NaCl (5.0 mmol/L) was also added to the reaction mixture to avoid the solvolysis [16], therefore, the consecutive processes (1) and (2) were avoided and the rate law written as in Eq. (5).

$$v = k_{obs,2}[\text{Pt}(\text{ophen})\text{Cl}_2] \cdot k_{obs,2} = k_2[\text{HIS}] \quad (5)$$

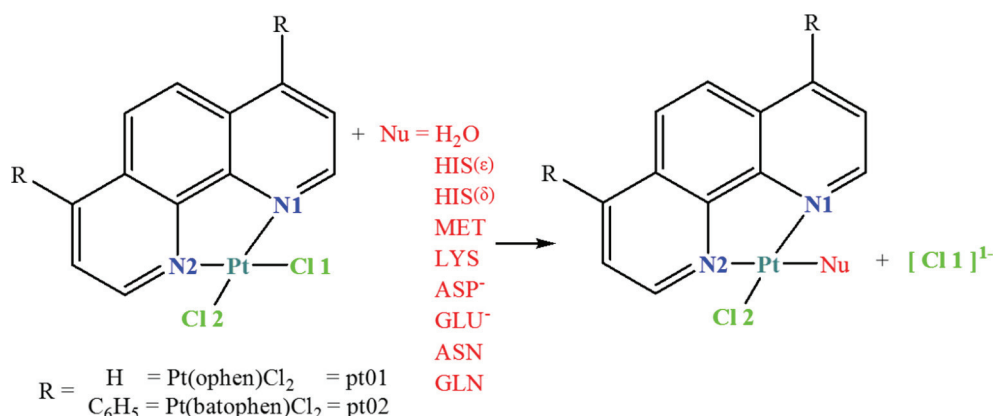
The reactant concentrations were [HIS] = 0.14 mmol/L and [pt01] = 0.018 mmol/L. The flask containing the reaction mixture was stirred for 1 h at constant temperature 345 K. As for the solvolysis reaction, the concentration of pt01 complex was monitored through the change in the absorbance at 252 nm. The experiments were conducted in duplicate. The UV–Vis spectra and other details were provided as [Supplementary Material](#).

2.4. DFT calculations

The processes represented in Scheme 2 were theoretically investigated for the pt01 and pt02 complexes. The amino acids (AA) were kept in their zwitterion form, and the aspartic (ASP – pKa = 3.86), glutamic acids (GLU – pKa = 4.07) and histidine (HIS – pKa = 6.10) were deprotonated at side chain. For LYS that is a strongly basic residue (pKa = 10.53), which side chain would be



Scheme 1. Synthesis of the pt01 complex.



Scheme 2. Processes calculated in the present study. The reaction of pt01 with water and HIS was experimentally investigated.

expected to be present mainly as R-NH_3^+ , the neutral R-NH_2 form was considered in the ligand exchange reaction [10].

The geometries of all species, including the transition states (TS), were optimized in aqueous solution through the IEFPCM approach [17], using the dielectric constant $\epsilon = 78.3553$ and the UFF atomic radii scaled with constant factor 1.10. The B3LYP DFT functional [18] was used in conjunction with the LanL2DZ basis set [19–22] for Pt; and at 6-31G(d), for light atoms (herein after abbreviated as B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d)). The same level of theory was used to characterize the stationary points and to predict the thermodynamic properties. The reaction energy and barriers were calculated assuming a supermolecular approach wherein the reactants and the products are treated as molecular complex; therefore, the correction to the standard state 1 mol/L was not needed.

Single point calculations were conducted using long-range corrected hybrid DFT functionals LC- ω PBE [23] and CAM-B3LYP [24], which yielded very good solvolysis energy barrier for cisplatin [25]. Augmented basis sets (SDD($\alpha_s = 0.0075$; $\alpha_p = 0.0130$; $\alpha_d = 0.0250$; $\alpha_f = 0.9804$) [26,27] for Pt; and 6-31+G(2df) for ligand atoms) were used aiming at improving the energy. These computational schemes were labeled as L1 (CAM-B3LYP/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//) and L2 (LC- ω PBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//). The double slashes mean that the B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d) geometries and thermal corrections were used. The DFT calculations were carried out in the Gaussian 09 software [28].

3. Results and discussion

The structural data calculated at the B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d) level for the compounds pt01 and pt02 are shown in Table 1 and compared to the experimental X-ray data [29,30]. The predicted bond lengths were slightly longer than those observed in the solid state, and it may be attributed to the solvent effect, which tends to enlarge the coordination bonds. The bond angles satisfactorily met the experimental data at approximately 5% deviation.

The reaction between the pt01 complex, H_2O (solvolysis) and HIS (direct ligand exchange) was experimentally monitored. The UV-Vis spectra through time and the data used to fit the linear plots ($\log A \times t$) are shown in the [Supplementary Material](#). The rate constants k_1 (solvolysis) and k_2 (direct ligand exchange) were obtained (Table 2) based on these data, assuming a pseudo-first-order kinetics. The mean k_1 was $(6.2 \pm 0.4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, which is within the corresponding rate-constant observed for cisplatin, $(2.52\text{--}8.51) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [25,31–33]. The Gibbs free energy barrier (ΔG_1^\ddagger) was obtained at 345 K in the standard state $c_0 = 1 \text{ mol/L}$ through the Eyring Eq. (6), and it led to 26.94 kcal/mol.

$$k = \frac{k_B T}{h c_0} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (6)$$

The kinetic plot $\log A \times t$ in the reaction using HIS led to pseudo-first order observed rate constant, $k_{obs,2}$ (Eq. (5)), which was used to estimate the second-order rate constant $k_2 = k_{obs,2}/[\text{HIS}]$. The mean $k_{obs,2}$ was $(7.4 \pm 0.3) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and k_2 was $52.8 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. From Eq. (6), $\Delta G_2^\ddagger = 20.73 \text{ kcal/mol}$.

The calculated values at 345 K were also included in Table 2. There was better compliance with the experiment when dispersion corrected functionals are used. At the LC- ω PBE level; ΔG^\ddagger showed 25.54 (solvolysis) and 20.74 kcal mol $^{-1}$ (reaction using HIS), respectively. The activation barrier for the mechanism through N ϵ was in slightly better compliance with the experimental data than the corresponding process at the N δ site in the reaction using HIS. The reactive species in the reaction of pt01 with H_2O and HIS are shown in Fig. 2.

Fig. 2 clearly shows the reaction pathway involving the formation of the Pt-Nu bond and the rupture of the Pt-Cl bond; the transition state was featured as distorted bipyramidal trigonal. The bond angle between the entering and leaving group (reactive angle) was between 60 and 80°. The reactive angle was larger (80.94°) in the Cl/HIS exchange process, due to the orientation of the HIS side

Table 1

Experimental (in parenthesis) and theoretical structural parameters of the Pt(II)-complexes pt01 and pt02. Experimental values are from solid state experiments and the calculated parameters were obtained in aqueous solution at B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d).

	Bond/Å		Angles/°			Error/%
	Pt–N	Pt–Cl	N–Pt–N	N–Pt–Cl	Cl–Pt–Cl	
pt01	2.025 (2.005)	2.391 (2.292)	80.70 (81.46)	94.51 (93.43)	90.26 (90.72)	5.4
pt02	2.048 (2.028)	2.393 (2.295)	80.25 (81.32)	94.91 (94.37)	89.90 (90.49)	4.4

Experimental values from Refs. [29,30].

Table 2

Experimental and calculated kinetic data (T = 345 K) for the reaction of pt01 with H₂O (k₁) and HIS (k₂).

Assay	Linear fit	k ₁ × 10 ⁻⁵ /s ⁻¹	⟨k ₁ ⟩ × 10 ⁻⁵ /s ⁻¹	ΔG ₁ [#] (kcal mol ⁻¹)
1	ln(A/A ₀) = -2.98 × 10 ⁻³ - 5.9 × 10 ⁻⁵ t (N = 5, R = 0.99, σ = 0.000005)	5.9	(6.2 ± 0.4)	26.94
2	ln(A/A ₀) = -2.45 × 10 ⁻² - 6.5 × 10 ⁻⁵ t (N = 5, R = 0.99, σ = 0.000006)	6.5		
B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d)				23.25
L1: CAM-B3LYP/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//				24.59
L2: LC-ωPBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//				25.54
Assay	Linear fit	k _{obs,2} × 10 ⁻⁵ /s ⁻¹	⟨k ₂ ⟩ × 10 ⁻² /M ⁻¹ s ⁻¹	ΔG ₂ [#] (kcal mol ⁻¹)
1	ln(A/A ₀) = 1.87 × 10 ⁻¹ + 7.6 × 10 ⁻⁵ t (N = 12, R = 0.98, σ = 0.000005)	7.6	52.8	20.73
2	ln(A/A ₀) = 1.66 × 10 ⁻¹ + 7.2 × 10 ⁻⁵ t (N = 12, R = 0.98, σ = 0.000005)	7.2		
		(7.4 ± 0.3)		
B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d)			ε: 20.30 [δ: 20.45]	
L1: CAM-B3LYP/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//			ε: 20.71 [δ: 20.86]	
L2: LC-ωPBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//			ε: 20.74 [δ: 20.23]	

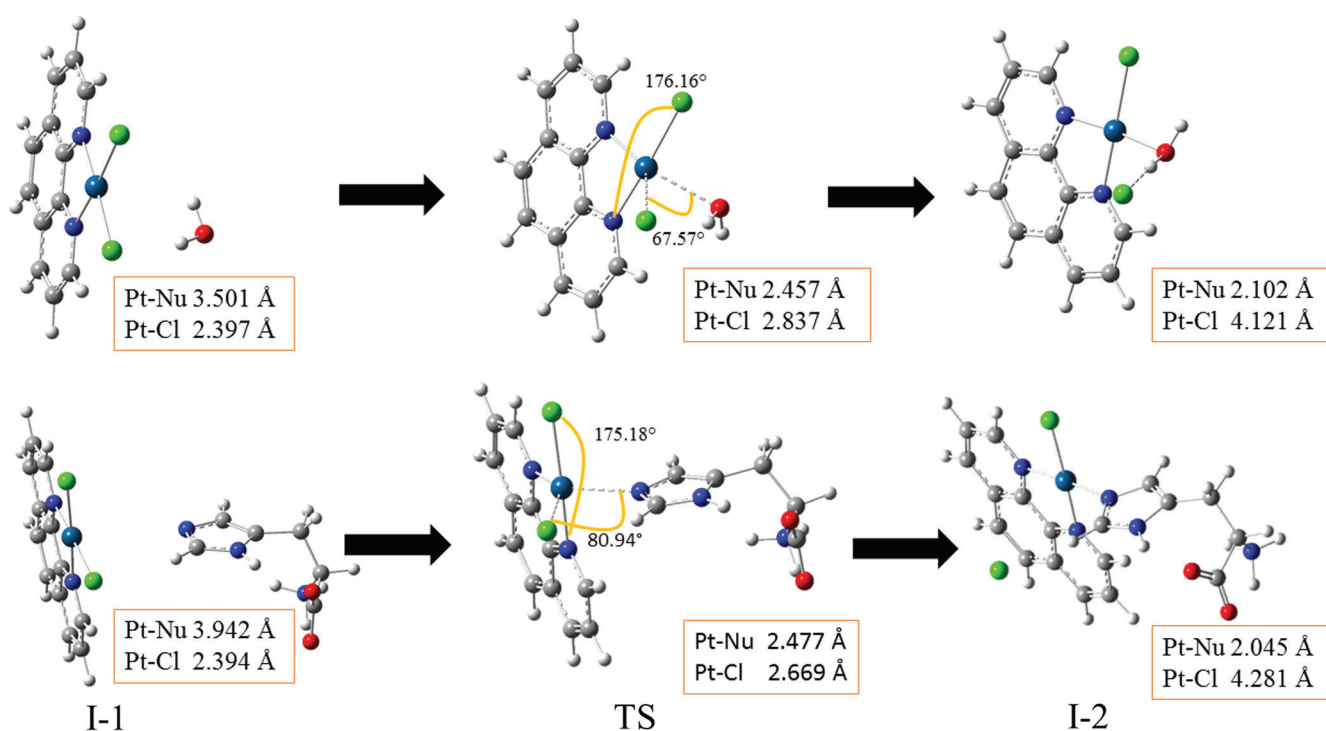


Fig. 2. Optimized geometries for the reactive species involved in the reaction of pt01 with H₂O and HIS, namely: I-1 (reagent), TS, I-2 (product). The structures were calculated in aqueous solution at B3LYP/LanL2DZ/6-31G(d) level.

chain, wherein the C–H bond was headed towards the chloride leaving group.

The previous analysis allowed the molecular view of the ligand exchange process, and the compliance between the theory and the experiment supports the herein applied level of theory,

mainly the DFT at L2 level. The reactivity of complexes pt01 and pt02 against other AA residues was assessed in the last part of the current study. The chosen AAs were the ones found in the Aβ structure, namely: MET, LYS, GLU, ASN, ASP, besides HIS and H₂O.

Table 3Calculated kinetic and thermodynamic properties at 298.15 K of the reaction between Pt(II)-complexes and amino acids (LC- ω PBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//).

		ΔH^\ddagger kcal mol ⁻¹	ΔG^\ddagger kcal mol ⁻¹	k/s ⁻¹	ΔH_R kcal mol ⁻¹	ΔG_R kcal mol ⁻¹
pt01	MET	17.115	17.986	4.1×10^{-1}	-2.150	-2.774
	LYS	15.367	18.110	3.3×10^{-1}	-10.965	-8.915
	HIS(δ)	16.941	18.683	1.3×10^{-1}	-9.694	-8.511
	HIS(ϵ)	17.001	20.153	1.1×10^{-2}	-9.952	-7.706
	GLU	16.967	20.176	1.0×10^{-2}	-7.532	-7.274
	ASP	20.124	20.438	6.5×10^{-3}	-1.374	-3.157
	H ₂ O	23.330	25.290	1.8×10^{-6}	4.089	4.855
	ASN	28.637	30.107	5.3×10^{-10}	12.828	15.022
	GLN	26.403	31.445	5.5×10^{-11}	8.839	12.263
pt02	MET	17.251	18.122	3.2×10^{-1}	-2.129	-2.753
	LYS	15.408	18.152	3.1×10^{-1}	-11.1384	-9.089
	HIS(δ)	17.210	18.952	7.9×10^{-2}	-10.637	-9.454
	HIS(ϵ)	16.961	20.113	1.1×10^{-2}	-9.886	-7.640
	GLU	16.920	20.129	1.1×10^{-2}	-7.500	-7.242
	ASP	20.137	20.451	6.3×10^{-3}	-1.461	-3.245
	H ₂ O	25.070	25.573	2.6×10^{-6}	3.807	4.073
	ASN	28.581	30.050	5.8×10^{-10}	12.599	14.793
	GLN	26.407	31.449	5.5×10^{-11}	9.954	13.378

The results at level L2 are shown in Table 3, which included the kinetic and thermodynamic parameters. The reaction using MET was assumed to be the fastest one, based on the kinetic data; regardless of the considered pt01 or pt02. The MET reaction was followed by the LYS and HIS ones, which presented more thermodynamically favorable reactions. The reactivity order of the most important residues, based on the rate constant, was MET > LYS > HIS; the reactions using LYS and HIS appeared to be the most exergonic ones. Indeed, the activation barriers in these three AAs were approximately 18 kcal mol⁻¹, but the reaction free energy differed by more than 5 kcal mol⁻¹ in favor of LYS and HIS. Therefore, the thermodynamics should drive the binding process between the Pt(II)-complexes and the residues presented in the A β peptide, the LYS and HIS found as potential targets.

4. Conclusions

The previously described study accomplished the experimental and theoretical analyses of the interaction between two Pt(II) complexes and the amino acids found in the A β peptide, which is a potential target for Alzheimer disease chemotherapy. The aim of the study was to identify the main binding sites in the peptide according to the kinetic and thermodynamic grounds. The reactions of pt01 derivative with H₂O and HIS were investigated at first; the experimental activation free energy showed 26.94 kcal mol⁻¹ in the solvolysis step; and 20.73 kcal mol⁻¹, in the direct replacement of Cl by HIS. These data met the calculated values at LC- ω PBE/SDD(spdf)/6-31+G(2df)//: 25.54 and 20.74 kcal mol⁻¹, respectively. Furthermore, the very same level of theory was used for reaction between the pt01 and pt02 complexes and seven amino acids, which were considered potential target of the Pt(II) complexes, namely, MET, LYS, HIS, GLU, ASP, ASN and GLN. The activation free energy ranged from ~17 to ~31 kcal mol⁻¹, regardless of the complex, and it has increased in the order of GLN > ASN > ASP > GLU > HIS > LYS > MET. On the other hand, the reaction free energy suggested the binding to HIS and LYS as the most favorable one. Considering very close rate constants (in units of 10⁻¹ s⁻¹) for MET (3.2–4.1), LYS (3.1–3.3) and HIS (0.1–1.3), we concluded that the Pt(II)-complex binding should be driven by thermodynamics, with the LYS and HIS suggested as potential targets.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (485779/2013-7), FAPEMIG and CAPES for supporting this project.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2016.11.025>.

References

- [1] L.E. Hebert, J. Weuve, P.A. Scherr, D.A. Evans, *Neurology* 80 (2013) 1778.
- [2] M.P. Mattson, *Nature* 430 (2004) 7000.
- [3] W.R. Markesbery, M.A. Lovell, *J. Neurol. Sci.* 19 (1998) 1.
- [4] M.A. Lovell, J.D. Robertson, W.J. Teesdale, J.L. Campbell, W.R. Markesbery, *J. Neurol. Sci.* 158 (1998) 1.
- [5] J. Ali-Torres, J.D. Maréchal, L. Rodríguez-Santiago, M. Sodupe, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 38.
- [6] K.J. Barnham, V.B. Kenche, G.D. Ciccotosto, D.P. Smith, D.J. Tew, X. Liu, K. Perez, G.A. Cranston, T.J. Johanssen, I. Volitakis, A.I. Bush, C.L. Masters, A.R. White, J.P. Smith, R.A. Cherny, R. Cappai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 19.
- [7] S. Tomaselli, V. Esposito, P. Vangone, N.A.J. van Nuland, A.M.J.J. Bonvin, R. Guerrini, T. Tancredi, P.A. Temussi, D. Picone, *ChemBioChem* 7 (2006) 2.
- [8] V.A. Streltsov, V. Chandana Epa, S.A. James, Q.I. Churches, J.M. Caine, V.B. Kenche, K.B. Barnham, *Chem. Commun.* 49 (2013) 11364.
- [9] G. Ma, E. Wang, H. Wei, K. Wei, P. Zhu, Y. Liu, *Metalomics* 5 (2013) 879.
- [10] G. Ma, F. Huang, X. Pu, L. Jia, T. Jiang, L. Li, Y. Liu, *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 11657.
- [11] F. Collin, I. Sasaki, H. Eury, P. Faller, C. Hureau, *Chem. Commun.* 49 (2013) 2130.
- [12] D.J. Hayne, S. Lim, P.S. Donnelly, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 6701.
- [13] A. Caragounis, T. Du, G. Filiz, K.M. Laughton, I. Volitakis, R.A. Sharples, R.A. Cherny, C.L. Masters, S.C. Drew, A.F. Hill, Q. Li, P.J. Crouch, K.J. Barnham, A.R. White, *Biochem. J.* 407 (2007) 435.
- [14] M. Turner, J.A. Platts, R.J. Deeth, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 1385.
- [15] J.H. Price, A.N. Williamson, R.F. Schramm, B.B. Wayland, *Inorg. Chem.* 11 (1972) 6.
- [16] A. Djeković, B. Petrović, Ž.D. Bugarčić, R. Puchta, R. van Eldik, *Dalton Trans.* 41 (2012) 3633.
- [17] G. Scalmani, M.J. Frisch, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 114110.
- [18] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
- [19] P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 270.
- [20] P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 284.
- [21] P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 299.
- [22] D. Andrae, U. Haeussermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuss, *Theor. Chem. Acc.* 77 (1990) 123.
- [23] O.A. Vydrov, G.E. Scuseria, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 234109.
- [24] T. Yanai, D. Tew, N. Handy, *Chem. Phys. Lett.* 393 (2004) 51–57.
- [25] D. Paschoal, B.L. Marcial, J.F. Lopes, W.B. De Almeida, H.F. Dos Santos, *J. Comput. Chem.* 33 (2012) 29.
- [26] A. Bergner, M. Dolg, W. Kuechle, H. Stoll, H. Preuss, *Mol. Phys.* 80 (1993) 1431.
- [27] J.V. Burda, M. Zeizinger, J. Sponer, J. Leszczynski, *J. Chem. Phys.* 113 (2000) 2224.
- [28] M.J. Frisch et al., GAUSSIAN 09, Revision A.02, GAUSSIAN Inc, Wallingford, CT, 2009.
- [29] A.L. Grzesiak, A.J. Matzger, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 453.
- [30] A. Gaballa, C. Wagner, H. Schmidt, D. Steinborn, Z. Anorg. Allg. Chem. 629 (2003) 703.
- [31] S.E. Miller, D.A. House, *Inorg. Chim. Acta* 161 (1989) 131.
- [32] S.E. Miller, D.A. House, *Inorg. Chim. Acta* 166 (1989) 189.
- [33] Z. Chval, M. Sip, *J. Mol. Struct. Theochem.* 532 (2000) 59.