

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

Eduardo Ribeiro Almeida

DINÂMICA MOLECULAR DE NANOHORNS DE CARBONO (NHC):
POTENCIAIS AGENTES CARREADORES DE COMPLEXOS
ANTITUMORAIS DE Pt(II)

Juiz de Fora

2019

Eduardo Ribeiro Almeida

DINÂMICA MOLECULAR DE NANOHORNS DE CARBONO:
POTENCIAIS AGENTES CARREADORES DE COMPLEXOS
ANTITUMORAIS DE Pt(II)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química,
área de concentração: Físico-Química, da
Universidade Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Hélio Ferreira dos Santos

Juiz de Fora

2019

À minha querida avó materna Heloysa Helena (*in memoriam*) que continua sendo um exemplo admirável de resiliência por sua longa luta contra o câncer. Saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar nos momentos de alegria e de dificuldade.

Aos meus pais, Ana Cláudia e Cleumar, pelo constante incentivo, carinho, compreensão e apoio em minha caminhada.

À minha irmã Natália, pela grande amizade, carinho e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu caro orientador Hélio Ferreira dos Santos, pela excelente orientação e atenção dedicadas aos avanços desse trabalho. Agradeço pelas ideias, elogios e críticas que ajudaram na evolução dos meus primeiros passos como um pesquisador.

Ao professor Luiz Antônio, pelas conversas, sugestões e elogios em minhas apresentações e aulas no estágio em docência.

Ao meu orientador da graduação e professor Emílio Borges da Universidade Federal de Viçosa, por ter sido o responsável pelo meu primeiro contato com universo da química teórica/computacional.

Aos professores Priscila e Cleber, por terem aceitado o convite para compor a banca de avaliação.

Aos amigos de pós-graduação e graduação do NEQC, Jhonnathan, Nathália, Yuliana, Júlio, Luã, Rodrigo, Maria Eduarda e João Marcos, pela convivência harmoniosa, conversas, almoços no RU, cafés e apoio nos momentos de alegria e de dificuldade.

Em especial ao Luã, pela orientação nos meus primeiros passos na utilização do LINUX e nos tutoriais do AMBER quando iniciei o mestrado. E ao Júlio, por estar sempre disposto a ajudar, trocar ideias em qualquer dúvida, e pelas orientações no preparo de imagens no VMD.

Também em especial, ao Jhonnathan que chegou a pouco tempo no nosso grupo de pesquisa (NEQC- Núcleo de Estudos em Química Computacional) e que rapidamente se tornou um grande amigo. Obrigado pela amizade e o excelente bom humor que sempre resultavam em gargalhadas, mesmo durante os momentos críticos da pós-graduação.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, onde cursei o mestrado.

“Nós somos uma maneira do Cosmos conhecer a si mesmo.”

Carl Sagan

RESUMO

A quimioterapia envolvendo fármacos a base de Pt(II), como a cisplatina, tem demonstrado resultados efetivos no combate a células cancerosas, apesar dos severos efeitos colaterais devido à alta toxicidade associada com a baixa seletividade desses agentes antitumorais. Uma potencial alternativa para contornar essa problemática ou reduzir os efeitos colaterais consiste da utilização dos sistemas carreadores de fármacos que podem, além de proteger e carrear altas doses de fármaco, também promover a sua liberação lenta e direcionada para os sítios tumorais. Nessa perspectiva, utilizando o método da dinâmica molecular, esse trabalho teve como objetivo a investigação e a caracterização do comportamento dinâmico de complexos de inclusão $cddp@NHC$, constituídos pela cisplatina (cddp) encapsulada em modelos de *nanohorns* de carbono (NHC), em solução aquosa. Com relação a esses nanocarreadores a base de carbono, avaliou-se tanto a potencialidade de modelos prístinos, que se diferenciavam em função do ângulo de abertura do cone, quanto de modelos oxidados (NHCox) e reduzidos (NHCh) que se distinguem em termos do tamanho das *nanowindows* funcionalizadas resultantes de diferentes graus de oxidação e redução. Os resultados indicaram a presença de até 36 moléculas de água no interior das cavidades dos NHC prístinos, dependendo no ângulo de cone e da presença da cddp. Algumas dessas moléculas de solvente foram expulsas com a inclusão da cddp, apesar de mais de 10 terem permanecido confinadas. Em contraste, complexos com modelos de NHCox e NHCh comportaram até 17 e 15 moléculas de solvente, respectivamente. O aumento do grau de oxidação também se mostrou relevante para a ampliação da área acessível ao solvente e, conseqüentemente, para a redução da hidrofobicidade dos NHC. A obstrução das *nanowindows* funcionalizadas impossibilitou o efeito da liberação da cddp. Como reportado em estudos experimentais, as energias livre de ligação ($\Delta_b G$) calculadas apontaram que a formação de todos os complexos de inclusão estudados foi termodinamicamente favorável em solução aquosa, o que sugeriu a potencialidade dessas nanoestruturas como carreadoras de fármacos. Enquanto para os complexos com o NHC prístino mais favorável a $\Delta_b G$ média foi de -35 e -79 kcal.mol⁻¹ para a inclusão de uma e duas cddp, no caso daqueles com os NHCox e NHCh, os referidos valores foram de -47 e -77 kcal.mol⁻¹ e de -40 e -74 kcal.mol⁻¹ respectivamente, sendo que a maior parte dessa estabilidade foi proveniente das contribuições de *van der Waals*.

Palavras-chave: *Nanohorns* de carbono. Sistemas carreadores de fármacos. Cisplatina. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Chemotherapy involving Pt(II)-based drugs, such as cisplatin, has demonstrated effective results against cancer cells, despite the severe side effects due to the high toxicity associated with the low selectivity of these antitumor agents. A potential alternative to overcome or decrease the side effects is to use drug delivery systems, which can provide protection against degradation, carry high doses of the anticancer drug and promote its slow and targeted release to the tumor sites. Herein, by using the molecular dynamics method, the purpose of this work was to investigate and characterize the dynamical behavior of the inclusion complexes cddp@CNH , formed by the encapsulated cisplatin (cddp) inside carbon nanohorns (CNH) models, in aqueous solution. In relation to these nanocarriers based on carbon atoms, it was evaluated the potentiality of both pristine models with different opening cone angles, and oxidized (CNHox) and reduced (CNHh) models, which were distinguished in terms of the size of the functionalized nanowindows generated by oxidation and reduction stages. The results indicated the presence of up to 36 water molecules inside the empty CNH cavity, depending on the cone angle and the presence of the cddp. Some of these solvent molecules are expelled out to the bulky upon cddp inclusion, although more than 10 molecules remain confined. In contrast, the complexes including CNHox and CNHh prototypes carried up to 17 and 15 solvent molecules, respectively. The increase in the degree of oxidation was also relevant for the expansion of the solvent accessible surface area, and consequently, for the hydrophobicity reduction of CNH. The effect of cddp release was made impossible by the obstruction of functionalized nanowindows. Moreover, as reported in experimental studies, the calculated binding free energy ($\Delta_b G$) pointed out that the inclusion complexes formation between CNH structures and up to two cddp molecules was thermodynamically favorable in aqueous media, which suggests the potential of this carbon nanostructures as drug carriers. While for the complexes with the most likely pristine CNH the average $\Delta_b G$ was -35 and -79 kcal mol⁻¹ for inclusion of one and two cddp, respectively, for the complexes with CNHox and CNHh the referred values of the average $\Delta_b G$ were -47 e -77 kcal mol⁻¹ and -40 e -74 kcal mol⁻¹ respectively, with most of the complex stability coming from the van der Waals contributions.

Keywords: Carbon nanohorns. Drug delivery systems. Cisplatin. Molecular dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Complexos de Pt(II) com atividade antitumoral: cisplatina (1), carboplatina (2), oxaliplatina (3), nedaplatina (4) e lobaplatina (5).	24
Figura 2. Dimensões do agregado <i>dahlia</i> de NHC (a) e de um NHC individual típico (b). ...	27
Figura 3. Esquema do processo de produção em larga escala dos NHC brutos.....	28
Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução do aglomerado de NHC oxidados, que é conhecido como estrutura <i>dahlia</i> , com os <i>clusters</i> de fármacos cisplatina encapsulados.....	30
Figura 5. As seis estruturas otimizadas dos modelos de NHC prístinos no nível B3LYP/6-31G(d,p) selecionado para os estudos.	37
Figura 6. Mecanismo de oxidação (Da Silva & Dos Santos, 2017) utilizado para a construção da série de topologias de NHCox.	39
Figura 7. Esquema das dimensões da caixa de simulação octaédrica utilizada.	42
Figura 8. Avaliação do protocolo de simulação por dinâmica molecular da cisplatina em solução aquosa.....	46
Figura 9. Análise do protocolo de simulação do modelo NHC5a.....	49
Figura 10. Variação temporal do desvio quadrático médio (RMSD) e flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF) do NHC5a.	50
Figura 11. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w , definidas entre o centro de massa da nanoestrutura de carbono e os átomos de oxigênio das moléculas de solvente (água), para os modelos de NHC prístinos.	52
Figura 12. <i>Snapshots</i> finais das trajetórias da dinâmica molecular de cada modelo NHC prístino destacando apenas o número médio de moléculas de água encapsuladas.....	54
Figura 13. Variação temporal da superfície acessível ao solvente (SASA) dos modelos de NHC prístinos.	55
Figura 14. Estruturas finais das trajetórias dos doze complexos cddp@NHC, incluindo uma (1com) e duas moléculas de cisplatina (2com) encapsuladas.....	57
Figura 15. Comportamento dinâmico da molécula de cisplatina no interior da cavidade do NHC para os complexos 1com5a (a) e 2com5a (b).....	59
Figura 16. Distâncias médias ($\langle d \rangle$) entre o átomo de carbono central da extremidade cônica de cada modelo de NHC prístino e o centro de massa da cisplatina para os complexos com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.....	60

Figura 17. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w , definidas entre o centro de massa dos modelos de NHC prístinos e os átomos de oxigênio (O _w) das moléculas de solvente (água), para os NHC puros e os complexos cddp@NHC.....	61
Figura 18. <i>Snapshots</i> finais da trajetória de 100 ns de dinâmica molecular dos modelos NHC5a, 1com5a e 2com5a, representando apenas a distribuição de moléculas de água referentes à camada interna de solvatação definida pelo número de coordenação NC2 da Tabela 8.	63
Figura 19. Ciclo termodinâmico para o cálculo das energias livre de ligação ($\Delta_b G$) dos complexos cddp@NHC (nesse exemplo para o modelo 1com5a).	65
Figura 20. Valores médios da $\Delta_b G$ (a), ΔE_{vdw} (b) e da ΔE_{ele} (c) ao longo do <i>ensemble</i> conformacional constituído por 1.000 estruturas para cada um dos doze modelos de complexos cddp@NHC.....	67
Figura 21. Evolução das energias livre de solvatação para o receptor (NHC5a), ligante (cddp-cddp), complexo cddp@NHC e do valor da diferença entre essas componentes do complexo 2com5a durante os 100 ns.....	69
Figura 22. Modelos de NHCox e as suas respectivas <i>nanowindows</i> resultantes dos quatro diferentes graus de oxidação.....	73
Figura 23. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w definidas entre o centro de massa de cada nanocarreador de carbono (NHCox-n com n = 1 - 4 e NHC5a) e os átomos de oxigênio das moléculas de água.	76
Figura 24. Comportamento da SASA (<i>solvent accessible surface area</i>) em função dos 20.000 <i>frames</i> da etapa de produção da dinâmica molecular dos quatro modelos de NHCox e do NHC5a.....	78
Figura 25. <i>Snapshots</i> finais das trajetórias de 100 ns de dinâmica molecular dos oito modelos de complexos cddp@NHCox com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.	80
Figura 26. Comportamento dinâmico da cisplatina na cavidade do modelo NHCox4 nos complexos 1com5ox4 (a) e 2com5ox4 (b).	82
Figura 27. Distâncias médias ($\langle d \rangle$) entre o átomo de carbono central da extremidade cônica de cada modelo de NHCox e o centro de massa da cisplatina para os complexos com uma (1com) e duas (2com) unidades dessa metalodroga encapsulada.....	83

Figura 28. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w dos complexos cddp@NHCox definidas entre o centro de massa dos NHCox e os átomos de oxigênio das moléculas de água.....	85
Figura 29. Estruturas finais (<i>frames</i> 20.000/20.000) dos modelos de NHCox4, 1com5ox4 e 2com5ox4, mostrando apenas a distribuição de moléculas de água relacionadas com a camada interna de solvatação definida pelo número de coordenação NC2 da Tabela 14.	87
Figura 30. Valores médios da $\Delta_b G$ (a), ΔE_{vdw} (b) e ΔE_{ele} (c) calculados a partir do <i>ensemble</i> conformacional contendo 1.000 estruturas (<i>frames</i>) selecionados das trajetórias dos modelos de complexos cddp@NHCox.....	90
Figura 31. Variação temporal das energias livre de solvatação para o receptor (NHCox4), ligante (dímero de cisplatina), complexo cddp@NHCox4 e do valor da diferença entre essas componentes ao longo dos 100 ns de simulação.....	92
Figura 32. Comparação das dimensões médias do protótipo NHCox4 e das moléculas de cisplatina e água representadas pelos modelos <i>ball and stick</i> (a) e <i>van der waals spheres</i> (b).	95
Figura 33. Modelos de NHC reduzidos (NHCh) com destaque para as suas <i>nanowindows</i> reduzidas que, a princípio, foram geradas ao longo dos quatro diferentes estágios de oxidação.....	97
Figura 34. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w para as séries de modelos de NHC reduzidos (NHCh) e oxidados (NHCox).	100
Figura 35. Estruturas finais (<i>frames</i> 20.000/20.000) das simulações dos oito protótipos de complexos cddp@NHCh incluindo uma (1com) e duas (2com) unidades de cisplatina encapsuladas.	104
Figura 36. Comportamento da mobilidade da cisplatina na cavidade do modelo NHCh4 nos complexos 1com5h4 (a) e 2com5h4 (b).	106
Figura 37. Distribuição espacial do fármaco cisplatina nos complexos 2com5a (a), 2com5ox4 (b) e 2com5h4 (c), ao longo do tempo de 100 ns de simulação.	108
Figura 38. Valores médios das distâncias ($\langle d \rangle$) entre o átomo de carbono central da extremidade cônica de cada modelo de NHCh e o centro de massa da cisplatina para os complexos cddp@NHCh com uma (1com) e duas (2com) moléculas desse fármaco. ...	109

Figura 39. Comparação das distâncias médias ($\langle d \rangle$) entre o centro de massa da cisplatina e a extremidade cônica dos NHC para as 3 séries de complexos estudadas: cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh.....	110
Figura 40. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w dos complexos cddp@NHCh definidas entre o centro de massa dos NHCh e os átomos de oxigênio das moléculas de água.....	111
Figura 41. <i>Snapshots</i> finais das trajetórias de 100 ns dos modelos de NHCh4, 1com5h4 e 2com5h4, destacando apenas a distribuição das moléculas de água referentes ao número de coordenação NC2 da Tabela 21.	113
Figura 42. Comparação dos valores médios da sasa (<i>solvent accessible surface area</i>) para cada uma das três classes de complexos de inclusão: cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh.	115
Figura 43. Valores médios da $\Delta_b G$ (a) e ΔE_{vdw} (b) calculados a partir de uma amostra de 1.000 estruturas (<i>frames</i>) selecionados das trajetórias complexos cddp@NHCh.	117
Figura 44. Variação temporal das energias livre de solvatação para o receptor (NHCh4), do ligante (dímero de cisplatina), do complexo cddp@NHCox4 e do valor da diferença entre essas componentes ao longo dos 100 ns de simulação.	119
Figura 45. Comparação dos valores médios em kcal mol ⁻¹ das componentes da energia livre de solvatação ($\delta\Delta G_{solv}$) dos complexos 2com5a, 2com5ox4 e 2com5h4.	120
Figura 46. Comparação das estabilidades ($\Delta_b G_{total}$) entre as três séries simuladas de complexos de inclusão: cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh.	121
Figura 47. Variação do RMSD em função dos <i>frames</i> referentes às quatro trajetórias de simulação que somam o tempo total de 1,0 μ s de simulação do complexo 2com5ox4.	123
Figura 48. Evolução temporal da energia potencial do complexo 2com5ox4 em solução aquosa, ao longo das quatro trajetórias de simulação que contabilizam o tempo total de 1,0 μ s de simulação.	124
Figura 49. Comparação das dimensões médias dos modelos de NHCh4 e das moléculas de cisplatina e água utilizando as representações <i>ball and stick</i> (a) e <i>van der waals spheres</i> (b).	125
Figura A.1. Movimentos modelados pelos potenciais intramoleculares: (a) comprimento de ligação, (b) deformação angular, (c) deformação diedral e (d) deformação de diedros impróprios.....	142

Figura A.2. Etapas principais de um algoritmo de simulação por dinâmica molecular clássica.	146
Figura A.3. <i>Ensemble</i> canônico com η réplicas, cada uma com N partículas e volume V ...	151
Figura A.4. Esquema da definição de uma função de distribuição radial (RDF).....	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agentes quimioterápicos.	23
Tabela 2. Fórmulas moleculares e parâmetros geométricos da série de modelos de NHC pristinos.	38
Tabela 3. Parâmetros intramoleculares da cisplatina.....	44
Tabela 4. Cargas atômicas chelpg (q_i) e parâmetros do potencial de Lennard-Jones (ϵ e σ) para a cisplatina.	45
Tabela 5. Valor médio e desvio padrão (std) do RMSD em função do tempo calculado a partir da trajetória da produção de cada modelo da série de NHC pristinos.	50
Tabela 6. Dados das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w referentes aos seis modelos de NHC pristinos.	53
Tabela 7. Valores médios do RMSD de cada modelo de complexo cddp@NHC com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.....	58
Tabela 8. Posições dos picos e números de coordenação das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w , definidas entre o centro de massa dos modelos de NHC e os átomos de oxigênio das moléculas de água, dos complexos cddp@NHC com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina.	62
Tabela 9. Valores médios das energias livres de ligação ($\langle \Delta_b G \rangle$) e de suas componentes energéticas (em kcal mol ⁻¹) referentes aos doze protótipos de complexos do tipo cddp@NHC.	66
Tabela 10. Contribuições entrópicas em kcal mol ⁻¹ dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais dos modelos de complexos cddp@NHC.	70
Tabela 11. RMSD médio do NHC5a pristino e dos quatro modelos de NHCox em diferentes graus de oxidação ao longo da trajetória de 100 ns da etapa de produção de cada modelo.	74
Tabela 12. Dados das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w definidas entre o centro de massa dos modelos de NHCox em diferentes graus e o átomo de oxigênio das moléculas de água.	77
Tabela 13. Valor médio do RMSD dos complexos cddp@NHCox e do complexo cddp@NHC5a, incluindo uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.	81

Tabela 14. Dados das RDF $g(r)$ CM--O _w , que são definidas entre o centro de massa dos modelos de NHC e os átomos de oxigênio das moléculas de água, dos complexos de inclusão cddp@NHCox e daqueles incluindo o NHC5a pristino (1com5a e 2com5a)....	86
Tabela 15. Valores médios da SASA (<i>solvent accessible surface area</i>) calculados a partir das trajetórias de 100 ns da dinâmica molecular de cada um dos modelos de NHCox e dos complexos cddp@NHCox.....	88
Tabela 16. Valores médios de energia livre de ligação ($\langle\Delta_bG\rangle$) e de suas componentes energéticas (em kcal mol ⁻¹) referentes aos modelos de complexos cddp@NHCox.....	89
Tabela 17. Contribuições entrópicas dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais dos modelos de complexos cddp@NHCox.	93
Tabela 18. Comparação dos valores de RMSD médio dos modelos de NHC pristino, oxidados e reduzidos referentes ao tempo de simulação de 100 ns.....	99
Tabela 19. Dados das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O _w definidas entre o centro de massa dos modelos de nhc oxidados (NHCox) e reduzidos (NHCh) e o átomo de oxigênio das moléculas de água.	101
Tabela 20. Comparação dos valores médios da SASA (<i>solvent accessible surface area</i>) referentes às trajetórias de 100 ns dos modelos de NHCox, NHCh e do NHC5a (pristino).	102
Tabela 21. Valor médio do RMSD de cada complexo cddp@NHCh incluindo uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.	105
Tabela 22. Dados das funções de distribuição do tipo $g(r)$ CM--O _w dos protótipos de complexos de inclusão cddp@NHCh e daqueles constituídos pelo NHC5a (pristino)..	112
Tabela 23. Valores médios da SASA (<i>solvent accessible surface area</i>) dos modelos de NHCh e dos complexos cddp@NHCh calculados a partir das trajetórias de 100 ns desses sistemas.....	114
Tabela 24. Valores médios de energia livre de ligação ($\langle\Delta_bG\rangle$) e de suas componentes energéticas referentes aos protótipos cddp@NHCh.	116
Tabela 25. Contribuições entrópicas dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais dos modelos de complexos cddp@NHCh.	122

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AM1-BCC	<i>AustinModell population charges with simple additive bond charge corrections</i>
B3LYP	<i>Becke 3-Parameter (Exchange), Lee, Yang and Parr (correlation) functional</i>
BSSE	<i>Basis set superposition error</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cddp	cisplatina (<i>cis</i> -diaminodicloroplatina(II))
ChelpG	<i>Charges from electrostatic potential, grid method</i>
CM	Centro de massa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CP	<i>Counterpoise method</i>
DDS	<i>Drug delivery systems</i>
DFT	<i>Density functional theory</i>
DM	Dinâmica molecular
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
GAFF	General Amber Force Field
HF	<i>Hartree-Fock</i>
IEFPCM	<i>Integral equation formalism polarizable continuum model</i>
LJ	<i>Lennard-Jones</i>
n	Número de pentágonos na região cônica dos <i>nanohorns</i> de carbono
NC	Número de coordenação
NHC	<i>Nanohorns</i> de carbono (modelos prístinos)
NHCh	<i>Nanohorns</i> de carbono reduzidos
NHCox	<i>Nanohorns</i> de carbono oxidados

NTC	Nanotubos de carbono
NTCox	Nanotubo de carbono oxidado
MM-GBSA	<i>Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area method</i>
MP2	<i>Møller-Plesset Second-Order Perturbation Theory</i>
PCM	<i>Polarizable continuum model</i>
RESP	<i>Restrained electrostatic potential</i>
RDF	<i>Radial distribution function</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
SEP	Superfície de energia potencial
std	<i>Standard deviation</i>
vdW	<i>van der Waals</i>
θ	Ângulo de cone
k_b	Constante de força de estiramento de ligação
r_{eq}	Comprimento de ligação
k_θ	Constante de força de deformação angular
Θ_{eq}	Ângulo de equilíbrio
K_d	Barreira de torção
$r_{i,j}$	Distância entre os átomos i e j
ϵ	Profundidade do poço de potencial
σ	Distância internuclear onde o potencial se anula
q_i	Carga do átomo i
$\Delta_b G$	Energia livre de ligação
ΔG_{solv}	Energia livre de solvatação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 CÂNCER.....	19
1.2 A QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER E AS CLASSES DE QUIMIOTERÁPICOS.....	21
1.3 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE Pt(II)	22
1.4 <i>NANOHORNS</i> DE CARBONO: POTENCIAIS CARREADORES DE FÁRMACOS.....	26
1.5 ESTUDOS TEÓRICOS DOS <i>NANOHORNS</i> DE CARBONO	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 PARAMETRIZAÇÃO DE CAMPO DE FORÇA	34
3.1.1 Cisplatina	35
3.1.2 Nanohorns de carbono	36
3.2 CONSTRUÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO <i>cddp@NHC</i>	41
3.3 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 PARÂMETROS DO CAMPO DE FORÇA.....	44
4.2 SIMULAÇÕES POR DM DOS NHC PRISTINOS.....	47
4.3 SIMULAÇÕES POR DM DOS COMPLEXOS <i>cddp@NHC</i>	56
4.4 MODELAGEM DOS NHC OXIDADOS	71
4.5 SIMULAÇÕES POR DM DOS NHC OXIDADOS	74
4.6 SIMULAÇÕES POR DM DOS COMPLEXOS <i>cddp@NHCox</i>	79
4.7 MODELAGEM DOS NHC REDUZIDOS	95
4.8 SIMULAÇÕES POR DM DOS NHC REDUZIDOS	98
4.9 SIMULAÇÕES POR DM DOS COMPLEXOS <i>cddp@NHCh</i>	102
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	127
REFERÊNCIAS	130

A. APÊNDICE – FORMALISMO TEÓRICO	139
A.1 DINÂMICA MOLECULAR	139
A.1.1 Superfície de energia potencial	140
A.1.2 Dinâmica molecular clássica	145
A.1.3 Ensembles	149
A.1.4 Etapas da simulação por dinâmica molecular	154
<i>A.1.4.1 Minimização</i>	155
<i>A.1.4.2 Aquecimento e equilibração</i>	156
<i>A.1.4.3 Produção e análises</i>	159
A.2 METODOLOGIA MM-GBSA	162

1. INTRODUÇÃO

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde publicou em seu relatório intitulado *Guide to Cancer Early Diagnosis* que anualmente, a estimativa mundial para o número de diagnósticos de câncer ultrapassava a faixa de 14 milhões, e que apenas em 2015 a mortalidade acarretada pela doença chegou a 8,8 milhões de casos na população global. Segundo o documento, esse cenário crítico assola principalmente os países em desenvolvimento, nos quais os diagnósticos tardios associados à menor acessibilidade a tratamentos contribuem ainda mais para a taxa de letalidade do câncer (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2017).

No Brasil, a situação também é alarmante, uma vez que 60% dos portadores de câncer obtêm o diagnóstico da doença já em estágio avançado, conforme indicado nos relatórios publicados pelo Instituto Nacional do Câncer - INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017). Esse órgão auxiliar do Ministério da Saúde ainda contabilizou em suas estimativas para o biênio 2018-2019, 600 mil novos casos por ano dessa doença no território brasileiro, cujo perfil de incidência envolve principalmente os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

Diante a esse crescente problema de saúde pública global, envolvendo política e economia, o câncer tem sido alvo de pesquisas em diferentes áreas do conhecimento correlacionadas com a oncologia, com o intuito de promover melhorias em seu diagnóstico e tratamento.

1.1 CÂNCER

O termo câncer engloba uma série de doenças complexas que possuem como característica comum a multiplicação desordenada de células de uma determinada parte do corpo humano que se tornam invasivas e formam os chamados tumores. Esse comportamento se opõe ao ciclo de uma célula normal que se subdivide em etapas como a formação, o crescimento, a divisão para formar novas células conforme a demanda do corpo, o envelhecimento e a morte celular (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017). Além de não responderem a sinais biológicos do corpo e serem menos especializadas do que as células normais, as células cancerosas podem induzir células sadias nas vizinhanças a formarem vasos sanguíneos com o intuito de nutrir os tumores, e até mesmo promover a substituição

celular, acarretando na perda das funções dos tecidos invadidos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017). Se o desenvolvimento das células cancerosas é lento e forma uma massa celular localizada com uma pseudocápsula fibrosa, o tumor é classificado como uma neoplasia benigna ou um tumor benigno que, em geral, não exibe um risco de vida. Por outro lado, uma neoplasia maligna ou tumor maligno se caracteriza por uma multiplicação celular acelerada, a qual representa um grande risco, uma vez que esse tumor pode atingir o estágio da metástase, no qual as células cancerosas invadem a corrente sanguínea e os vasos linfáticos, atingindo órgãos vizinhos ou distantes, o que configura o estágio crítico e letal da doença (SUDHAKAR, 2009).

Além do crescimento rápido, destrutivo e infiltrativo, as neoplasias malignas possuem um alto grau de diferenciação celular com relação às células que as originaram. Especificamente, a análise da morfologia dessas células no microscópico indica características típicas como irregularidades no citoplasma, alterações na membrana celular e atipias nos núcleos, em termos tanto do formato, quanto nas dimensões e cromatismo (MANUAL DE BASES TÉCNICAS DA ONCOLOGIA, 2013).

O mecanismo de desenvolvimento de um câncer está diretamente relacionado com alterações no DNA durante o ciclo das células normais. Essas mutações podem ser provenientes de fatores externos, como a exposição e a interação com ambiente, e por fatores internos como a carga hereditária (SUDHAKAR, 2009). Entretanto, estudos revelam que a incidência de câncer atribuída a fatores genéticos correspondem apenas a 5 a 10% de todos os casos, em contraste à faixa de 90-95% relacionados ao ambiente e estilo de vida que incluem os fatores de risco como o tabagismo, o consumo excessivo de álcool, dietas caracterizadas pelo excesso de gorduras e carne vermelha, a obesidade, o estresse e a exposição ao sol (ANAND, *et al.*, 2008). Evitar ou reduzir ao máximo esses fatores constitui uma importante medida preventiva a essa complexa doença.

Em geral, os tratamentos do câncer envolvem uma combinação de modalidades como a cirurgia, a radioterapia, a imunoterapia, o transplante de medula óssea, a transfusão de sangue, a quimioterapia, entre outros procedimentos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). Com relação à cirurgia oncológica, esse tipo de tratamento envolve a remoção integral do tumor do paciente sob anestesia, podendo ser realizada tanto para fins curativos como paliativos. No caso da radioterapia, radiações ionizantes como, por exemplo, os raios-X, são utilizadas para impedir ou eliminar células cancerosas dos tumores por meio de um procedimento indolor em um aparelho de radioterapia (INSTITUTO NACIONAL DO

CÂNCER, 2018). A imunoterapia consiste em uma modalidade, que ainda não é amplamente empregada como as demais terapias, baseada tanto no estímulo quanto no auxílio do sistema imunológico para o ataque às células tumorais, por meio dos imunoterápicos como, anticorpos, vacinas e inibidores. O tratamento via transplante de medula óssea é direcionado para cânceres que afetam as células do sangue como as hemácias, plaquetas e glóbulos brancos. Basicamente, esse transplante envolve a troca da medula óssea afetada por uma saudável (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017). Especificamente, a quimioterapia será discutida na próxima subseção.

1.2 A QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER E AS CLASSES DE QUIMIOTERÁPICOS

A quimioterapia tem sido apontada como uma das principais abordagens clássicas de tratamentos do câncer, que são tipicamente utilizadas em conjunto com as radioterapias e/ou cirurgias, contra os vários tipos de câncer englobando os metastáticos e os localizados. Baseada na administração de medicamentos, denominados quimioterápicos, com intuito de combater as células cancerosas, a quimioterapia pode ser aplicada via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e tópica (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Com base na estrutura e função, os quimioterápicos são classificados em agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, nitrossureias, alcalóides da vinca, agentes hormonais e miscelânea.

Os agentes alquilantes são fármacos antineoplásicos que formam derivados com o ácido desoxirribonucléico (DNA) por meio de ligações, acarretando, conseqüentemente, em alterações importantes no ciclo celular de células em repouso ou em ativa divisão, como a supressão de etapas como a replicação e a transcrição (RIUL & AGUILLAR, 1999).

Os agentes antimetabólitos, os quais exibem uma semelhança estrutural com os metabólitos naturais essenciais, são fármacos que quando internalizados na célula tumoral, enviam mensagens errôneas e exercem o bloqueio bioquímico da síntese de DNA por meio de interposições com o DNA e o ácido ribonucléico (RNA) na fase S da divisão celular (ALMEIDA, *et al*, 2005).

Os agentes antineoplásicos denominados antibióticos antitumorais são derivados do processo de fermentação de fungos com atividade citotóxica. Por meio do mecanismo de intercalação, essa classe de fármacos pode interferir na síntese dos ácidos nucleicos DNA e

RNA, impedindo o crescimento e a multiplicação celular. Esses medicamentos são direcionados principalmente para casos envolvendo infecções (RIUL & AGUILLAR, 1999).

A classe das nitrosureias envolve agentes antineoplásicos alquilantes lipossolúveis que, conseqüentemente, são capazes de atravessar a barreira hematoliquórica. Esses fármacos podem induzir danos tanto em células em repouso quanto em células com um mecanismo de divisão ativa (RIUL & AGUILLAR, 1999).

Os alcalóides da vinca consistem em uma classe de quimioterápicos antineoplásicos derivados de produtos naturais nitrogenados que atuam como inibidores mitóticos. Basicamente, esses fármacos atuam por meio da supressão do processo de formação de microtúbulos que, conseqüentemente, interrompe o processo de divisão celular na etapa da metáfase (RIUL & AGUILLAR, 1999, ALMEIDA, *et al*, 2005).

Agentes hormonais também formam uma classe de quimioterápicos que podem ser empregados para inibir o crescimento tumoral, uma vez que o próprio desenvolvimento de alguns tumores mantém uma relação com os níveis hormonais. Apesar de não serem citotóxicos, esses fármacos são direcionados principalmente para um tratamento paliativo (RIUL & AGUILLAR, 1999, ALMEIDA, *et al*, 2005).

O grupo de agentes antineoplásicos denominado miscelânea engloba fármacos que possuem tanto mecanismos de ação variados ou até mesmo desconhecidos, quanto a toxicidade e outros aspectos sem precedentes na literatura (RIUL & AGUILLAR, 1999).

Um resumo envolvendo as classes e os principais agentes quimioterápicos, bem como as respectivas indicações para o tipo de câncer, está organizado na Tabela 1 (AMBOSS, 2019).

1.3 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE Pt(II)

O emprego dos complexos de coordenação de Pt(II) na quimioterapia do câncer iniciou-se com metalodroga *cis*-diaminodicloroplatina(II), também conhecida como cisplatina (cddp) (Fig. 1, 1) que continua sendo um dos fármacos antitumorais amplamente empregados e eficazes para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos como no pulmão, fígado, bexiga, mama, cabeça e pescoço. (DUAN, *et al*, 2016). Comercializado como Platinol[®], esse fármaco pioneiro a base de Pt(II) apresenta uma acentuada atividade antitumoral para os cânceres nos ovários, testículos e na vesícula (ALMEIDA, *et al*, 2005).

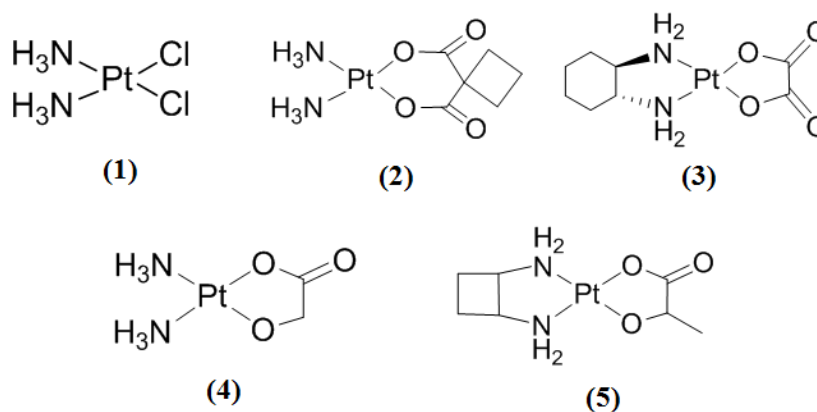
Tabela 1 - Agentes quimioterápicos.

Classe	Fármaco	Indicação
Agente alquilantes	Ciclofosfamida	Leucemias, mieloma múltiplo
	Ifosfamida	Tumores ginecológicos, câncer de pulmão
	Busulfan	Mieloma múltiplo, leucemia linfóide e mielóide crônica
	Clorambucil	
	Melfalano	
	Temozolomida	Glioblastoma
	Cisplatina	Câncer de bexiga
	Carboplatina	Câncer de pulmão
Oxaliplatina	Câncer nos testículos, ovários e colorretal	
Antimetabólitos	Metotrexato	Sarcomas, coriocarcinoma, linfomas, leucemia linfóide aguda,
	Pemetrexede	Mesotelioma pleural, câncer de pulmão
	Citarabina	Câncer de mama
	5-fluorouracil	Carcinoma de células uroteliais
	Gemcitabina	Câncer colorretal
	Capecitabina	Câncer de pâncreas
	6-mercaptopurina	Leucemias agudas
	Cladribina	Leucemias de células pilosas
	Fludarabina	Leucemia linfocítica crônica
Hidroxiureia	Leucemia mielóide crônica, trombocitemia essencial, policitemia vera, profilaxia da crise falciforme	
Antibióticos antitumorais	Bleomicina	Câncer nos testículos, linfoma de Hodgkin
	Actinomicina-D	Tumor de Wilms, sarcoma de Ewing, Rbdomiossarcoma
	Mitomicina-C	Tratamento paliativo de vários tumores
Nitrosureias	Carmustina e Lomustina	Tumores cerebrais
	Estreptozotocina	Insulinomas
Alcalóides da vinca	Vincristina	Vários tumores sólidos
	Vinblastina	Leucemias, linfomas
Agentes hormonais	Prednisona	Tratamento paliativo de leucemias e linfomas
	Metilprednisolona	Prevenção de náuseas e vômitos da quimioterapia
	Dexametasona	Redução dos sintomas da fadiga em pacientes com câncer

FONTE: Adaptado de AMBOSS, 2019.

Embora a cisplatina tenha sido primeiramente sintetizada em 1844 por Michele Peyrone (PEYRONE, 1844), a sua atividade antitumoral foi acidentalmente identificada em 1965 por Rosenberg e colaboradores (ROSENBERG, *et al.*, 1965). Com a aprovação comercial em 1971, primeiramente para o tratamento do câncer de testículo e de ovário, a cddp constituiu a primeira geração de complexos antitumorais baseados em Pt(II) (MJOS & ORVIG, 2014; DUAN, *et al.*, 2016).

Figura 1. Complexos de Pt(II) com atividade antitumoral: cisplatina (1), carboplatina (2), oxaliplatina (3), nedaplatina (4) e lobaplatina (5).



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Além desse fármaco pioneiro e bem sucedido, existem outras gerações de complexos aprovados a base de platina que são administrados no tratamento contra o câncer como a carboplatina (*cis*-1,1-ciclobutildicarboxilatodiaminoplatina(II)) (Fig. 1, 2), a oxaliplatina (*cis*-oxalato-*trans*-1-1,2-diaminociclohexanoplatina(II)) (Fig. 1, 3), a nedaplatina (*cis*-diaminoglicolatoplatina(II)) (Fig. 1, 4) e a lobaplatina (lactatodiaminometilciclobutanoplatina(II)) (Fig. 1, 5). Enquanto a cddp e a carboplatina são fármacos aprovados no mundo todo, a oxaliplatina é aprovada em alguns países, a nedaplatina no Japão e a lobaplatina apenas na China (ABU-SURRAH & KETTUNEN, 2006). As estruturas desses complexos de Pt(II) estão apresentadas na Figura 1.

O alto potencial antitumoral da cddp está conectado ao mecanismo de ação desse fármaco que é capaz de induzir danos no DNA das células tumorais e, portanto, inibir etapas vitais do ciclo celular, acarretando no acionamento de mecanismos de morte celular programada, também denominada apoptose (AJIMA, *et al.*, 2005). Entretanto, as terapias com

essas metalodrogas, especialmente no caso da cddp, resultam em severos efeitos colaterais aos pacientes acometidos por um câncer, como náuseas, vômitos, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, extrema fadiga, entre outros. A variedade de efeitos colaterais da cddp encorajou a pesquisa e o desenvolvimento de análogos dessa metalodroga, resultando nos fármacos de segunda e terceira geração, cujas estruturas foram apresentadas na Figura 1.

Apontada como o segundo fármaco de Pt aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), a carboplatina (Fig. 1, 2), a qual é comercializada como Paraplatina[®], apresenta o grupo carboxilato no lugar dos grupos cloreto da cddp. A sua toxicidade é inferior em relação à cddp, uma vez que ela possui maior solubilidade em água devido a esse grupo carboxilato, menor reatividade e maior facilidade para a excreção pela urina. Apesar de essas características possibilitarem o emprego de uma maior dose do fármaco no organismo, a carboplatina demonstra uma menor atividade antitumoral contra alguns cânceres, se comparada com a cddp (NEVES & VARGAS, 2011).

Comercializada como Eloxatina[®], a oxaliplatina (Fig. 1, 3) possui o grupo oxalato como grupo abandonador e o ligante diaminocicloexano. Uma vez que os adutos dessa metalodroga não são identificados pelos mecanismos de reparo do DNA, esse agente antineoplásico demonstra maior atividade contra células resistentes à cddp. Além disso, a oxaliplatina se destaca frente à cddp em função da redução significativa da nefrotoxicidade (NEVES & VARGAS, 2011).

Os medicamentos nedaplatina e a lobaplatina ainda não receberam a aprovação comercial mundial pela FDA. Com relação à nedaplatina, o fármaco tem apresentado uma efetividade contra tumores comparável à da cddp associada a um decréscimo das toxicidades renais e gastrointestinais (SHIMADA, *et al*, 2013). Supostamente, a lobaplatina também se destaca no sentido de superar a resistência tumoral observada com a administração da cddp e da carboplatina. Entretanto o mecanismo de ação desses dois fármacos ainda não foi totalmente elucidado, bem como resultados conclusivos em termos de atividade antitumoral e toxicidade (McKEAGE, 2001).

Vale ressaltar que essa família de antineoplásicos a base de Pt(II) (ver Figura 1) é de grande relevância, uma vez que de 40 a 80% de portadores de um determinado câncer recebem um tratamento incluindo um ou mais medicamentos dessa classe. Em vista disso, a pesquisa por metalodrogas de platina para a terapia do câncer tem avançado para desenvolvimento de fármacos cada vez mais eficientes (NEVES & VARGAS, 2011). Nessa direção, surgiram os chamados complexos de platina não-tradicionais como os derivados trans

os compostos polinucleares de Pt(II), complexos de Pt(IV) e os complexos híbridos (NEVES & VARGAS, 2011).

Uma vez que a cddp ainda é empregada na quimioterapia de uma ampla variedade de cânceres (LAU & ENSING, 2010), essa metalodroga foi selecionada como o sistema protótipo de complexo a base de Pt(II) investigado nesse trabalho, cujo estudo poderá ser ampliado para os demais análogos apresentados na Figura 1. Além de ser apontada como um dos fármacos mais proeminentes e bem sucedidos para determinados cânceres (TING, *et al*, 2010), a cddp também tem sido alvo de uma série de estudos tanto experimentais (DUAN, *et al*, 2016; BEYDOKHTI, *et al*, 2016; GUVEN, *et al*, 2017) como teóricos (NEJAD & URBASSEK, 2019; LV, *et al*, 2018; MEHRJOUEI, *et al*, 2017).

A problemática da quimioterapia com o agente antineoplásico cddp está intimamente relacionada com a rápida liberação desses quimioterápicos, e a subsequente inabilidade para a diferenciação entre células cancerosas e as sadias (GUVEN, *et al.*, 2011). Diante a esse quadro crítico associado à alta incidência de câncer prevista nas próximas décadas, torna-se relevante o desenvolvimento de terapias com mecanismos de liberação de moléculas antitumorais eficientes e seletivos, a fim de se promover um melhoramento na qualidade do tratamento de pacientes acometidos por um determinado tipo de câncer.

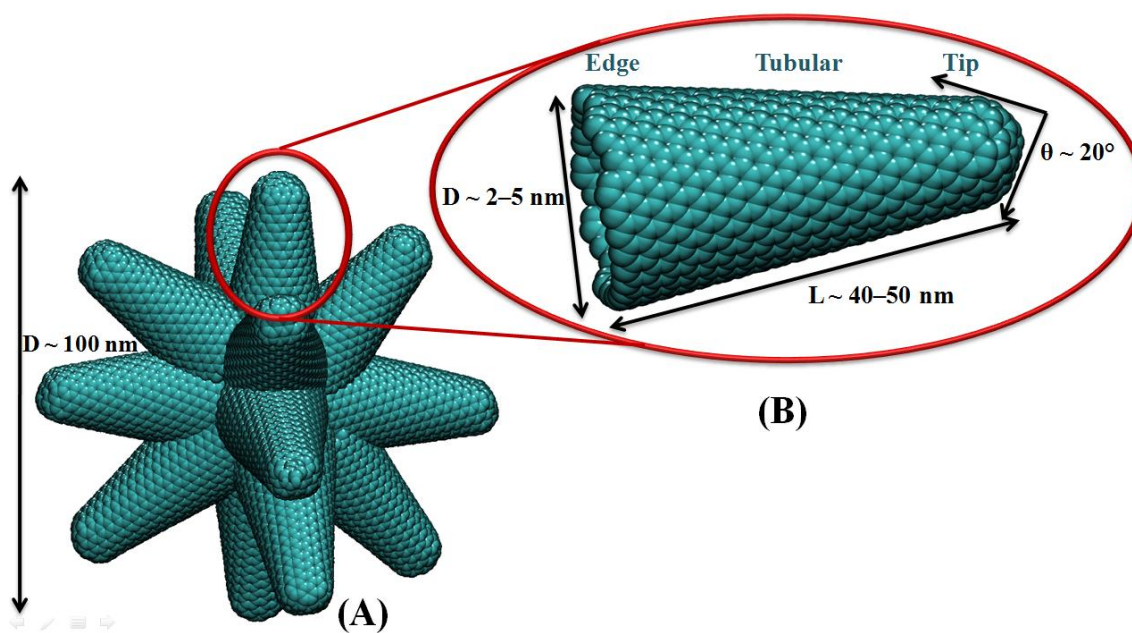
1.4 NANOHORNS DE CARBONO: POTENCIAIS CARREADORES DE FÁRMACOS

No contexto das pesquisas por novas tecnologias para tratamentos do câncer, a nanomedicina tem se destacado como um campo multidisciplinar, inclusive com a química, em constante desenvolvimento e representando a convergência para os futuros fármacos e terapias (HARE, *et al.*, 2017). Nessa ciência, uma abordagem promissora e amplamente estudada para reduzir a alta toxicidade dos agentes antineoplásicos envolve o encapsulamento dos mesmos nos *drug delivery systems* (DDS). Esses sistemas carreadores possibilitam o transporte de altas doses de fármacos e a respectiva liberação controlada e direcionada para os sítios tumorais, alcançando assim uma ótima eficiência terapêutica caracterizada, principalmente, pela minimização dos efeitos colaterais (JAIN, *et al.*, 2015).

Uma série de DDS têm sido empregados e investigados na literatura como, por exemplo, os lipossomos, micelas poliméricas, ciclodextrinas, nanotubos de carbono, entre outros com o intuito de melhorar a ação farmacológica desses complexos antitumorais (KUSHWAHA, *et al.*, 2012; JAIN, *et al.*, 2015).

Nesse contexto, os *nanohorns* de carbono (NHC) constituem uma potencial categoria dos DDS a base de carbono (Fig. 2B) que foram identificadas por Iijima e colaboradores em 1999 (IIJIMA, *et al.*, 1999) como um forma alotrópica do carbono caracterizada por uma região tubular com diâmetro típico de 2-5 nm e comprimento na faixa de 40-50 nm, sendo que uma das extremidades é fechada com um formato cônico e ângulo médio de 20°. Além disso, imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão revelam que os NHC são obtidos experimentalmente como agregados, denominados *Dahlia* (Fig. 2A), com uma geometria esférica de diâmetro em torno de 100 nm e contendo milhares de estruturas individuais de NHC, cujas pontas (extremidade cônica) se dispõem radialmente para fora a partir do centro desse *cluster*. (KAROUSIS, *et al.*, 2016).

Figura 2. Dimensões do agregado *Dahlia* de NHC (A) e de um NHC individual típico (B).



*Os parâmetros D, L e θ referem-se ao diâmetro médio, comprimento e ângulo de cone, respectivamente.

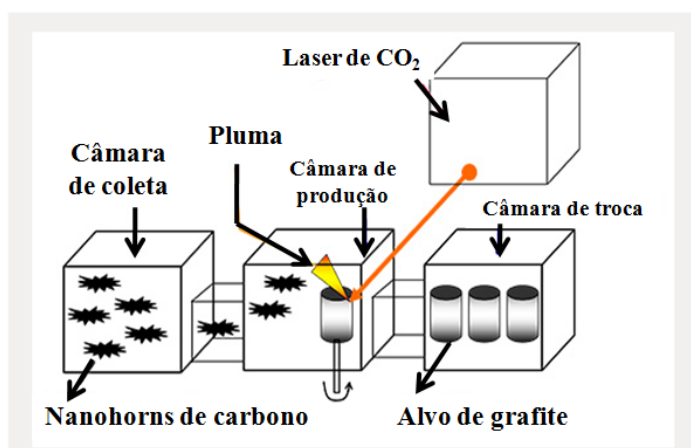
FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Em contraste aos nanotubos de carbono (NTC), os NHC são obtidos com alta pureza, uma vez que a síntese não envolve a utilização de catalisadores metálicos que podem gerar impurezas, resultando assim em uma toxicidade negligenciável *in vivo* e, conseqüentemente, na dispensabilidade de etapas de purificação, fatores esses que configuram um grande interesse industrial (KAROUSIS, *et al.*, 2016). A baixa toxicidade aguda desses

nanomateriais também foi confirmada por Miyawaki e colaboradores ao longo de um extensivo estudo toxicológico *in vitro* e *in vivo*, indicando que eles não são carcinogênicos (MIYAWAKI, *et al.*, 2008). Além disso, Zhang e colaboradores reportaram que os NHC podem ser biodegradados *in vivo* por macrófagos e pela oxidação catalisada pela enzima mieloperoxidase (ZHANG, *et al.*, 2015). Recentemente, uma publicação na *Nature Communications* voltada para a comparação da internalização celular e a subsequente nanotoxicidade entre NHC e NTC demonstrou um menor grau de citotoxicidade e de distúrbio das biomembranas no caso dos NHC, indicando assim, um futuro promissor desses nanomateriais em termos de aplicações biomédicas (HE, *et al.*, 2018). Além disso, a ampla superfície associada com as relações dos diâmetros, comprimentos e ângulos de cone, conforme indicado na Fig. 2, otimizam ainda mais a absorção e liberação de complexos encapsulados, o que possibilita a utilização dessas nanoestruturas no contexto das quimioterapias do câncer como carreadores de fármacos antitumorais (AJIMA, *et al.*, 2006).

Com relação aos métodos de síntese, os NHC brutos podem ser produzidos via descarga por arco, ablação por laser e pelo aquecimento Joule. Devido à alta eficiência, o método de ablação por laser tem sido a base da atual produção comercial em larga escala dos NHC (KAROUSIS, *et al.*, 2016). Nesse processo, os NHC são sintetizados via ablação por laser de CO₂ de um alvo de grafite com dimensões de diâmetro e altura de 100 e 500 mm, respectivamente. A Figura 3 apresenta os detalhes desse processo de produção dos NHC.

Figura 3. Esquema do processo de produção em larga escala dos NHC brutos.



FONTE: Adaptado de Sigma-Aldrich, 2018.

Como apresentado na Figura 3, a síntese dos NHC é processada em um sistema constituído por três câmaras fechadas sendo elas o reservatório de alvos de grafite (*Exchange*

chamber), a câmara de produção (*Production chamber*) e a câmara de coleta (*Collection chamber*). Essas câmaras são submetidas a um fluxo de gás inerte, em geral com o gás argônio, tipicamente na pressão de 760 Torr e na temperatura ambiente. A síntese é procedida sem a inclusão de catalisadores metálicos, e com um rendimento em torno de 95 % (KASUYA, *et al.*, 2002). Durante esse processo, os NHC são depositados e coletados a partir do fundo da câmara, podendo atingir, em escala industrial, uma produção de até 1 kg/dia (Sigma-Aldrich, 2018).

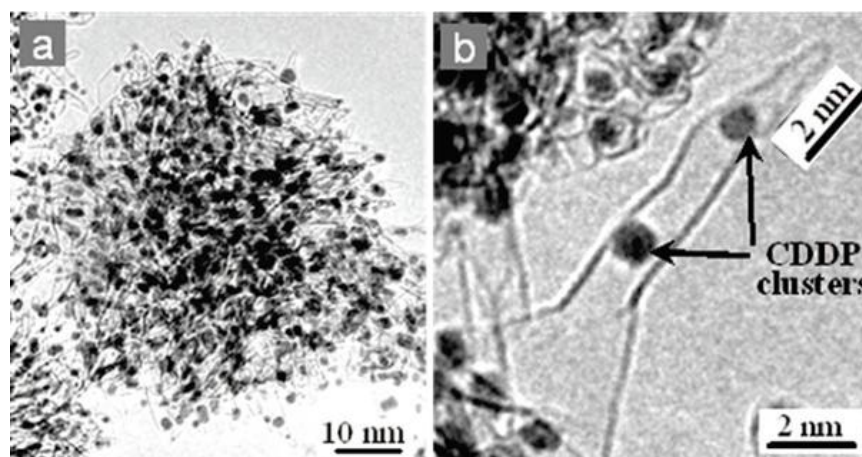
Entretanto, os NHC puros ou brutos possuem características indesejáveis como a baixa reatividade e solubilidade em soluções aquosas, uma vez que essas estruturas são caracterizadas por uma alta hidrofobicidade, comprometendo assim as interações com o meio fisiológico. A fim de se contornar esse problema, torna-se necessário a aplicação de tratamentos químicos pós-síntese com o intuito de promover a ativação e a dispersão dos NHC. Nesse sentido, o processo de oxidação é uma alternativa de tratamento químico utilizada para a funcionalização dessas nanoestruturas por meio da inclusão de grupos funcionais oxigenados como carbonilas, carboxilas, hidroxilas, entre outros (KAROUSIS, *et al.*, 2016). Em geral, os processos oxidativos comumente utilizados para os NTC e NHC envolvem reações com O₂ ou com outros agentes oxidantes como o H₂O₂ e o KMnO₄. Além disso, soluções ácidas de HCl, H₂SO₄, HNO₃ e até mesmo misturas desses ácidos, como por exemplo H₂SO₄/HNO₃, em diferentes proporções também são empregadas nesses tratamentos químicos (PORTO, *et al.*, 2018). Além do aumento da hidrofilicidade, os processos oxidativos também proporcionam um significativo aumento da reatividade desses materiais de carbono, devido à inclusão de defeitos topológicos em função da intensidade do agente oxidante empregado no processo. Essa versatilidade para modificações químicas é outra característica relevante dos NHC para o planejamento racional de carreadores de fármacos (DE SOUZA, *et al.*, 2017; PORTO, *et al.*; 2016; KAROUSIS, *et al.*, 2016).

Experimentalmente, a potencialidade dos NHC oxidados atuando como carreadores de fármacos já havia sido investigada e constatada pela primeira vez em estudo envolvendo o carreamento do anti-inflamatório glucocorticóide dexametasona em 2004, o qual demonstrou um aumento da eficiência terapêutica desse fármaco (MURAKAMI, *et al.*, 2004). O confinamento do agente antitumoral cddp nos NHC e a sua subsequente liberação lenta foram os tópicos de um estudo realizado por Ajima e colaboradores (AJIMA, *et al.*, 2005). Já em 2006, o efeito da modificação de grupos funcionais nos buracos dos NHC oxidados sobre a liberação da cddp encapsulada nesses nanomateriais foi o objeto de outro estudo nessa linha

de pesquisa (AJIMA, *et al.*, 2006). Além disso, um estudo envolvendo a injeção intratumoral do complexo de inclusão cddp@NHC oxidado, o qual é constituído pela metalodroga cddp encapsulada em NHC oxidados, em tumores transplantados em ratos indicou, além de uma liberação lenta do fármaco, uma maior redução do volume do tumor se comparado à administração da cddp livre, consubstanciando a relevância do emprego dos NHC na quimioterapia do câncer (AJIMA, *et al.*, 2008).

A Figura 4 exibe algumas imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução do aglomerado do tipo *Dahlia* de NHC oxidados com *clusters* do fármaco cddp encapsulados.

Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução do aglomerado de NHC oxidados, que é conhecido como estrutura *Dahlia*, com os *clusters* de cisplatina encapsulados.



FONTE: Adaptado de AJIMA, *et al.*, 2008.

Nessa perspectiva, investigações sobre a química dos NHC atuando como carreadores de fármacos antitumorais, como os complexos de Pt(II), tornam-se relevantes no sentido de que elas podem contribuir para um melhoramento na eficiência das terapias contra o câncer.

1.5 ESTUDOS TEÓRICOS DOS NANOHORNS DE CARBONO

Uma alternativa para a análise dos complexos de inclusão constituídos pela cddp encapsulada em estruturas de NHC envolve o estudo desses sistemas por meio dos métodos da química teórica/computacional. Baseada nos fundamentos da física e da matemática, essa abordagem da química possibilita a investigação e a interpretação de elementos da estrutura

da matéria a níveis não alcançados por métodos experimentais, proporcionando, por exemplo, a previsão de propriedades eletrônicas, espectroscópicas, termodinâmicas e de parâmetros e possíveis mecanismos de reações (MORGON, 2001; LEWARDS, 2003).

Nesse contexto de estudos teóricos, em 2014, uma série de modelos de estruturas não-oxidadas de NHC foi proposta em um estudo que também envolveu uma discussão sobre as estabilidades e os espectros na região do infravermelho das geometrias de equilíbrio desses nanomateriais (DOS SANTOS, *et al.*, 2014). Nessa mesma linha, Souza e colaboradores (DE SOUZA, *et al.*, 2013) conduziram um estudo mecânico-quântico desses complexos cddp-NHC, a fim de se caracterizar a estabilidade e a distribuição de cargas, e calcular os espectros de ressonância magnética nuclear. Em 2017, com o intuito de caracterizar as propriedades eletrônicas e avaliar a atuação dos NTC e NHC como DDS, Souza e colaboradores utilizaram cálculos quânticos no nível da teoria do funcional de densidade (DFT) para estudar a influência das vacâncias resultantes da oxidação sobre a estabilidade dessas nanoestruturas (DE SOUZA, *et al.*, 2017). Recentemente, os complexos de inclusão envolvendo estruturas oxidadas de NTC e NHC com a cddp também foram investigados à luz dos métodos da química quântica, corroborando a formação estável desses complexos e apresentando os espectros teóricos de Raman, na região do infravermelho e de RMN (DE SOUZA, *et al.*, 2018).

Entretanto, os estudos citados anteriormente baseiam-se em métodos quânticos que fornecem informações para o sistema estático, sem levar em consideração aspectos dinâmicos das estruturas e propriedades, que são de grande relevância no contexto da atuação e no planejamento de fármacos. Para isso, outra abordagem teórica eficiente da química computacional que tem sido empregada principalmente no estudo de sistemas complexos, como as macromoléculas, é a dinâmica molecular (DM) que, em linhas gerais, consiste um poderoso método que permite a análise da evolução temporal do sistema por meio da integração das equações do movimento da mecânica clássica (NAMBA, *et al.*, 2008).

Com relação a estudos teóricos envolvendo DM de NHC, em 2013, os aglomerados *Dahlia*, foram modelados e caracterizados a nível atômico por meio de simulações por dinâmica molecular (DM) e por dados da técnica de difração de nêutrons conduzida por Hawelek e colaboradores (HAWELEK, *et al.*, 2013). A condução assimétrica de calor nos NHC também foi outro aspecto investigado dessas nanoestruturas de carbono por WU e LI com base em simulações por DM (WU & LI, 2008). Além disso, Mejri e colaboradores (MEJRI, *et al.*, 2015) desenvolveram simulações por DM de nanotubos de carbono (NTC)

para avaliar tanto o encapsulamento e a liberação de cisplatina, como a subsequente interação desse complexo com a membrana celular. Em princípio, os fundamentos aplicados para esse material de carbono podem ser estendidos para as estruturas dos NHC.

Apesar da existência de alguns estudos teóricos de NHC envolvendo métodos quânticos e clássicos, observa-se uma vacância na literatura em termos da descrição do comportamento dinâmico desses nanomateriais de carbono atuando como DDS de complexos antitumorais. A relevância de um estudo seguindo abordagem está centrada no fato de que ela pode fornecer informações importantes que podem contribuir tanto para o melhoramento da arquitetura molecular desse nanocarreador, quanto para a composição do conjunto de indícios em voga que caracterizam a potencialidade do emprego dos NHC nas quimioterapias do câncer, incentivando ainda mais futuras avaliações clínicas.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo geral a caracterização do comportamento dinâmico em solução aquosa dos complexos de inclusão do tipo $cddp@NHC$, constituídos por *clusters* do fármaco cisplatina encapsulados em estruturas de nanohorns de carbono prístinos, oxidados e reduzidos, utilizando simulações por dinâmica molecular clássica.

Os objetivos específicos foram:

- I. Empregar metodologias quânticas para a otimização e parametrização do fármaco $cddp$ e da série de estruturas de NHC prístinos que fornecerão os parâmetros necessários para as simulações por DM.
- II. Verificar a influência de uma série de topologias de NHC prístinos, que se diferenciam principalmente em termos do ângulo de cone (θ), sobre as estabilidades e as estruturas de solvatação desses modelos em água, por meio de simulações por DM.
- III. Construir modelos de complexos de inclusão do tipo $cddp@NHC$, que envolvem a $cddp$ encapsulada nos modelos de NHC prístinos, e realizar simulações por DM para avaliar as estabilidades e as propriedades estruturais e energéticas em função do tempo.
- IV. Elaborar modelos de NHC oxidados (NHCox) e reduzidos (NHCh) com base em mecanismos de reações de oxidação e de redução em diferentes estágios, utilizando o modelo de NHC prístino mais provável como estrutura de partida.
- V. Parametrizar as duas séries de topologias de NHCox e NHCh e realizar simulações por DM em água para verificar a influência da presença das vacâncias e grupos funcionais sobre as interações em solução aquosa.
- VI. Construir protótipos de complexos de inclusão do tipo $cddp@NHCox$ e $cddp@NHCh$ e investigar o efeito dessas novas topologias de NHC, com vacâncias de diferentes tamanhos e graus de funcionalização, sobre tanto a dinâmica da metalodroga $cddp$ encapsulada, como a espontaneidade do processo de formação desses complexos ao longo do tempo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse trabalho, o método teórico utilizado para simular a evolução temporal dos complexos de inclusão cddp@NHC em solução aquosa, considerando o modelo de solvente explícito, foi o da DM clássica. Antes de conduzir as simulações desses complexos, tanto o fármaco cddp quanto os modelos de NHC prístinos, oxidados e reduzidos foram individualmente parametrizados e simulados. Nessa perspectiva, essa seção foi dividida em três subseções: primeiramente uma descrição do procedimento de parametrização da cddp e dos modelos de NHC, depois uma discussão da construção dos complexos de inclusão e por fim, a apresentação dos detalhes computacionais das simulações por DM desenvolvidas ao longo do trabalho.

3.1 PARAMETRIZAÇÃO DE CAMPO DE FORÇA

A primeira etapa envolveu o preparo de cada uma das espécies que compõem o complexo de inclusão cddp@NHC para o subsequente tratamento clássico com as simulações por DM. Essa preparação envolveu a definição de um dos elementos fundamentais na DM que é o campo de força, também denominado de superfície de energia potencial, que consiste em uma função multidimensional de energia potencial $V(r)$ construída com parâmetros que descrevem todas as interações químicas existentes no sistema molecular. A forma funcional do campo de força utilizado, que foi construído dentro da aproximação harmônica, está apresentada na Equação (1) a seguir.

$$V(r) = \sum_b k_b (r - r_{eq})^2 + \sum_\theta k_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_\varphi K_d/2 [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{A_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \quad (1)$$

Na Equação (1), o primeiro termo é referente aos parâmetros que descrevem as ligações, onde k_b são as constantes de força de estiramento em $kcal.mol^{-1}.\text{\AA}^{-2}$ e r_{eq} são os comprimentos de ligação na posição de equilíbrio em \AA . O segundo termo é referente aos parâmetros que descrevem os ângulos de ligações, onde k_θ são as constantes de força de curvatura em $kcal.mol^{-1}.rad^{-2}$ e r_θ são ângulos de equilíbrio θ_{eq} em graus do sistema. O

terceiro termo envolve os ângulos diedros próprios onde K_d é a constante de equilíbrio das torções, que também é conhecida como a barreira de torção, n indica a periodicidade, γ indica a fase e φ o ângulo de torção. E por fim, o quarto e o quinto termo indicam os parâmetros do potencial intermolecular, que nesse caso é representado pelo potencial de *Lennard-Jones* (LJ) e pelo potencial de *Coulomb*, respectivamente. Nos potenciais de LJ e de Coulomb, r_{ij} é a distância que separa dois átomos, q_i é a carga do átomo i e as constantes $A_{ij} = 4\epsilon_{i,j}\sigma^{12}$ e $B_{ij} = 4\epsilon_{i,j}\sigma^6$. O parâmetro, $\epsilon_{i,j}$ é a profundidade do poço de potencial para a interação entre os átomos i e j , e $\sigma_{i,j}$ é a distância onde o potencial se anula, o que sugere o tamanho aproximado das partículas.

O procedimento de determinação dos parâmetros que compõe o campo de força, como o da Equação (1), é designado como parametrização. Nesse trabalho, antes de se prosseguir para a construção e as simulações por DM dos complexos de inclusão, a cddp e os NHC foram parametrizados individualmente, conforme descrito em detalhes a seguir.

3.1.1 Cisplatina

Tradicionalmente, os pacotes computacionais empregados em simulações por DM, como o AMBER[®] (CASE, *et al.*, 2012), o GROMACS[®] (HESS, *et al.*, 2008) e o NAMD[®] (NELSON, *et al.*, 1996), já possuem em suas bibliotecas os parâmetros do campo de força de sistemas caracterizados por ligações covalentes convencionais, como as moléculas orgânicas. Entretanto, o mesmo não ocorre para sistemas contendo íons metálicos, como os complexos de Pt(II), devido à natureza inconventional das ligações químicas em compostos de coordenação (LI & MERZ, 2017). Por esse motivo, os parâmetros do campo de força da cddp foram calculados e os detalhes desse procedimento estão descritos a seguir.

Para obter os parâmetros intramoleculares, os comprimentos (r_{eq}) e os ângulos (Θ_{eq}) de ligação na posição de equilíbrio foram calculados a partir da geometria otimizada da cddp no nível MP2 (MØLLER & PLESSET, 1934), com a abordagem *frozen core* (MP2(FC)), empregando o conjunto de base 6-31G(d,p) para os ligantes (HEHRE, *et al.*, 1972) e o potencial efetivo de caroço (ECP) LANL2DZ para o átomo de Pt, o qual define os orbitais atômicos do caroço e o conjunto de base de qualidade duplo zeta para os orbitais atômicos de valência. As constantes de força de estiramento de ligação (k_b) e de deformação angular (k_Θ) foram obtidas a partir do *software* VFFDT - *Visual Force Field Derivation Toolkit* desenvolvido por Zheng e colaboradores (ZHENG, *et al.*, 2016). Baseado no Método

Seminário (SEMINARIO, 1996), o VFFDT extrai as derivadas segundas do potencial em relação às coordenadas nucleares no ponto de equilíbrio, que são constantes de força de ângulos e ligações, a partir da análise da matriz hessiana do sistema. A hessiana, por sua vez, pode ser gerada a partir de um cálculo quântico de frequência. As geometrias e as constantes de força foram determinadas em solução aquosa utilizando o modelo contínuo polarizável (PCM) com o formalismo IEFPCM (CANCÈS & TOMASI, 1997) para incluir a água como solvent implícito. Uma vez que as barreiras de torção (K_d) para compostos de coordenação são, em geral, pequenas, os respectivos parâmetros de diedros da cddp foram tratados como se a altura da barreira de torção fosse nula, como proposto por Li e Merz Jr (LI & MERZ, 2017). Todos os cálculos mecânico-quânticos foram conduzidos no *software* Gaussian-09 revisão D.01 (FRISCH, *et al.*, 2009).

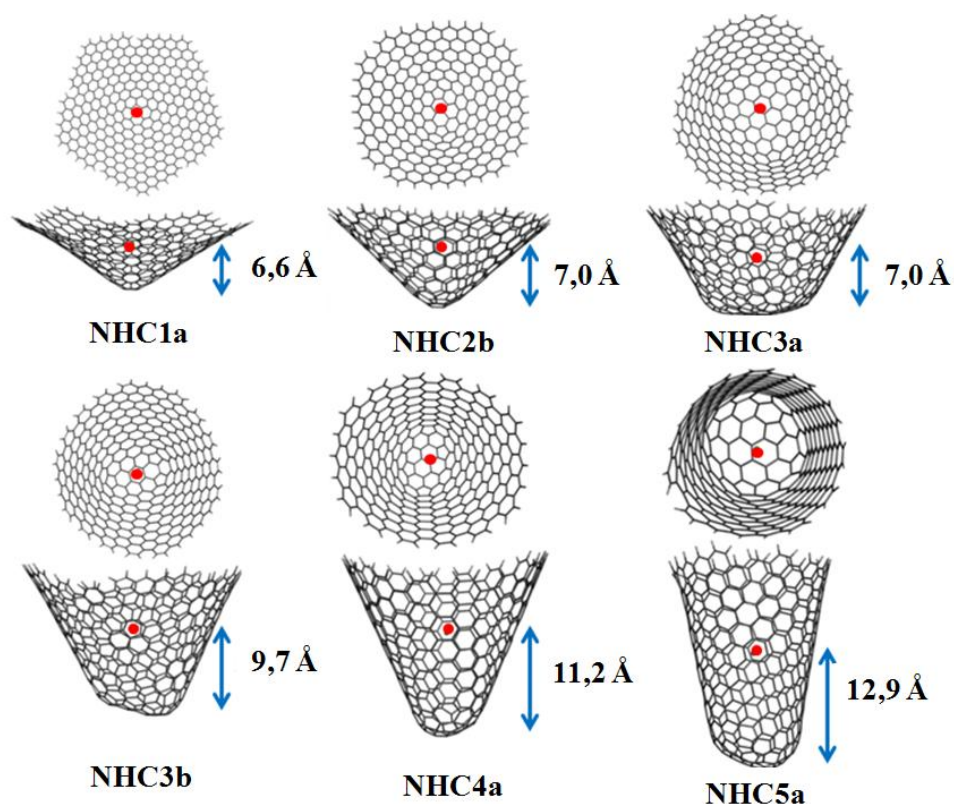
Com relação aos parâmetros intermoleculares, aqueles referentes ao potencial de *Lennard-Jones* (LJ) para o átomo de Pt, que incluem $\epsilon / \text{kcal mol}^{-1}$ e $\sigma / \text{Å}$, foram obtidos por Lopes e colaboradores (LOPES, *et al.*, 2008; BOYS & BERNARDI, 1970) a partir de um ajuste com uma superfície de energia potencial (SEP) mecânico-quântica para a interação cddp-água, sem considerar a correção para o erro de superposição do conjunto de base (BSSE). Os parâmetros de LJ para os átomos de Cl, N, H e O foram coletados a partir do *General Amber Force Field* (GAFF) (WANG, *et al.*, 2004). As cargas atômicas da cddp, que correspondem aos parâmetros do potencial de *Coulomb*, foram calculadas utilizando a o procedimento de ajuste *ChelpG* (BRENNEMAN & WIBERG, 1990), por meio de um cálculo quântico no nível Hartree-Fock (HF) utilizando o conjunto de base 6-31G(d,p)/LANL2DZ. O efeito do solvente também foi incluído nesse cálculo de cargas por meio do modelo PCM implementado com o formalismo IEFPCM.

3.1.2 *Nanohorns* de carbono

Em se tratando dos NHC, três séries de topologias desses nanomateriais de carbono foram estudadas: os prístinos, que serão designados simplesmente pela terminologia “NHC”, os oxidados (NHCox) e os reduzidos (NHCh).

No que se refere aos NHC, seis modelos (1a, 2b, 3a, 3b, 4a e 5a – ver Figura 5) foram selecionados a partir de um estudo conduzido por Dos Santos e colaboradores (DOS SANTOS, *et al.*, 2014).

Figura 5. As seis estruturas otimizadas dos modelos de NHC prístinos no nível B3LYP/6-31G(d,p) selecionado para os estudos.



*Cada estrutura é representada pela sua vista lateral e frontal. Os pontos vermelhos indicam o centro de massa de cada modelo.

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

As fórmulas moleculares e os parâmetros geométricos dessas nanoestruturas prístinas de carbono estão organizados na Tabela 2. Essas estruturas se diferenciam em função do ângulo de cone (θ) que se relaciona com o número de pentágonos (n) na região cônica (ponta) dos NHC por meio da seguinte expressão (DOS SANTOS, *et al.*, 2014).

$$\theta = 2 \sin^{-1} \left(1 - \frac{n}{6} \right) \therefore n = 1 - 5 \quad (2)$$

É importante mencionar que dos seis modelos apresentados na Figura 5, o NHC5a é a topologia mais provável experimentalmente, uma vez que o ângulo de abertura de cone desse modelo ($\theta = 19,2^\circ$) é próximo ao observado experimentalmente ($\theta \sim 20^\circ$) (DOS SANTOS, *et al.*, 2014; IJIMA, *et al.*, 1999).

Tabela 2. Fórmulas moleculares e parâmetros geométricos da série de modelos de NHC prístinos.

Modelos de NHC	Fórmula molecular	n	$\theta / ^\circ$	L / Å	D / Å
NHC1a	C ₄₀₀ H ₅₀	1	112,9	18,5	20,6
NHC2b	C ₃₁₀ H ₃₆	2	83,6	17,5	16,2
NHC3a	C ₃₇₀ H ₃₈	3	60,0	19,0	19,7
NHC3b	C ₄₀₂ H ₃₈	3	60,0	19,0	19,7
NHC4a	C ₃₅₂ H ₃₀	4	38,9	21,9	14,5
NHC5a	C ₃₆₀ H ₂₄	5	19,2	24,3	12,7

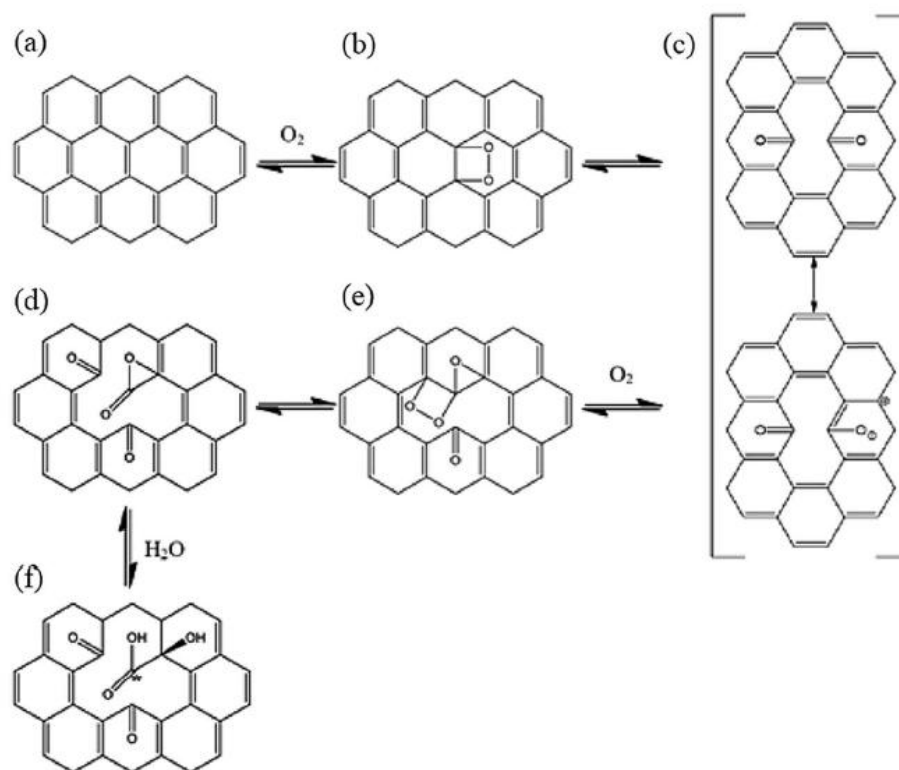
*Os símbolos n, θ , L, D correspondem ao número de pentágonos na região cônica (ponta), o ângulo de abertura do cone, o comprimento médio da parte tubular e o diâmetro médio, respectivamente.

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Como os NHC constituem um sistema molecular orgânico, todos os parâmetros intramoleculares e os de LJ já se encontram definidos nas bibliotecas do campo de força GAFF do *software* empregado para simulações por DM. Dessa forma, a parametrização dos NHC envolveu apenas a determinação das cargas atômicas *ChelpG* que, por sua vez, foram computadas a partir de cálculos quânticos em solução (PCM - água). Os seis modelos da Figura 5 foram otimizados com o método da teoria do funcional de densidade (DFT), utilizando o funcional B3LYP (BECKE, 1993; LEE, *et. al.*, 1988) e o conjunto de base 6-31G(d,p). Os cálculos de carga foram conduzidos no protocolo HF/6-31G(d,p). Em ambos os cálculos, o efeito do solvente foi incluído utilizando o modelo IEFPCM.

Em contraste, os modelos de NHCox e NHCh foram elaborados nesse trabalho, partindo-se da topologia prístina experimentalmente mais provável (NHC5a) da série estudada. No que concerne as nanoestruturas oxidadas de carbono, a construção da série de NHCox foi baseada no mecanismo de oxidação de NTC com os reagentes O₂ e H₂O, que havia sido proposto por Da Silva e Dos Santos (DA SILVA & DOS SANTOS, 2017) e posteriormente empregado em cálculos de estrutura eletrônica de NTC e NHC no nível da DFT por De Souza e colaboradores (DE SOUZA, *et al.*, 2017). O esquema das etapas que compõem esse processo oxidativo está apresentado na figura a seguir.

Figura 6. Mecanismo de oxidação (DA SILVA & DOS SANTOS, 2017) utilizado para a construção da série de topologias de NHCox.



FONTE: Adaptado de DE SOUZA, *et al.*, 2017.

Conduzido em condições drásticas de elevada temperatura na faixa de 250-650°C e altas pressões, o processo reacional explicitado na Figura 6 inicia-se com a adsorção química de uma molécula de oxigênio (O_2) a uma dupla ligação presente no nanomaterial pristino de carbono via cicloadição covalente do tipo [2 + 2], a qual resulta na espécie da Figura 6b. Consistindo em um peróxido orgânico de elevada instabilidade, esse grupo funcional pode reagir por meio do rompimento tanto da ligação carbono-carbono, que envolve os átomos de carbono ligados aos átomos de oxigênio, quanto da ligação oxigênio-oxigênio, resultando em uma dicetona. Como indicado na Figura 6c, essa espécie com uma dicetona ainda pode ser representada por estruturas canônicas de ressonância devido ao considerável efeito de deslocalização eletrônica nessa topologia de átomos de carbono. Devido ao excesso de oxigênio no meio reacional, a espécie representada na Figura 6c pode interagir com outra molécula de O_2 de tal modo que, se a interação ocorrer com a dupla ligação vicinal ao oxigênio aniônico, o resultado seria a formação da espécie indicada na Figura 6e. Assim como ocorrido na conversão da espécie da Figura 6b para a Figura 6c, essa última espécie altamente

tensionada e, por sua vez, reativa, também sofre quebras de ligações resultando na formação dos grupos funcionais lactona e cetona como indicado na Figura 6d. Por fim, os átomos de carbono da lactona podem sofrer um ataque nucleofílico do átomo de oxigênio da molécula de água, a qual é proveniente do vapor de água no meio reacional, resultando nos grupos hidroxila e carboxila, que são grupamentos funcionais de grande relevância que contribuem para a ativação desses materiais de carbono, uma vez que se torna possível uma série de reações de substituição nucleofílica nas carbonilas formadas (BANERJEE, *et al.*, 2005; DE SOUZA, *et al.*, 2017).

É importante mencionar que todo o caminho reacional descrito na Figura 6 consiste em uma única etapa de oxidação do tipo $\text{NTC} + 2\text{O}_2 + 1\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NTCox}$, onde “NTCox” representa o NTC oxidado. Entretanto, como esse processo de oxidação é contínuo até o consumo completo dos reagentes, foram propostos quatro estágios de oxidação que passaram a ser denominados de “graus de oxidação”, resultando em quatro diferentes topologias oxidadas de NHC indicadas por “NHCox-N”, onde N indica o grau de oxidação. Vale ressaltar que a viabilidade do caminho reacional similar a esse processo oxidativo descrito já havia sido investigada e consubstanciada à luz de métodos da DFT em um estudo conduzido por Da Silva e colaboradores (DA SILVA, *et al.*, 2009). Acrescenta-se, ainda, que reações de oxidação de NHC com oxigênio molecular já foram reportadas em trabalhos experimentais anteriores (MURAKAMI, *et al.*, 2004; AJIMA, *et al.*, 2006; MURATA, *et al.*, 2002), o que configura a potencialidade da modelagens das estruturas de NHCox desenvolvidos nesse trabalho. Os quatro modelos de NHCox serão apresentados na seção de resultados e discussão.

Por fim, topologias reduzidas de NHC foram construídas partindo-se das quatro estruturas oxidadas de NHC descritas anteriormente. Em termos de mecanismo de reação, a modelagem dos NHCh foi conduzida tomando por base o processo de redução estudado e discutido por Ajima e colaboradores (AJIMA, *et al.*, 2006). Nesse processo, os NHCh são obtidos a partir do tratamento por um tempo de 3h dos NHCox em fluxo do gás H_2 , na temperatura de 1200°C . Nesse sentido, os quatro protótipos de NHCh, que serão apresentados na seção de resultados, foram construídos a partir das quatro estruturas de NHCox em diferentes graus.

Após a construção dos modelos de NHCox e NHCh, cada estrutura foi otimizada com o método semiempírico AM1 - *Austin Method 1* (LEWARS, 2003) incluindo a água como solvente implícito por meio do PCM com o formalismo IEFPCM. Assim como para os NHC

pristinos, o procedimento de parametrização dos NHCox e NHCh envolveu apenas o cálculo quântico das cargas atômicas no nível HF/6-31G(d,p) em solução aquosa (PCM).

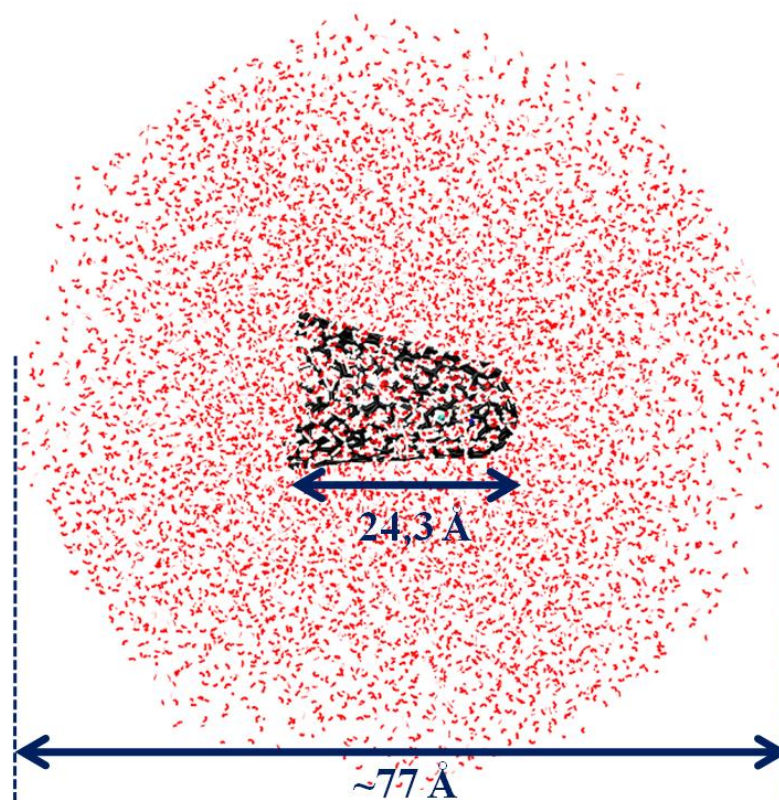
3.2 CONSTRUÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO cddp@NHC

Com a parametrização da cddp e das estruturas de NHC pristinos, oxidados e reduzidos, o próximo passo envolveu a construção de três séries de complexos de inclusão do tipo cddp@NHC que incluíram uma e duas cddp encapsuladas. A presença de até duas unidades de cddp nas cavidades dos NHC teve o intuito de simular os *clusters* desse fármaco que são identificados experimentalmente (MIYAWAKI, *et al.*, 2008) na região cônica desses nanomateriais de carbono reais, que são exatamente as regiões descritas pelos modelos estudados. Além disso, esse número máximo de agentes antitumorais encapsulados foi o mais razoável para o tamanho das cavidades dos protótipos de NHC. Especificamente, doze complexos cddp@NHC foram construídos envolvendo os seis modelos de NHC pristinos e até duas cddp. E no caso dos NHCox e NHCh, foram elaborados oito complexos cddp@NHCox e mais oito do tipo cddp@NHCh, ambos com estequiometria 1:1 e 2:1.

3.3 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR

Todas as simulações por DM desse trabalho foram conduzidas utilizando o *software* AMBER 12[®] (CASE, *et al.*, 2012) que se encontra disponível no Núcleo de Estudos em Química Computacional (NEQC-UFJF). Todos os sistemas a serem simulados (topologias de NHC, NHCox e NHh e os respectivos complexos de inclusão com a cddp) foram individualmente centralizados em uma caixa de simulação com formato octaédrico truncado, com dimensões em torno de 77 Å. Essa caixa de simulação (ver Figura 7) também incluiu, em média, 7159 moléculas de água explícitas tratadas pelo modelo TIP3P (JORGENSEN, *et al.*, 1983) e com parâmetros do campo de força ff99SB (HORNAK, *et al.*, 2006), também foram adicionadas nas caixas de simulação para compor o solvente dos sistemas.

Figura 7 - Esquema das dimensões da caixa de simulação octaédrica incluindo o sistema (soluto).



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Para os três conjuntos de sistemas, a densidade foi equilibrada, utilizando o *ensemble* isotérmico-isobárico NPT e condições periódicas de contorno, a fim de se obter um valor próximo a $0,99337 \text{ g.cm}^{-3}$ em 310,15 K e pressão de 1,0 atm. Os termostatos e barostatos de Berendsen (BERENDSEN, *et al.*, 1984) e Langevin (UBERUAGA, *et al.*, 2004) foram aplicados para manter constante a temperatura e a pressão. As interações de *van der Waals* foram computadas esféricamente dentro de um raio de corte (*cutoff*) de 10 \AA , e as interações eletrostáticas de longo-alcance foram tratadas pelo procedimento *Particle-Mesh Ewald* (PME) (DARDEN, *et al.*, 1993). Em termos do tempo de simulação, os sistemas foram simulados por 100 ns (etapa de produção), com um fator de integração foi de 2,0 fs. O procedimento de integração numérica utilizado para resolver as equações newtonianas do movimento foi conduzido pelo algoritmo *Leap Frog*. O algoritmo SHAKE (RYCKAERT, *et al.*, 1977) também foi usado para restringir as oscilações das ligações envolvendo átomos de hidrogênio. Por fim, as energias livre de ligação dos complexos cddp@NHC, incluindo os modelos de NHC prístinos, oxidados e reduzidos, foram calculadas pelo método MMGBSA (*Molecular*

Mechanics Generalized-Born Surface Area) que se encontra implementado no AMBER12[®] (MILLER, *et al.*, 2012). Com relação ao protocolo de simulação, inicialmente foi realizado a minimização de energia do solvente mantendo o soluto fixo, seguida de todo o sistema. Ambas as minimizações envolveram 2000 ciclos, sendo os primeiros 1000 ciclos realizados com o algoritmo do método *steepest descent* (ARFKEN & WEBER, 1985) e os 1000 últimos conduzidos com o algoritmo do método dos gradientes conjugados (HESTENES & STIEFEL, 1952). Após essa etapa, o sistema foi aquecido de 0 a 310 K, por meio de uma rampa de aquecimento/equilíbrio dividida em etapas graduais de aquecimento de 50 em 50 K, sendo cada uma seguida por um estágio de estabilização de 340 ps. Com os sistemas equilibrados em 310 K e 1,0 bar (1,0 bar \approx 0,986923 atm), a etapa da produção foi conduzida pelo tempo de simulação discutido. Todas as análises da DM foram conduzidas com a trajetória da etapa de produção, utilizando o CPPTRAJ (ROE & CHEATHAM, 2013) implementado no AMBER 12[®], e as imagens foram elaboradas no software VMD (Visual Molecular Dynamics) (HUMPHREY, *et al.*, 1996). Um resumo dos formalismos teóricos da dinâmica molecular e do método MM-GBSA, encontra-se na seção do Apêndice desse trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção, primeiramente serão apresentados os resultados referentes ao procedimento de parametrização da cddp e dos NHC, e em seguida, os resultados relacionados com as simulações por DM dos NHC puros e dos complexos de inclusão do tipo cddp@NHC. Vale ressaltar que as discussões sobre as topologias de NHC prístinos, oxidados e reduzidos, tanto na forma pura como em complexos de inclusão, foram organizadas em subseções nessa mesma ordem.

4.1 PARÂMETROS DO CAMPO DE FORÇA

O método MP2 foi selecionado para o cálculo de otimização de geometria da cddp, uma vez que ele fornece resultados caracterizados por uma notável concordância com dados experimentais (MILBURN & TRUTER, 1966), e também em função de existirem estudos teóricos reportados na literatura (LOPES, *et al.*, 2008; LOPES, *et al.*, 2006) que empregaram o mesmo nível de teoria para o cálculo dos parâmetros do potencial de LJ 12-6 da molécula de cddp. Nessa perspectiva, o nível MP2/6-31G(d,p)/LANL2DZ foi escolhido para a obtenção de todos os parâmetros intramoleculares da cddp, que estão organizados na Tabela 3, requeridos para as simulações por DM.

Tabela 3. Parâmetros intramoleculares da cisplatina.

	Pt-Cl	Pt-N	Cl-Pt-Cl	N-Pt-N	Cl-Pt-N	Pt-N-H
x_{eq}	2,39	2,06	94,62	91,00	132,68	55,17
k	106,95	119,36	92,74	122,16	109,29	111,65

* Valores de equilíbrio (x_{eq}) para comprimento de ligação em Å e ângulos em graus, e constantes de força (k) para estiramento de ligação em kcal mol⁻¹ Å⁻² e para deformação angular em kcal mol⁻² rad⁻². Cálculos no nível MP2/6-31G(d,p)/LANL2DZ. O efeito do solvente foi levado em conta utilizando o modelo IEFPCM (água).

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Em relação ao campo de força intermolecular da molécula de cddp, tanto os parâmetros do potencial de LJ 12-6 quanto as cargas atômicas calculadas nesse trabalho estão apresentadas na Tabela 4. Uma vez que os parâmetros de LJ 12-6 foram derivados para a interação cddp-água, utilizando o método pós-HF MP2, selecionou-se um conjunto de

parâmetros que foram calculados sem levar em consideração o procedimento *counterpoise* (CP) para corrigir o BSSE (BOYS & BERNARDI, 1970), devido ao fato de estudos recentes reportarem uma superestimação da correção CP. Esse efeito ocorre principalmente no caso de cálculos envolvendo métodos perturbativos com conjuntos de base pequenos (MELCHIOR, *et al.*, 2015).

Tabela 4. Cargas atômicas ChelpG (q_i) e parâmetros do potencial de Lennard-Jones (ϵ e σ) para a cisplatina.

Átomo	$q / \text{a.u.}^1$	$\epsilon / \text{kcal mol}^{-1}{}^2$	$\sigma / \text{Å}^2$
Pt	0,4988	7,0100	2,559
Cl	-0,6173	0,2650	1,948
N	-0,5641	0,1700	1,824
H	0,3107	0,0157	0,600

¹Cargas chelpG calculadas no nível HF/6-31G(d,p)/LANL2DZ em solução aquosa (modelo IEFPCM).

²Para o átomo de Pt, os parâmetros de LJ 12-6 foram coletados de um trabalho anterior (LOPES, *et al.*, 2008), e para os átomos de Cl, N e H, os mesmos parâmetros foram obtidos a partir do GAFF (WANG, *et al.*, 2004) implementado no AMBER 12[®].

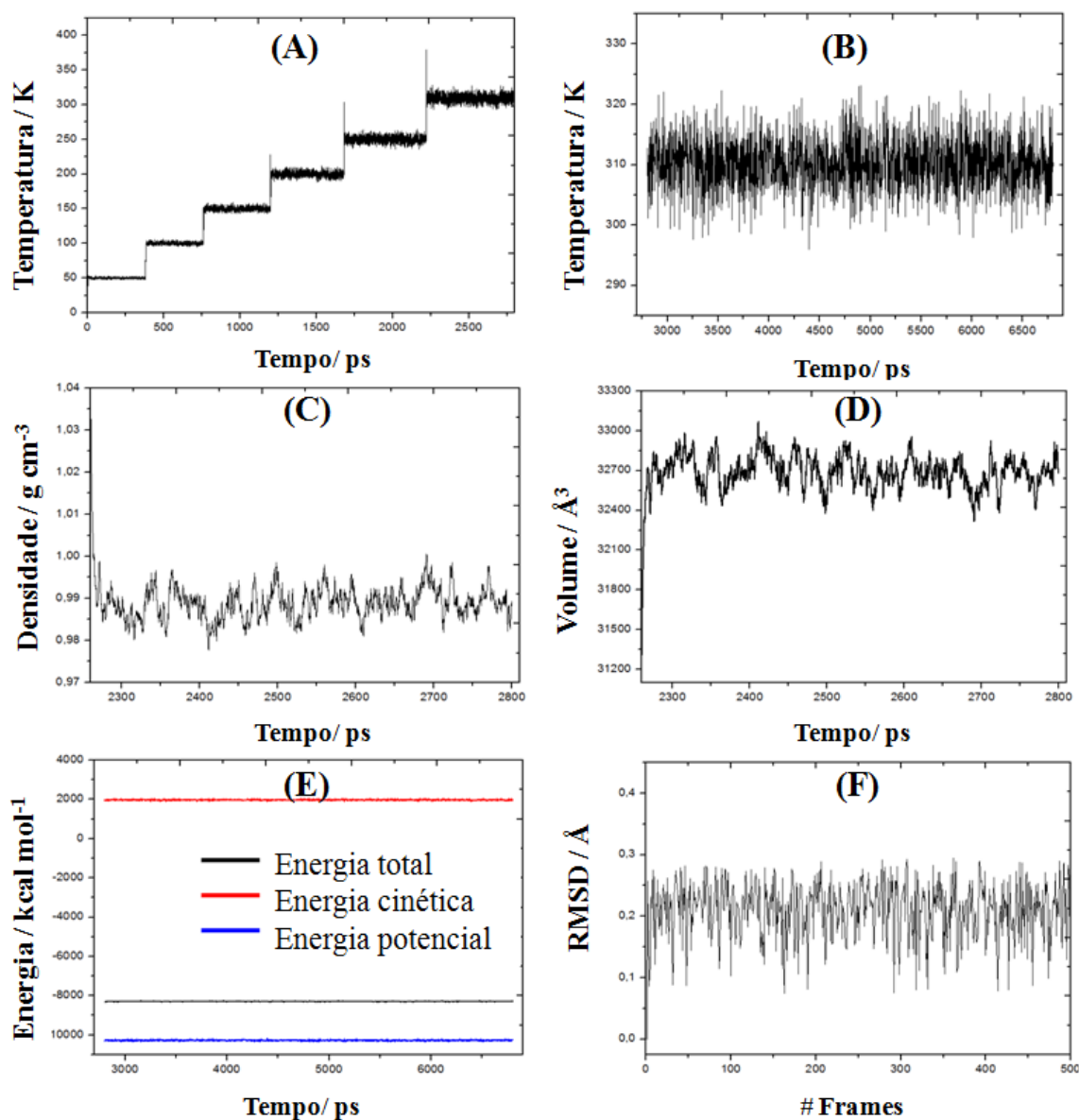
FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

No que tange as cargas atômicas, a escolha do nível de teoria HF está fundamentada no fato de que os métodos de cálculos de cargas utilizados para a composição do campo de força geral do AMBER12[®], denominado GAFF são o HF/6-31G(d) RESP (BAYLY, *et al.*; 1993) e o AM1-BCC (JAKALIAN, *et al.*, 2002), que consistem em alternativas robustas para a descrição da interação eletrostática em métodos clássicos como a DM. Também é importante enfatizar que como as cargas não variam ao longo da DM clássica, esses parâmetros devem ser maximizados para simular o efeito de polarização eletrônica devido ao solvente, fato esse que justifica, mais uma vez, o emprego das cargas no nível HF que são superestimadas.

Com o intuito de se verificar a consistência do esquema de parametrização descrito para a molécula de cddp, foi realizada uma DM curta de 4,0 ns desse fármaco em solução aquosa. O protocolo de simulação da cddp foi avaliado por meio da análise das propriedades macroscópicas do *ensemble* de *frames*. O comportamento temporal dessas propriedades, como

a temperatura, a energia cinética, potencial e total, a densidade e o volume está descrito graficamente na Figura 8. Além disso, a variação estrutural no tempo também foi avaliada com base no cálculo no cálculo do desvio quadrático médio (RMSD) em relação ao primeiro frame da etapa da produção da DM da cddp.

Figura 8 - Avaliação do protocolo de simulação por dinâmica molecular da cisplatina em solução aquosa.



*Onde cada gráfico representa a variação temporal: da temperatura da rampa de aquecimento (A), da temperatura da etapa da produção (B), da densidade no último estágio de equilíbrio (C), do volume no último estágio de equilíbrio (D), da energia total, cinética e potencial da etapa da produção (E) e do desvio quadrático médio – RMSD (F).

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

A partir do cálculo do RMSD (*root mean square deviation*) como função do tempo da trajetória da etapa de produção (ver Figura 8F), foi possível verificar que o sistema atingiu uma estabilidade estrutural ao longo dos 4,0 ns com um valor médio de RMSD de 0,21 Å (e desvio padrão de 0,05 Å) em relação à estrutura inicial da etapa da produção. Além da estabilidade no que diz respeito à variação da topologia parametrizada da cisplatina, as pequenas flutuações das demais grandezas macroscópicas também sugeriu uma estabilidade energética da cddp durante a simulação, o que reforçou ainda mais a consistência do esquema de parametrização elaborado nesse trabalho.

Por fim, o procedimento de parametrização dos NHC prístinos, oxidados e reduzidos envolveu apenas a determinação das cargas atômicas por meio de cálculos quânticos no mesmo nível empregado para a cddp (HF/6-31G(d,p)) com o procedimento de ajuste ChelpG. Os demais parâmetros já estavam implementados nas bibliotecas de campo de força do *software* AMBER12[®].

4.2 SIMULAÇÕES POR DM DOS NHC PRÍSTINOS

O próximo passo nesse trabalho envolveu o estudo dos modelos de NHC prístinos (ver Tabela 1) utilizando as cinco estruturas mais estáveis de uma série proposta por Dos Santos e colaboradores (DOS SANTOS, *et al.*, 2014). Uma sexta estrutura, denominada NHC3b, também foi incluída devido à assimetria na região cônica dessa topologia resultante da disposição peculiar dos três pentágonos nessa região que, diferentemente das cinco topologias mais estáveis, possui uma ligação entre dois pentágonos. Essa conexão, por sua vez, acaba induzindo uma maior tensão na estrutura, se comparada com as demais selecionadas e, conseqüentemente, uma deformação devido à presença maior defeito topológico.

Como evidenciado na Tabela 2, os pentágonos assumem um papel importante para a geometria dos NHC, uma vez que a quantidade deles na região cônica (a ponta) define o ângulo de abertura do cone (θ), parâmetro esse que interfere no diâmetro médio dessas nanoestruturas, o que, por sua vez, influencia na capacidade de transporte dos NHC. Além disso, a estabilidade desses modelos está relacionada ao número de pentágonos (n), sendo que quanto maior o número de ligações envolvendo esses anéis na região da ponta, menor é a estabilidade da estrutura, devido às deformações geométricas e tensões impostas (DOS SANTOS, *et al.*, 2014).

Com o campo de força definido, os seis protótipos de NHC prístinos foram individualmente simulados em solução aquosa, conforme o protocolo apresentado na seção da metodologia, com o intuito de se estudar a estabilidade estrutural, a capacidade das cavidades e as interações desses modelos em água. A fim de se verificar se o protocolo de simulação por DM garantiu a estabilidade estrutural e energética dos modelos de NHC, as propriedades macroscópicas do *ensemble* de *frames* das trajetórias foram analisadas. Selecionando o modelo NHC5a, a evolução temporal dessas propriedades, como a temperatura, a energia cinética e potencial, a densidade, o volume e a pressão ao longo do tempo de simulação, está representada graficamente na Figura 9.

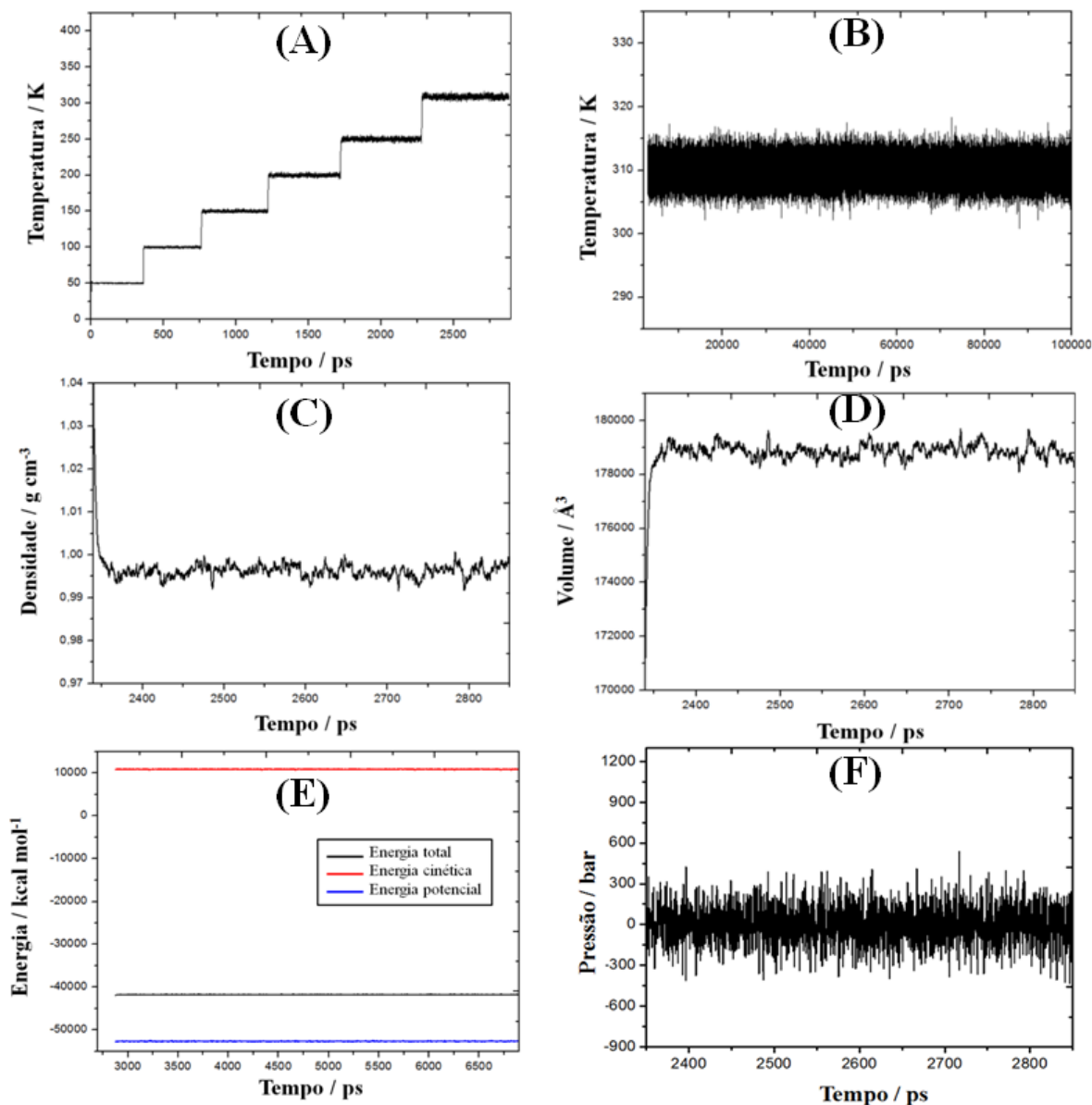
Com base na Figura 9A, verificou-se que a rampa de aquecimento empregada para elevar a temperatura de 0 a 310,15 K proporcionou um aquecimento lento e gradual do sistema sem promover excessivas flutuações estruturais. A partir disso, a temperatura se manteve em torno de 310,00 K ao longo dos 100 ns (ver Figura 9B), consubstanciando a eficiência do termostato de Berendsen nas simulações por DM. Ainda sobre a Figura 9, a etapa de equilíbrio da densidade também se mostrou eficiente, uma vez que ela indicou que a densidade média do sistema foi de $0,996 \text{ g cm}^{-3}$ a 310,00 K com um desvio padrão de 0,002, enquanto que experimentalmente, a densidade da água nessa temperatura é de $0,993 \text{ g cm}^{-3}$ (TANAKA, *et al.*, 2001). A análise da Figura 9E permitiu confirmação da conservação da energia do processo, uma vez que as energias cinética, potencial e total atingiram valores relativamente constantes ao longo da dinâmica 100 ns de produção. Esse comportamento sugere o alcance de uma estabilização do sistema ao longo do tempo simulado.

Finalmente, o comportamento temporal da pressão do sistema foi apresentado na Figura 9F. Em um primeiro momento, a pressão parece flutuar drasticamente ao longo da simulação atingindo altos valores positivos e negativos, mas na média, os valores oscilam em torno de 1,0 atm. Esse comportamento peculiar para a pressão se conecta ao fato de que o controle da pressão é conduzido com base em um escalonamento do volume do sistema. Nesse sentido, enquanto valores negativos de pressão indicam uma força que atuam visando a compressão da caixa de simulação, valores positivos correspondem a uma força referente à expansão da caixa de simulação. Assim, uma vez que líquidos e sólidos são altamente incompressíveis, onde $1/V \cdot dV/dP$, pequenas variações no volume resultam em amplas variações na pressão, o que pode explicar o comportamento expresso na Figura 9F.

Em adição a essas propriedades, a variação estrutural também foi analisada com base no cálculo do RMSD e do RMSF (*Root mean square fluctuation*) ao longo dos 100 ns de

simulação tomando como referência o primeiro *frame* da etapa de produção. A evolução do RMSD e do RMSF, ambos do NHC5a, está representada graficamente na Figura 10.

Figura 9. Análise do protocolo de simulação do modelo NHC5a.



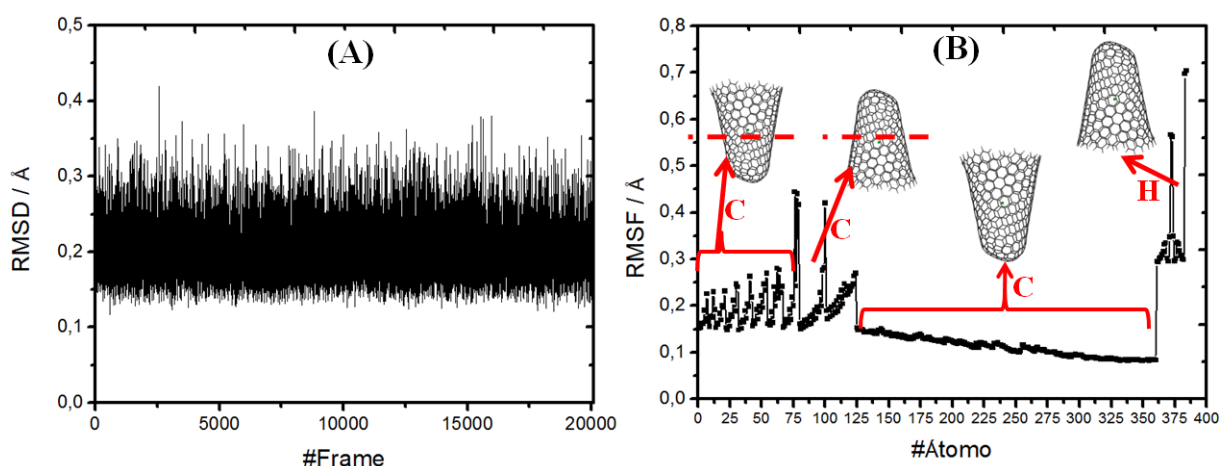
*Variação temporal da temperatura da rampa de aquecimento (A), da temperatura da etapa da produção (B), da densidade (C) e do volume (D) durante a última etapa de equilíbrio, da energia cinética, potencial e total da etapa da produção (E) e da pressão no último estágio de equilíbrio (F).

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Com base no gráfico do RMSD do NHC5a mostrado na Figura 10A, foi possível constatar que a nanoestrutura sofreu pequenas flutuações em sua geometria em torno de uma

valor médio de 0,2 Å, ao longo do tempo de simulação, caracterizando assim a sua estabilidade estrutural. O comportamento do RMSF do NHC5a apresentado na Figura 10B indicou que as maiores flutuações atômicas ocorreram com os átomos de hidrogênio, que envolvem os átomos enumerados de 361 a 384 no arquivo pdb, seguido dos átomos de carbono próximos e também ligados aos hidrogênios que englobam os átomos de 75 a 100 no arquivo de coordenadas. Em contraste, os átomos pertencentes à região cônica da nanoestrutura, que envolvem o conjunto de números de 125 a 360 na Figura 10B, exibiram as menores flutuações com um valor médio de 0,11 Å, sugerindo que essa é a região mais rígida e restrita dessa topologia de NHC.

Figura 10 - Variação temporal do desvio quadrático médio (RMSD) e flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF) do NHC5a.



*As letras C e H referem-se ao conjunto de átomos de carbono e hidrogênio, respectivamente.

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Com relação aos demais protótipos de NHC prístinos, os valores médios do RMSD em função do tempo estão expressos na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Valor médio e desvio padrão (std) do RMSD em função do tempo calculado a partir da trajetória da produção de cada modelo da série de NHC prístinos.

Modelo de NHC	NHC1a	NHC2b	NHC3a	NHC3b	NHC4a	NHC5a
RMSD / Å	0,360	0,257	0,276	0,239	0,269	0,200
std / Å	0,086	0,060	0,071	0,051	0,059	0,036

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Na Tabela 5, os valores consideravelmente baixos de RMSD indicaram que, ao término da simulação, as estruturas finais dos modelos apresentaram pequenas flutuações estruturais em relação ao início da etapa da produção, o que sugeriu a obtenção de trajetórias estáveis para os seis modelos. Especificamente, ao analisar os valores dessa tabela, foi possível notar que os modelos mais planos, como o NHC1a e o NHC3a, se mostraram mais flexíveis, devido às maiores flutuações estruturais expressas pelos respectivos valores de RMSD. Em contraste, os menores valores na Tabela 5 indicaram que as estruturas mais tubulares (com menor ângulo de cone (θ)) demonstraram maior rigidez, como o NHC5a.

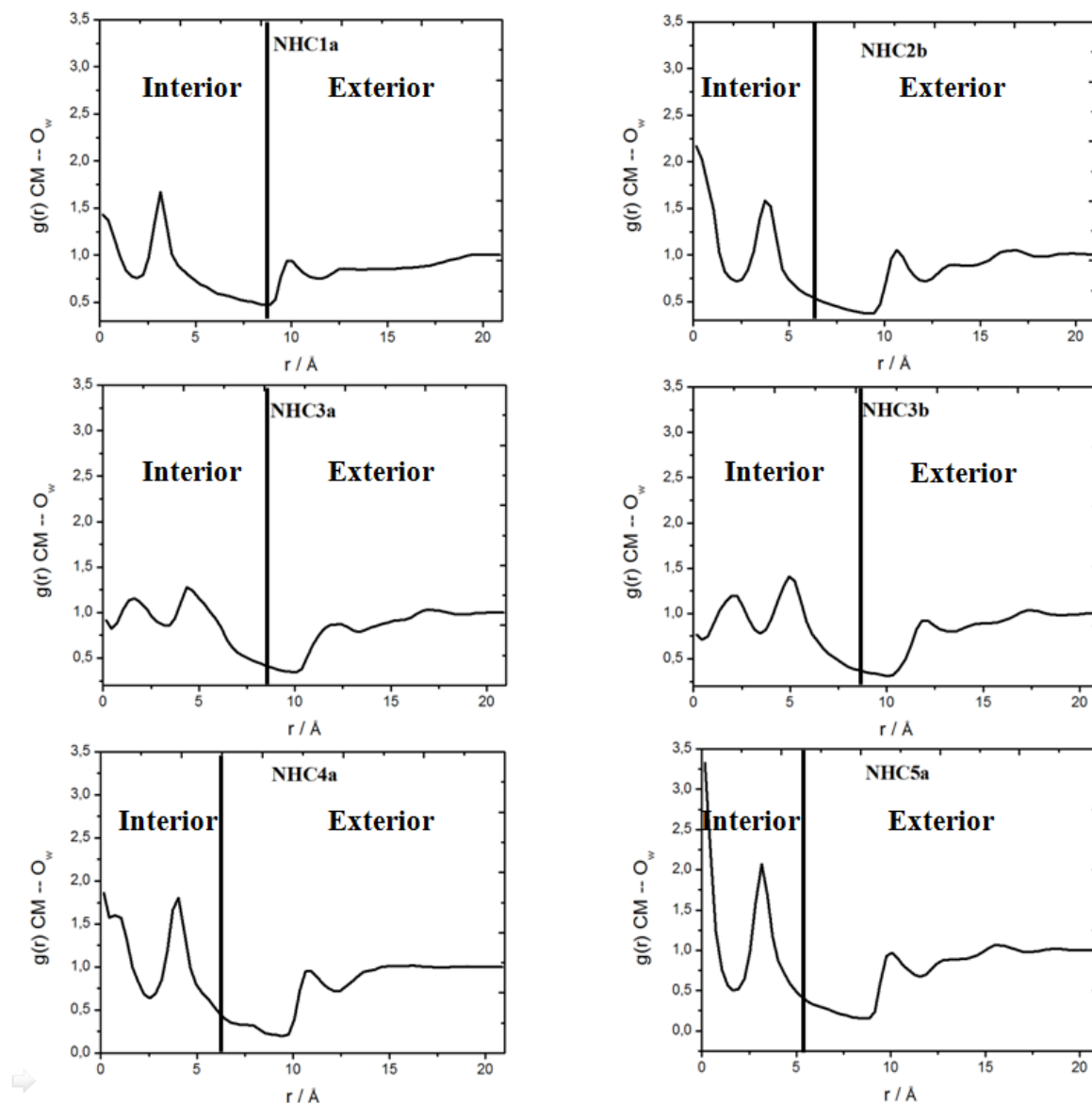
A análise das camadas de solvatação desses modelos de NHC também foi procedida por meio do cálculo das RDF $g(r)$ entre o centro de massa (CM) dessas nanoestruturas pristinas de carbono com os átomos de oxigênio da água (solvente), assim denominadas $g(r)$ CM--Ow, cujo perfil e informações da curva se encontram na Figura 11 e na Tabela 6, respectivamente.

Com base nos raios médios de cada topologia de NHC pristino, que foram obtidos a partir dos dados da Tabela 2, e no raio de *van der Waals* do átomo de carbono (BATSANOV, 2001), os gráficos da Figura 11 foram divididos em duas regiões que representam o espaço no interior da cavidade (“Interior”) e o espaço externo ao modelo (“Exterior”). Nessa mesma figura, verificou-se a existência de dois picos na região interna de todos os NHC estudados que representam a presença, em média, de moléculas de água encapsuladas. Especificamente, os modelos NHC5a, NHC4a e NHC2b se assemelharam no posicionamento médio das águas internas em torno dos respectivos CM das estruturas (ver Figura 11) uma vez que as posições dos primeiros picos foram as mesmas, como pôde ser verificado na Tabela 6. Essa semelhança no primeiro pico da RDF, que englobou, em média, apenas uma molécula de água, pode estar conectada tanto ao diâmetro médio desses três modelos, que são relativamente próximos, como ao caráter altamente hidrofóbico esperado para todos os NHC pristinos.

Entretanto, vale ressaltar que o número de coordenação NC2 é mais importante para a discussão do que o NC1, uma vez que ele representa, de fato, o número total de moléculas de água que, em média, se encontram encapsuladas no interior dos NHC. Nesse sentido, analisando a Tabela 6, verificou-se que os modelos NHC3a e NHC3b foram aqueles que apresentaram o maior número de moléculas de solvente confinadas, o que pode estar conectado com o formato da região cônica dessas nanoestruturas que, por ser mais plano em

função do posicionamento dos pentágonos nessa região, possibilitou um maior acesso a moléculas do solvente.

Figura 11. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w, definidas entre o centro de massa da nanoestrutura de carbono e os átomos de oxigênio das moléculas de solvente (água), para os modelos de NHC prístinos.



*A linha vertical dividindo os gráficos entre “Interior” e “Exterior” delimita as moléculas presentes dentro e fora das cavidades dos modelos de NHC prístinos.

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Ainda no que concerne os dados da Tabela 6, foi possível verificar a influência do ângulo de abertura de cone (θ) sobre a constituição da segunda camada de solvatação, ou

também denominada de camada de solvatação interna, dos modelos NHC5a, NHC4a e NHC3b, de tal modo que a medida em que se prosseguiu para modelos com maior θ , ocorreu, em média, um aumento gradativo do número de coordenação devido ao aumento da cavidade desses nanomateriais.

Tabela 6. Dados das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w referentes aos seis modelos de NHC prístinos.

Modelo	$\theta / ^\circ$	$r / \text{Å}^1$		NC1 ²	$r / \text{Å}$		NC2 ³
		1° pico	1° mínimo		2° pico	2° mínimo	
NHC1a	112,9	0,15	1,95	1,07	3,15	4,65	15,35
NHC2b	83,6	0,15	2,25	1,70	3,75	4,95	19,48
NHC3a	60,0	1,65	3,45	6,07	4,35	6,15	35,37
NHC3b	60,0	1,95	3,45	6,11	4,95	6,15	36,33
NHC4a	38,9	0,15	2,55	2,33	4,05	5,55	25,40
NHC5a	19,2	0,15	1,65	0,56	3,15	4,95	17,04

¹ Distância média. ² Número de coordenação (NC) referente ao primeiro pico e que foi calculado com a integral de zero até o valor do 1° mínimo. ³ NC que engloba o primeiro e o segundo pico, cujo a integral foi calculada de zero até o valor do 2° mínimo.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

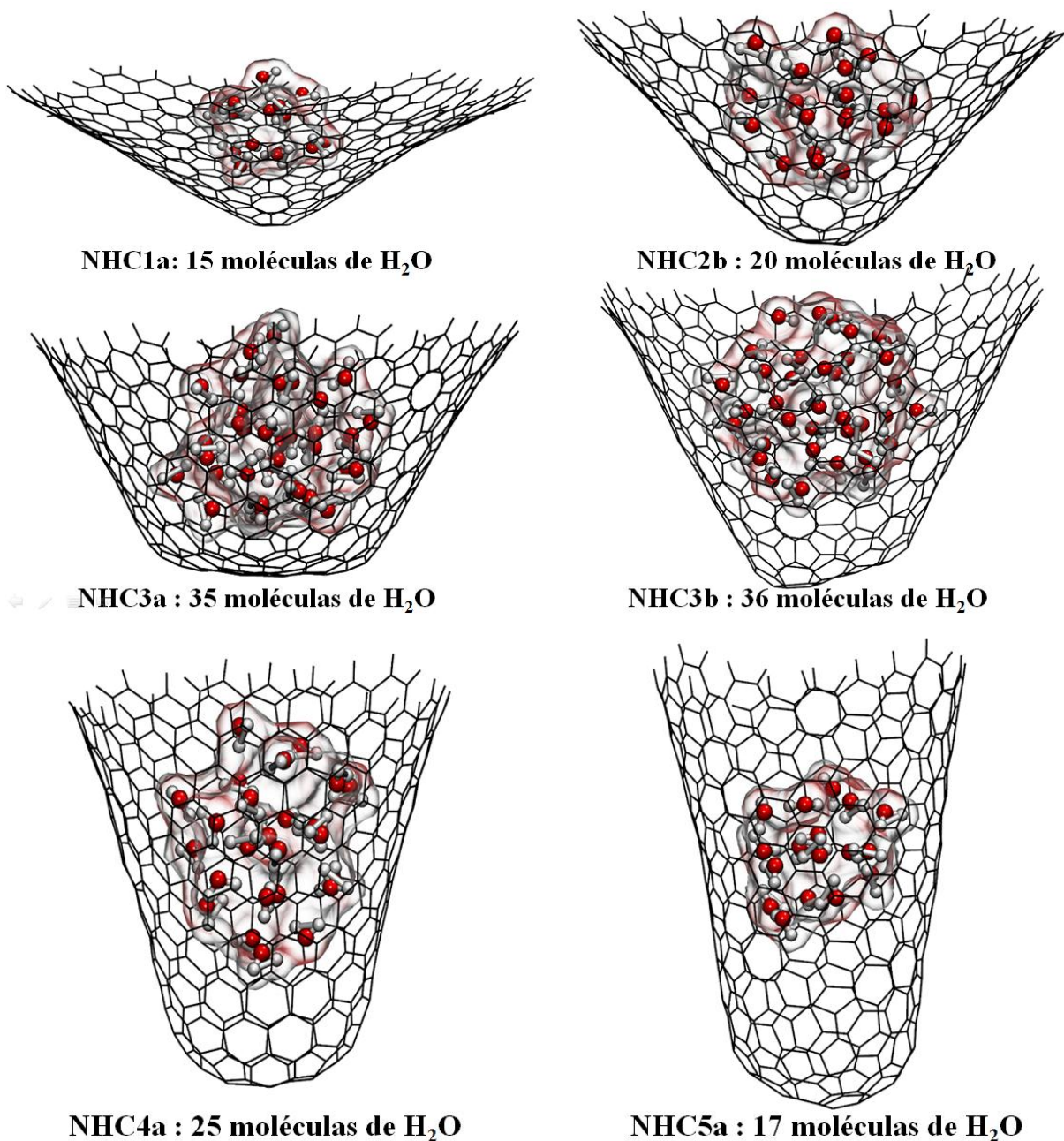
Outro ponto evidenciado na Tabela 6 foi o comportamento atípico das RDF do NHC3b cujo os picos, em 1,95 Å e em 4,95 Å, foram os mais distantes em relação ao CM do modelo (ver Fig. 11). Esse efeito pode estar relacionado com a assimetria na região cônica desse modelo que pode ter acarretado no afastamento das águas próximas ao seu CM.

A fim de se obter uma visualização da distribuição das moléculas de água no interior de cada modelo de NHC ao final da trajetória de 100 ns de DM, *snapshots* foram gerados a partir de uma topologia, a qual foi criada com o comando *closest* da ferramenta de análise de trajetória *cpptraj* (ROE & CHEATHAM, 2013), que considerou apenas as moléculas de água referentes ao NC2 dos NHC prístinos explicitado na Tabela 6. A Figura 12 a seguir mostra os *snapshots* finais da trajetória de cada modelo estudado evidenciando o número médio de moléculas de água carregadas pelas nanoestruturas prístinas.

Na Figura 12, a quantidade de moléculas de água encapsuladas em cada topologia de NHC prístino correspondeu aos números de coordenação (NC2) apresentados na Tabela 6

que, por sua vez, haviam sido obtidos a partir da integração das RDF do tipo $g(r)$ CM--O_w apresentadas na Figura 11.

Figura 12. *Snapshots* finais das trajetórias da dinâmica molecular de cada modelo NHC pristino destacando apenas o número médio de moléculas de água encapsuladas.



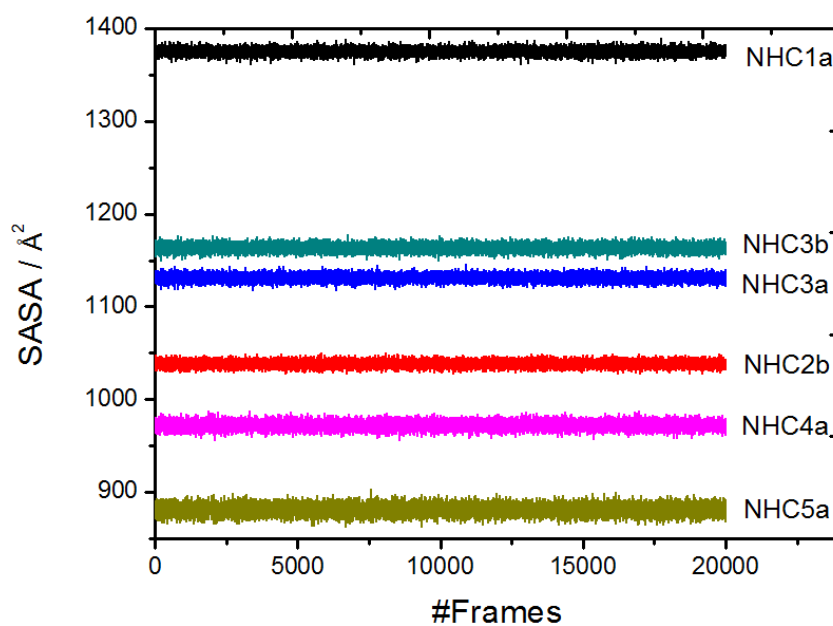
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além disso, a Figura 12 destacou claramente que as estruturas de NHC com as extremidades fechadas com uma topologia mais plana, como as estruturas do NHC3a e

NHC3b, comportaram um maior número de moléculas de solvente se comparado, principalmente, com as estruturas mais tubulares. A título de exemplo, o NHC5a carregou, em média, quase metade das moléculas de água carregadas pelo NHC3a, exatamente em função das divergências relacionadas com o volume interno efetivo dessas nanoestruturas.

A acessibilidade das moléculas de água em relação aos modelos de NHC prístinos também foi analisada com base no cálculo das superfícies acessíveis ao solvente (SASA – *Solvent accessible surface area*). Os valores da SASA, bem como a sua variação no tempo ao longo dos *frames* da etapa da produção de 100 ns estão representados graficamente na Figura 13 a seguir.

Figura 13. Variação temporal da superfície acessível ao solvente (SASA) dos modelos de NHC prístinos.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De um modo geral, a análise da Figura 13 indicou que as SASA dos seis modelos de NHC prístinos mostraram-se estáveis, com pequenas flutuações, ao longo de todos os *frames* da etapa de produção da simulação por DM dessas topologias. As diferenças nos valores médios da SASA foram observadas em função do ângulo de cone (θ) e da topologia da região cônica dos NHC. Nesse sentido, notou-se uma ampliação da SASA com o aumento do θ e com a existência de extremidades fechadas mais planas. Desse modo, os modelos com os maiores θ , como o NHC1a, e com regiões cônicas mais planas, como o NHC3a e NHC3b,

exibiram uma maior acessibilidade em relação às moléculas de solvente. Por outro lado, o modelo NHC5a dificultou o acesso de moléculas de solvente devido ao menor θ e o formato tubular mais estreito, o que explica os seus menores valores de SASA.

Por fim, vale ressaltar que os modelos estudados de NHC são consideravelmente reduzidos em relação às estruturas reais cujo comprimento da parede (L) e diâmetro médio (D) são de aproximadamente 400 e 30 Å, respectivamente. Apesar de pequenos, os modelos propostos são representativos, sendo que aquele com cinco pentágonos na ponta (NHC5a) é o mais provável, uma vez que ele exibe o ângulo de abertura de cone próximo aos valores observados experimentalmente ($\sim 20^\circ$) (DOS SANTOS, *et al.*, 2014). Acrescenta-se ainda que esses modelos de NHC prístinos são protótipos preliminares, uma vez que aqueles usados como nanocarreadores necessitam de processos de oxidação a fim de se alcançar a biocompatibilidade com o meio fisiológico. Mesmo assim, o estudo aqui desenvolvido possui a sua relevância como um passo inicial para a compreensão da natureza dinâmica desse nanomaterial em solução que, por sua vez, será útil para o estudo dos complexos de inclusão desses materiais de carbono com a cddp, como será discutido na próxima seção.

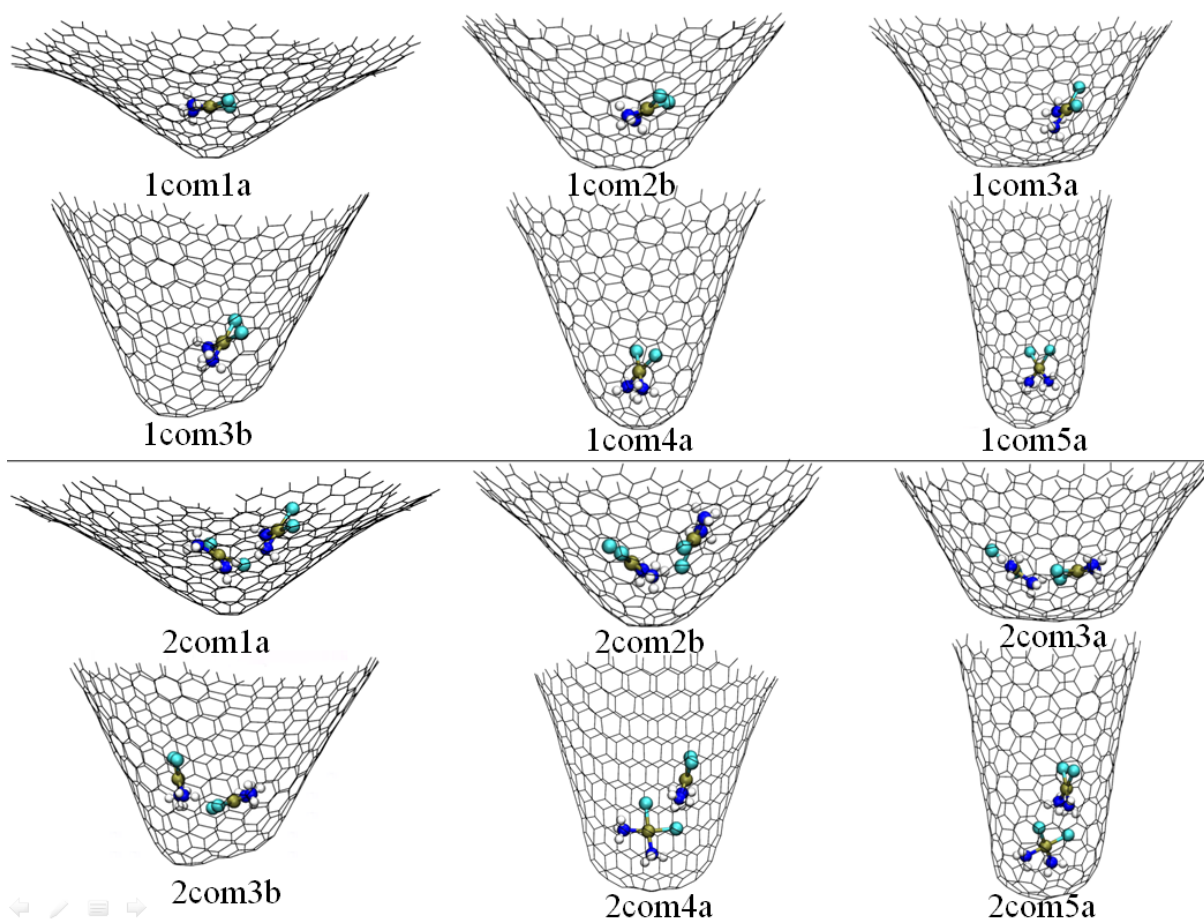
4.3 SIMULAÇÕES POR DM DOS COMPLEXOS cddp@NHC

Após o procedimento de parametrização dos monômeros (cddp e modelos de NHC prístinos) e da análise das simulações por DM dos modelos de NHC prístinos puros, os doze complexos de inclusão cddp@NHC foram construídos e simulados, sendo que seis deles incluíram apenas uma cddp e outros seis incluíram duas unidades dessa metalodroga. As estruturas finais das trajetórias da etapa de produção de 100 ns de cada complexo estão explicitadas na Figura 14. Nessa figura, enquanto os complexos com uma cddp encapsulada foram identificados pelo prefixo “1com”, os modelos com duas cddp receberam o prefixo “2com”. Além disso, os sufixos 1a, 2b, 3a, 3b, 4a e 5a indicavam o tipo de topologia de NHC prístino. A Figura 14 ainda evidencia a residência dos agentes antitumorais no interior dos modelos de NHC durante todo o tempo de simulação. É importante ressaltar que os próximos passos nesse trabalho envolveram a caracterização do comportamento dinâmico desses protótipos cddp@NHC por meio da análise das trajetórias das simulações por DM desses modelos.

A primeira análise envolveu o cálculo do RMSD (ver Tabela 7) que indicou que os complexos cddp@NHC com uma cddp (1com) incluída nas cavidades dos NHC5a, 4a e 3a

apresentaram maiores flutuações estruturais do que as correspondentes nos modelos com duas cddp (2com) encapsuladas.

Figura 14. Estruturas finais das trajetórias dos doze complexos cddp@NHC, incluindo uma (1com) e duas moléculas de cisplatina (2com) encapsuladas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Esse comportamento era esperado, uma vez que nos modelos 1com com tubos mais estreitos, uma molécula individual de cddp pode mover livremente no interior das nanoestruturas de carbono. Em contraste, os *clusters* de cddp presentes nos complexos 2com demonstraram uma mobilidade do fármaco mais restrita, pois nesse caso existiam duas unidades de cddp dentro das cavidades dos NHC que ainda precisavam se rearranjar a fim de se atingir uma configuração mais estável. Em média, foi possível afirmar que todos os modelos cddp@NHC alcançaram uma relativa estabilidade estrutural com um RMSD médio de 0,775 Å e desvio padrão de 0,291 Å.

Tabela 7. Valores médios do RMSD de cada modelo de complexo cddp@NHC com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.

	1com5a	1com4a	1com3a	1com3b	1com2b	1com1a
RMSD / Å ¹	0,987	0,939	1,163	0,431	0,759	0,581
std ²	0,196	0,092	0,580	0,186	0,404	0,141
	2com5a	2com4a	2com3a	2com3b	2com2b	2com1a
RMSD / Å	0,268	0,374	1,134	0,559	1,065	1,037
std	0,051	0,674	0,481	0,119	0,163	0,400

¹ Cada valor de RMSD foi calculado como uma média dos *frames* da etapa de produção com relação à primeira estrutura dessa etapa. ² std: desvio padrão.

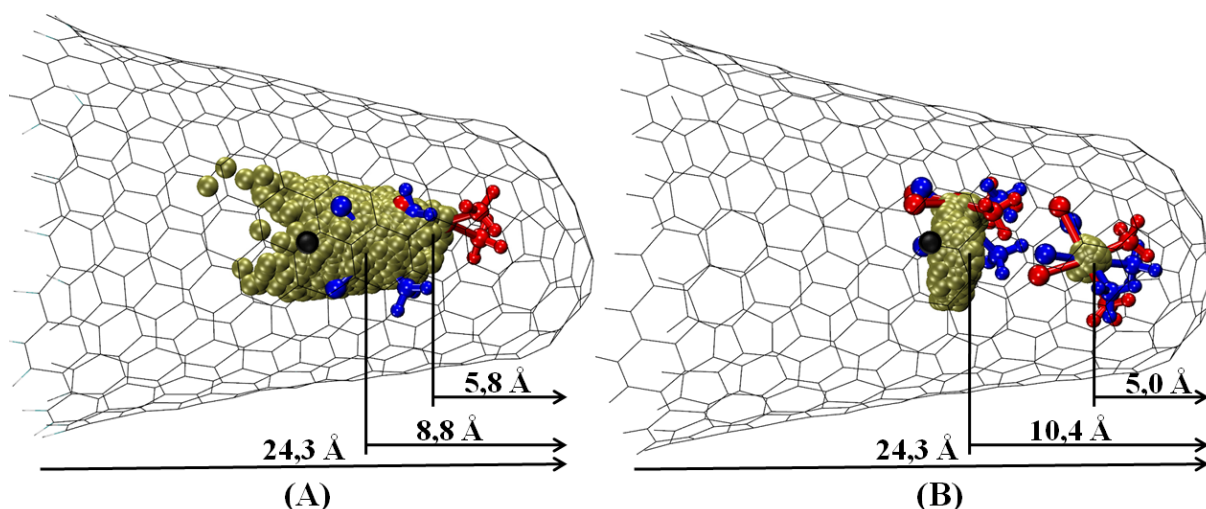
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para entender a mobilidade do fármaco antitumoral nas cavidades das nanoestruturas pristinas de carbono, a segunda análise envolveu o mapeamento da evolução da posição da cddp durante a etapa de produção de 100 ns. A Figura 15 mostra esse mapeamento para os protótipos 1com5a e 2com5a que, por sua vez, são os modelos mais prováveis devido ao a presença do NHC5a. Com base no grupo de esferas douradas nessa figura, que representam o posicionamento no tempo do átomo de Pt, foi possível observar a permanência da metalodroga a base de Pt(II) no interior dos NHC, ao longo de todo o tempo de simulação dos complexos 1com5a e 2com5a, confinamento esse que também foi observado para todos os demais complexos (ver Figura 14). Acrescenta-se ainda que, enquanto no complexo 1com5a (Figura 15A) a cddp moveu em torno do CM do nanocarreador, no modelo 2com5a (Figura 15B), uma molécula de cddp teve a sua mobilidade próxima à região cônica (extremidade fechada) e a outra se manteve em movimento em torno do centro de massa do NHC5a. Cabe ressaltar que as distâncias referentes à estrutura final (em vermelho) foram omitidas na Figura 15B, visto que elas são aproximadamente idênticas com relação à estrutura inicial (em azul).

Para quantificar a mobilidade do fármaco cddp, a função *distance* do *cpptraj* foi empregada, permitindo a verificação da variação temporal das distâncias entre um átomo de carbono da região cônica dos NHC pristinos e o CM da cddp. A representação gráfica dos valores médios dessas distâncias, que foram calculados a partir das trajetórias de 100 ns de cada complexo cddp@NHC, encontra-se na Figura 16, assim como os valores de desvio padrão (std) que fornecem uma ideia da intensidade das flutuações dessas distâncias.

Analisando os resultados da Figura 16A, foi possível verificar que, de um modo geral, a diminuição do ângulo de cone (θ) dos modelos de NHC (do 1a para o 5a) contribuiu para o aumento da distância entre os átomos de carbono da extremidade fechada dos NHC (região cônica) e o CM da cddp, como notado no caso dos complexos 1com1a, 1com2b e 1com3a.

Figura 15. Comportamento dinâmico da molécula de cisplatina no interior da cavidade do NHC para os complexos 1com5a (A) e 2com5a (B).



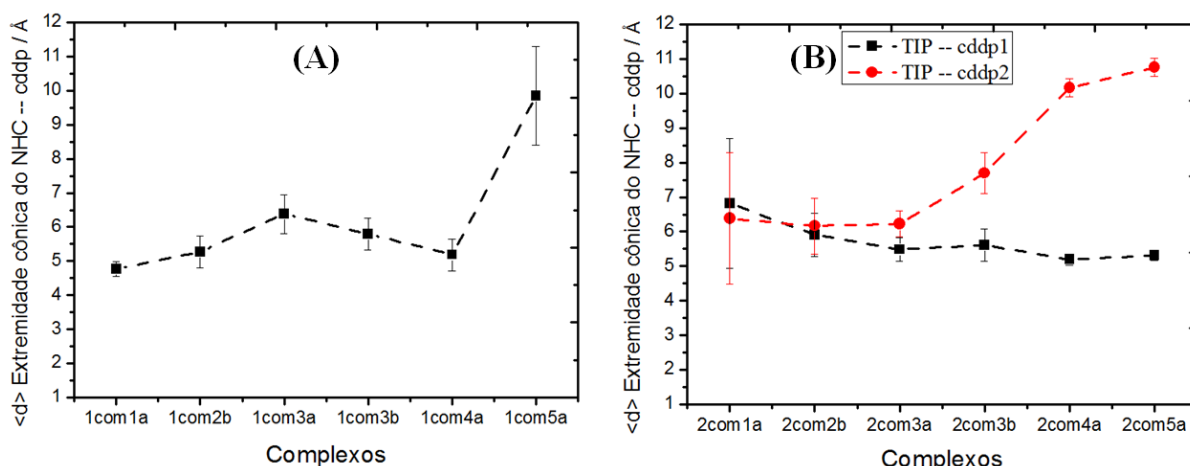
*As esferas douradas representam a variação temporal da posição do átomo de Pt da cddp ao longo da trajetória de 100 ns dos complexos. O centro de massa do NHC está indicado pela esfera em preto e as estruturas iniciais e finais da cisplatina, com todos os átomos explícitos, estão indicadas pelas representações em azul e vermelho, respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Esse aumento consistiu no afastamento da cddp preferencialmente para a extremidade aberta dos NHC, efeito esse que foi mais pronunciado no caso do complexo 1com5a devido ao fato do NHC5a ter o menor ângulo de cone e, conseqüentemente, uma topologia mais cilíndrica. A Figura 16B mostrou um comportamento similar para os complexos com duas cddp confinadas. Nesse caso, foi possível observar um aumento da $\langle d \rangle$ para a cddp2, que estava localizada na região próxima à extremidade aberta, associado com um pequeno decréscimo dessa $\langle d \rangle$ para a cddp1 encontrada próxima à “ponta” ou extremidade fechada dos NHC. Como afirmado anteriormente, o efeito do ângulo do cone (θ) foi mais acentuado para os complexos que englobavam o NHC5a que se caracterizava, principalmente, pelo pequeno volume de sua cavidade.

A fim de se estudar sobre como as estruturas de solvatação dos modelos de NHC prístinos foram influenciadas pelo confinamento do fármaco antitumoral, as funções de distribuição radial (RDF) do tipo $g(r)$ CM--O_w, definidas entre o CM de cada modelo de NHC e os átomos de oxigênio das moléculas de solvente (água), foram calculadas e analisadas.

Figura 16. Distâncias médias ($\langle d \rangle$) entre o átomo de carbono central da extremidade cônica de cada modelo de NHC prístino e o centro de massa da cisplatina para os complexos com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.



*O termo "TIP" refere-se à região cônica da topologia de cada modelo de NHC.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

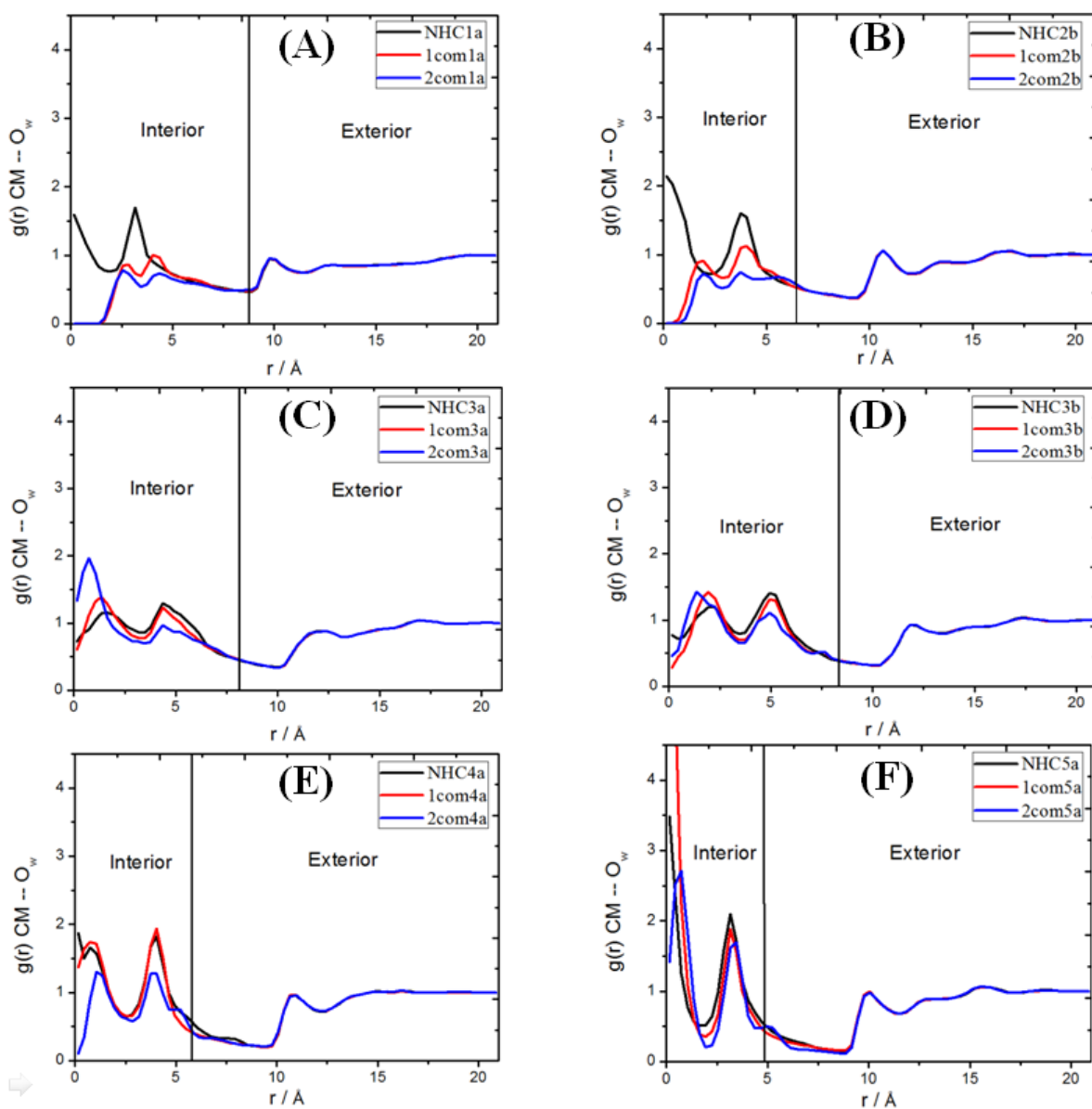
Essas RDF para os doze complexos de inclusão cddp@NHC (ver Figura 14) estão representadas graficamente na Figura 17. A primeira conclusão que se pôde formular com base na análise do comportamento das RDF expresso na Figura 13 foi que as camadas externas de solvatação de todos os sistemas não sofreram modificações com a inclusão do agente antitumoral, como sugerido na região "Exterior" de todas as RDF representadas. De fato, as mudanças significativas nas RDF ocorreram na região das cavidades das nanoestruturas ($r < 9,0 \text{ \AA}$) onde a camada de solvatação interna foi definida.

Informações sobre os picos e o número de coordenação (NC) das camadas de solvatação derivados da região "Interior" destacada nas RDF da Figura 17 estão organizadas na Tabela 8.

Os dados da Figura 17A-B e da Tabela 8 indicaram que o primeiro pico em $0,15 \text{ \AA}$ nas RDF do NHC1a e NHC2b desapareceu no caso dos complexos 1com (com uma cddp) e 2com (com duas cddp) quando ocorreu a inclusão da cddp. Esse efeito sugeriu que o fármaco deve ter ocupado uma posição média próxima ao CM desses modelos de NHC prístinos,

promovendo assim, a expulsão das moléculas de água dessa região. Esse mesmo efeito não foi claro para os outros complexos, o que pode estar conectado com a posição do CM dos NHC mais estreitos ou tubulares que, diferentemente dos complexos com o NHC1a e o NHC2b, não estava próximo à extremidade cônica como pode ser observado na Figura 5.

Figura 17. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM- O_w , definidas entre o centro de massa dos modelos de NHC prístinos e os átomos de oxigênio (O_w) das moléculas de solvente (água), para os NHC puros e os complexos cddp@NHC.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ainda sobre as RDF da Figura 17, verificou-se novamente a existência de dois picos na região “Interior” em todas as espécies que, por sua vez, representavam o número e a posição de moléculas de água no interior das cavidades dos NHC prístinos. O segundo pico foi particularmente interessante, pois ele representou, de fato, a camada interna de solvatação. Além disso, o NC2 na Tabela 8 foi o parâmetro que permitiu descrever, qualitativamente, a quantidade de moléculas de solvente (água) que se encontravam, em média, nas cavidades dos nanocarreadores de carbono avaliados.

Tabela 8. Posições dos picos e números de coordenação das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w, definidas entre o centro de massa dos modelos de NHC e os átomos de oxigênio das moléculas de água, dos complexos cddp@NHC com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.

Modelo	$\theta / ^\circ$	$r / \text{Å}^1$		NC1 ²	$r / \text{Å}$		NC2 ³
		1 ^o pico	1 ^o mínimo		2 ^o pico	2 ^o mínimo	
NHC1a	112,9	0,15	1,95	1,07	3,15	4,65	15,35
1com1a		2,85	3,45	4,00	4,05	5,25	16,46
2com1a		2,55	3,45	3,49	4,35	5,55	15,99
NHC2b	83,6	0,15	2,25	1,70	3,75	4,95	19,48
1com2b		1,95	2,85	2,64	4,05	4,95	15,83
2com2b		1,95	2,85	1,98	3,75	4,65	9,44
NHC3a	60,0	1,65	3,45	6,07	4,35	6,15	35,37
1com3a		1,35	3,45	5,79	4,35	6,15	32,15
2com3a		0,75	3,45	5,31	4,35	6,15	28,07
NHC3b	60,0	1,95	3,45	6,11	4,95	6,15	36,33
1com3b		1,95	3,45	6,15	4,95	6,15	33,90
2com3b		1,35	3,45	5,87	4,95	6,15	30,32
NHC4a	38,9	0,15	2,55	2,33	4,05	5,55	25,40
1com4a		0,75	2,55	2,41	4,05	4,95	20,47
2com4a		1,05	2,85	2,68	3,75	4,65	13,81
NHC5a	19,2	0,15	1,65	0,56	3,15	4,95	17,04
1com5a		0,15	1,95	0,90	3,15	4,95	14,82
2com5a		0,75	1,95	0,93	3,45	4,35	11,28

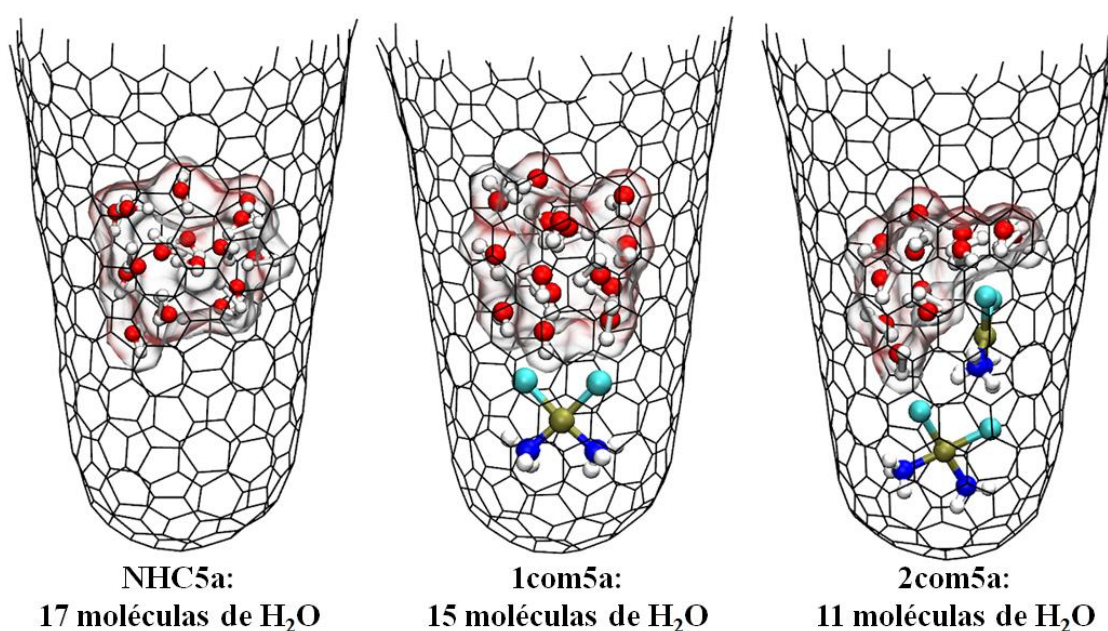
¹ Distância média referente aos *frames* da etapa de produção. ² Número de coordenação (NC) referente ao primeiro pico e que foi calculado com a integral de zero até o valor do 1^o mínimo. ³ NC que engloba o primeiro e o segundo pico, cujo a integral foi calculada de zero até o valor do 2^o mínimo.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De um modo geral na Tabela 8, a redução progressiva do NC2 para os complexos com uma (1com) e duas (2com) cddp refletiu exatamente o número de moléculas de água expelidas das cavidades dos NHC para possibilitar a acomodação de uma e duas unidades desse fármaco antitumoral. Mais uma vez, foi possível notar que as estruturas incluindo o NHC3a e o NHC3b foram aquelas que acomodaram os maiores números de moléculas de água em suas cavidades, em torno de 30 moléculas, devido às respectivas topologias dessas nanoestruturas que se destacam pelas extremidades fechadas (região cônica) mais planas (ver Figura 5). Embora uma pequena redução nesses números de coordenação foi observada nos complexos de inclusão com esses modelos, como consequência da presença do fármaco, esses modelos continuaram a carrear o maior número de moléculas de solvente.

A fim de se visualizar como a presença da molécula de cddp promoveu modificações nas cavidades hidrofóbicas dos NHC, especialmente no caso do NC, por meio de interações intermoleculares com as moléculas de água, *snapshots* foram selecionados a partir de topologias que incluíam apenas as moléculas de água relacionadas com o primeiro e o segundo pico das RDF (Figura 17 e Tabela 8). Essas topologias estão apresentadas na Figura 18 para o caso dos modelos mais prováveis (NHC5a, 1com5a e 2com5a).

Figura 18. *Snapshots* finais da trajetória de 100 ns da dinâmica molecular dos modelos NHC5a, 1com5a e 2com5a, representando apenas a distribuição de moléculas de água referentes à camada interna de solvatação definida pelo número de coordenação NC2 da Tabela 8.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Analisando a Figura 18, foi possível notar uma distribuição esférica das moléculas de solvente em torno do CM dos nanocarreadores de carbono contendo, em média, 17, 15 e 11 moléculas de água no interior do NHC5a, 1com5a e 2com5a, respectivamente. Uma vez que essas novas topologias para os outros modelos seguiram o mesmo comportamento mostrado na Figura 18, elas foram omitidas nesse trabalho para maior clareza. Em se tratando dos complexos 1com e 2com, foi possível deduzir a existência de interações predominantemente eletrostáticas entre as moléculas de cddp e as águas (solvente), com base nas ligações de hidrogênio detectadas ao longo dos *snapshots* das trajetórias dos complexos cddp@NHC.

A última análise dos doze complexos cddp@NHC, envolveu o cálculo de suas energias livre de ligação ($\Delta_b G$) em solução aquosa a fim de se caracterizar, energeticamente, a afinidade ligante-receptor. Essas energias foram estimadas utilizando a abordagem MM-GBSA (MILLER, *et al.*, 2012) que considera o modelo de solvatação implícita *Generalized-Born* (GB) (BASHFORD & CASE, 2000) e o termo referente à área da superfície acessível ao solvente (SASA) (LEE & RICHARDS, 1971) no formalismo da mecânica molecular. Nessa abordagem clássica, as $\Delta_b G$ foram calculadas a partir da diferença entre as energias livres das moléculas de NHC (*host*) e da cddp (*guest*) como descrito pela Equação 3 a seguir (MILLER, *et al.*, 2012).

$$\Delta_b G_{solvated} = \Delta G_{complex, solvated} - [\Delta G_{host, solvated} + \Delta G_{guest, solvated}] \quad (3)$$

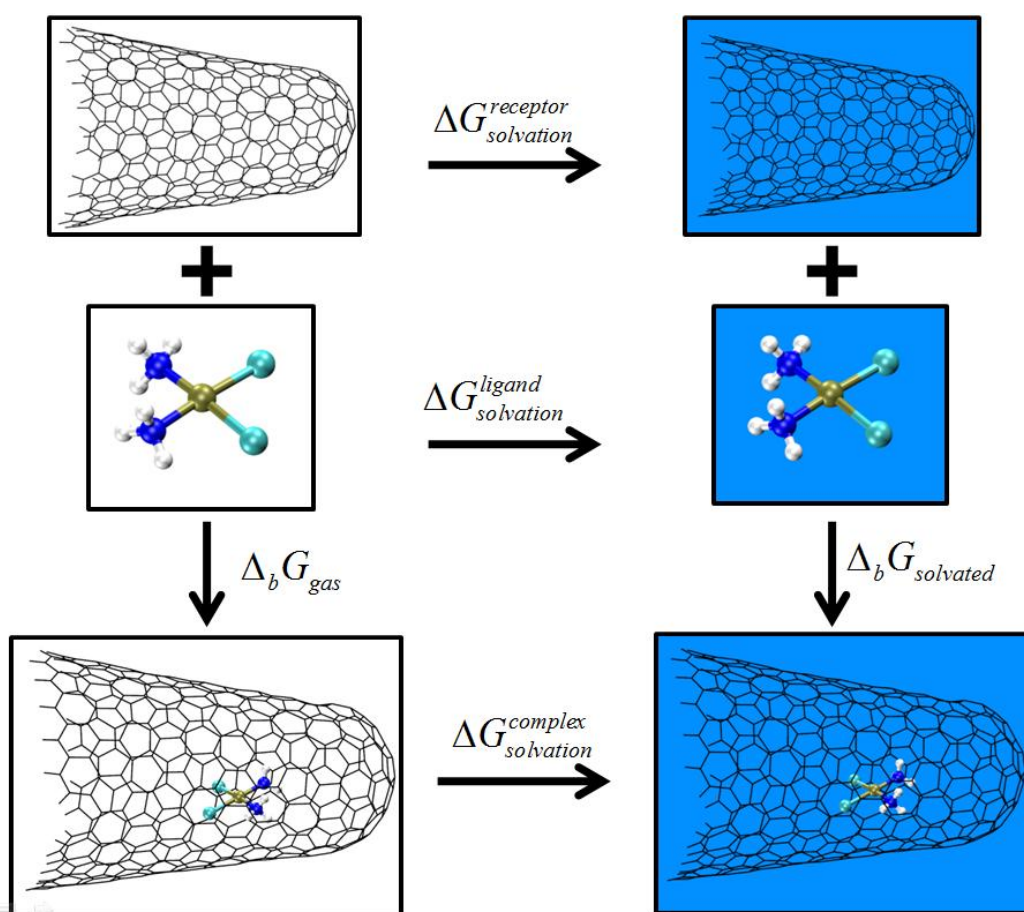
Na Equação 3, os termos $\Delta G_{complex}$, ΔG_{host} , e ΔG_{guest} se referem aos modelos cddp@NHC, NHC e molécula de cddp, respectivamente. Cada termo do lado direito dessa equação é calculado de acordo com a seguinte equação.

$$\Delta G_{i, solvated} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{gas} + \Delta G_{solv} - T\Delta S_{solute} \quad (4)$$

Enquanto o termo ΔE_{gas} indica a variação da energia mecânico-molecular na fase gasosa, o termo ΔG_{solv} na Equação 4 corresponde à energia livre de solvatação que é tratada pelo modelo de solvatação GB. Nesse contexto, o cálculo das energias livre de ligação pode ser derivado esquematicamente a partir de um ciclo termodinâmico para a formação dos complexos cddp@NHC, ciclo esse que inclui as energias envolvidas em todos os processos teóricos descritos pela Equação 3. A Figura 19 a seguir exibe um exemplo do ciclo termodinâmico para a formação do complexo 1com5a, o qual foi escolhido como o protótipo representativo da série dos complexos de inclusão estudados.

Como os cálculos MM-GBSA são aplicados no *ensemble* conformacional derivado da simulação por DM de cada complexo, as $\Delta_b G$ são calculadas como médias ao longo das conformações de uma específica trajetória. Nesse sentido, os valores médios das energias livre de ligação ($\langle \Delta_b G \rangle$) e todas as suas componentes energéticas dos complexos cddp@NHC estão organizados na Tabela 9, cujos dados foram computados tomando por base uma amostra de 1.000 *frames* selecionados das etapas de produção de cada modelo.

Figura 19. Ciclo termodinâmico para o cálculo das energias livre de ligação ($\Delta_b G$) dos complexos cddp@NHC (nesse exemplo para o modelo 1com5a).



*Enquanto as caixas em azul representam as moléculas na presença do solvente implícito, as caixas em branco correspondem às moléculas na fase gasosa.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Tabela 9, os valores das $\langle \Delta_b G \rangle$ indicaram que a formação dos doze complexos inclusão estudados foi um processo termodinamicamente favorável, pelo menos no tempo de 100 ns, com algumas diferenças relacionadas com as topologias de NHC e com o número de

cddp incluídas, como evidenciado na Figura 20A. Nessa figura, verificou-se claramente que os complexos 2com (com duas cddp e representados pela curva em vermelho) se mostraram mais estáveis do que aqueles com apenas uma molécula de cddp (1com, curva em preto).

Tabela 9. Valores médios das energias livres de ligação ($\langle\Delta_bG\rangle$) e de suas componentes energéticas (em kcal mol⁻¹) referentes aos doze protótipos de complexos do tipo cddp@NHC.

Modelo	$\langle\Delta E_{vdW}\rangle$	$\langle\Delta E_{ELE}\rangle$	$\langle\Delta E_{GB}\rangle$	$\langle\Delta E_{SURF}\rangle$	$\langle\Delta E_{GAS}\rangle^1$	$\langle\Delta G_{SOLV(GB)}\rangle^2$	$\langle\Delta_bG\rangle^3$
1com1a	-48,01±1,59	-0,87±0,63	16,66±1,36	-0,98±0,02	-48,88±1,60	15,68±1,36	-29,77±1,33
2com1a	-78,51±2,40	-0,53±1,53	24,06±2,16	-1,60±0,06	-79,04±2,51	22,46±2,16	-49,84±2,29
1com2b	-50,56±1,99	-2,83±1,40	19,42±1,60	-1,01±0,03	-53,39±2,01	18,41±1,61	-33,35±1,53
2com2b	-92,99±3,52	-0,43±1,29	28,92±1,81	-1,73±0,08	-93,41±3,38	27,19±1,80	-54,75±3,00
1com3a	-48,23±1,45	-8,08±7,39	23,33±7,16	-0,98±0,02	-56,31±7,41	22,35±7,16	-34,96±1,30
2com3a	-96,33±1,93	-10,65±6,10	38,99±5,94	-1,78±0,04	-106,98±6,29	37,20±5,94	-63,06±1,79
1com3b	-52,52±1,90	-3,47±1,21	20,86±1,60	-1,05±0,03	-55,98±1,86	19,81±1,62	-32,51±1,46
2com3b	-98,33±1,88	-5,10±1,47	36,31±1,96	-1,93±0,05	-103,43±2,23	34,38±1,98	-56,68±1,80
1com4a	-69,71±2,91	-9,41±1,03	32,40±2,25	-0,94±0,04	-79,12±3,60	31,46±2,28	-38,51±2,57
2com4a	-115,01±1,87	-12,64±1,38	48,20±1,97	-1,78±0,05	-127,65±2,40	46,42±1,99	-65,03±2,27
1com5a	-54,11±3,49	-21,05±1,89	37,63±2,64	-1,10±0,03	-75,17±4,92	36,52±2,63	-34,78±2,89
2com5a	-126,35±1,83	-47,07±1,92	79,93±2,37	-1,76±0,07	-173,42±2,96	78,17±2,40	-79,27±2,05

*Onde E_{vdW} , E_{ELE} , E_{GB} , E_{SURF} , E_{GAS} , $G_{SOLV(GB)}$ e Δ_bG correspondem à energia de *van der Waals*, a energia eletrostática de *Coulomb*, a contribuição polar para a solvatação pelo modelo *Generalized Born* (GB), a contribuição não-polar para a solvatação, a energia na fase gasosa, a energia livre de solvatação e a energia livre de ligação, respectivamente.

$$^1 E_{GAS} = E_{MM} = E_{\text{ligações}} + E_{\text{ângulos}} + E_{\text{torção}} + E_{vdW} + E_{ELE}$$

$$^2 G_{SOLV(GB)} = E_{GB} + E_{SURF}$$

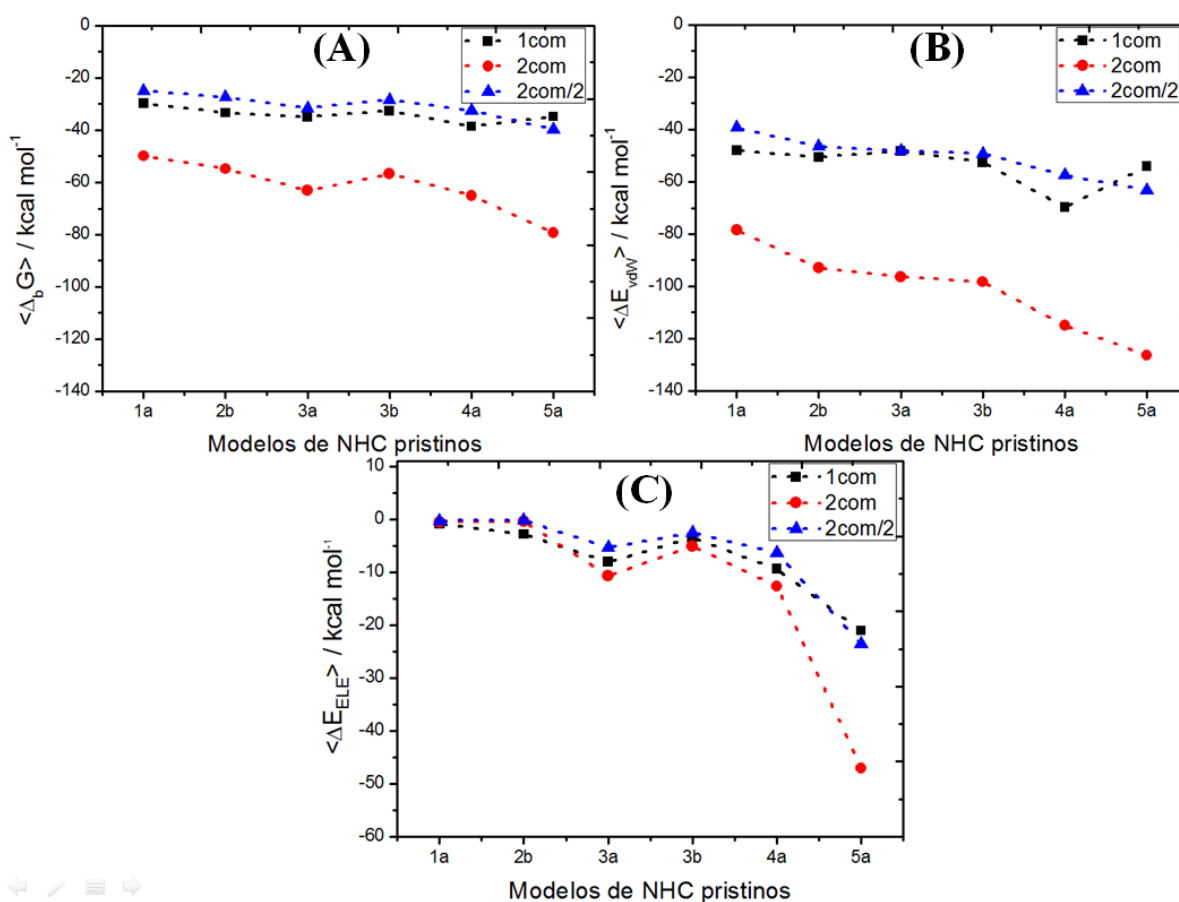
$$^3 \Delta_bG = \Delta E_{GAS} + \Delta G_{SOLV(GB)} - T\Delta S_{\text{solut.}}$$

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Esse comportamento era esperado, uma vez que o aumento do número de ligantes (cddp) acarretou no aumento do número de interações intermoleculares entre o fármaco e o receptor (NHC) que, por sua vez, contribuíram para a estabilização do sistema. É importante mencionar que as interações de vdW estabelecidas entre a molécula de cddp e a superfície interna dos NHC prístinos foram as principais responsáveis por esse efeito geral de estabilização, conforme explicitado pelos valores consideravelmente negativos do termo E_{vdw}

mostrado na Tabela 9 e Figura 20B. Curiosamente, a estabilização extra adquirida pelo sistema devido à inclusão da segunda cddp foi quase a mesma que a observada devido a primeira cddp sugerindo, pelo menos para o caso da presença de algumas unidades de fármacos confinados, uma contribuição aditiva para a energia de interação (ver linha azul na Figura 20).

Figura 20. Valores médios da $\Delta_b G$ (A), ΔE_{vdW} (B) e da ΔE_{ELE} (C) ao longo do *ensemble* conformacional constituído por 1.000 estruturas para cada um dos doze modelos de complexos cddp@NHC.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além das interações de vdW, as interações eletrostáticas, que estão relacionadas com a componente E_{ELE} , também se tornaram cada vez mais significativas na medida em que se prosseguiu para complexos com modelos de NHC com ângulo de cone (θ) cada vez menores (ver Figura 20C), com destaque para o modelo 2com5a. Efeito esse que pode estar conectado com a formação das interações entre os dois fármacos encapsulados (cddp1--cddp2),

especialmente do tipo ligação de hidrogênio (NH--Cl). De um modo geral, o efeito estabilizador dessas duas interações (vdW e eletrostática) está em consonância com estudos reportados envolvendo simulações por DM de complexos constituídos por unidades de cddp encapsuladas em NTC (MEJRI, *et al.*, 2015). A Figura 20A também demonstrou que a diminuição do ângulo de abertura de cone (θ) dos modelos de NHC induziu na diminuição da $\langle\Delta_bG\rangle$ dos modelos de complexo cddp@NHC. Esse ganho de estabilidade pode ter sido relacionado ao fato de que cavidades mais estreitas (menor θ) facilitaram a interação da cddp com a superfície interna dos NHC, promovendo assim, a estabilização do sistema. Por esse motivo, os complexos 1com4a e 2com5a, ambos constituídos pelos NHC com menores θ , foram apontados, em média, como os modelos mais estáveis devido aos menores valores de $\langle\Delta_bG\rangle$.

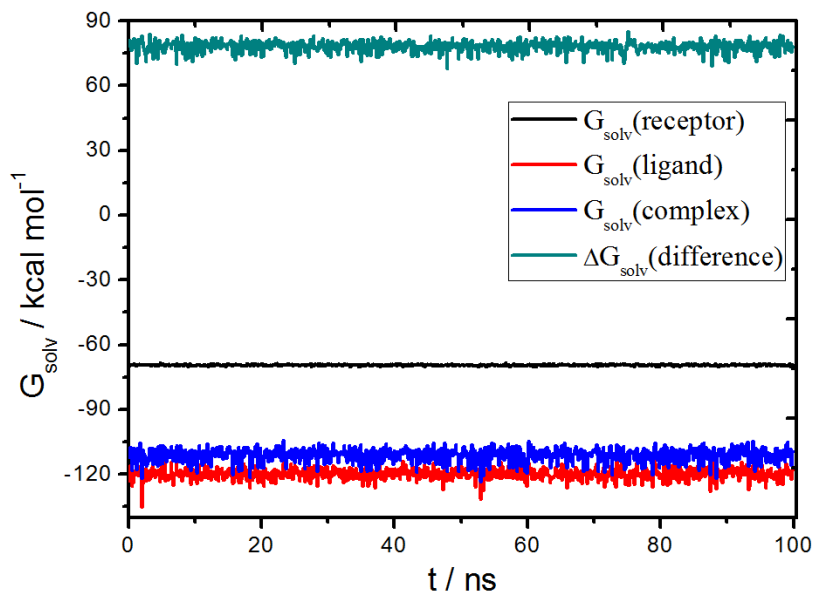
Ainda no que se refere aos dados da Tabela 9, apesar de todos os modelos de complexos cddp@NHC serem estáveis na fase gasosa, devido aos valores progressivamente negativos de $\langle\Delta G_{GÁS}\rangle$, todas as energias livre de solvatação ($\Delta G_{SOLV(GB)}$) foram positivas, o que sugeriu um efeito desestabilizador sobre os complexos para o caso da solvatação implícita com o modelo GB. Esses resultados puderam ser compreendidos ao se analisar as contribuições individuais para a ΔG_{SOLV} , isto é, a energias livre de solvatação dos complexos cddp@NHC e das espécies individuais (NHC e cddp). Essas diferenças nos valores das ΔG_{SOLV} , tomando como exemplo o complexo 2com5a, estão representadas na Figura 21 a seguir.

Os valores de ΔG_{SOLV} da Figura 21 indicaram que o processo de solvatação do ligante, no caso o dímero de cddp (cddp1--cddp2), foi o mais favorável com um valor médio de $-119 \text{ kcal mol}^{-1}$. Em contraste, a solvatação do NHC foi mais desfavorável com um valor médio de $-69,4 \text{ kcal mol}^{-1}$, resultado esse esperado devido à natureza altamente hidrofóbica dessa nanoestrutura pristina de carbono. Entretanto, notou-se que a inclusão do dímero do NHC5a conferiu um ganho de estabilidade com uma valor médio de $-40,6 \text{ kcal mol}^{-1}$, o que sugere que a inclusão do fármaco teve um efeito estabilizador no processo de solvatação.

No entanto, uma vez que o cálculo da ΔG_{SOLV} , seguindo o ciclo termodinâmico indicado na Figura 19, envolve uma dupla diferença como mostrado na Equação 5 a seguir:

$$\delta\Delta G_{solv} = \Delta G_{solv}^{cddp@NHC} - (\Delta G_{solv}^{cddp} + \Delta G_{solv}^{NHC}) \quad (5)$$

Figura 21 - Evolução das energias livre de solvatação para o receptor (NHC5a), ligante (cddp--cddp), complexo cddp@NHC e do valor da diferença entre essas componentes do complexo 2com5a durante os 100 ns.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O valor da ΔG_{SOLV} assume um valor positivo, como evidenciado anteriormente na Tabela 9, o que sugere, em linhas gerais, que o processo de dissolução desse complexo não é favorável em água (tratada pelo modelo implícito de solvatação GB).

Embora a $\Delta G_{SOLV(GB)}$ tenha mostrado um considerável caráter repulsivo, no saldo energético líquido, a $\langle \Delta_b G \rangle$ continuou a apontar a formação favorável de todos os doze modelos de complexos cddp@NHC estudados.

A entropia do soluto também foi considerada nos cálculos das $\Delta_b G$ a fim de se obter uma descrição mais acurada do processo de formação dos complexos cddp@NHC. Essa propriedade termodinâmica, a qual é descrita pelo último termo na Equação 4 ($T\Delta S_{solute}$), é decomposta como uma soma de contribuições entrópicas resultantes dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais como representado na Equação 6 a seguir.

$$\Delta S_{solute} = \Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{vib} \quad (6)$$

Na Equação 6, cada termo expressa a variação entrópica no processo de formação do complexo ($\Delta S = S_{complexo} - (S_{cddp} + S_{NHC})$). Enquanto os cálculos das entropias translacionais e rotacionais do soluto (complexos cddp@NHC) assumem o modelo do rotor rígido utilizando

as funções de partição translacionais (Q_{trans}) e rotacionais (Q_{rot}) do *ensemble* considerado na simulação, a entropia vibracional foi estimada baseando-se na aproximação quase-harmônica (SCHLLTTER, 1993; BROOKS, *et al.*, 1995) por meio da avaliação da matriz de covariância de $3N$ coordenadas e da função de partição vibracional (Q_{vib}). Os dados das entropias dos doze complexos cddp@NHC, incluindo as suas componentes da Equação 6, estão expressos na Tabela 10 a seguir. Vale ressaltar que para o cálculo dos termos entrópicos, a temperatura considerada foi de 298,15 K. Embora as simulações tenham sido conduzidas em uma temperatura média de 310 K, os cálculos de entropia apresentados consideraram a temperatura de 298,15 K, uma vez que o erro acarretado na $\Delta_b G$ em 310 K é da ordem de $0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, o que pode ser negligenciado.

Tabela 10. Contribuições entrópicas em kcal mol^{-1} dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais dos modelos de complexos cddp@NHC.

Modelo	1com1a	2com1a	1com2b	2com2b	1com3a	2com3a	1com3b	2com3b	1com4a	2com4a	1com5a	2com5a
$T\Delta S_{\text{trans}}$	-12,76	-13,32	-12,74	-13,29	-12,75	-13,31	-12,76	-13,32	-12,75	-13,31	-12,75	-13,31
$T\Delta S_{\text{rot}}$	-8,66	-10,23	-8,65	-10,36	-8,66	-10,44	-8,65	-10,43	-8,63	-10,29	-8,65	-10,28
$T\Delta S_{\text{vib}}$	17,98	16,80	19,76	12,18	22,41	17,05	17,74	11,38	12,23	7,41	17,54	7,61
$T\Delta S_{\text{tot}}$	-3,43	-6,75	-1,64	-11,48	1,00	-6,71	-3,66	-12,36	-9,15	-16,20	-3,87	-15,98

*O termo $T\Delta S_{\text{tot}}$ envolve a soma das contribuições entrópicas para a formação do complexo cddp@NHCox (soluto) na Equação 5. A temperatura considerada foi de 298,15 K.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A análise dos dados da Tabela 10 apontou que a formação dos complexos cddp@NHC resultou na perda dos graus de liberdade translacionais e rotacionais, uma vez que essas contribuições (ΔS_{trans} e ΔS_{rot}) foram negativas. Em se tratando dos complexos 1com (uma cddp encapsulada), esses dois termos entrópicos demonstraram excelente concordância com os valores previstos por cálculos quânticos ($-12,8$ and $-8,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) em um trabalho anterior (DE SOUZA, *et al.*, 2013) focado no complexo de inclusão cddp@NHC4a (1com4a na notação do presente trabalho). Por outro lado, como o número de modos normais de moléculas não-lineares aumenta na ordem de $3N - 6$, onde N é o número de átomos, todas as variações das entropias vibracionais (ΔS_{vib}) para a formação do complexo foram positivas. De modo geral, o termo $-T\Delta S_{\text{solute}}$ (ver Equação 4) para cada complexo assumiu um valor positivo, o que indicou que o termo entrópico teve uma contribuição líquida positiva para a afinidade de ligação de monômeros cddp e NHC. Em outras palavras, o termo $-T\Delta S_{\text{solute}}$ contribuiu repulsivamente para o cálculo da energia livre de Gibbs, diminuindo a espontaneidade no processo de formação dos complexos de inclusão, embora no balanço

energético líquido, a formação de todos os complexos cddp@CNH ainda se mostrou favorável.

Por fim, um efeito observado na DM de todos os complexos simulados foi a mobilidade restrita do agente antineoplásico (cddp) no interior das cavidades dos modelos de NHC prístinos, que perdurou por todas as trajetórias de 100 ns dos complexos simulados. Entretanto, vale a pena enfatizar que estudos experimentais relatam que, na verdade, a liberação da cddp a partir dos NHC ocorre majoritariamente ao longo dos buracos (vacâncias) nessas nanoestruturas que são resultantes de processos oxidativos conduzidos em etapas do preparo dos NHC (AJIMA, *et al.*, 2006). Assim, a inexistência dessas vacâncias nos modelos de NHC prístinos simulados pode ter sido o principal fator que contribuiu para o confinamento da cddp, impedindo o processo de liberação espontânea desse fármaco. Com relação ao tempo de simulação, partiu-se do pressuposto de que ele tenha sido suficiente para a simulação desses sistemas, visto que os eventos de liberação controlada de cddp encapsuladas em modelos de NTC com dimensões comparáveis aos NHC avaliados, que é um sistema similar ao estudado nesse trabalho, ocorreram na faixa de 2,0 a 25,0 ns (MEJRI, *et al.*, 2015). Apesar disso, vale salientar que a análise desenvolvida nessa etapa do trabalho, a qual possuiu um caráter exploratório desses modelos de complexos cddp@NHC, constituiu um estudo preliminar que possibilitou a caracterização do efeito da alta hidrofobicidade desses NHC prístinos sobre o carreamento do fármaco cddp, informação essa que será útil para uma comparação com os efeitos obtidos nos estudos com os modelos de NHC oxidados e reduzidos.

4.4 MODELAGEM DOS NHC OXIDADOS

Após o estudo do comportamento dinâmico dos complexos de inclusão cddp@NHC envolvendo os NHC prístinos, o próximo passo no projeto envolveu a construção e a análise teórica, por meio de simulações por DM, de modelos de NHC oxidados (NHCox), para posteriormente serem avaliados como carreadores do agente antitumoral cddp. A relevância dessa etapa de modelagem de nanoestruturas oxidadas de carbono está centrada no fato de que ela possibilitará a avaliação de protótipos de NHC mais realísticos, uma vez que esses materiais são previamente funcionalizados por meio de processos oxidativos, com o intuito de melhorar a biocompatibilidade no contexto das aplicações biomédicas (KAROUSIS, *et al.*, 2016).

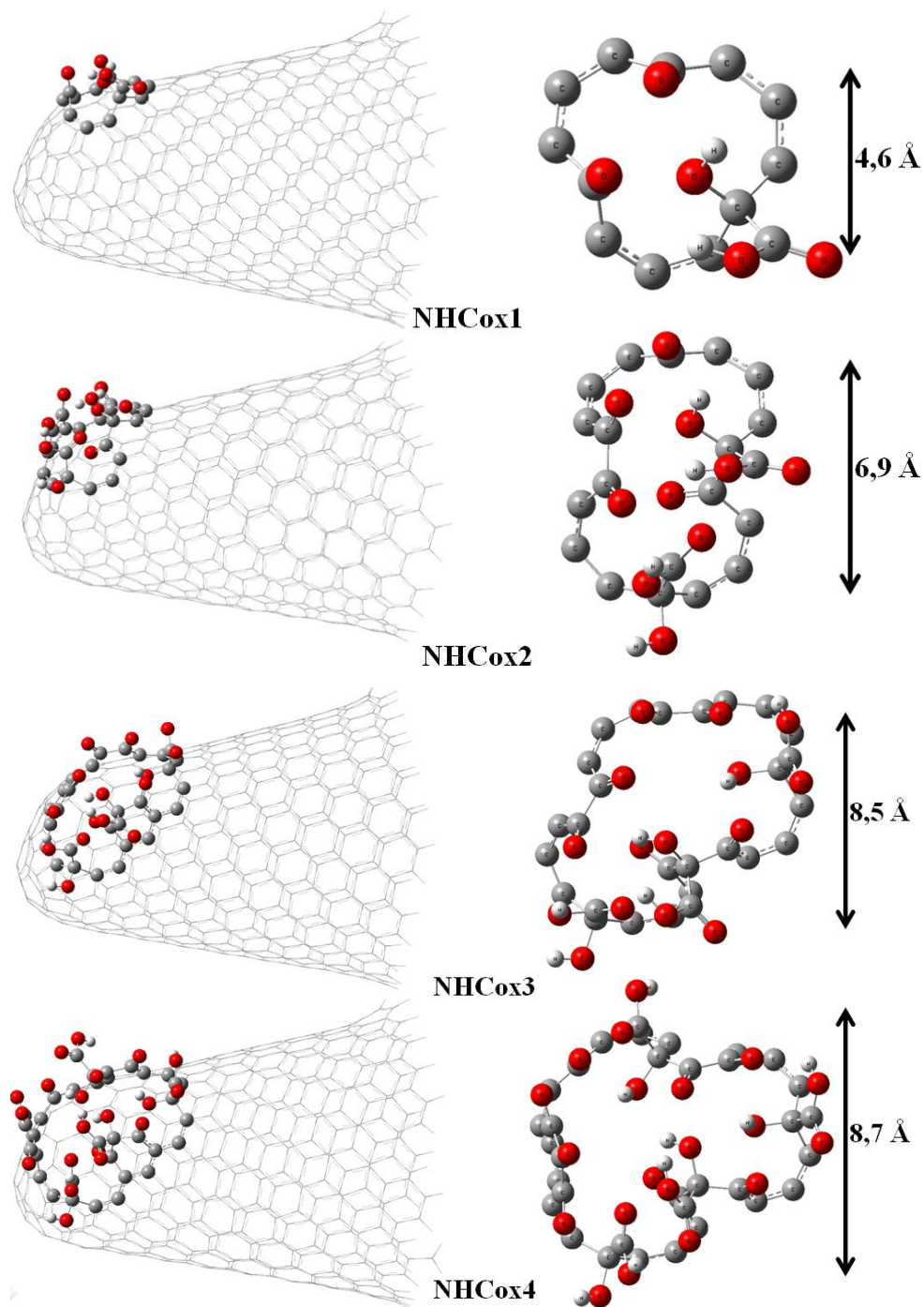
Como descrito na seção da metodologia, a construção das topologias oxidadas desse trabalho foi baseada no mecanismo de oxidação proposto e estudado anteriormente para NTC e NHC na presença de moléculas de O_2 e H_2O (DA SILVA Jr, *et al.*, 2009 ; DE SOUZA, L. A.; *et al.*, 2017). Para isso, o NHC5a (Tabela 2) foi selecionado como a estrutura de partida para a elaboração dos modelos oxidados, tendo em vista que experimentalmente, esse protótipo pristino é o mais provável. As estruturas otimizadas no nível semiempírico AM1 dos quatro modelos de NHCox, que correspondem a quatro diferentes graus de oxidação, encontram-se na Figura 22.

Na Figura 22, as estruturas dos NHCox são identificadas pela nomenclatura NHCox-N, onde doravante, “NHC” se refere ao NHC5a e N (N = 1, 2, 3 e 4) é o parâmetro que indica o grau de oxidação da nanoestrutura estudada. Cada um desses estágios de oxidação envolve uma reação de oxidação entre 1 mol de NHC com uma relação estequiométrica de 2:1 entre o agente oxidante O_2 e H_2O . Nesse sentido, pôde-se concluir, como indicado na Figura 22, que o aumento do grau de oxidação acarretou no aumento do nível de funcionalização das nanoestruturas, devido à maior formação de grupamentos funcionais do tipo hidroxilas (OH), carbonilas (C=O) e carboxilas (CHO). Nessa perspectiva, o NHCox4, que é o modelo resultante de uma grau de oxidação 4, contabilizou um total de 15 grupos funcionais em contraste a apenas 4 grupos, no caso do NHC oxidado até o grau 1 (NHCox1).

Além de incluir esses grupos funcionais, outro efeito resultante da quebra da isotropia estrutural dos NHC pristinos, imposta pelo processo de oxidação, foi a formação das *nanowindows*. Esse último termo já havia sido empregado por Murata e colaboradores (MURATA, *et al.*, 2002) para descrever as vacâncias formadas nas superfícies dos NHC quando submetidos a processos de oxidação com O_2 em diferentes temperaturas. Em relação ao tamanho dessas *nanowindows*, a Figura 22 sugere que o aumento do grau de oxidação das nanoestruturas acarreta na formação de vacâncias cada vez maiores nas superfícies desses materiais de carbono, como pode ser constatado a partir do aumento das distâncias médias entre átomos de carbono em direções opostas nas *nanowindows*. Essa relação entre aumento do tamanho da vacância com o estágio de oxidação já havia sido relatada em um estudo conduzido por Souza e colaboradores (DE SOUZA, *et al.*, 2017) envolvendo uma série de topologias oxidadas construídas a partir do modelo de NHC4d (DOS SANTOS, *et al.*, 2014). Apesar das diferenças geométricas entre os NHC pristinos 5a e 4d, como por exemplo o ângulo de cone (θ) e o número de pentágonos (n), as respectivas estruturas oxidadas demonstraram semelhanças no tamanho das *nanowindows*, sendo que para o grau de oxidação

4 verificou-se uma diferença estrutural de 0,2 Å entre as vacâncias do NHCox4 (esse trabalho) e do NHC4d-4 (DE SOUZA, *et al.*, 2017).

Figura 22. Modelos de NHCox e as suas respectivas *nanowindows* resultantes dos quatro diferentes graus de oxidação.



*As esferas vermelhas, brancas e cinzas referem-se aos átomos de oxigênio, hidrogênio e carbono das vacâncias nas nanoestruturas, respectivamente. As distâncias indicadas representam valores médios.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Do ponto de vista da termodinâmica da formação dos modelos de NHCox propostos nesse trabalho, pode-se esperar energias de formação mais favoráveis do que as respectivas energias para os modelos estudados por Souza e colaboradores (DE SOUZA, *et al.*, 2017). Isso pode ser afirmado, uma vez que ao contrário do NHC4d, o NHC5a possui um maior número de defeitos em sua estruturas, representados pelos pentágonos ($n = 5$), que são sítios potencialmente reativos que podem orientar e facilitar o processo de oxidação (GERBER, *et al.*, 2011). A relevância dessas características está centrada no fato de que elas garantem a consistência dos modelos de NHCox elaborados nesse trabalho para as simulações por DM.

4.5 SIMULAÇÕES POR DM DOS NHC OXIDADOS

A fim de se avaliar a dinâmica desses modelos oxidados de NHC em solução aquosa, a próxima etapa nesse trabalho consistiu na parametrização e nas simulações por DM dessas topologias oxidadas, seguindo os protocolos apresentados na seção da metodologia. É importante salientar que a partir de agora, o grau de oxidação ($N = 1$ a 4) tornou-se a variável a ser analisada, uma vez que ela era responsável pela diferenciação entre os modelos de NHCox, enquanto o ângulo de cone ($\theta = 19,2^\circ$) foi mantido constante nessa série estudada.

Após o tempo de simulação de 100 ns, as trajetórias da DM de cada topologia oxidada foram analisadas, iniciando-se com a verificação do RMSD em função do tempo com relação à primeira estrutura (*frame*) da etapa da produção. A Tabela 11 a seguir apresenta o valor médio e o desvio padrão do RMSD, referente de cada modelo de NHCox e do NHC5a pristino.

Tabela 11. RMSD médio do NHC5a pristino e dos quatro modelos de NHCox em diferentes graus de oxidação ao longo da trajetória de 100 ns da etapa de produção de cada modelo.

Modelo de NHC	NHC5a	NHCox1	NHCox2	NHCox3	NHCox4
RMSD / Å	0,200	0,209	0,237	0,229	0,311
std / Å*	0,036	0,003	0,042	0,031	0,041

* Desvio padrão.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De um modo geral, embora os dados de RMSD da Tabela 10 sugeriram pequenas variações estruturais nesses nanomateriais de carbono, os protótipos oxidados evidenciaram uma menor estabilidade estrutural do que a observada na topologia pristina (NHC5a). Esse

comportamento pode estar conectado à maior complexidade dos NHCox, se comparada ao modelo pristino, devido a presença de grupos funcionais gerados nas superfícies dessas estruturas que, por sua vez, conferiram um aumento do número de graus de liberdade dos sistemas. Além disso, também foi possível verificar que o aumento do grau de oxidação também acarretou em maiores flutuações estruturais, com destaque para o NHCox4, que é referente ao estágio de oxidação 4, com um RMSD médio de $0,311 \pm 0,041$.

Além da avaliação estrutural da etapa de produção, as outras etapas do protocolo de simulação empregado também foram validadas, incluindo o procedimento artificial de aquecimento e a equilibração da densidade do sistema. Seguindo o mesmo comportamento dos modelos de NHC prístinos, verificou-se em média, uma estabilização da temperatura em torno de 310,00 K e da densidade do sistema em $0,966 \text{ g cm}^{-3}$ para os quatro protótipos oxidados, validando mais uma vez o protocolo utilizado para as simulações.

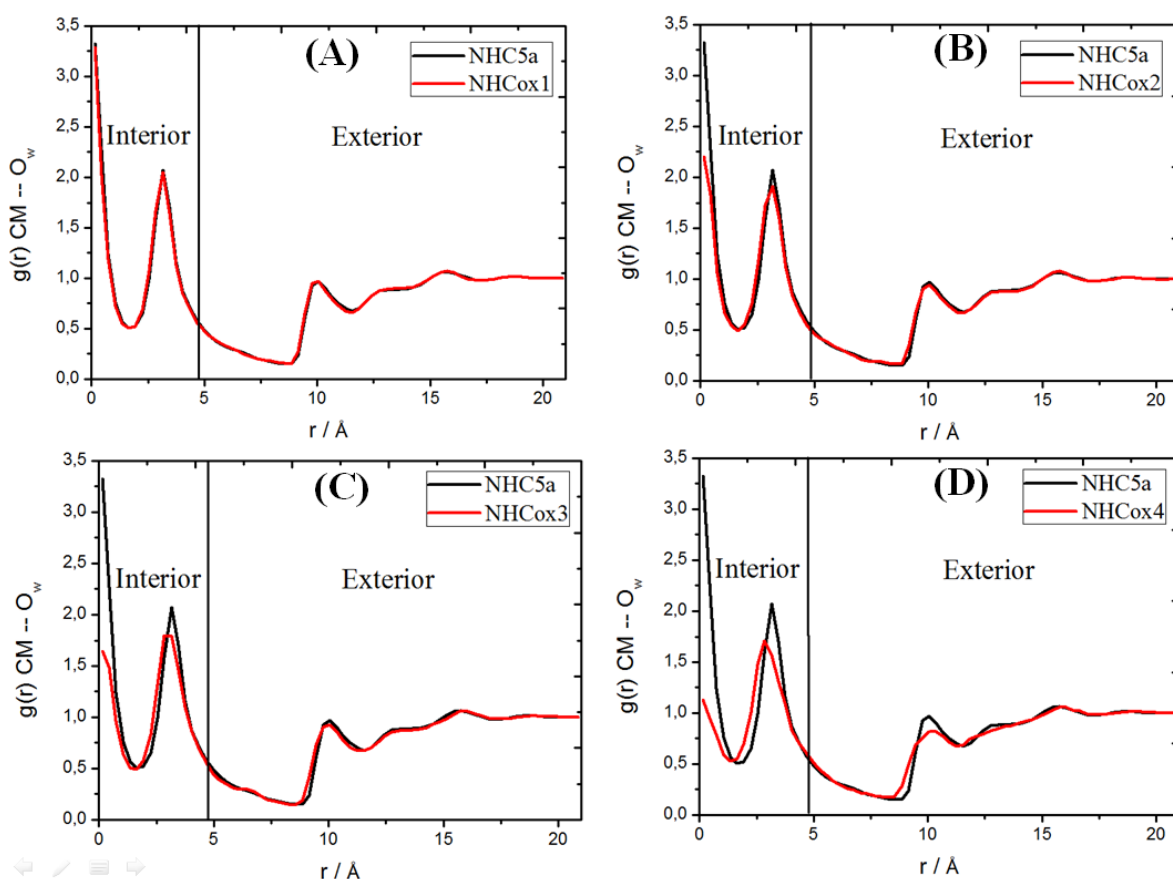
Com o intuito de se verificar como a presença das *nanowindows* nas topologias oxidadas em diferentes graus influenciou nas interações com as moléculas de solvente, as funções de distribuição radial (RDF) do tipo $g(r) \text{ CM--O}_w$ foram novamente obtidas e comparadas com o modelo de NHC pristino correspondente (NHC5a). A comparação do perfil dessas RDF entre os modelos de NHCox e o NHC5a está representada na Figura 23.

Ao comparar as RDF $g(r) \text{ CM--O}_w$ dos quatro modelos oxidados (Figura 23) com a mesma função definida para o protótipo pristino (Figura 23, NHC5a), pôde-se constatar uma semelhança significativa nos perfis dessas funções de correlação de pares, como por exemplo, no posicionamento e no número de picos, sugerindo que a existência das vacâncias oxidadas exerceu um efeito relativamente inexpressivo sobre as estruturas de solvatação desses nanomateriais de carbono. Assim como no modelo pristino, as RDF dos NHCox também exibiram dois picos dentro de uma distância de $5,0 \text{ \AA}$ em relação ao CM dos NHC, evidenciando novamente a presença de moléculas de água que compõem a camada de solvatação interna dos nanocarreadores. Ainda sobre a Figura 23, verificou-se uma redução progressiva das intensidades dos dois primeiros picos com o aumento do grau de oxidação, o que indicou uma leve diminuição da probabilidade de se encontrar moléculas de águas nas cavidades dos NHC cada vez mais oxidados.

Os detalhes qualitativos das RDF $g(r) \text{ CM--O}_w$ dos NHCox (Figura 23), incluindo os dados referentes ao modelo pristino NHC5a para fins comparativos, estão expressos na Tabela 12. Assim como a Figura 23, a primeira conclusão que se pôde extrair da Tabela 12 foi que,

em média, os estágios de oxidação não influenciaram no posicionamento dos picos e mínimos das RDF.

Figura 23. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w definidas entre o centro de massa de cada nanocarreador de carbono (NHCox-N com N = 1 - 4 e NHC5a) e os átomos de oxigênio das moléculas de água.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Entretanto, apesar da presença das vacâncias funcionalizadas nos NHCox não modificarem a posição das camadas de solvatação, pequenas diferenças foram observadas nos números de coordenação (NC1 e NC2). Especificamente, notou-se uma pequena redução do número de moléculas (NC) que compõem as camadas de solvatação com o aumento do grau de oxidação, resultado esse que já havia sido previsto pela redução das intensidades das RDF na Figura 23. De certo modo, esses últimos comportamentos podem ser negligenciados, uma vez que a diferença média entre o NC do modelo pristino com os oxidados ser da ordem de 0,42 moléculas de água.

É importante enfatizar que nas RDF $g(r)$ CM--O_w da Figura 23 foram considerados apenas os átomos de oxigênio presentes nas moléculas de água (solvente), uma vez que em um primeiro momento, o objetivo era verificar como o número de coordenação (NC) referente às cavidades dos NHC seria modificado em função do grau de oxidação da nanoestrutura. Por outro lado, os átomos de oxigênio pertencentes às hidroxilas, carbonilas e carboxilas dos NHCox foram negligenciados nessa análise.

Tabela 12. Dados das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w definidas entre o centro de massa dos modelos de NHCox em diferentes graus e o átomo de oxigênio das moléculas de água.

Modelo	$r / \text{Å}^1$		NC1 ²	$r / \text{Å}$		NC2 ³
	1° pico	1° mínimo		2° pico	2° mínimo	
NHC5a	0,15	1,65	0,56	3,15	4,95	17,04
NHCox1	0,15	1,65	0,54	3,15	4,95	16,87
NHCox2	0,15	1,65	0,51	3,15	4,95	16,61
NHCox3	0,15	1,65	0,48	2,85	4,95	16,49
NHCox4	0,15	1,35	0,28	2,85	4,95	16,50

¹ Distância média. ² Número de coordenação (NC) referente ao primeiro pico e que foi calculado com a integral de zero até o valor do 1° mínimo. ³ NC que engloba o primeiro e o segundo pico, cujo a integral foi calculada de zero até o valor do 2° mínimo.

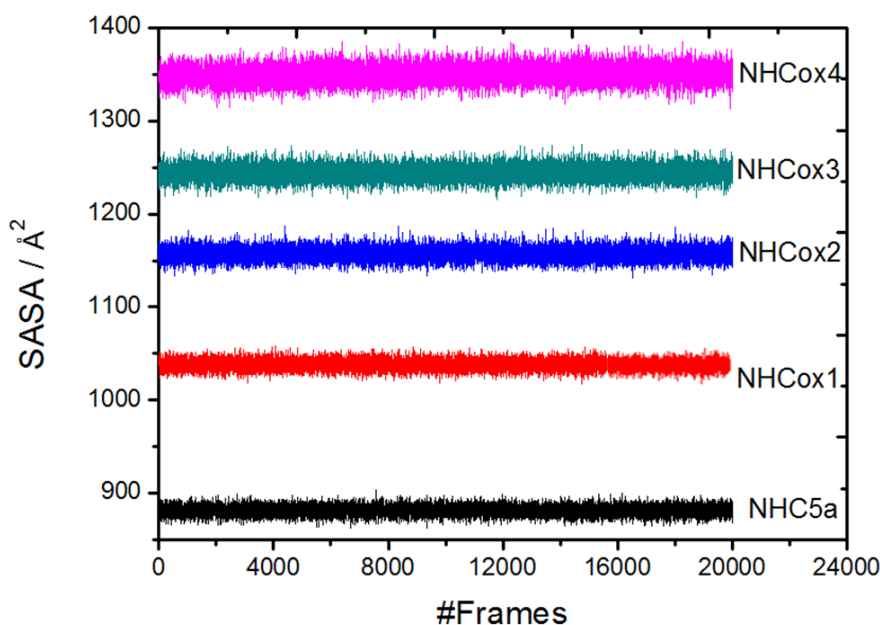
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A última análise dos modelos de NHCox envolveu o cálculo e o monitoramento da área da superfície acessível ao solvente (SASA – *surface acessible solvent area*) do soluto ao longo das trajetórias de 100 ns da etapa de produção. Com unidade de Å^2 , a SASA se refere a uma superfície gerada pela sobreposição dos raios de *van der Waals* de cada átomo que compõe o sistema em questão. No AMBER12[®], essa superfície é construída com base no algoritmo do método LCPO (*Linear combination of pairwise overlaps*) desenvolvido por Weiser e colaboradores (WEISER, SHENKIN e STILL, 1999). Nesse trabalho, a ideia era analisar como a formação das *nanowindows* de diferentes tamanhos nas topologias oxidadas influenciou na acessibilidade das moléculas de solvente. Ressalta-se que a área de uma molécula de água, calculado pelo método LCPO, é, em média, $88,1 \text{ Å}^2$. A Figura 24 a seguir

fornece a representação gráfica da evolução temporal da SASA de cada um dos quatro modelos de NHCox, incluindo a do NHC pristino (NHC5a) para fins comparativos.

Os dados da Figura 24 indicaram nitidamente que o aumento do grau de oxidação acarretou na ampliação da área acessível ao solvente (SASA) dos NHCox que, em média, também manteve-se relativamente estável ao longo de toda a trajetória composta por 20.000 *frames*.

Figura 24. Comportamento da SASA (*Solvent Accessible Surface Area*) em função dos 20.000 *frames* da etapa de produção da dinâmica molecular dos quatro modelos de NHCox e do NHC5a.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em outras palavras, pôde-se concluir que tanto a formação quanto o aumento do tamanho das *nanowindows* funcionalizadas contribuiu para a redução progressiva da hidrofobicidade dos NHC, com destaque para a topologia oxidada no grau 4 (NHCox4) que apresentou a maior área superficial exposta à moléculas do solvente. Especificamente, o estágio de oxidação 4 proporcionou, em média, um acréscimo de 468,89 Å² no valor da SASA em relação ao NHC pristino correspondente. Além dessa ampliação da SASA estar correlacionada com o aumento do número de grupos funcionais polares que, por sua vez, intensificaram o grau de interação do nanomaterial com as moléculas de água, o próprio aumento do número de átomos que compõe as topologias oxidadas também foi outro fator responsável por esse efeito de expansão da SASA. O aumento do número de átomos nos

NHCox pode ser justificado pelo tratamento com as reações de oxidação que resultaram na abertura das *nanowindows* e na subsequente inclusão manual de grupos funcionais nos modelos, a fim de se completar a valência dos átomos de carbono nessas vacâncias. Nessa perspectiva, enquanto o NHC pristino era constituído por 391 átomos, a topologia oxidada no maior grau estudado (NHCox4) contou com 412 átomos.

Por fim, uma vez que a SASA possui uma relação de proporcionalidade com a energia relativa à contribuição não-polar para a solvatação (E_{SURF}), espera-se que as diferenças explicitadas na Figura 24 possam exercer algum efeito sobre as energias livre de ligação ($\Delta_b G$), análise essa que será explorada em detalhes no final da próxima seção desse trabalho.

4.6 SIMULAÇÕES POR DM DOS COMPLEXOS cddp@NHCox

Depois do estudo relativo à evolução temporal de uma série composta por quatro topologias oxidadas de NHC em diferentes estágios, a próxima etapa baseou-se na construção dos complexos de inclusão do tipo cddp@NHCox, seguindo a mesma ideia da elaboração dos modelos de complexos com NHC pristinos (ver início da seção 4.4). Com complexos envolvendo o encapsulamento de no máximo duas unidades de cddp, construíram-se oito protótipos de complexos de inclusão cddp@NHCox, sendo quatro incluindo uma cddp (1com) e mais quatro com duas cddp (2com). Vale ressaltar que na elaboração das estruturas iniciais desses complexos de inclusão, a cddp foi posicionada no CM dos NHCox, no caso dos complexos 1com, ou equidistante ao CM quando se tratava do encapsulamento do dímero de cddp (complexos 2com).

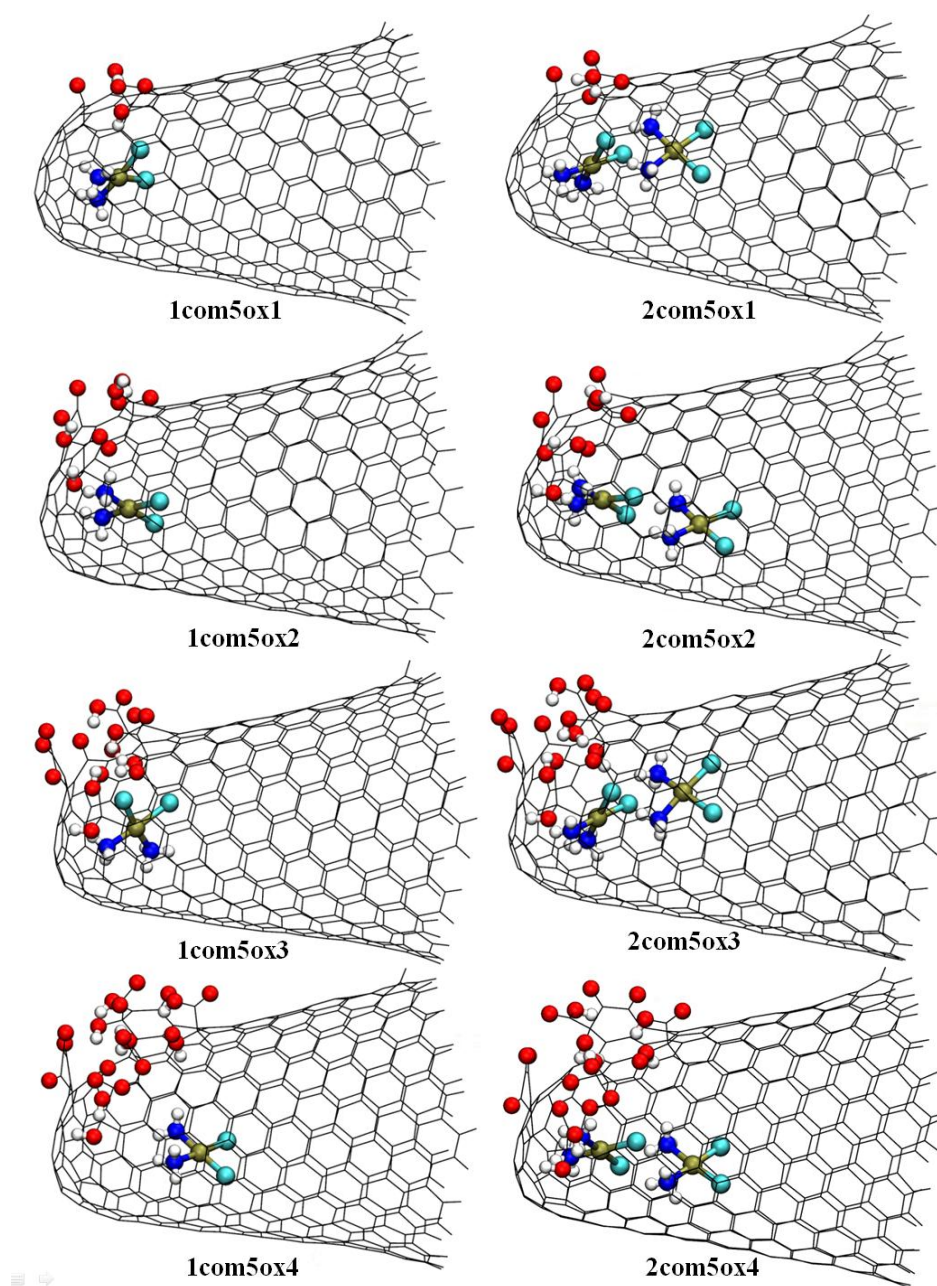
Com o intuito de se investigar o efeito da inclusão das *nanowindows* funcionalizadas sobre a dinâmica dos NHCox carregando a cddp em solução aquosa, bem comparar resultados com o modelo pristino mais provável (NHC5a), simulações por DM foram realizadas com cada protótipo seguindo o mesmo protocolo padrão apresentado na seção da metodologia. Os *snapshots* das estruturas finais da etapa de produção de 100 ns desses complexos de inclusão cddp@NHCox estão apresentados na Figura 25.

Na Figura 25, a nomenclatura utilizada para se referir aos complexos cddp@NHCox inicia-se com um prefixo relacionado com o número de fármacos encapsulados e com um sufixo que indica o grau de oxidação que o NHC5a foi submetido. Por exemplo, no caso do protótipo nomeado “1com5ox1”, o prefixo “1” indica a presença de uma cddp encapsulada, o “com” informa que se trata de um complexo de inclusão e o sufixo “5ox1” mostra que se trata

do NHCox1 que é gerado a partir do primeiro estágio de oxidação do NHC5a pristino. Ainda sobre a mesma figura, os *frames* apresentados apontaram a permanência do fármaco cddp no interior das cavidades dos NHCox, independentemente do grau de oxidação.

As próximas etapas desse trabalho envolveram exatamente a análise das trajetórias da DM de cada um dos modelos de complexos de inclusão apresentados na Figura 25.

Figura 25. *Snapshots* finais das trajetórias de 100 ns de dinâmica molecular dos oito modelos de complexos cddp@NHCox com uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Inicialmente, realizou-se uma análise estrutural baseada no cálculo do RMSD em função do tempo que foi monitorado ao longo do número total de *frames* (20.000) que compunha a etapa de produção da DM. O valor médio do RMSD de cada complexo do tipo cddp@NHCox, tomando como referência a primeira estrutura da etapa da produção, está organizado na Tabela 13 a seguir. Cabe mencionar que os valores de RMSD foram calculados levando em consideração todos os átomos do complexo, isto é, dos modelos de NHC e das moléculas de cddp encapsuladas.

Tabela 13. Valor médio do RMSD dos complexos cddp@NHCox e do complexo cddp@NHC5a, incluindo uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.

	1com5a	1com5ox1	1com5ox2	1com5ox3	1com5ox4
RMSD / Å ¹	0,767	0,344	0,320	1,650	1,558
std ²	0,258	0,128	0,047	0,071	0,215
	2com5a	2com5ox1	2com5ox2	2com5ox3	2com5ox4
RMSD / Å	0,306	0,337	0,375	0,388	0,333
std	0,055	0,205	0,087	0,098	0,060

¹ Valores calculados a partir da média dos 20.000 *frames* da etapa de produção. ² Desvio padrão.

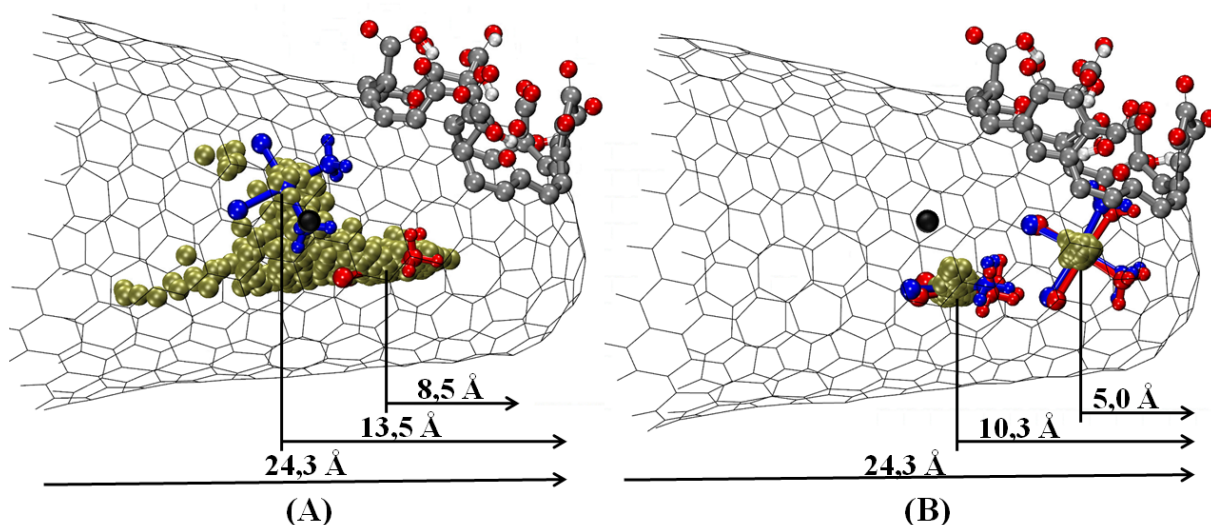
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Embora os valores de RMSD da Tabela 13 indicaram, em média, uma relativa estabilidade estrutural de todos os protótipos estudados, verificou-se que os complexos com uma cddp encapsulada apresentaram maiores flutuações em suas estruturas do que aqueles que englobaram duas unidades do agente antitumoral. Provavelmente, esse comportamento pode estar relacionado com a mobilidade facilitada da cddp na cavidade hidrofóbica dos NHC quando se tem apenas um fármaco e as moléculas de solvente. Além da estabilidade estrutural dos complexos cddp@NHCox sugerida pelos valores médios de RMSD, outras variáveis da DM, como a temperatura e a energia potencial do sistema, também se mostraram equilibradas ao longo da trajetória de 100 ns, assegurando mais uma vez a validade do protocolo de simulação empregado.

Assim como procedido para os complexos 1com5a e 2com5a na Figura 15, a evolução da posição da cddp no interior dos nanocarreadores oxidados de carbono também foi mapeada utilizando-se como exemplo os complexos 1com5ox4 e 2com5ox4, conforme mostrado na

Figura 26. Esses dois protótipos de complexos $cddp@NHCox$ foram escolhidos, pois eles eram constituídos por $NHCox$ com o maior número de grupos funcionais e tamanho das *nanowindows*, variáveis essas que a princípio, poderiam exercer alguma influência na dinâmica do agente antitumoral confinado.

Figura 26. Comportamento dinâmico da cisplatina na cavidade do modelo $NHCox_4$ nos complexos $1com5ox_4$ (A) e $2com5ox_4$ (B).



*As esferas douradas representam a variação temporal da posição do átomo de Pt da cisplatina ao longo dos 100 ns de trajetória. O centro de massa do $NHCox$ está indicado pelas esferas em preto. As estruturas iniciais e finais da cisplatina, considerando explicitamente todos os seus átomos, estão representadas em azul e em vermelho, respectivamente.

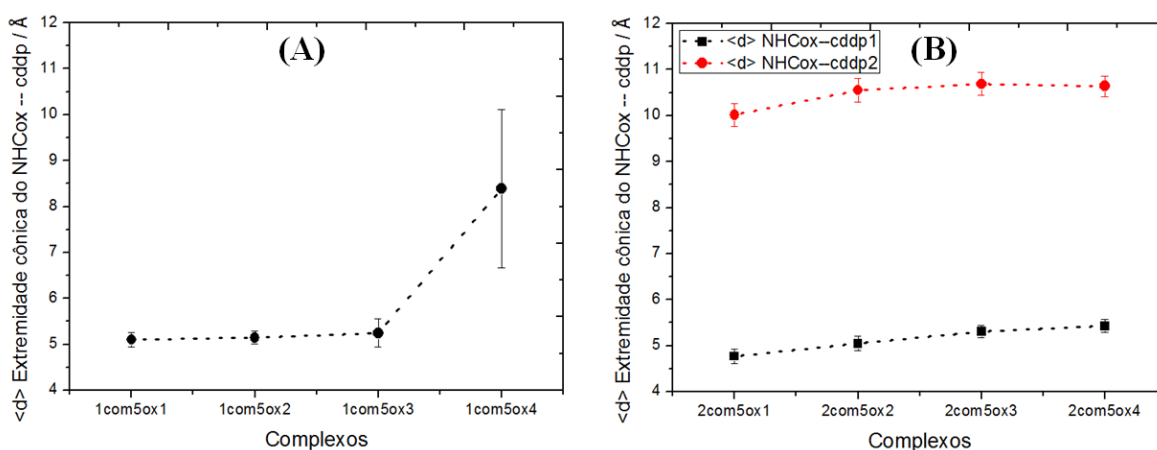
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com base na distribuição das esferas douradas na Figura 26, que representam a evolução temporal do átomo de Pt da $cddp$, foi possível constatar uma maior mobilidade da $cddp$ no interior da cavidade do $NHCox_4$ para o complexo $1com5ox_4$ (Figura 26A), do que em relação ao complexo $2com5ox_4$ (Figura 26B) que, por sua vez, demonstrou flutuações consideravelmente restritas das moléculas de $cddp$. Comparando esse mapeamento com aquele exposto na Figura 15, pôde-se concluir que, no caso dos complexos com uma $cddp$, a topologia pristina do NHC presente no complexo $1com5a$ (Figura 15A) proporcionou uma distribuição simétrica e uniforme da $cddp$ em torno do CM do nanomaterial, em contraste à distribuição mais dispersa do fármaco no complexo com o $NHCox$ (Figura 26A). Com relação aos modelos que incluíram duas $cddp$, tanto no protótipo pristino $2com5a$ (Figura 15B) como no oxidado $2com5ox_4$ (Figura 26B) as moléculas de $cddp$ exibiram uma mobilidade mais

restrita e localizada próximo à região cônica dos NHC, ao longo do tempo de simulação de 100 ns. Como as distâncias entre o CM da cddp e o centro da região cônica são praticamente as mesmas, tanto da estrutura inicial (em azul) quanto na final (em vermelho), as referidas distâncias da estrutura final foram omitidas na Figura 26B.

Com o intuito de se descrever quantitativamente a mobilidade dos oito modelos de complexos de inclusão cddp@NHCox, as distâncias entre um átomo de carbono central da extremidade cônica do NHC e o CM do fármaco cddp foram calculadas como valores médios ao longo do número total de *frames* que compunham a trajetória de produção. Essas distâncias médias ($\langle d \rangle$) para cada um dos complexos incluindo uma e duas cddp estão esquematizadas nos gráficos da Figura 27 a seguir.

Figura 27. Distâncias médias ($\langle d \rangle$) entre o átomo de carbono central da extremidade cônica de cada modelo de NHCox e o centro de massa da cisplatina para os complexos com uma (1com) e duas (2com) unidades dessa metalodroga encapsulada.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ao analisar os dois gráficos da Figura 27, verificou-se que em ambos complexos com uma e duas cddp, o aumento do nível de oxidação dos NHC teve como consequência o afastamento progressivo da cddp em relação ao átomo de carbono central da extremidade cônica desses nanomateriais de carbono, afastamento esse representado pelo aumento das $\langle d \rangle$ de todos os modelos de cddp@NHCox estudados. Nesse sentido, ao analisar os complexos com uma cddp (Figura 27A), constatou-se que enquanto aqueles envolvendo os NHCox nos níveis 1, 2 e 3 exibiram $\langle d \rangle$ semelhantes e da ordem de 5,16 Å, o protótipo com o NHCox4 (1com5ox4) se destacou por ter demonstrado uma $\langle d \rangle$ de 8,39 Å, sendo a maior da série avaliada. Por outro lado, nos complexos com duas cddp (Figura 27B), o aumento da $\langle d \rangle$ com

o grau de oxidação não foi significativo, uma vez que as diferenças entre essas $\langle d \rangle$ de cada modelo foram inferiores a 1,0 Å, o que sugeriu, mais uma vez, a maior estabilidade estrutural dos complexos do tipo 2com5ox-N ao longo dos 100 ns simulados. Ao comparar o comportamento da $\langle d \rangle$ exposto nessa figura com aquele apresentado pelos complexos cddp@NHC da Figura 16, foi possível notar que a presença das *nanowindows* funcionalizadas nas topologias oxidadas de NHC nos complexos cddp@NHCox acarretou na maior aproximação do fármaco em relação à extremidade cônica do nanocarreador. Essa diminuição da $\langle d \rangle$ pode estar relacionada ao efeito das interações dos grupos funcionais presentes nos NHCox com a molécula de cddp encapsulada.

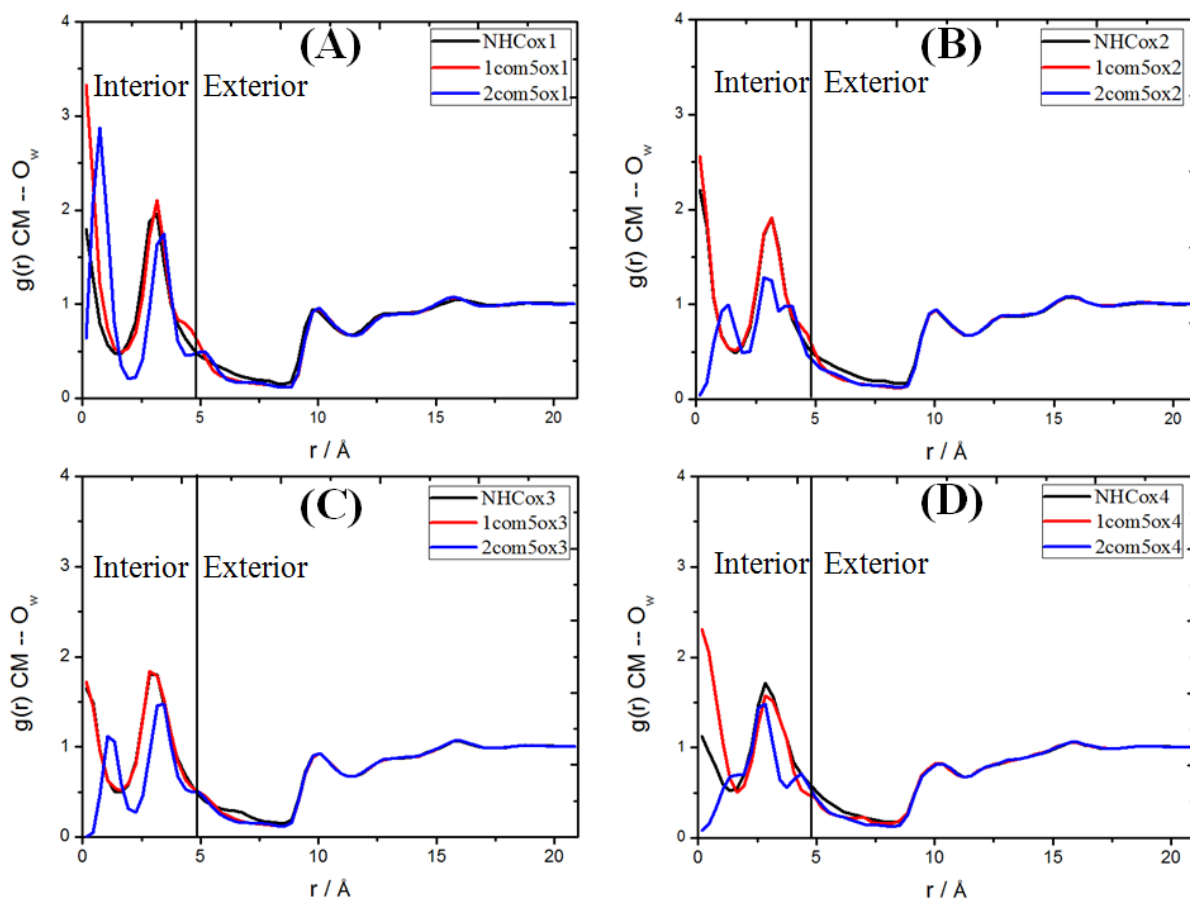
A fim de se caracterizar as estruturas de solvatação dos modelos de complexos cddp@NHCox, as RDF $g(r)$ CM--O_w, que são definidas entre o centro de massa de cada NHCox e os átomos de oxigênio do solvente, também foram calculadas para cada complexo de inclusão e comparadas com os respectivos NHCox puros, conforme explicitado na Figura 28.

Em uma primeira análise, as RDF da Figura 28 indicaram que a presença de moléculas de cddp encapsuladas acarretou em modificações na estrutura de solvatação no interior dos protótipos cddp@NHCox. Com base nas intensidades dessas RDF, verificou-se uma maior probabilidade de se encontrar moléculas de água encapsuladas (região “Interior”) tanto nos NHCox (curvas em preto) quanto nos complexos com uma cddp (curvas em vermelho).

Assim como observado nas RDF dos complexos cddp@NHC (ver Figura 17), esse comportamento pode estar relacionado com efeitos estéricos na cavidade dos NHC, uma vez que a presença de mais de uma cddp exerceu um maior impedimento ao acesso de moléculas de água nas cavidades dos NHC, conforme constatado pela queda nas intensidades das RDF dos complexos com duas cddp (curva em azul). Além disso, comparando-se as RDF desses modelos cddp@NHCox (Figura 28) com aquelas dos modelos cddp@NHC (Figura 17), notou-se uma semelhança nos perfis dessas funções de correlação de pares apenas entre os complexos incluindo o NHC5a pristino (Figura 17F) e os complexos incluindo o NHCox1 (Figura 28A).

Em contraste, o aumento do grau de oxidação dos NHC nos complexos cddp@NHCox resultou em diferenças significativas, em relação aos complexos cddp@NHC, no que diz respeito ao padrão de distribuição de moléculas de solvente encapsuladas, como destacado nas curvas em azul na Figura 28B-D.

Figura 28. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w dos complexos cddp@NHCox definidas entre o centro de massa dos NHCox e os átomos de oxigênio das moléculas de água.



*A divisão entre “Interior” e “Exterior” referiu-se às regiões do NHC e foi baseada no raio médio de cada modelo (ver Tabela 1) considerando o raio de vdW do átomo de carbono (BATSANOV, 2001)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Provavelmente, essas divergências nas RDF entre complexos de inclusão com NHC prístinos e oxidados podem estar conectadas com a orientação das moléculas de solvente nas cavidades dessas nanoestruturas de carbono. Por sua vez, a disposição das moléculas de água encapsuladas possui uma dependência com a mobilidade dos agentes antineoplásicos confinados e, de certo modo, com a natureza das *nanowindows* oxidadas.

Ainda no que concernem as RDF da Figura 28, informações sobre picos, mínimos e números de coordenação das camadas de solvatação estão apresentadas na Tabela 14. Os dados dessa tabela sugeriram que a formação das *nanowindows* em diferentes tamanhos não exerceu um efeito considerável sobre o posicionamento das moléculas de águas no interior das cavidades dos NHC, conforme constatado pelas posições praticamente invariáveis dos picos e mínimos. As principais diferenças foram observadas com os modelos de complexos

com duas cddp (2com5ox-N). Ao avaliar o NC2 que fornece uma ideia do número total de moléculas de água nas cavidades dos NHC, verificou-se que, independentemente da presença de NHC prístinos ou oxidados, os NC sofreram uma redução com a presença de uma ou mais moléculas de cddp encapsuladas.

Tabela 14. Dados das RDF $g(r)$ CM--O_w, que são definidas entre o centro de massa dos modelos de NHC e os átomos de oxigênio das moléculas de água, dos complexos de inclusão cddp@NHCox e daqueles incluindo o NHC5a prístino (1com5a e 2com5a).

Modelo	r / Å ¹		NC1 ²	r / Å		NC2 ³
	1º pico	1º mínimo		2º pico	2º mínimo	
NHC5a	0,15	1,65	0,56	3,15	4,95	17,04
1com5a	0,15	1,95	0,90	3,15	4,95	14,82
2com5a	0,75	1,95	0,93	3,45	4,35	11,28
NHCox1	0,15	1,65	0,54	3,15	4,95	16,87
1com5ox1	0,15	1,65	0,54	3,15	4,05	12,21
2com5ox1	0,75	1,95	0,90	3,45	4,35	11,10
NHCox2	0,15	1,65	0,51	3,15	4,95	16,61
1com5ox2	0,15	1,65	0,52	3,15	4,05	12,21
2com5ox2	1,35	1,95	0,86	2,85	3,45	5,97
NHCox3	0,15	1,65	0,48	2,85	4,95	16,49
1com5ox3	0,15	1,65	0,49	2,85	4,65	15,08
2com5ox3	1,05	2,25	0,93	3,45	4,35	10,43
NHCox4	0,15	1,35	0,28	2,85	4,95	16,50
1com5ox4	0,15	1,65	0,63	2,85	4,35	12,31
2com5ox4	1,65	1,95	0,81	2,85	3,75	7,16

¹ Distância média. ² Número de coordenação (NC) referente ao primeiro pico e que foi calculado com a integral de zero até o valor do 1º mínimo. ³ NC que engloba o primeiro e o segundo pico, cujo a integral foi calculada de zero até o valor do 2º mínimo.

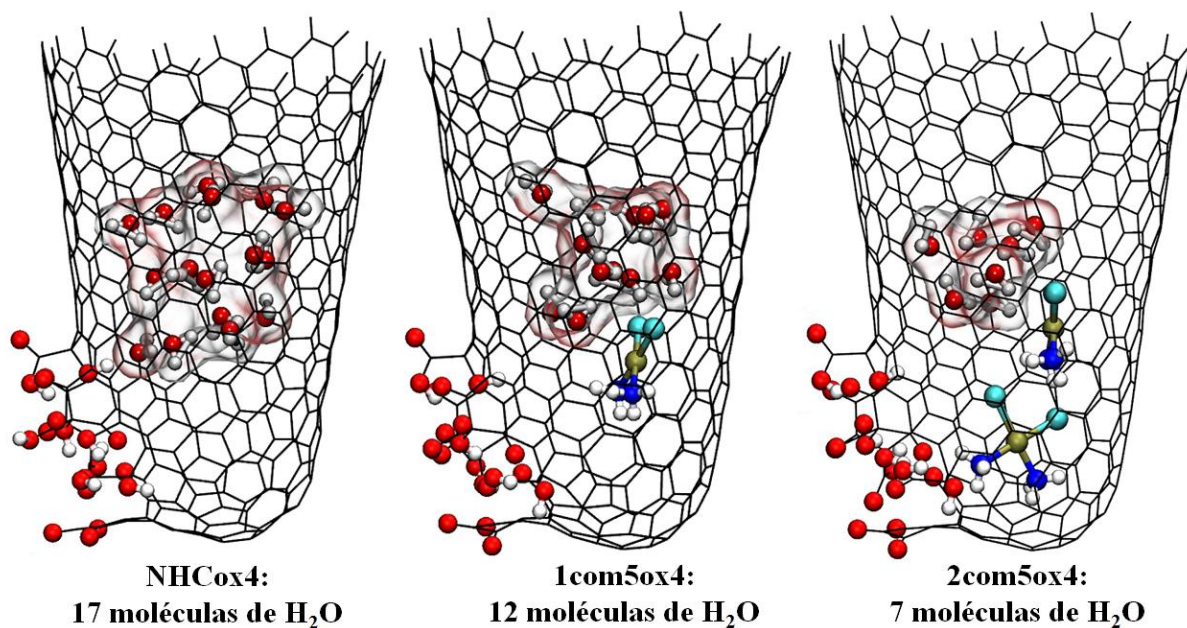
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como exemplo, o complexo 2com5ox4 chegou a apresentar uma diferença média de nove moléculas de água em relação ao do NC2 do NHCox4 puro. Por fim, é importante ressaltar que as *nanowindows* nas topologias oxidadas de NHC não influenciarem nas RDF, pois os átomos de oxigênio presentes nessas vacâncias não foram levados em conta no cálculo das funções $g(r)$ CM--O_w.

A fim de se analisar visualmente a distribuição das moléculas de solvente e a redução do NC2 com a inclusão do complexo de Pt(II), topologias envolvendo apenas as moléculas de

água presentes nas cavidades dos NHC foram construídas seguindo o mesmo procedimento empregado para os complexos cddp@NHC (Figura 18). Para isso, o grau de oxidação quatro foi selecionado para a representação dessas topologias como mostrado na Figura 29 a seguir.

Figura 29 .Estruturas finais (*frames* 20.000/20.000) dos modelos de NHCox4 , 1com5ox4 e 2com5ox4 , mostrando apenas a distribuição de moléculas de água relacionadas com a camada interna de solvatação definida pelo número de coordenação NC2 da Tabela 14.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como previsto pelas RDF $g(r) \text{CM--O}_w$, a Figura 29 evidenciou nitidamente a redução da concentração de moléculas de água no interior dos NHC na medida em que se prosseguiu do modelo de NHCox4 puro com NC2 igual a 17 para o complexo de inclusão com duas cddp (2com5ox4) com NC2 igual a 7. Proporcionado pela estreita cavidade efetiva dos NHC, esse mesmo efeito foi observado para todos os demais protótipos simulados como apontado pelos NC2 da Tabela 14.

A próxima análise envolveu o estudo do efeito da presença de uma e duas unidades do fármaco cddp nas cavidades dos NHC sobre a superfície acessível ao solvente (SASA) desses nanomateriais prístinos (com o NHC5a) e oxidados. A ideia era obter informações sobre a variação do valor médio da SASA dos complexos cddp@NHCox em função dos diferentes graus de oxidação dos NHC presentes. Os dados dessa análise foram organizados na Tabela 15 a seguir.

Tabela 15. Valores médios da SASA (*solvent accessible surface area*) calculados a partir das trajetórias de 100 ns da dinâmica molecular de cada um dos modelos de NHCox e dos

complexos cddp@NHCox.	
Modelo	$\langle \text{SASA} \rangle / \text{Å}^2$
NHC5a	881,47±4,98
1com5a	886,45±5,37
2com5a	906,98±5,77
NHCox1	1038,23±5,36
1com5ox1	1054,43±5,78
2com5ox1	1060,61±6,26
NHCox2	1157,33±6,65
1com5ox2	1177,23±7,39
2com5ox2	1179,76±7,54
NHCox3	1244,32±7,58
1com5ox3	1261,11±8,34
2com5ox3	1262,06±8,53
NHCox4	1350,36±9,04
1com5ox4	1350,38±8,82
2com5ox4	1360,98±9,20

*O termo $\langle \text{SASA} \rangle$ reforça que os valores da SASA dessa tabela foram calculados como médias do número total de *frames* da etapa de produção de cada sistema simulado.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os dados dispostos na Tabela 15 indicaram dois efeitos relevantes para a maximização da SASA dos modelos simulados. O primeiro deles já havia sido caracterizado nas simulações por DM dos NHCox puros (ver Figura 24). Do mesmo modo, verificou-se que nos complexos cddp@NHCox, o aumento do grau de oxidação dos NHC, resultou na diminuição sistemática da hidrofobicidade desses complexos, devido ao aumento dos valores médios da SASA que denotam a acessibilidade de moléculas de solvente.

O segundo efeito que contribuiu para o aumento da SASA dos complexos foi relativo à presença do agente antitumoral na cavidade dos NHCox que, como sugerido por todos os valores da Tabela 15, promoveu um aumento da probabilidade de interações com moléculas do solvente, embora os números de coordenação expressados nessa tabela diminuíssem devido aos impedimentos estéricos nessa região.

Por fim, uma análise energética dos complexos cddp@NHCox foi conduzida com o objetivo de se investigar a influência da formação das *nanowindows* funcionalizadas nos NHC sobre as estabilidades nessa série de complexos de inclusão. Para isso, as energias livre de

ligação ($\Delta_b G$) e todas as suas componentes foram calculadas como médias ao longo do *ensemble* de 1000 *frames* selecionados da etapa de produção, utilizando a metodologia MM-GBSA que também foi empregada na caracterização energética dos complexos cddp@NHC (Tabela 9). A Tabela 16 a seguir apresenta os valores médios e os desvios padrão dessas energias de formação para a classe de complexos em estudados nessa seção.

Tabela 16. Valores médios de energia livre de ligação ($\langle \Delta_b G \rangle$) e de suas componentes energéticas (em kcal mol⁻¹) referentes aos modelos de complexos cddp@NHCox.

Modelo	$\langle \Delta E_{vdW} \rangle$	$\langle \Delta E_{ELE} \rangle$	$\langle \Delta E_{GB} \rangle$	$\langle \Delta E_{SURF} \rangle$	$\langle \Delta E_{GAS} \rangle^1$	$\langle \Delta G_{SOLV(GB)} \rangle^2$	$\langle \Delta_b G \rangle^3$
1com5a	-54,11±3,49	-21,05±1,89	37,63±2,64	-1,10±0,03	-75,17±4,92	36,52±2,63	-34,78±2,89
2com5a	-126,35±1,83	-47,07±1,92	79,93±2,37	-1,76±0,07	-173,42±2,96	78,17±2,40	-79,27±2,05
1com5ox1	-71,83±1,32	-29,57±2,64	48,54±2,36	-0,99±0,04	-101,40±2,78	47,54±2,36	-47,07±1,59
2com5ox1	-125,91±1,98	-50,92±3,20	84,98±2,57	-1,82±0,06	-176,83±2,98	83,16±2,55	-75,95±2,12
1com5ox2	-72,53±1,33	-26,20±2,13	45,64±1,75	-1,02±0,05	-98,73±2,02	44,62±1,76	-41,70±1,67
2com5ox2	-124,58±1,66	-50,30±2,20	83,47±1,90	-1,88±0,06	-174,88±2,31	81,59±1,90	-77,44±2,10
1com5ox3	-70,77±2,07	-36,82±4,75	56,48±4,17	-1,02±0,04	-107,59±4,48	55,46±4,17	-40,91±2,07
2com5ox3	-122,33±2,02	-62,64±2,65	97,05±2,63	-1,96±0,05	-184,92±3,02	95,09±2,63	-72,97±2,42
1com5ox4	-57,70±3,87	-24,94±8,94	44,28±9,81	-1,17±0,06	-82,64±12,00	43,11±9,77	-37,19±2,87
2com5ox4	-123,23±2,20	-63,91±3,85	97,35±3,17	-2,00±0,07	-187,14±3,63	95,35±3,18	-74,78±2,33

* Os valores relativos aos complexos prístinos 1com5a e 2com5a também foram incluídos. Onde E_{vdW} , E_{ELE} , E_{GB} , E_{SURF} , $E_{GÁS}$, $G_{SOLV(GB)}$ e $\Delta_b G$ correspondem à energia de *van der Waals*, a energia eletrostática de *Coulomb*, a contribuição polar para a solvatação pelo modelo *Generalized Born* (GB), a contribuição não-polar para a solvatação, a energia na fase gasosa, a energia livre de solvatação e a energia livre de ligação, respectivamente.

$$^1 E_{GÁS} = E_{MM} = E_{\text{ligações}} + E_{\text{ângulos}} + E_{\text{torção}} + E_{vdW} + E_{ELE}$$

$$^2 G_{SOLV(GB)} = E_{GB} + E_{SURF}$$

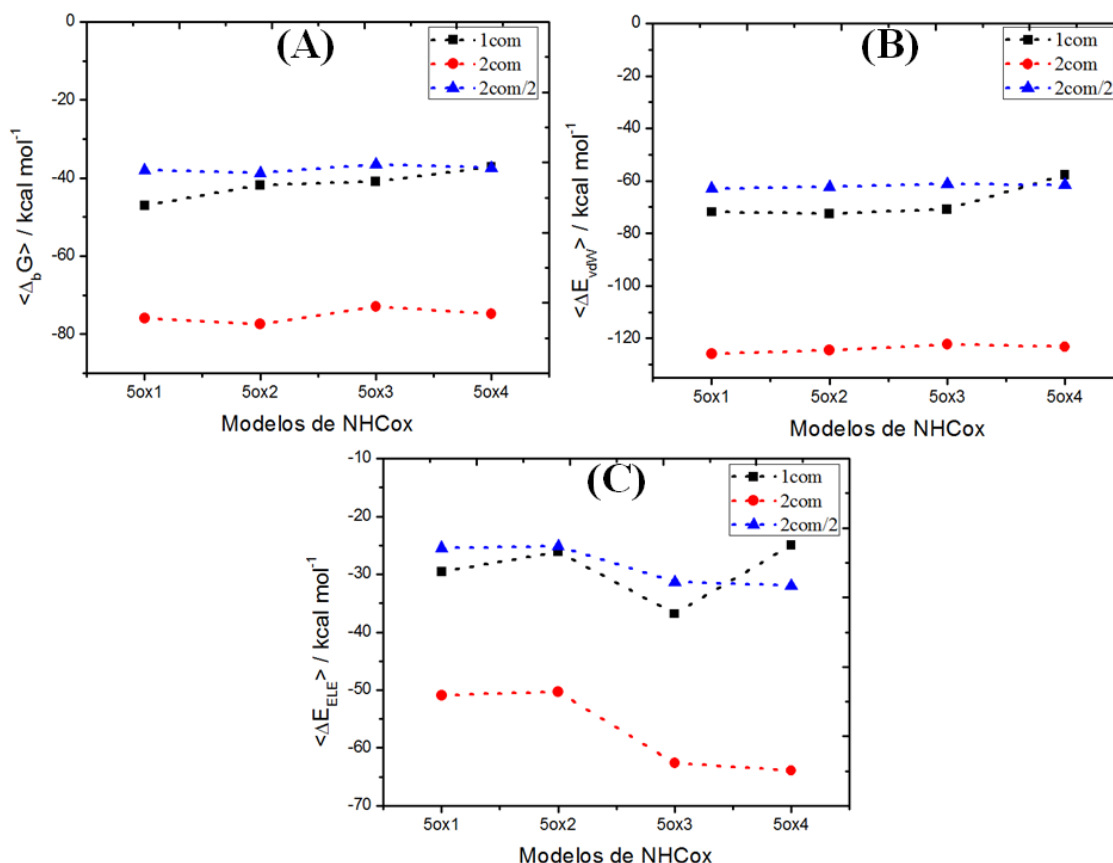
$$^3 \Delta_b G = \Delta E_{GÁS} + \Delta G_{SOLV(GB)} - T \Delta S_{\text{solut.}}$$

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os valores das $\Delta_b G$ organizados na Tabela 16 indicaram que, mesmo com topologias de NHC submetidas a reações de oxidação em quatro diferentes graus, o processo de formação dos complexos de inclusão, constituídos por esses nanomateriais oxidados de carbono com moléculas de cddp encapsuladas, continuou sendo termodinamicamente favorável como mostrado na Figura 30A.

Assim como observado nos complexos com NHC prístinos (ver Figura 20A), a Figura 30A destacou $\Delta_b G$ consideravelmente mais favoráveis para os complexos com duas cddp (ver curva em vermelho) do que para aqueles com apenas uma cddp (ver curva em preto).

Figura 30. Valores médios da $\Delta_b G$ (A), ΔE_{vdW} (B) e ΔE_{ELE} (C) calculados a partir do *ensemble* conformacional contendo 1.000 estruturas (*frames*) selecionados das trajetórias dos modelos de complexos cddp@NHCox.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Novamente, esse resultado pôde estar correlacionado com o aumento do número de interações entre os átomos do fármaco com os átomos de carbono da superfície interna dos NHCox que acarretou nesse efeito estabilizador dos complexos cddp@NHCox. É importante enfatizar que essa afinidade fármaco-receptor, a qual foi descrita com base na abordagem da mecânica molecular com o método MM-GBSA, corroborou tanto trabalhos experimentais de síntese desses complexos (AJIMA, *et al.*, 2005; AJIMA, *et al.*, 2006; AJIMA *et al.*, 2008), quanto trabalhos teóricos envolvendo cálculos quânticos de estrutura eletrônica (DE SOUZA, *et al.*, 2017; DE SOUZA, *et al.*, 2018), o que permitiu, mais uma vez, validar os nossos protótipos e resultados.

Como esperado, a principal componente energética responsável por essa estabilização dos complexos cddp@NHCox continuou a ser aquela referente às interações de *van der Waals* (E_{vdW}), como pode ser observado na Figura 30B. O caráter aditivo da estabilização do sistema com o aumento do número de moléculas de cddp encapsuladas, foi mais uma vez observado ao se dividir a E_{vdW} referente aos complexos $2\text{com}5\text{ox-N}$ pelo número de fármacos encapsulados, fornecendo, em média, o valor referente aos complexos com uma cddp , conforme indicado pelas curvas em azul na Figura 30.

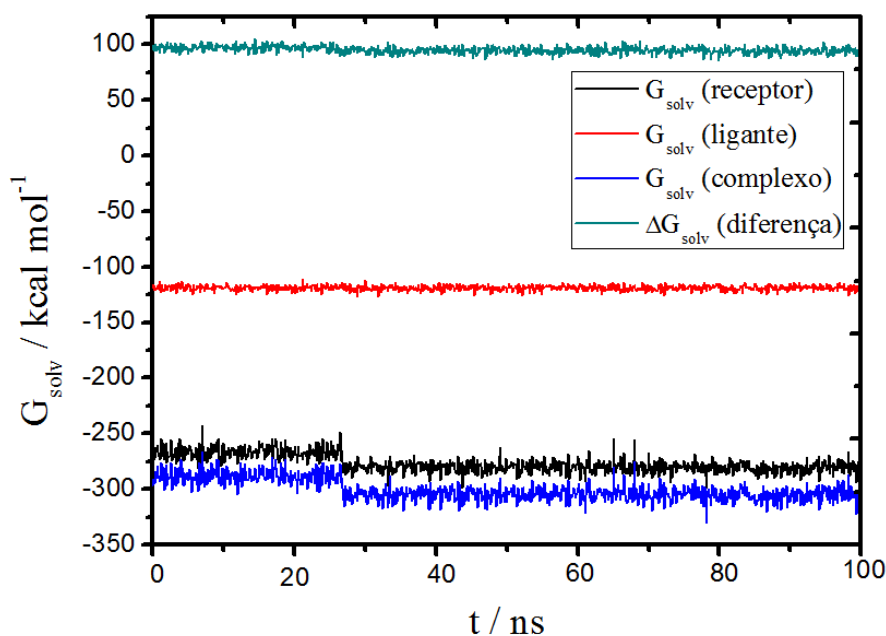
Outra contribuição que se mostrou relevante para a estabilização dos complexos cddp@NHCox foi aquela referente à energia eletrostática coulombiana (E_{ELE}). Com base nos dados da Tabela 16, foi possível constatar, em média, valores de E_{ELE} mais favoráveis para os complexos de inclusão com topologias oxidadas de NHC do que aqueles com os mesmos nanocarreadores prístinos ($1\text{com}5\text{a}$ e $2\text{com}5\text{a}$). Esse efeito está majoritariamente relacionado com as interações eletrostáticas do tipo fármaco-receptor que foram proporcionadas pela presença dos grupos funcionais polares nas superfícies dos NHCox . Além disso, a Figura 30C sugeriu que esse efeito estabilizador foi intensificado com o avanço do grau de oxidação das nanoestruturas de carbono, principalmente no caso do carregamento de duas unidades (dímero) do agente antineoplásico estudado. Esse ganho de estabilização alcançada nos complexos com duas cddp pode estar conectado, em média, com a formação das interações intermoleculares do tipo $\text{cddp}1\text{-cddp}2$. Nesse sentido, foi possível verificar na Figura 30C e na Tabela 16 uma estabilização em torno de 13 kcal mol^{-1} na $\langle E_{\text{ELE}} \rangle$ do complexo $2\text{com}5\text{ox}4$ quando comparada com o protótipo que era constituído pelo $\text{NHCox}1$ ($2\text{com}5\text{ox}1$).

Em se tratando da componente referente à contribuição não-polar ou não-eletrostática para a energia livre de solvatação (E_{SURF}), a qual é diretamente proporcional à SASA do protótipo simulado, foi possível notar, nos dados da Tabela 16, valores relativamente mais favoráveis tanto para complexos com duas cddp como para aqueles envolvendo as topologias oxidadas de NHC. Além disso, o aumento do grau de oxidação dos NHC também acarretou em valores de E_{SURF} que favoreceram as afinidades fármaco-receptor, em especial no caso dos complexos com duas cddp . Mais uma vez, a intensificação do processo de oxidação, gerando *nanowindows* cada vez maiores e mais funcionalizadas, demonstrou ser um fator relevante para modular a estabilidade de complexos de inclusão formados por NHC e moléculas de cddp .

Entretanto, outro aspecto destacado na Tabela 16 foi o conjunto de valores notadamente positivos de energia livre de solvatação ($\Delta G_{\text{SOLV}(\text{GB})}$), indicando assim uma

desestabilização de todos os complexos simulados no processo de solvatação implícita tratada pelo modelo GB. O mesmo comportamento, o qual já havia sido notado para os complexos cddp@NHC (ver Tabela 9), pode ser compreendido ao avaliar as contribuições individuais para a ΔG_{SOLV} que envolvem o complexo cddp@NHC e as espécies singulares cddp e NHC . A Figura 31 a seguir evidencia as diferenças entre as componentes da ΔG_{SOLV} tomando o complexo 2com5ox4 como exemplo representativo da série de complexos cddp@NHCox .

Figura 31 - Variação temporal das energias livre de solvatação para o receptor (NHCox4), ligante (dímero de cisplatina), complexo cddp@NHCox4 e do valor da diferença entre essas componentes ao longo dos 100 ns de simulação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com base na análise dos dados da Figura 31, pode-se concluir que o processo de solvatação do complexo 2com5ox4 foi o mais favorável com um valor médio de $-300 \text{ kcal mol}^{-1}$. A solvatação do receptor (NHCox4), por sua vez, foi o segundo processo de solvatação mais espontâneo com um valor médio, $-276,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ em contraste ao valor médio de $-69,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ referente à topologia pristina do NHC5a (ver Figura 21). Essa divergência de quase $-207 \text{ kcal mol}^{-1}$ na espontaneidade do processo de solvatação de uma topologia oxidada de NHC frente a uma pristina é uma consequência da abertura da *nanowindows* com grupos funcionais polares que favorece a solvatação implícita nanomaterial de carbono. Apesar dos valores consideravelmente negativos da G_{SOLV} das espécies individuais do complexo

2com5ox4, a diferença ΔG_{solv} resultou em valores positivos com um valor médio de 95,3 kcal mol⁻¹. De um modo geral, esse resultado ($\delta\Delta G_{\text{solv}} > 0$) denota que a dissolução do complexo 2com5ox4 é um processo termodinamicamente desfavorável no caso do modelo de soltação implícita GB para incluir a água. Apesar dessa desestabilização, a espontaneidade para a formação desses complexos foi garantida pelo saldo líquido energético que compõe a $\Delta_b G$.

Os valores da contribuição entrópica ($T\Delta S_{\text{soluto}}$) para energia livre de ligação ($\Delta_b G$) dos complexos cddp@NHCox também foram calculados como valores médios do *ensemble* conformacional composto por uma amostra de 1.000 estruturas. Os valores médios das contribuições entrópicas dos oito complexos cddp@NHCox se encontram na Tabela 17 a seguir. Do mesmo modo como procedido para o cálculo dos termos entrópicos para os complexos cddp@NHC (ver Tabela 10), os cálculos da contribuição entrópica para a $\Delta_b G$ consideraram a temperatura de 298,15 K visto que o erro para o valor na temperatura de 310 K pode ser negligenciado (0,1 kcal mol⁻¹).

Tabela 17. Contribuições entrópicas dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais dos modelos de complexos cddp@NHCox.

Modelo	1com5ox1	1com5ox2	1com5ox3	1com5ox4	2com5ox1	2com5ox2	2com5ox3	2com5ox4
$T\Delta S_{\text{trans}}$	-12,75	-12,75	-12,75	-12,75	-13,31	-13,31	-13,32	-13,32
$T\Delta S_{\text{rot}}$	-8,63	-8,63	-8,63	-8,66	-10,37	-10,41	-10,41	-10,40
$T\Delta S_{\text{vib}}$	14,59	8,98	10,16	19,06	5,96	7,87	6,81	6,71
$T\Delta S_{\text{tot}}$	-6,79	-12,41	-11,22	-2,35	-17,72	-15,85	-16,92	-17,01

*O termo $T\Delta S_{\text{tot}}$ envolve a soma das contribuições entrópicas para a formação do complexo cddp@NHCox (soluto) na Equação 4. Todos os valores estão em kcal mol⁻¹.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

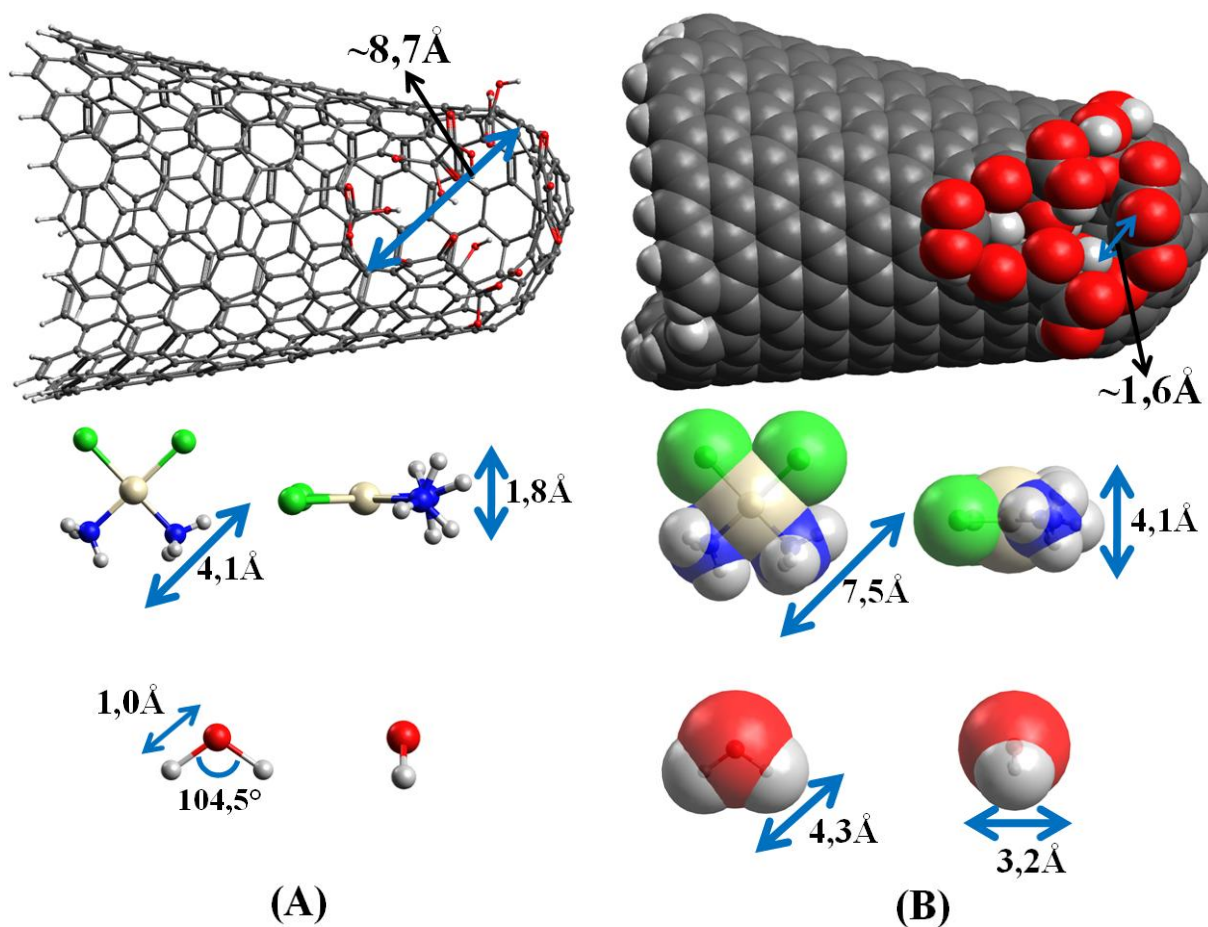
Assim como observado para o caso dos modelos de complexos de inclusão com NHC prístinos (ver Tabela 10 da seção anterior), os valores negativos dos termos $T\Delta S_{\text{trans}}$ e $T\Delta S_{\text{rot}}$ denotaram uma perda dos graus de liberdade translacionais e rotacionais com a formação de todos os complexos cddp@NHCox, conforme apresentado na Tabela 17. Apesar dos valores de $T\Delta S_{\text{tot}}$ na Tabela 17 serem negativos, esse termo entrópico na expressão da $\Delta_b G$ tem um sinal negativo, tornando todos esses valores positivos e, por sua vez, contribuindo para a desestabilização dos complexos. Essa contribuição repulsiva para a interação fármaco-receptor teve maior destaque nos complexos cddp@NHCox com duas cddp encapsuladas, principalmente devido ao maior peso dos termos $T\Delta S_{\text{trans}}$ e $T\Delta S_{\text{rot}}$ que maximizaram os seus efeitos com a mudança de sinal na expressão para o cálculo da $\Delta_b G$.

A última questão a ser discutida nessa seção refere-se à residência do fármaco cddp no interior dos NHCox ao longo de toda as trajetórias de simulação dos complexos cddp@NHCox, assim como observado na série dos protótipos do tipo cddp@NHC. Esse comportamento perdurou mesmo nos nanocarreadores que contavam com as *nanowindows* mais extensas em suas superfícies resultantes dos maiores graus de oxidação. Embora o evento de liberação do fármaco a partir das *nanowindows* não tenha sido observado, os modelos NHCox2, NHCox3 e NHCox4 contavam com vacâncias (ver Figura 22) com dimensões que, a princípio, seriam apropriadas para a passagem de uma molécula de cddp com um comprimento total aproximado de 4,2 Å. Entretanto, o confinamento do fármaco permitiu apontar que as dimensões das vacâncias geradas ainda eram insuficientes para promover a passagem da molécula de cddp, fato esse que pode ser claramente constatado ao se observar uma representação estrutural considerando os raios de *van der Waals* dos átomos. Tomando como exemplo o complexo 1com5ox4, a Figura 32 apresenta esse tipo de representação tanto para o NHCox4 e a cddp isolada, quanto para a molécula de água.

Na Figura 32, a representação da estrutura molecular utilizando as esferas de *van der Waals* se mostrou relevante, uma vez que ela forneceu uma ideia do tamanho efetivo das moléculas estudadas, informação essa que deve ser levada em conta no estudo de processos de liberação e translocação de fármacos. Nessa perspectiva, a Figura 32B destacou que mesmo o maior grau de oxidação estudado (grau 4) gerou uma vacância consideravelmente obstruída no NHC devido à presença dos grupos funcionais formados ao longo do mecanismo das reações de oxidação. Essa obstrução das *nanowindows* funcionalizadas, que foi verificada nos quatro modelos de NHCox simulados, somada ao volume molecular efetivo da cddp e da molécula de água, contribuiu para a supressão do processo espontâneo de liberação controlada do agente antitumoral e de moléculas de solvente ao longo dessas vacâncias.

Diante a esse comportamento, espera-se que o desenvolvimento de topologias de NHC oxidados em graus superiores possa proporcionar a formação de *nanowindows* com dimensões superiores ao tamanho efetivo da cddp (maiores do que 7,5 x 4,1 Å como na Figura 32B) para proporcionar a translocação e a liberação do fármaco a partir dessas novas vacâncias.

Figura 32. Comparação das dimensões médias do protótipo NHCox4 e das moléculas de cisplatina e água representadas pelos modelos *Ball and stick* (A) e *Van der Waals Spheres*(B).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Desviando dessa linha de modelagem de NHC em estágios de oxidação cada vez mais avançados de oxidação, a próxima seção desse trabalho apresentará outra importante abordagem de tratamento químico dos NHC, a qual também é empregada no contexto das pesquisas desses nanomateriais de carbono como DDS, com o intuito de otimizar os eventos de liberação controlada de fármacos

4.7 MODELAGEM DOS NHC REDUZIDOS

Embora a funcionalização química seja um dos principais efeitos dos processos oxidativos dos NHC, visto que ela pode otimizar a biodistribuição e a biocompatibilidade, e ainda proporcionar uma redução da toxicidade, a formação de grupos funcionais em excesso nas superfícies desses nanomateriais pode promover uma obstrução dessas estruturas e,

consequentemente, impedir a liberação de biomoléculas encapsuladas. Em um estudo experimental, Ajima e colaboradores (AJIMA, *et al.*, 2006) ainda mostraram que esse efeito de obstrução pode ser intensificado no caso da imersão dos NHC oxidados em uma solução tampão fosfato salina (PBS), devido ao fato da conversão dos grupos carboxila ($-\text{COOH}$) e hidroxila ($-\text{OH}$) em sais de ácidos carboxílicos ($-\text{COONa}$) e alcóxidos ($-\text{ONa}$). Conversão essa que reduz as dimensões efetivas das *nanowindows* em função da inclusão de átomos de sódio cujo raio de van *de Waals* do átomo de sódio é de 2,27 Å, em contraste a 1,58 Å e 1,20 Å referente aos átomos de oxigênio e hidrogênio, respectivamente (AJIMA, *et al.*, 2006; BATSANOV, 2001).

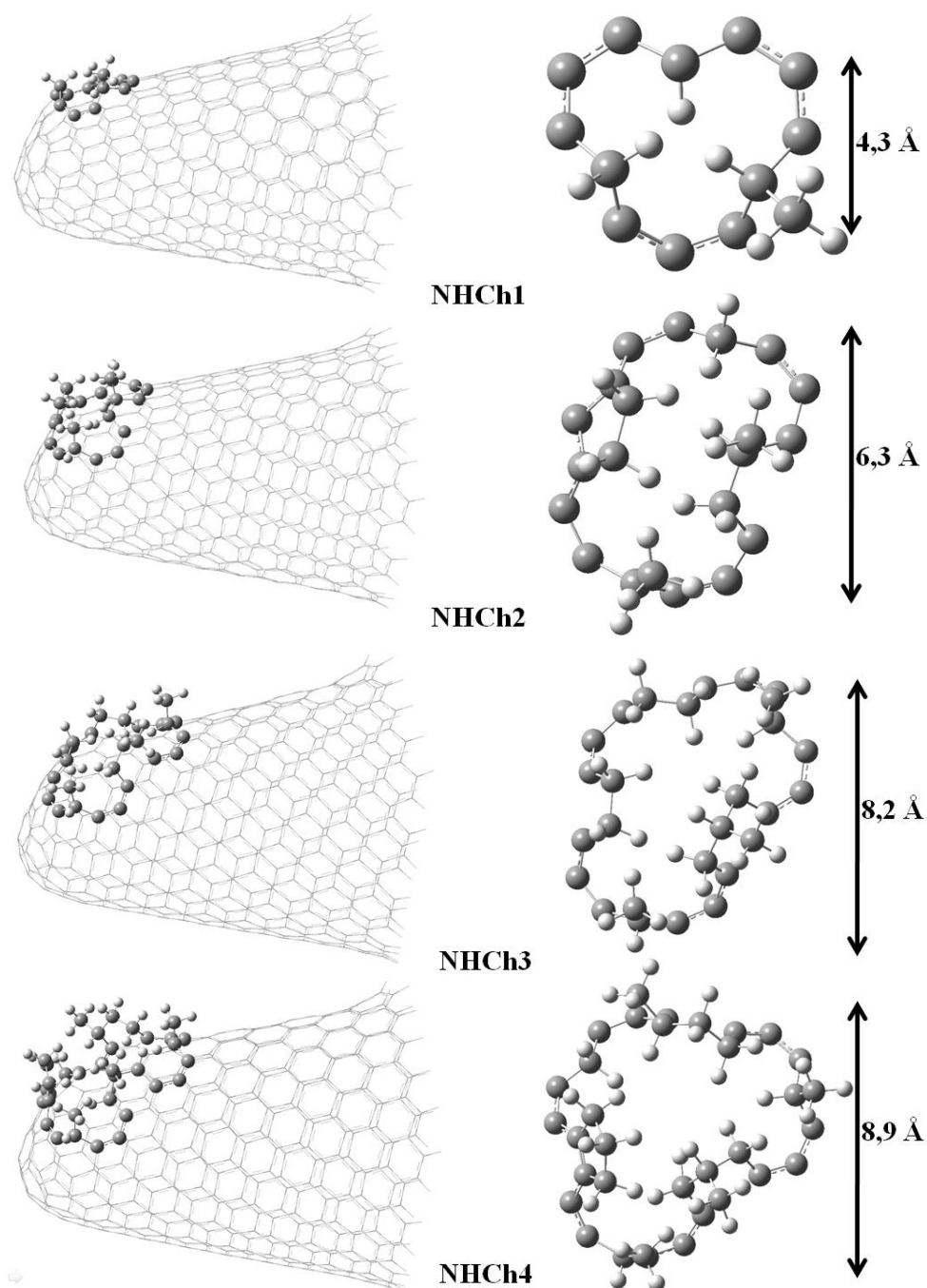
Nessa perspectiva, a última etapa desse trabalho abordou a reação de redução como uma importante estratégia de tratamento químico dos NHC, a qual pode ser empregada em conjunto com os processos oxidativos pós-síntese desses materiais nanoestruturados de carbono. O processo de redução possui uma relevância no contexto dos NHC funcionalizados como DDS, uma vez que essa reação pode promover o aumento do tamanho efetivo das *nanowindows*, por meio da conversão química dos grupos funcionais oxigenados em grupos hidrocarbonetos presentes nas bordas dessas vacâncias (AJIMA, *et al.*, 2006). Consequentemente, essa ampliação das *nanowindows* pode maximizar a ocorrência dos eventos de incorporação e liberação de fármacos a partir dos NHC.

Nessa linha, baseando-se no estudo da reação de redução dos NHCox conduzido por Ajima e colaboradores (AJIMA, *et al.*, 2006), uma nova série de topologias de NHC reduzidos, de agora em diante denominados “NHCh” foi proposta e estudada nesse trabalho. Para isso, as quatro topologias de NHCox elaboradas nesse trabalho foram empregadas como estruturas de partida gerando, consequentemente, quatro novos protótipos de NHCh, cuja as estruturas otimizadas, conforme descrito na metodologia, se encontram na Figura 33.

Do mesmo modo que na série de NHCox, o modelo pristino NHC5a continuou sendo a estrutura base para a construção de novas topologias de NHC, conforme mostrado na Figura 33. Em termos de nomenclatura dessa nova classe, utilizou-se a notação NHCh-N, que foi similar àquela empregada para os NHCox, onde novamente, o sufixo N referiu-se ao grau de oxidação do NHC que foi submetido ao processo teórico de redução. Por exemplo, a topologia designada “NHCh4” refere-se a um modelo de NHC reduzido, o qual foi obtido a partir da redução da estrutura NHCox4. Além da manutenção do efeito de ampliação das *nanowindows* em função do avanço do grau de oxidação, a Figura 33 também destacou a ausência dos grupos funcionais oxigenados nas vacâncias que, por sua vez, tinham sido

substituídos por grupos contendo átomos de hidrogênio em suas terminações. De certa forma, essa substituição proporcionada pela reação de redução exerce uma proteção química para as *nanowindows*, impedindo a possibilidade de reações laterais envolvendo os grupos funcionais oxigenados nessas regiões de defeito que, por sua vez, poderiam resultar na obstrução das vacâncias devido à formação de grupos volumosos.

Figura 33. Modelos de NHC reduzidos (NHCh) com destaque para as suas *nanowindows* reduzidas que, a princípio, foram geradas ao longo dos quatro diferentes estágios de oxidação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Figura 33, embora as dimensões médias das vacâncias dos NHCh não sejam consideravelmente reduzidas em relação àquelas referentes aos NHCox (Figura 22), é importante ressaltar que as *nanowindows* dos NHCh são mais estáveis e, conseqüentemente, menos susceptíveis a reações químicas que possam obstruí-las, conservando assim, o tamanho efetivos dessas vacâncias.

Por fim, é importante enfatizar que a eliminação dos grupos funcionais oxigenados nas topologias dos NHCh não compromete ou exclui a ideia do melhoramento da biocompatibilidade, uma vez que as estruturas elaboradas nesses trabalho consistem apenas em modelos desses nanomateriais de carbono, cujo principal foco, nessa etapa, é investigar o efeito dessas novas *nanowindows* reduzidas sobre a dinâmica do sistema carreador cddp@NHCh em solução aquosa. Dessa forma, as próximas seções desse trabalho envolveram exatamente o estudo do comportamento dinâmico dos NHCh da Figura 33.

4.8 SIMULAÇÕES POR DM DOS NHC REDUZIDOS

Antes de se proceder para o estudo dos complexos de inclusão constituídos por moléculas de cddp confinadas nas cavidades dos NHCh, a variação temporal da série de NHCh puros, a qual foi proposta na seção anterior, também foi avaliada por meio do método da dinâmica molecular. Nesse sentido, após a parametrização de cada modelo de NHCh (ver Figura 33), as respectivas estruturas foram simuladas seguindo o mesmo protocolo de simulação empregado para os modelos prístinos e oxidados. Os detalhes das análises dessas simulações foram organizados nessa seção do trabalho.

Primeiramente, avaliou-se a variação estrutural média das topologias reduzidas, por meio do cálculo do RMSD, cujos valores foram comparados com os obtidos para os NHC prístinos e oxidados, como apresentado na Tabela 18. Os dados referentes aos modelos reduzidos indicaram um aumento das flutuações estruturais ao longo das trajetórias de 100 ns na medida em que se progrediu para protótipos incluindo *nanowindows* maiores. Comportamento esse já observado com os outros modelos de NHC e também esperado, dado que a existência desses defeitos cada vez maiores, associada com o aumento concomitante do número de grupos metila, proporciona uma maior liberdade de movimento das nanoestruturas. Sob essa ótica, o modelo NHCh4 foi aquele que apresentou as maiores flutuações nessa série com um valor médio de RMSD de $0,265 \pm 0,052$. Ainda sobre os dados da Tabela 18, pôde-se perceber que, no geral, as topologias reduzidas se mostraram mais estáveis do que as

oxidadas. Entretanto, apesar das flutuações apontadas nessa tabela, foi possível afirmar que todos os modelos de NHC desenvolvidos atingiram uma estabilidade estrutural, validando o protocolo de simulação empregado nesse trabalho. Outros aspectos desse protocolo como aqueles acerca do controle da temperatura, da pressão e da densidade do sistema também ratificaram a sua eficiência nas simulações desenvolvidas.

Tabela 18. Comparação dos valores de RMSD médio dos modelos de NHC pristino, oxidados e reduzidos referentes ao tempo de simulação de 100 ns.

Pristino				
NHC5a				
RMSD / Å	0,200			
std / Å*	0,036			
Oxidados				
	NHCox1	NHCox2	NHCox3	NHCox4
RMSD / Å	0,209	0,237	0,229	0,311
std / Å	0,003	0,042	0,031	0,041
Reduzidos				
	NHCh1	NHCh2	NHCh3	NHCh4
RMSD / Å	0,192	0,214	0,236	0,265
std / Å	0,036	0,033	0,045	0,052

* Desvio padrão.

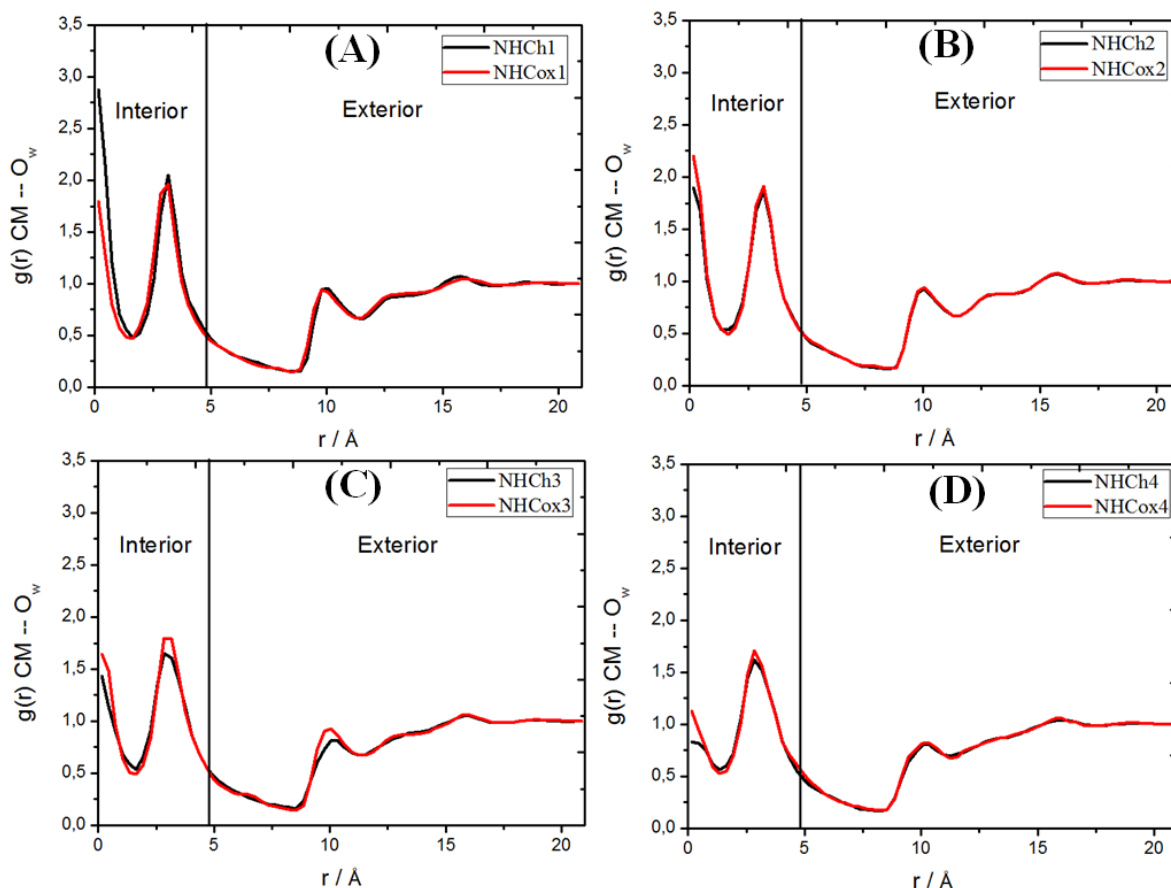
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A próxima análise envolveu a verificação da influência das *nanowindows* desprovidas de grupos funcionais oxigenados sobre o ambiente no interior das cavidades dos NHCh, a fim de se caracterizar a capacidade de transporte desses NHC, bem como comparar com os dados obtidos para os modelos pristinos e oxidados. Para isso, procedeu-se ao cálculo e a análise das funções de distribuição radial do tipo $g(r)$ CM--O_w, definidas entre o centro de massa dos NHCh e os átomos de oxigênio das moléculas de solvente (água), cujos perfis foram representados na Figura 34.

De um modo geral, a Figura 34 indicou uma similaridade apreciável entre as RDF $g(r)$ CM--O_w dos NHCh (curva em preto) e dos NHCox (curva em vermelho), semelhança essa que também foi constatada entre as mesmas RDF dos NHC oxidados e pristinos (ver Figura 23). Assim como no caso dos NHC pristinos e oxidados, as RDF $g(r)$ CM--O_w dos NHCh (Figura 34) também indicaram a presença de moléculas de água na região “interior” dos NHC, isto é, no interior das cavidades desses nanomateriais quando imersos em solução

aquosa. As posições das camadas de solvatação interna e os respectivos números de coordenação dos NHCh estão listados na Tabela 19.

Figura 34. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w para as séries de modelos de NHC reduzidos (NHCh) e oxidados (NHCox).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em geral, apesar da conservação da posição das camadas de solvatação, independente da natureza dos modelos de NHC, sejam eles prístinos, oxidados ou reduzidos, foi possível observar diferenças em relação ao NC2 nas três séries avaliadas desses nanocarreadores. No que tange aos NHCh, notou-se uma redução do NC2 com o aumento das *nanowindows* quando se tratou dos modelos dessa série. Além disso, as topologias reduzidas também demonstraram uma menor capacidade de transporte de moléculas de água do que em relação às estruturas prístinas e oxidadas. Vale ressaltar que essas diferenças foram da ordem de até duas moléculas de água. Em resumo, os dados das RDF $g(r)$ CM--O_w (Figura 34 e Tabela 19) permitiram concluir que a presença das *nanowindows* estudadas, incluindo ou não os grupos funcionais oxigenados, não exerceu modificações intensas na estrutura de solvatação interna

desses materiais de carbono. Essa similaridade nas RDF pode estar conectada às dimensões das vacâncias geradas nas topologias de NHC que, provavelmente, não devem ter sido apropriadas para possibilitar o fluxo de moléculas de solvente através desses defeitos, o que possivelmente impediu variações apreciáveis nos números de coordenação das camadas de solvatação interna.

Tabela 19. Dados das funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w definidas entre o centro de massa dos modelos de NHC oxidados (NHCox) e reduzidos (NHCh) e o átomo de oxigênio das moléculas de água.

Modelo	$r / \text{Å}^1$		NC1 ²	$r / \text{Å}$		NC2 ³
	1° pico	1° mínimo		2° pico	2° mínimo	
NHC5a	0,15	1,65	0,56	3,15	4,95	17,04
NHCox1	0,15	1,65	0,54	3,15	4,95	16,87
NHCh1	0,15	1,65	0,53	3,15	4,95	16,84
NHCox2	0,15	1,65	0,51	3,15	4,95	16,61
NHCh2	0,15	1,35	0,33	3,15	4,65	15,11
NHCox3	0,15	1,65	0,48	2,85	4,95	16,49
NHCh3	0,15	1,65	0,50	2,85	4,65	14,96
NHCox4	0,15	1,35	0,28	2,85	4,95	16,50
NHCh4	0,15	1,35	0,29	2,85	4,65	14,66

¹ Distância média. ² Número de coordenação (NC) referente ao primeiro pico e que foi calculado com a integral de zero até o valor do 1° mínimo. ³ NC que engloba o primeiro e o segundo pico, cujo a integral foi calculada de zero até o valor do 2° mínimo.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Finalmente, a série de NHCh foi analisada em termos da área acessível ao solvente (SASA), a qual foi calculada como uma média referente ao número total de *frames* das trajetórias de 100 ns de cada umas das quatro topologias de NHCh. Os valores médios da SASA de cada modelo de NHCh, assim como aqueles referentes aos NHCox e ao pristino (NHC5a) foram organizados na Tabela 20. Os dados dessa tabela indicaram um aumento da SASA dos NHCh na medida em que se prosseguiu para protótipos com *nanowindows* maiores, como o caso do NHCh4 com um valor médio da SASA de 1156,96 Å². Em outras palavras, a abertura de vacâncias na superfície de topologias de NHC pristinos proporcionou

uma diminuição da hidrofobicidade desses sistemas, efeito esse de grande importância para a interatividade química com o meio fisiológico.

Tabela 20. Comparação dos valores médios da SASA (*solvent accessible surface area*) referentes às trajetórias de 100 ns dos modelos de NHCox, NHCh e do NHC5a (pristino).

Modelo	$\langle \text{SASA} \rangle / \text{\AA}^2$
NHC5a	881,47±4,98
NHCox1	1038,23±5,36
NHCh1	969,11±5,53
NHCox2	1157,33±6,65
NHCh2	1029,68± 5,99
NHCox3	1244,32±7,58
NHCh3	1089,22± 6,09
NHCox4	1350,36±9,04
NHCh4	1156,96±12,57

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como esperado, os modelos de NHCox foram aqueles que se destacaram em termos da acessibilidade a moléculas de solvente (ver Tabela 20), em função da presença dos grupos funcionais polares que garantiram uma maior biocompatibilidade e, conseqüentemente, um melhoramento na solubilidade, dispersibilidade e hidrofiliçidade dessas nanoestruturas em solução aquosa.

4.9 SIMULAÇÕES POR DM DOS COMPLEXOS cddp@NHCh

Após a análise de aspectos da dinâmica em solução aquosa de uma série de NHCh na forma pura, o próximo passo nesse trabalho envolveu o estudo desses nanomateriais reduzidos de carbono atuando como carreadores de moléculas do fármaco cddp. Para isso, procedeu-se com a construção de um série de oito complexos de inclusão do tipo cddp@NHCh, dentre eles, quatro envolveram o carregamento de apenas uma unidade do agente antitumoral, e os outros quatro englobaram duas, visando mimetizar os *clusters* de cddp detectados experimentalmente. Com as estruturas elaboradas, prosseguiu-se com os procedimentos de otimização, parametrização e, por fim, as simulações por DM, seguindo os protocolos apresentados na metodologia desse trabalho.

A Figura 35 exibe as estruturas finais das trajetórias de 100 ns desses oito protótipos cddp@NHCh. Nesse ponto, é importante enfatizar que, além de discutir o comportamento dos NHCh como DDS a cddp, essa etapa também envolveu análises comparativas com os resultados obtidos para o complexos cddp@NHC5a e cddp@NHCox, a fim de se descrever o efeito de topologias de NHC modeladas com base em tratamentos químicos convencionais de pós-síntese sobre o confinamento de fármacos a base de Pt(II).

No que tange a nomenclatura dos complexos cddp@NHCh, a Figura 35 indicou um sistema de nomes similar aquele utilizado para designar os complexos cddp@NHCox (ver Figura 25), sendo que a única diferença foi verificada na substituição do termo “ox” pelo “h”. Seguindo essa linha, no protótipo designado “2com5h4”, por exemplo, o “2” indica que existem duas cddp encapsuladas, o “com” reforça que se trata de um complexo de inclusão, o “5” refere-se ao modelo de NHC base (no caso o 5a, ver Figura 5), o “h” mostra que se trata de uma topologia de NHC reduzido e o “4” corresponde à topologia de NHCox que foi submetida ao processo de redução (no caso o NHCox4, ver Figura 22).

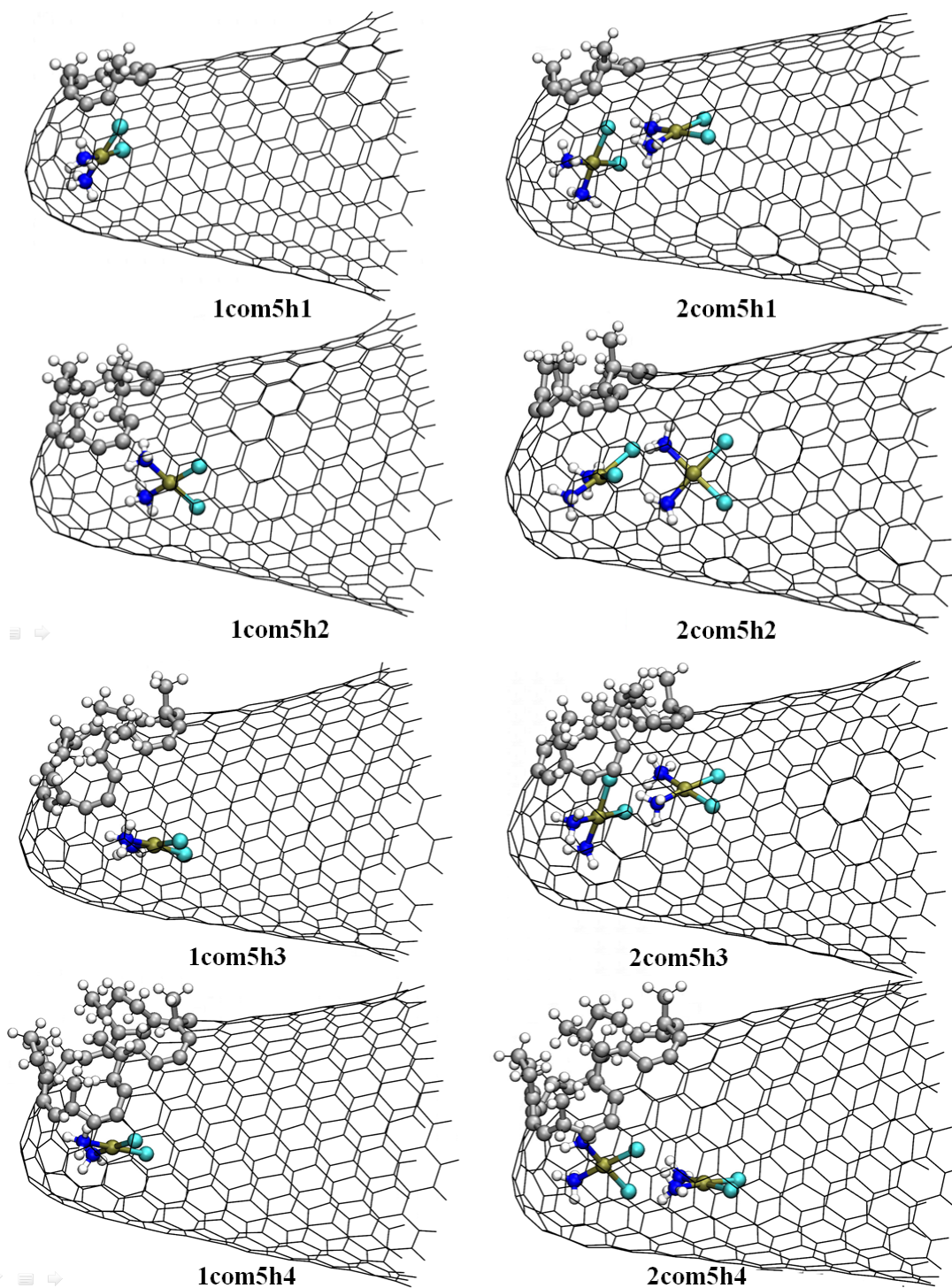
Ainda com relação à Figura 35, os *frames* apresentados sugeriram que, ao final do tempo de simulação de 100 ns, o fármaco permaneceu em um regime de confinamento nas cavidades dos NHCh, independentemente do tamanho das *nanowindows* desses modelos simulados. A partir desse resultado, as próximas análises conduzidas envolveram a varredura da história dinâmica desses complexos cddp@NHCh, a fim de se caracterizar eventos intermediários que possam ter ocorrido nesse período de tempo simulado.

Assim como procedido para os protótipos cddp@NHC e cddp@NHCox, a estabilidade estrutural dos complexos cddp@NHCh também foi analisada com base no valor médio e o desvio padrão do RMSD, os quais foram calculados a partir do *ensemble* de *frames* que compunha as trajetórias desses modelos. Os referidos valores estão organizados na Tabela 21.

Considerando a série de complexos cddp@NHCh, os valores de RMSD da Tabela 21 indicaram a inexistência de variações estruturais drásticas, em relação ao início da etapa de produção, durante o tempo simulado. Além disso, os valores do desvio padrão também sugeriram o alcance de um equilíbrio estrutural que também foi constatado para os complexos de inclusão com NHC prístinos (cddp@NHC) e com oxidados (cddp@NHCox). Apesar disso, a série de valores de RMSD da Tabela 21 apontou que, em média, os complexos com duas cddp (2com) tiveram um movimento mais restrito, como expressado pelos menores valores de RMSD, do que aqueles com uma cddp (1com). Como esperado, o modelo 1com5h4 se destacou pela maior flutuação estrutural observada ao longo do curso da simulação,

comportamento esse que pode ser justificado em função da presença da maior *nanowindow* estudada em sua superfície, e da inclusão de uma única unidade do fármaco cddp, garantindo uma maior liberdade de movimento no interior da cavidade do nanomaterial.

Figura 35. Estruturas finais (*frames* 20.000/20.000) das simulações dos oito protótipos de complexos cddp@NHCh incluindo uma (1com) e duas (2com) unidades de cisplatina.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além da relativa estabilidade estrutural dos complexos *cddp@NHCh* expressa pelos valores de RMSD, o protocolo de simulação empregado também se mostrou apropriado para o preparo e a equilibração desses sistemas, uma vez que não foram detectadas flutuações drásticas, por exemplo, da temperatura, da densidade e da energia potencial durante as simulações.

Tabela 21. Valor médio do RMSD de cada complexo *cddp@NHCh* incluindo uma (1com) e duas (2com) moléculas de cisplatina encapsuladas.

	1com5a	1com5h1	1com5h2	1com5h3	1com5h4
RMSD / Å ¹	0,767	0,238	0,844	0,667	1,278
std ²	0,258	0,034	0,242	0,302	0,248
	2com5a	2com5h1	2com5h2	2com5h3	2com5h4
RMSD / Å	0,306	0,839	0,344	0,286	0,710
std	0,055	0,104	0,155	0,042	0,198

* Os valores dos complexos com NHC prístinos também foram incluídos. ¹ Valores calculados a partir da média dos 20.000 *frames* da trajetória da etapa de produção. ² Desvio padrão.

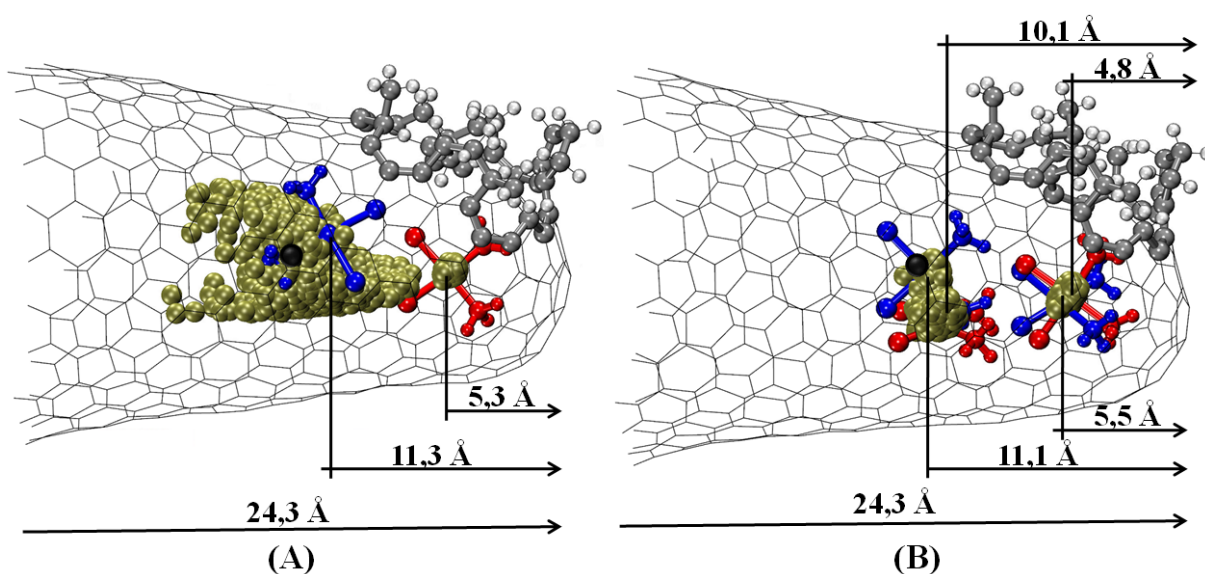
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com o intuito de acessar, em detalhes, a história da dinâmica do agente antitumoral no interior das cavidades dos modelos de *NHCh*, realizou-se um mapeamento da posição do átomo de Pt da *cddp* ao longo dos 100 ns de simulação. Esse mapeamento, cuja ideia já havia sido explorada nas seções anteriores desse trabalho para os complexos *cddp@NHC* e *cddp@NHCox*, encontra-se esquematizado na Figura 36, considerando os modelos 1com5h4 e 2com5h4.

Na Figura 36, as distribuições das posições do átomo de platina revelaram que a mobilidade da molécula de *cddp* foi restrita ao interior das cavidades dos *NHCh*, durante toda a trajetória de simulação dos complexos 1com5h4 (Figura 36A) e 2com5h4 (Figura 36B). O mesmo confinamento também foi observado para os demais complexos *cddp@NHCh*. Além disso, a Figura 36 corroborou os valores de RMSD da Tabela 21, uma vez que, de fato, no complexo com uma *cddp*, 1com5h4 (Figura 36A), a distribuição da posição do átomo de platina foi mais difusa do que no complexo 2com5h4 (Figura 36B), indicando uma maior mobilidade daqueles protótipos com apenas uma unidade de fármaco incluído. Vale ressaltar

que esse comportamento dinâmico foi semelhante ao observado para os complexos cddp@NHC (ver Figura 15). Em contraste, especialmente no caso dos complexos com uma cddp encapsulada, os modelos com NHC prístinos (cddp@NHC) apresentaram uma distribuição espacial mais simétrica e regular, o que provavelmente pode ter sido um efeito imposto pela superfície uniforme de átomos de carbono no caso dos modelos prístinos de NHC.

Figura 36. Comportamento da mobilidade da cisplatina na cavidade do modelo NHCh_4 nos complexos 1com5h_4 (A) e 2com5h_4 (B).



*As esferas douradas representam a variação temporal da posição do átomo de Pt da cddp ao longo do tempo de 100 ns. O centro de massa está indicado pelas esferas em preto. A posição inicial e final da cisplatina está indicada pelas representações, com todos os átomos explícitos do fármaco, em azul e em vermelho, respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Entretanto, as representações ilustradas tanto na Figura 36, quanto nas Figuras 15 e 26, não forneceram informação relativas à orientação da molécula de cddp no interior das cavidades dos NHC, como por exemplo, a questão dos modos de interação preferenciais entre a cddp e a superfície interna dos NHC. A fim de se clarificar esses questionamentos, imagens representando a distribuição espacial da molécula de cddp como um todo, e não apenas englobando o átomo de platina, foram construídas para topologias selecionadas das três séries de complexos de inclusão estudados (cddp@NHC , cddp@NHCox e cddp@NHCh), conforme mostrado na Figura 37. De um modo geral, a Figura 37 mostrou que, em média, o plano da

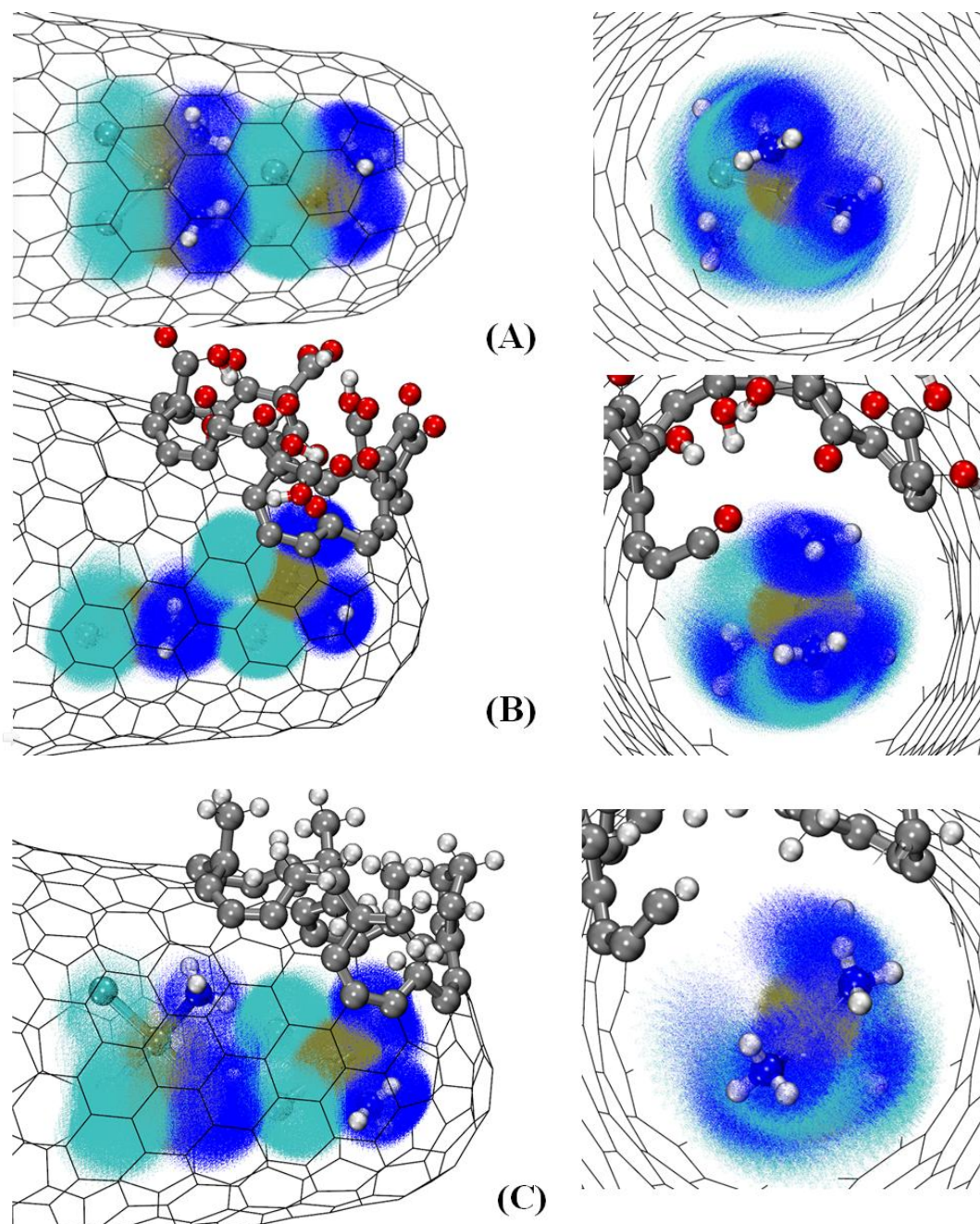
molécula de cddp permaneceu paralelo ao eixo central da cavidade dos NHC durante toda a simulação, de modo que a mobilidade do fármaco antitumoral seguiu essa distribuição espacial cilíndrica ilustrada nessa figura. Além disso, a própria distribuição das cores expressa nessa figura apontou que, em média, os dois grupos amino ($-\text{NH}_3$) da cddp permaneceram voltados para a região cônica dos NHC ao longo de toda a simulação.

Cabe ressaltar que esse arranjo preferencial da cddp no interior dos NHC também foi observado nos complexos com uma cddp (1com). Ainda com relação à Figura 37, acrescenta-se que a molécula de fármaco localizada mais próxima à extremidade aberta dos NHC, além de se orientar os dois grupos $-\text{NH}_3$ voltados para o interior das cavidades dos NHC, ela também formou interações de hidrogênio do tipo $\text{H} \cdots \text{Cl}$ entre as duas cddp encapsuladas. Embora a contribuição dos átomos de hidrogênio não tenha sido levada em conta nas distribuições espaciais dessa figura, a interação central da nuvem em azul (referente ao N) com a verde (referente ao Cl) sugerem essas interações intermoleculares cddp \cdots cddp (dímero de cisplatina). Comparando-se a distribuição espacial da cddp no complexo 2com5a (Figura 37A) com as respectivas distribuições nos complexos 2com5ox4 (Figura 37B) e 2com5h4 (Figura 37C), verificou-se uma similaridade em termos das orientações das duas moléculas de cddp nas cavidades dos NHC.

Apesar dessa semelhança no arranjo das moléculas de cddp que compõem o modelo de *cluster* desse fármaco, a distribuição espacial da cddp no complexo 2com5h4 (Figura 37C) se mostrou mais dispersa, insinuando uma maior mobilidade da molécula de cddp nessas topologias de NHC reduzidos. Por outro lado, a distribuição espacial da cddp no complexo 2com5ox4 (Figura 37B) se mostrou mais concentrada ou compactada se comparada às demais dessa figura. Esse efeito sugere que no caso dos NHCox, a presença de *nanowindows* com grupos funcionais polares pode exercer uma modulação na mobilidade de moléculas encapsuladas, fornecendo assim uma capacidade tanto de orientar determinados eventos de interesse nas cavidades desses nanomateriais como, por exemplo, a liberação controlada de fármacos por essas vacâncias.

Outro parâmetro importante que foi monitorado ao longo da DM dos complexos cddp@NHCh foi a distância média ($\langle d \rangle$) entre o centro de massa da cddp e um átomo de carbono posicionado na região cônica central dos NHCh. O valor médio desse parâmetro, que pode ser interpretado como uma estimativa média do comportamento expresso na Figura 36, está representado na Figura 38, considerando cada um dos oito complexos dessa série que englobou os modelos de NHCh.

Figura 37. Distribuição espacial do fármaco cisplatina nos complexos 2com5a (A), 2com5ox4 (B) e 2com5h4 (C), ao longo do tempo de 100 ns de simulação.



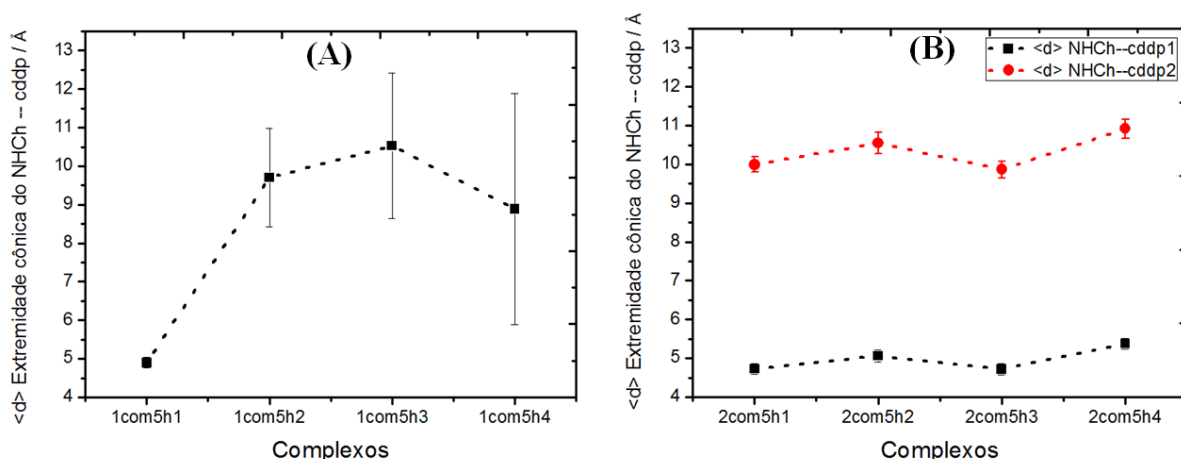
*As nuvens em azul, verde e dourado referem-se à distribuição espacial dos átomos de N, Cl e Pt, respectivamente. Essa distribuição da cddp, na qual foi excluída a contribuição dos átomos de hidrogênio, refere-se a uma amostra de 400 *frames* selecionados da etapa de produção dos complexos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

No que se refere aos dados dos complexos com uma cddp (1com) da Figura 38A, foi possível notar que o aumento da vacância, gerada pelo processo preliminar de oxidação,

promoveu tanto o afastamento da cddp em relação à região cônica do NHC, quanto uma maior oscilação desse parâmetro ($\langle d \rangle$), conforme indicado pelo aumento das barras relativas ao desvio padrão dessa medida. Entretanto, esse comportamento inverteu no caso do complexo 1com5h4, que se caracteriza por possuir a maior *nanowindow* dessa série, de tal modo que, ao invés de um afastamento, verificou-se uma aproximação da cddp em relação à “ponta” do NHC. Esse resultado sugere que o tamanho médio da vacância gerada pode ter atingido uma dimensão apropriada para possibilitar, por exemplo, interações com moléculas de água localizadas na região externa ao nanocarreador, uma vez que esse defeito estrutural (*nanowindow*) não exerce um grande impedimento estérico.

Figura 38. Valores médios das distâncias ($\langle d \rangle$) entre o átomo de carbono central da extremidade cônica de cada modelo de NHCh e o centro de massa da cisplatina para os complexos cddp@NHCh com uma (1com) e duas (2com) moléculas desse fármaco.



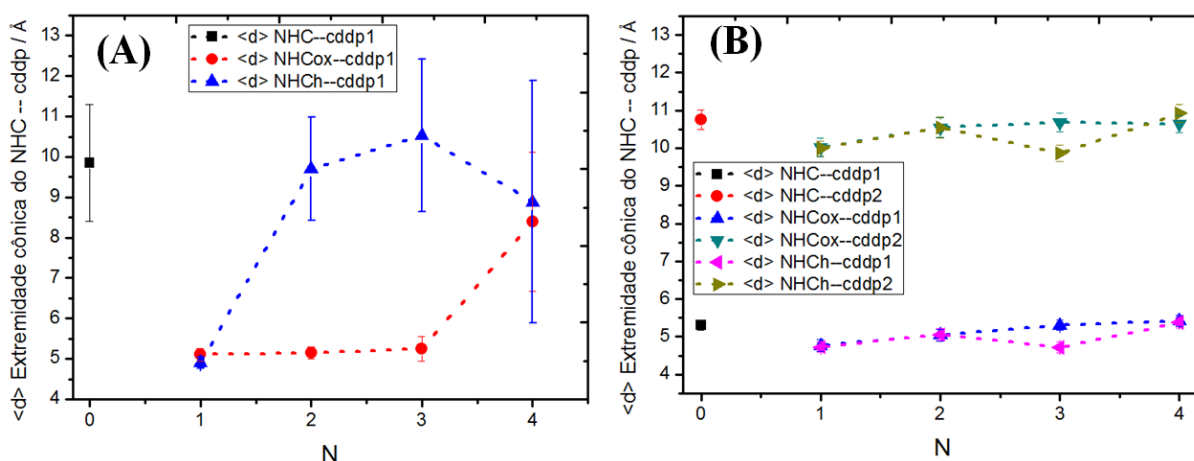
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em relação aos complexos 2com (Figura 38B), os dados das $\langle d \rangle$ não exibiram amplas diferenças entre os modelos da série desses complexos 2com, o que além de insinuar uma independência em termos do tamanho das *nanowindows* dos NHCh, também reforça a discussão da mobilidade mais restrita do fármaco, quando se tem o *cluster* de cddp encapsulado. Ressalta-se que a separação entre as curvas em vermelho e em preto também é uma consequência da distância de equilíbrio entre os dois fármacos que compõem o *cluster*.

A fim de se comparar a variação dessas $\langle d \rangle$ em função da natureza do modelo de NHC que constitui o complexo de inclusão, os valores médios desse parâmetro ($\langle d \rangle$) para os complexos cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh foram organizados em um mesmo gráfico, conforme esquematizado na Figura 39. Analisando a Figura 39A, constatou-se a

influência da presença dos grupos funcionais oxigenados nos NHCox sobre a aproximação da cddp em relação à região da “ponta” dos NHC. Em outras palavras, a presença das *nanowindows* funcionalizadas com grupos polares modulou a mobilidade do fármaco encapsulado, restringindo o seu movimento na região cônica que é a mais reativa nesse nanomaterial. Por outro lado, tanto a topologia pristina quanto as reduzidas de NHC não induziram uma determinada orientação da cddp no interior das cavidades, proporcionando assim, uma maior liberdade de movimento. Comportamento esse que se opôs ao observado para os complexos com duas cddp, conforme explicitado na Figura 39B. Essa figura mostra que, em média, apesar das diferenças em termos da natureza do NHC envolvido, a mobilidade do *cluster* de cddp se manteve mais restrita em todos os complexos de inclusão simulados.

Figura 39. Comparação das distâncias médias ($\langle d \rangle$) entre o centro de massa da cisplatina e a extremidade cônica dos NHC para as 3 séries de complexos estudadas: cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh.



*N refere-se ao grau de oxidação do complexo considerado, seja ele reduzido ou não. Ressalta-se que N = 0 engloba os modelos de complexos com o NHC pristino (NHC5a).

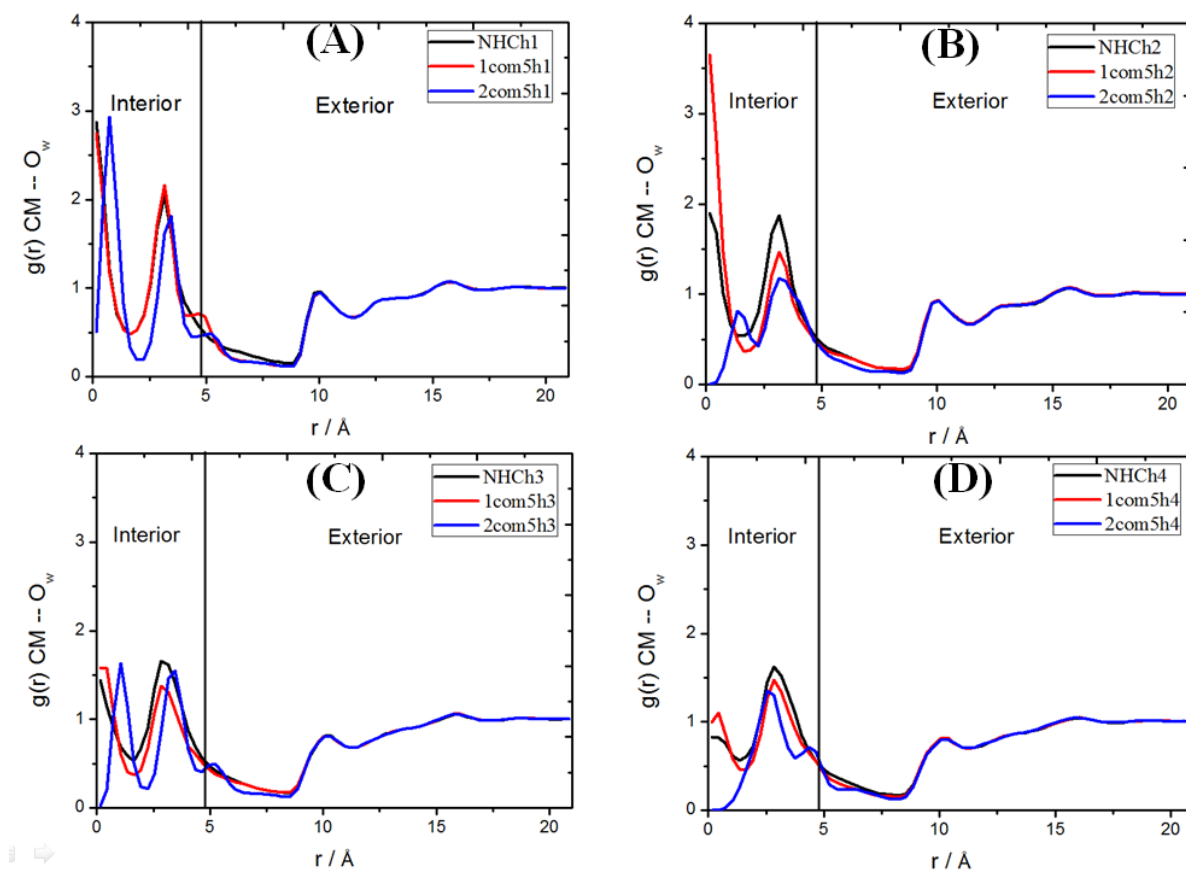
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

No que tange à interação dos complexos cddp@NHCh com o meio aquoso, as funções de distribuição radial (RDF) do tipo $g(r)$ CM--O_w também foram calculadas e analisadas para esses complexos, visando verificar a influência da inclusão de moléculas antitumorais (cddp) sobre a interação dos NHCh com a água. A comparação do perfil dessas RDF para todos os complexos dessa série, contendo os NHCh, está representada na Figura 40.

Novamente, as cavidades dos complexos cddp@NHCh também foram preenchidas por um determinado número de moléculas de água, o qual pode ser calculado a partir da

integração dos picos referentes à região “interior” das RDF apresentadas na Figura 40. Ao analisar as referidas funções, notou-se uma diminuição das intensidades dessas funções de correlação de pares, principalmente no caso dos complexos com duas cddp (ver curvas em azul), indicando assim, uma redução da probabilidade de se encontrar moléculas de águas nesses modelos. Associado a esse comportamento, também foi verificado um deslocamento dos picos que também foi mais expressivo para com os complexos 2com, como destacado em todos os gráficos da Figura 40 (ver curvas em azul). Esse efeito de deslocamento da camada interna de solvatação pôde ser justificado pelos resultados das $\langle d \rangle$ expressos na Figura 38B (curva em vermelho), uma vez que o fato de uma das moléculas de cddp ter assumido uma posição média próxima ao CM dos NHCh ($\sim 12,9 \text{ \AA}$), pode ter contribuído tanto o deslocamento como para a expulsão de moléculas de água dessa região. As posições dos picos e os NC das RDF da Figura 40 estão organizados na Tabela 22.

Figura 40. Funções de distribuição radial $g(r)$ CM--O_w dos complexos cddp@NHCh definidas entre o centro de massa dos NHCh e os átomos de oxigênio das moléculas de água.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Tabela 22, pôde-se perceber que o decréscimo das intensidades das RDF $g(r)$ CM--O_w da Figura 35 refletiu na diminuição dos NC2 na medida em que se prosseguiu dos NHCh puros para a inclusão de consecutiva de fármacos cddp no caso dos complexos. Vale lembrar que o mesmo comportamento também foi observado nos complexos cddp@NHC (ver Tabela 8) e cddp@NHCox (Tabela 14). Acrescenta-se, ainda, que as posições do 2º pico das RDF da Tabela 22 reforçaram que o deslocamento das camadas de solvatação interna foi mais expressivo para o caso dos complexos com duas cddp.

Tabela 22. Dados das funções de distribuição do tipo $g(r)$ CM--O_w dos protótipos de complexos de inclusão cddp@NHCh e daqueles constituídos pelo NHC5a (pristino).

Modelo	r / Å ¹		NC1 ²	r / Å		NC2 ³
	1º pico	1º mínimo		2º pico	2º mínimo	
NHC5a	0,15	1,65	0,56	3,15	4,95	17,04
1com5a	0,15	1,95	0,90	3,15	4,95	14,82
2com5a	0,75	1,95	0,93	3,45	4,35	11,28
NHCh1	0,15	1,65	0,53	3,15	4,95	16,84
1com5h1	0,15	1,65	0,52	3,15	4,05	11,91
2com5h1	0,75	1,95	0,90	3,45	4,35	11,10
NHCh2	0,15	1,35	0,33	3,15	4,65	15,11
1com5h2	0,15	1,65	0,52	3,15	4,95	13,59
2com5h2	1,35	2,25	1,03	3,15	4,95	13,39
NHCh3	0,15	1,65	0,50	2,85	4,65	14,96
1com5h3	0,45	1,65	0,42	2,85	5,25	14,80
2com5h3	1,05	1,95	0,84	3,45	4,65	11,59
NHCh4	0,15	1,35	0,29	2,85	4,65	14,66
1com5h4	0,45	1,35	0,27	2,85	4,95	14,27
2com5h4	2,55	3,75	6,74	4,35	4,73	12,83

¹ Distância média. ² Número de coordenação (NC) referente ao primeiro pico e que foi calculado com a integral de zero até o valor do 1º mínimo. ³ NC que engloba o primeiro e o segundo pico, cujo a integral foi calculada de zero até o valor do 2º mínimo.

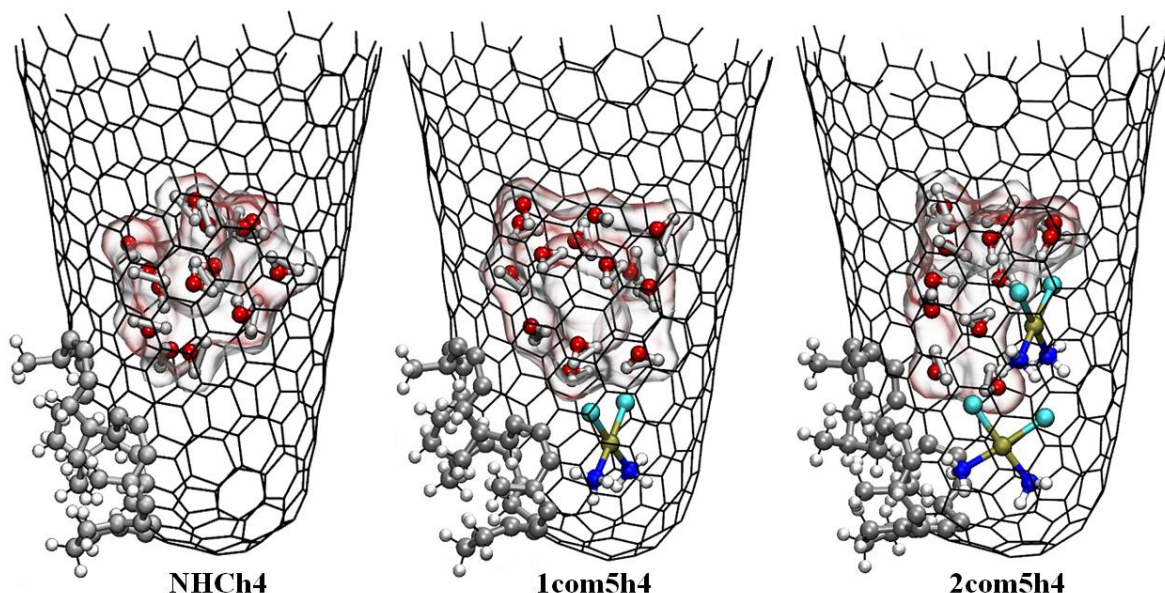
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ao se comparar o NC2 do complexo 2com5h4 (Tabela 22) com o do complexo 2com5ox4 (Tabela 14), verificou-se que aquele com o NHCh4 possibilitou o carregamento de 13 moléculas de água, em contraste a apenas 7 no caso do modelo com o NHCox4. Isso sugere que apesar da suposta maior hidrofiliçidade dos NHCox frente aos NHCh, as

nanowindows oxidadas podem não ter proporcionado um fluxo de moléculas de solvente similar ao observado no caso das vacâncias reduzidas.

A fim de se obter uma visualização do arranjo referente ao NC2 da Tabela 22, os modelos contendo o NHCh4 foram selecionados para a construção de topologias que representassem as distribuições de moléculas de água encapsuladas nesses protótipos. Essas topologias estão apresentadas na Figura 41.

Figura 41. *Snapshots* finais das trajetórias de 100 ns dos modelos de NHCh4, 1com5h4 e 2com5h4, destacando apenas a distribuição das moléculas de água referentes ao número de coordenação NC2 da Tabela 21.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além da dispersão da distribuição de moléculas de água ao se incluir o fármaco cddp, a Figura 41 também evidenciou a expulsão, em média, de pelo menos uma molécula de água do NHCh4 puro, quando uma unidade do agente antitumoral foi incluída, e de duas moléculas de água no caso da inclusão do *cluster* constituído por duas moléculas de cddp. Como resultado, o NC2 do NHCh4 reduziu de 15 para 14, no caso da formação do complexo 1com5h4, e de 15 para 13, ao se considerar a formação do complexo de inclusão 2com5h4.

Outro ponto analisado sobre os complexos cddp@NHCh foi referente ao estudo da variação da área acessível ao solvente dos NHCh, quando uma ou duas moléculas de cddp foram incluídas nas cavidades desses nanomateriais de carbono. Para isso, procedeu-se com o cálculo da SASA, a qual foi obtida como uma média ao longo dos *frames* da etapa de

produção. Os valores médios da SASA de cada protótipo do tipo cddp@NHCh estão dispostos na Tabela 23. Além dos protótipos contendo NHCh apresentarem uma maior acessibilidade a moléculas de solvente frente aos complexos com NHC prístinos (NHC5a), os dados da Tabela 23 também evidenciaram que o processo de inclusão do fármaco cddp proporcionou uma redução da hidrofobicidade das estruturas de NHCh. Ainda no que concernem os dados da Tabela 23, o aumento do tamanho médio da *nanowindow* reduzida também foi outro fator importante que contribuiu para a ampliação da SASA dos complexos cddp@NHC.

Tabela 23. Valores médios da SASA (*solvent accessible surface area*) dos modelos de NHCh e dos complexos cddp@NHCh calculados a partir das trajetórias de 100 ns desses sistemas.

Modelo	<SASA>/Å ²
NHC5a	881,47±4,98
1com5a	886,45±5,37
2com5a	906,98±5,77
NHCh1	969,11±5,53
1com5h1	995,50±6,34
2com5h1	1000,46±6,45
NHCh2	1029,68±5,99
1com5h2	1030,66±6,49
2com5h2	1050,72±7,52
NHCh3	1089,22±6,09
1com5h3	1089,45±6,46
2com5h3	1115,06±7,19
NHCh4	1156,96±12,57
1com5h4	1152,73±11,77
2com5h4	1187,06±8,17

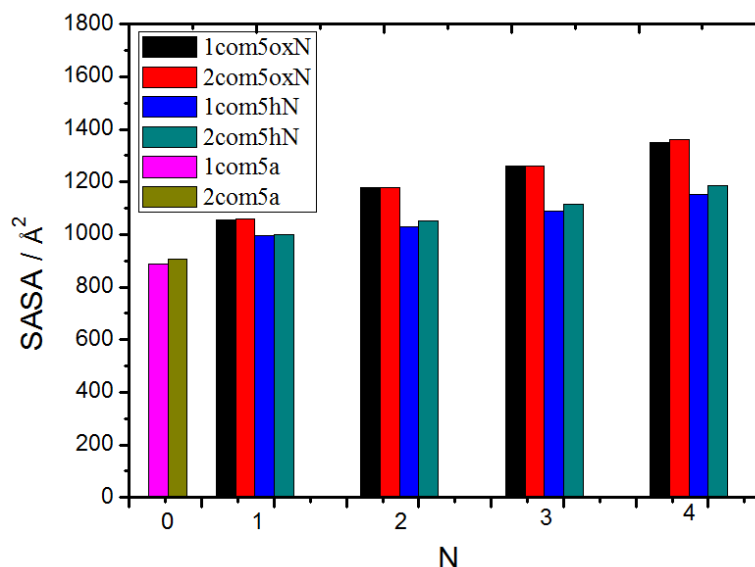
*O termo <SASA> reforça que os valores da SASA dessa tabela foram calculados como médias do número total de *frames* da etapa de produção de cada sistema simulado.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ainda com relação à análise da SASA, uma comparação dos valores médios dessa medida para os complexos cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh foi organizada conforme o gráfico apresentado na Figura 37. Como primeira observação, notou-se que os complexos incluindo os NHCox (barras em vermelho e em preto) foram aqueles que demonstraram a maior acessibilidade à moléculas de solvente, principalmente no caso de duas cddp. Em seguida, verificou-se que embora o processo de redução tenha eliminado os grupos

funcionais oxigenados nas vacâncias, o tratamento químico continuou a garantir a formação de NHC menos hidrofóbicos do que os correspondentes prístinos. Vale ressaltar ainda o papel da presença e do tamanho das *nanowindows*, uma vez que se verificou que quanto maior o tamanho desse defeito, maior será a acessibilidade a moléculas do solvente. Nessa linha, ao se comparar, por exemplo, o valor da SASA do 2com5a com o do complexo 2com5ox4, constatou-se um aumento médio de 454 Å² na SASA, ao incluir a topologia oxidada de NHC.

Figura 42. Comparação dos valores médios da SASA (*solvent accessible surface area*) para cada uma das três classes de complexos de inclusão: cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh.



*N refere-se ao grau de oxidação do NHC presente. Ressalta-se que N = 0 engloba os complexos que possuem NHC prístinos, uma vez que esses não foram submetidos a tratamentos químicos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como análise final, a termodinâmica da formação dos complexos cddp@NHCh também foi avaliada, por meio da metodologia clássica MM-GBSA, a fim de se caracterizar a influência das topologias de NHC reduzidos sobre a estabilidade desses complexos de inclusão. Nessa perspectiva, as energias livre de ligação ($\Delta_b G$) e suas componentes foram calculadas como valores médios referentes a uma amostra composta por 1.000 *frames* selecionados da etapa de produção de cada complexo (ver Tabela 24).

Com base na análise dos valores das $\langle \Delta_b G \rangle$ organizados na Tabela 24, foi possível constatar teoricamente que a formação dos oito complexos do tipo cddp@NHCh consistiu em um processo termodinamicamente favorável, corroborando a aplicabilidade do tratamento

químico de redução estudado por Ajima e colaboradores (AJIMA, *et al.*, 2006). As diferenças entre valores médios das Δ_bG de todos os protótipos dessa série de complexos com NHCh estão esquematizadas na Figura 43A. Em uma primeira análise dessa figura, foi evidente concluir que a inclusão do *cluster* de cddp (curva em vermelho) teve uma maior contribuição para a estabilidade dos complexos do que a inclusão de uma única molécula desse fármaco (curva em preto). Cabe ressaltar que esse resultado, baseado em valores de Δ_bG notoriamente mais favoráveis para os complexos com duas cddp, já havia sido constatado, em seção anteriores, para os complexos cddp@NHC e cddp@NHCox. E esse efeito estabilizador pode ser interpretado como uma consequência do aumento do número de interações intermoleculares do tipo cddp--NHC no interior das cavidades desses nanomateriais.

Tabela 24. Valores médios de energia livre de ligação ($\langle\Delta_bG\rangle$) e de suas componentes energéticas referentes aos protótipos cddp@NHCh.

Modelo	$\langle\Delta E_{vdW}\rangle$	$\langle\Delta E_{ELE}\rangle$	$\langle\Delta E_{GB}\rangle$	$\langle\Delta E_{SURF}\rangle$	$\langle\Delta E_{GAS}\rangle^1$	$\langle\Delta G_{SOLV(GB)}\rangle^2$	$\langle\Delta_bG\rangle^3$
1com5a	-54,11±3,49	-21,05±1,89	37,63±2,64	-1,10±0,03	-75,17±4,92	36,52±2,63	-34,78±2,89
2com5a	-126,35±1,83	-47,07±1,92	79,93±2,37	-1,76±0,07	-173,42±2,96	78,17±2,40	-79,27±2,05
1com5h1	-73,62±1,33	-29,78±2,25	51,54±2,65	-0,93±0,05	-103,40±2,57	50,61±2,67	-39,95±1,76
2com5h1	-126,16±1,52	-28,13±1,85	65,56±2,48	-1,77±0,05	-154,29±2,25	63,79±2,51	-73,77±2,16
1com5h2	-52,04±2,76	-14,35±1,74	30,45±2,05	-1,10±0,03	-66,39±3,43	29,35±2,04	-33,37±2,20
2com5h2	-121,78±1,73	-35,10±2,67	68,10±2,91	-1,88±0,06	-156,87±2,81	66,13±2,92	-73,62±2,13
1com5h3	-66,10±7,22	-29,93±12,65	48,57±13,61	-1,03±0,06	-96,02±19,70	47,55±13,66	-42,40±6,29
2com5h3	-118,71±2,13	-26,12±6,16	60,53±6,25	-1,85±0,09	-144,83±6,29	58,68±6,22	-70,10±2,43
1com5h4	-58,32±8,76	-12,19±10,40	30,40±11,63	-1,06±0,08	-70,52±18,89	29,33±11,68	-39,25±7,44
2com5h4	-120,47±2,37	-25,52±4,64	59,26±4,37	-1,86±0,07	-145,99±4,69	57,40±4,38	-73,72±2,37

* Os valores relativos aos complexos com NHC prístinos (1com5a e 2com5a) também foram incluídos. Onde E_{vdW} , E_{ELE} , E_{GB} , E_{SURF} , E_{GAS} , $G_{SOLV(GB)}$ e Δ_bG correspondem à energia de *van der Waals*, a energia eletrostática de *Coulomb*, a contribuição polar para a solvatação pelo modelo *Generalized Born* (GB), a contribuição não-polar para a solvatação, a energia livre na fase gasosa, a energia livre de solvatação e a energia livre de ligação, respectivamente. Todos os valores estão em kcal mol⁻¹.

$$^1 E_{GAS} = E_{MM} = E_{\text{ligações}} + E_{\text{ângulos}} + E_{\text{torção}} + E_{vdW} + E_{ELE}$$

$$^2 G_{SOLV(GB)} = E_{GB} + E_{SURF}$$

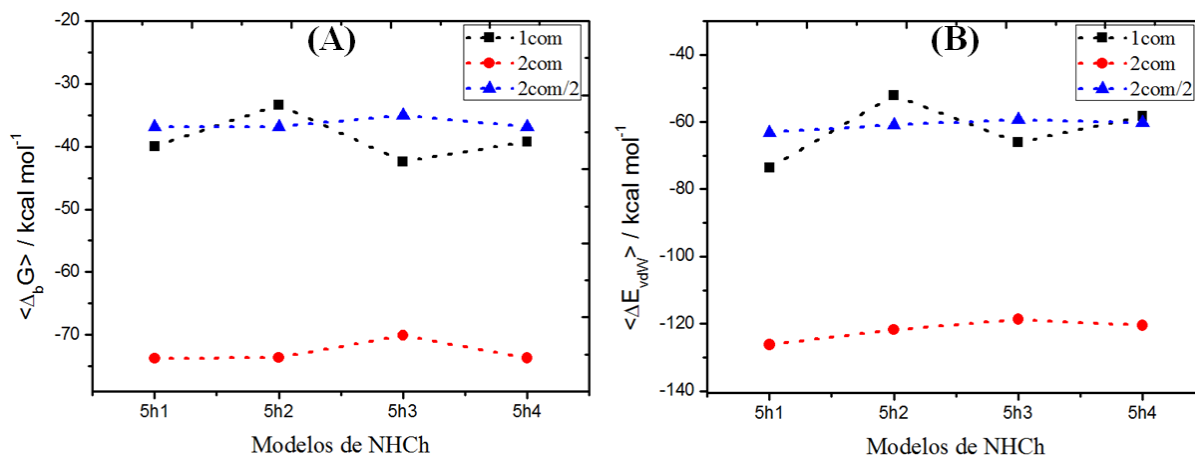
$$^3 \Delta_bG = \Delta E_{GAS} + \Delta G_{SOLV(GB)} - T\Delta S_{\text{soluto}}$$

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Entretanto, não foi observada uma correlação entre o tamanho das *nanowindows* reduzidas com a afinidade fármaco-receptor, uma vez que os valores para os diferentes complexos cddp@NHCh oscilaram em torno de $-38,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ para os complexos 1com e $-72,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ para os complexos 2com. Os dados da Tabela 24 também destacaram claramente o papel significativo das interações de *van der Waals*, representadas pelo termo “ E_{vdW} ”, para a estabilização dos complexos cddp@NHCh, fato esse esperado, uma vez que essa é uma das principais forças que compõem esses sistemas.

Ademais, no contexto dos cálculos quânticos, De Souza e colaboradores também apontaram a necessidade em se incluir termos que representam as forças de dispersão para descrever as interações de vdW proeminentes nesses complexos de inclusão (DE SOUZA, *et al.*, 2013). A Figura 43B apresenta os valores das ΔE_{vdW} em função da série de complexos estudados nessa seção. Nessa figura, a curva em azul retratou o efeito estabilizador aditivo acarretado pela inclusão de moléculas do fármaco cddp, sugerindo o prosseguimento dessa tendência, em função do tamanho das vacâncias e do número de moléculas de cddp encapsuladas, pelo menos no caso do carreamento de algumas moléculas desse fármaco.

Figura 43. Valores médios da $\Delta_b G$ (A) e ΔE_{vdW} (B) calculados a partir de uma amostra de 1.000 estruturas (*frames*) selecionados das trajetórias complexos cddp@NHCh.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A interação eletrostática, a qual é descrita pelo termo “ E_{ELE} ”, também foi outra componente energética que teve uma parcela significativa para a estabilização dos complexos com NHCh. Ao avaliar os valores dessas energias ao longo da coluna “ $\langle \Delta E_{ELE} \rangle$ ” da Tabela 24, notou-se oscilações maiores para os complexos que incluíam os modelos NHCh3 e NHCh4, especialmente no caso daqueles com duas cddp confinadas. Essas amplas variações

da energia potencial eletrostática podem estar relacionadas com o tamanho das vacâncias dos complexos com esses NHCh que, conforme os resultados expressos na Figura 38, proporcionou uma maior mobilidade dos fármacos no interior das cavidades desses nanocarreadores. Com relação aos complexos com duas cddp, verificou-se um maior peso dessa contribuição eletrostática estabilizadora para o complexo contendo o NHC pristino (2com5a), do que em relação aos demais modelos da série de complexos com NHCh. Ainda sobre a componente eletrostática, ao se comparar os respectivos valores $\langle \Delta E_{ELE} \rangle$ da Tabela 24 com os mesmos estimados para o caso dos complexos com NHCox (Tabela 16), concluiu-se que esse tipo de interação foi mais expressiva para os complexos de inclusão com NHCox. Esse resultado é plausível, uma vez que as topologias oxidadas, ao contrário das pristinas e reduzidas, possuem grupos funcionais em suas vacâncias, como as carbonilas, hidroxilas e carboxilas, que contêm o átomo de oxigênio, o qual possui uma maior carga e eletronegatividade do que comparada com os átomos de carbono e hidrogênio. Conseqüentemente ocorreu um aumento da E_{ELE} , em partes como consequência da relação de proporcionalidade desse potencial com a carga dos átomos.

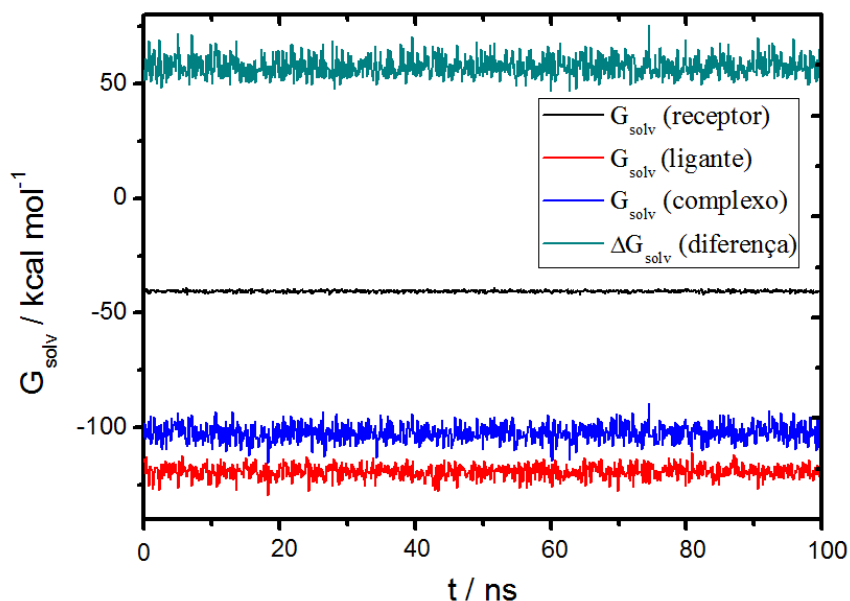
No que tange à energia livre de solvatação ($G_{SOLV(GB)}$), a Tabela 24 indicou que a componente relativa à contribuição não-polar (E_{SURF}) se tornou cada vez mais significativa com o aumento das *nanowindows* nos complexos cddp@NHCh com duas cddp. Resultado esse que está em consonância com os valores médios da SASA desses protótipos expressos na Tabela 23. Por outro lado, foi possível notar valores consideravelmente positivos do termo referente à contribuição polar para a energia livre de solvatação (E_{GB}) (ver Tabela 23). Esse último comportamento, o qual resultou em um efeito desestabilizador dos complexos cddp@NHCh ($\Delta G_{SOLV} > 0$), pode ser compreendido a partir da análise das contribuições individuais de cada espécie do complexo, conforme a Figura 44 para o complexo 2com5h4.

De um modo geral, o processo de solvatação implícita, pelo modelo GB, das três espécies individuais (NHCh4, dímero de cddp e complexo cddp@NHCh4) pode ser classificado como termodinamicamente favorável, devido aos apreciáveis valores negativos dessas componentes (ver Figura 44). Como destaque, o maior nível de espontaneidade para o processo de solvatação, foi observado para o dímero de cddp com um valor médio de $-119,2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Em contraste, a solvatação do NHCh4 foi o processo mais desfavorável, com um valor médio de $-40,5 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Apesar disso, a inclusão do dímero de cddp na cavidade do NHCh4 teve um papel relevante, uma vez que ela promoveu um decréscimo da energia livre de solvatação do

NHCh4, isto é, uma estabilização do sistema por quase $-61,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, atingindo um valor médio de $-102,3 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Figura 44 - Variação temporal das energias livre de solvatação para o receptor (NHCh4), do ligante (dímero de cisplatina), do complexo cddp@NHCOx4 e do valor da diferença entre essas componentes ao longo dos 100 ns de simulação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

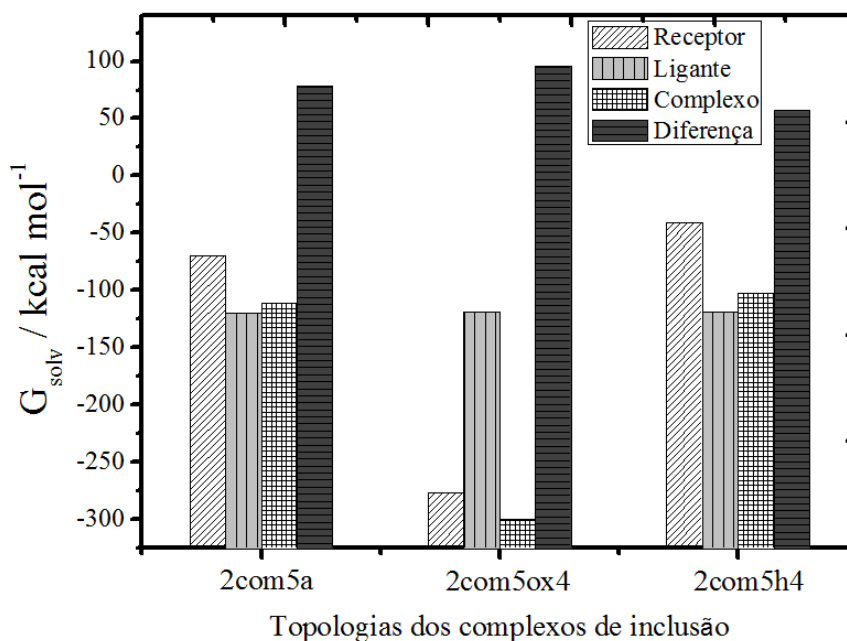
No entanto, as diferenças entre as espécies singulares e o complexo continuou resultando em um processo desfavorável. Em outras palavras, o processo de dissolução desses nanomateriais, considerando o modelo contínuo de solvatação GB, não se mostrou favorável. Vale enfatizar que esse efeito desestabilizador da $\Delta G_{\text{SOLV(GB)}}$, que também foi observado nos complexos cddp@NHC e cddp@NHCOx, pode estar conectado com a alta hidrofobicidade desses sistemas.

A Figura 45 a seguir apresenta uma comparação das contribuições individuais para a energia livre de ligação (ΔG_{SOLV}) no caso das três classes dos complexos de inclusão, 2com5a, 2com5ox4 e 2com5h4, estudados nesse trabalho.

Com base nos dados da Figura 45, foi possível notar, nitidamente, que a solvatação do receptor constituído por um NHCOx é mais favorável (ver barras do complexo 2com5ox4) do que no caso da solvatação de receptores prístinos (NHC no 2com5a) ou reduzidos (NHCh4 no 2com5h4). Como consequência, o processo de solvatação implícita do complexo com a

topologia oxidada de NHC (2com5ox4) foi o mais espontâneo com relação aos complexos 2com5a e 2com5h4, conforme o seu valor apreciavelmente negativo.

Figura 45 - Comparação dos valores médios em kcal mol⁻¹ das componentes da energia livre de solvatação ($\delta\Delta G_{\text{solv}}$) dos complexos 2com5a, 2com5ox4 e 2com5h4.



*Diferença: $\delta\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{complexo}} - (\Delta G_{\text{receptor}} + \Delta G_{\text{ligante}})$.

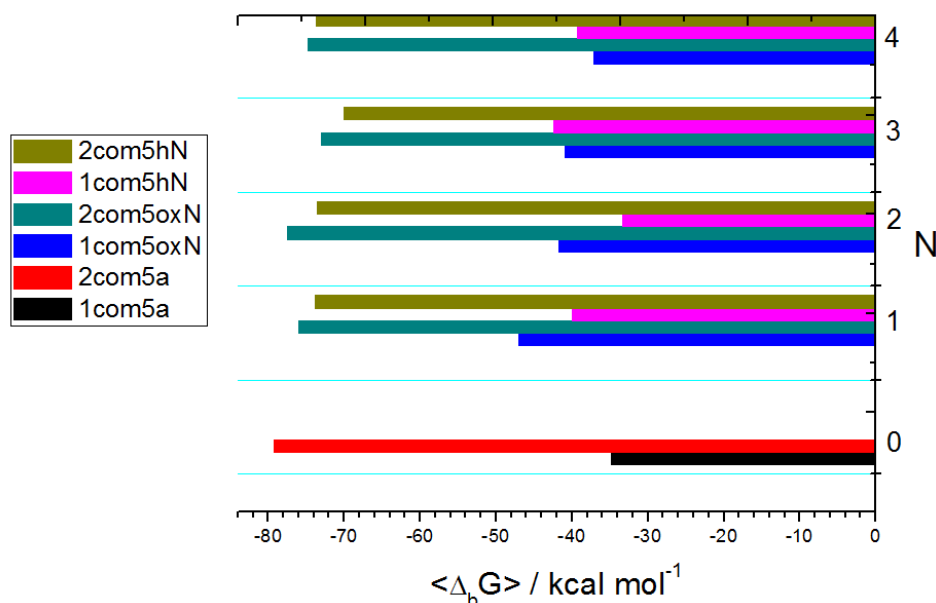
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Entretanto, ao se avaliar os valores relativos à “Diferença”, os quais constituem a energia livre de solvatação ($\delta\Delta G_{\text{solv}}$), constata-se que todos os valores são positivos, independente da natureza da topologia de NHC, o que indica que o processo de dissolução desses complexos em água é termodinamicamente desfavorável ($\delta\Delta G_{\text{solv}} > 0$), com base no modelo de solvatação implícita GB utilizado nos cálculos MMGBSA.

A fim de se comparar a afinidade fármaco-receptor estimada para as três séries de complexos estudados, os dados das $\Delta_b G$ encontrados nas Tabelas 9, 16 e 24 foram organizados em um mesmo gráfico, conforme mostrado na Figura 46. Os dados dessa figura reforçaram o resultado de que o processo de inclusão de duas moléculas de cddp nas cavidades dos NHC, independentemente da sua natureza desses nanomateriais, foi termodinamicamente mais favorável do que o processo de inclusão de apenas uma molécula desse fármaco. Claramente, o complexo 2com5a (barra em vermelho na Figura 46) se

destacou como o mais estável dos protótipos com um valor médio de $\Delta_b G$ em torno de $-79,3$ kcal mol⁻¹, seguido dos complexos contendo os NHCox. Mais uma vez, o processo de oxidação se mostrou relevante para a ativação dessas nanoestruturas, associada a uma garantia de estabilidade energética.

Figura 46. Comparação das estabilidades ($\Delta_b G_{total}$) entre as três séries simuladas de complexos de inclusão: cddp@NHC5a, cddp@NHCox e cddp@NHCh.



*N refere-se ao grau de oxidação do complexo considerado. Ressalta-se que N = 0 engloba os modelos com os NHC prístinos, uma vez que esses não foram submetidos a tratamentos químicos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Uma vez que a entropia do soluto também foi considerada nos cálculos das $\Delta_b G$ com o intuito de se descrever, de forma mais acurada, a formação dos complexos cddp@NHCh, as variações das contribuições dessa propriedade termodinâmica nas simulações também foram caracterizadas. Os valores das contribuições entrópicas, que constituem o termo $-T\Delta S_{solute}$, na expressão das $\Delta_b G$ dos complexos cddp@NHCh, estão dispostos na Tabela 25 a seguir.

Novamente, o efeito da perda dos graus de liberdade translacionais e rotacionais, no evento de formação do complexo de inclusão, também foi observado nos protótipos do tipo cddp@NHCh, a partir dos valores negativos dos termos $T\Delta S_{trans}$ e $T\Delta S_{rot}$ na Tabela 25. Nesse ponto, cabe ressaltar que a estimativa dessas duas contribuições entrópicas exibiu uma desconexão com a natureza de cada uma das três séries de complexos simulados (cddp@NHC, cddp@NHCox e cddp@NHCh), uma vez que os valores obtidos foram

praticamente os mesmos (ver Tabela 10, 17 e 25), independente das diferenças existentes nas topologias dos NHC.

Tabela 25. Contribuições entrópicas dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais dos modelos de complexos cddp@NHCh.

Modelo	1com5h1	1com5h2	1com5h3	1com5h4	2com5h1	2com5h2	2com5h3	2com5h4
$T\Delta S_{\text{trans}}$	-12,75	-12,75	-12,75	-12,75	-13,31	-13,31	-13,31	-13,31
$T\Delta S_{\text{rot}}$	-8,63	-8,67	-8,64	-8,65	-10,40	-10,38	-10,32	-10,23
$T\Delta S_{\text{vib}}$	8,53	17,74	15,31	19,47	6,98	6,57	7,57	8,67
$T\Delta S_{\text{tot}}$	-12,84	-3,67	-6,07	-1,93	-16,74	-17,12	-16,06	-14,87

*O termo $T\Delta S_{\text{tot}}$ envolve a soma das contribuições entrópicas para a formação do complexo cddp@NHCOx (soluto) na Equação 4. Todos os valores estão em kcal mol⁻¹ e a temperatura considerada de 298,15 K.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Por outro lado, o termo referente às variações da entropia vibracional ($T\Delta S_{\text{vib}}$) apresentou valores positivos nos oito modelos com diferenças tanto na série dos complexos da Tabela 25, quanto em relação aos complexos cddp@NHCOx e cddp@NHCh, sugerindo a especificidade do método da aproximação quase-harmônica, no que diz respeito ao tratamento de sistemas similares.

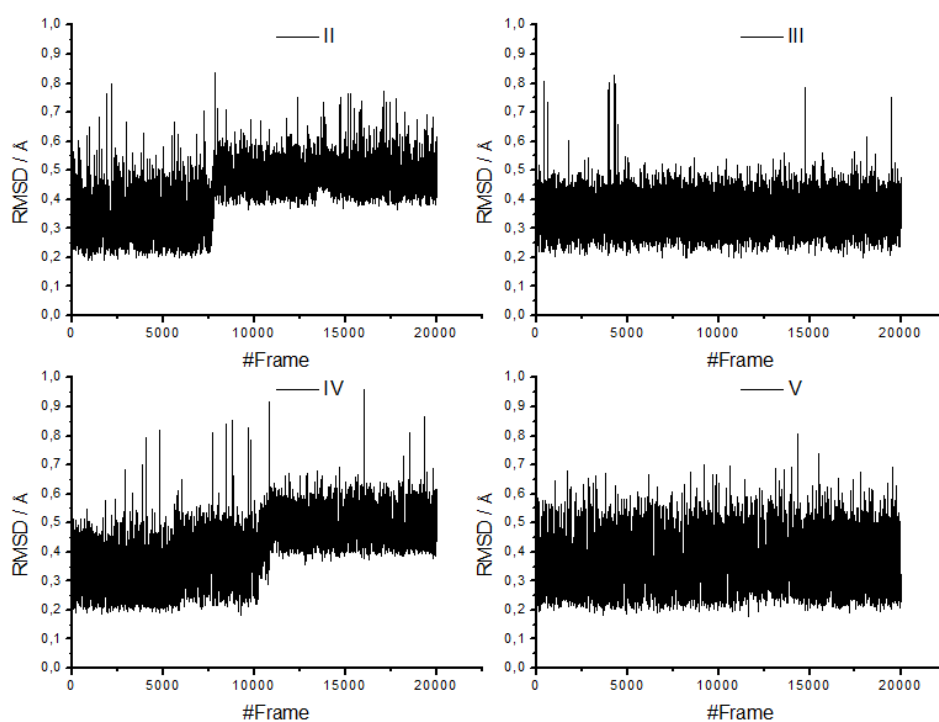
Ao se comparar os valores do termo $T\Delta S_{\text{vib}}$ entre o processo de formação de complexos com uma cddp com o processo de formação daqueles com duas unidades desse fármaco, considerando um mesmo modelo de NHC, verificou-se uma redução dessa contribuição entrópica para o caso da inclusão de duas moléculas dessa metalodroga. Esse comportamento, que também foi notado na formação dos complexos cddp@NHC e cddp@NHCOx, pode estar conectado com a redução dos graus de liberdade vibracionais acessíveis devido, à maior restrição ao movimento no interior das cavidades dos NHC contendo duas moléculas de cddp. No geral, o termo $T\Delta S_{\text{solute}}$ exerceu uma contribuição desestabilizadora para a formação dos complexos, devido aos seus valores negativos expressos na Tabela 25. Apesar disso, os valores das $\Delta_b G$ continuaram a garantir a espontaneidade do processo de formação dos protótipos cddp@NHCh.

Um último ponto a ser discutido com base na análise das trajetórias dos complexos cddp@NHCh, se refere ao tempo de confinamento do agente antitumoral nas cavidades dos NHCh. Nessa perspectiva, o que se verificou para esses complexos de inclusão foi a residência da molécula de cddp no interior dos NHCh durante toda a trajetória de simulação com o tempo total de 100 ns. Esse comportamento, que se perdurou mesmo no caso dos

complexos com a maior *nanowindow* da série (NHCh4), também foi notado em todos os protótipos de complexos do tipo *cddp@NHC* e *cddp@NHCox*.

A fim de se investigar se a não ocorrência do evento de liberação do fármaco *cddp*, a partir dos NHC, envolvesse uma questão de insuficiência do tempo de simulação, foi realizada uma nova simulação do complexo 2com5ox4, a qual envolveu basicamente a expansão do tempo de simulação de 100 ns para 1,0 μ s (1.000 ns). De certa forma, esse novo tempo de simulação foi uma extrapolação de cunho exploratório, visto que existem registros na literatura apontando que a liberação controlada da *cddp* a partir de modelos de NTC, que é um sistema similar ao estudado nesse trabalho, ocorreu na faixa de 2 a 25 ns (MEJRI, *et al.*, 2015). Partindo-se dos 100 ns já simulados do complexo 2com5ox4, ressalta-se que a simulação de 1,0 μ s foi fragmentada em quatro simulações, sendo que as três primeiras envolveram 200 ns separadamente, e a última contabilizou os 300 ns finais. Após a simulação teste do complexo 2com5ox4, realizou-se algumas análises a fim de se detectar algum evento de interesse nesse tempo de 1,0 μ s. A primeira delas foi a análise do comportamento do RMSD, visando verificar alguma alteração estrutural que representasse o evento de liberação do fármaco. A variação do RMSD em função dos *frames* encontra-se na Figura 47 a seguir.

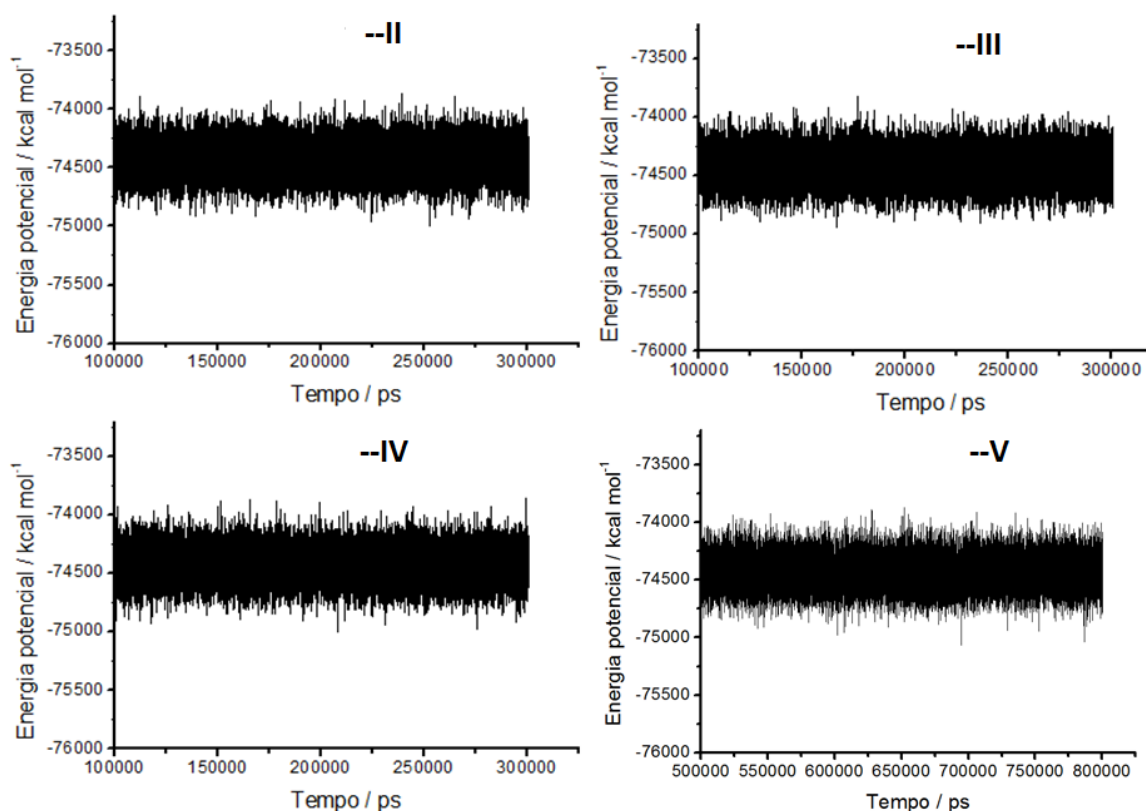
Figura 47. Variação do RMSD em função dos *frames* referentes às quatro trajetórias de simulação que somam o tempo total de 1,0 μ s de simulação do complexo 2com5ox4.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Partindo-se da ideia de que o RMSD fornece um indicativo do nível de variação estrutural de uma dada estrutura em relação à outra tomada como referência, concluiu-se que os valores consideravelmente baixos de RMSD da Figura 47 sugeriram a inexistência de uma ampla mudança estrutural no curso da simulação de 1,0 μ s. Com valores de RMSD abaixo de 1,0 Å , também se constatou que o sistema atingiu uma relativa estabilidade estrutural durante a simulação. Do ponto de vista energético, a energia potencial do sistema 2com5ox4 também foi monitorada ao longo do curso da simulação de 1,0 μ s. O comportamento da energia potencial em função do tempo da simulação de 1,0 μ s, que foi particionada em quatro simulações, está exposto na Figura 48.

Figura 48. Evolução temporal da energia potencial do complexo 2com5ox4 em solução aquosa, ao longo das quatro trajetórias de simulação que contabilizam o tempo total de 1,0 μ s de simulação.



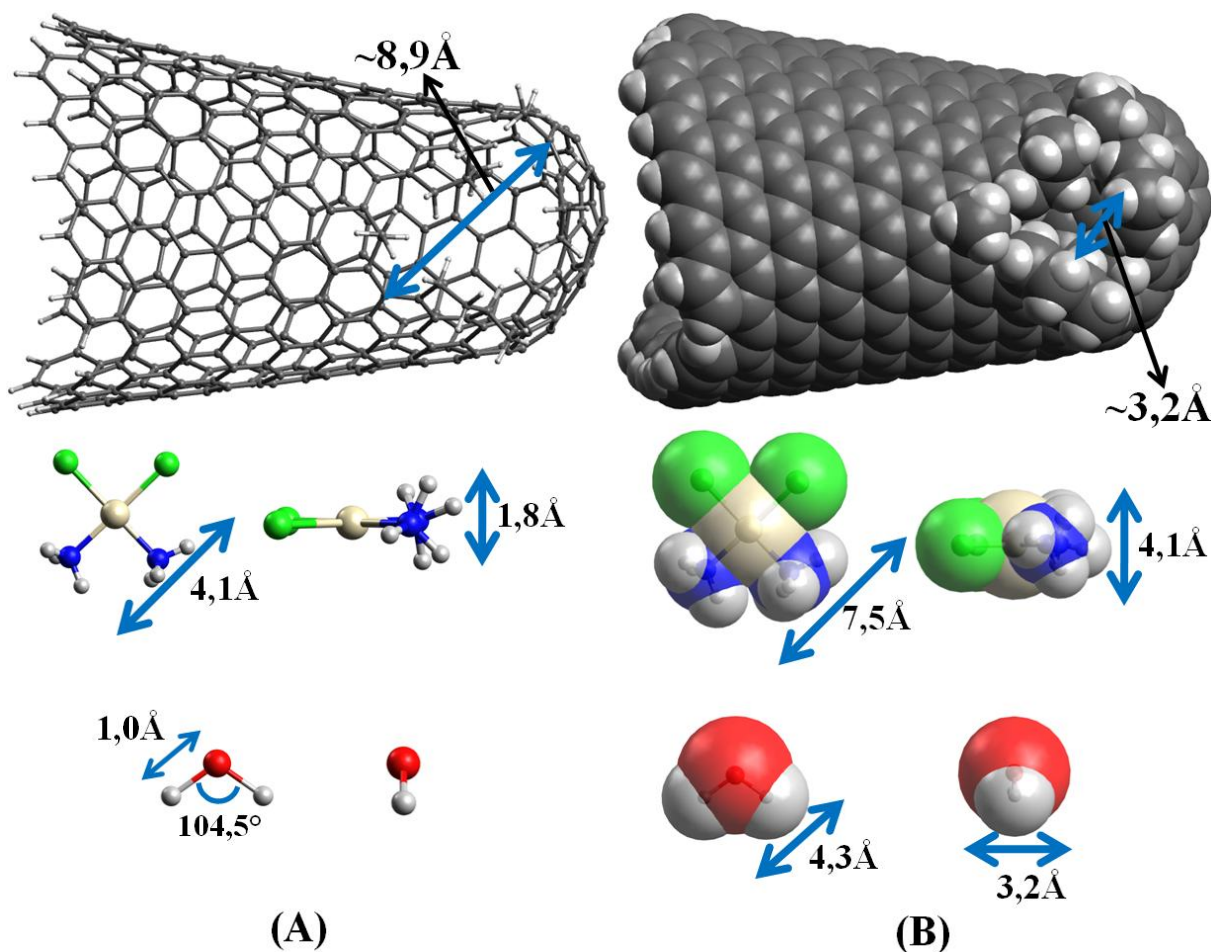
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Figura 48, foi possível notar claramente a estabilização da energia potencial do sistema ao longo de todo o tempo de simulação do complexo 2com5ox4, excluindo assim a possibilidade de um evento de liberação controlada de fármaco nessa trajetória, que

possivelmente alteraria esse perfil energético. Assim, concluiu-se que o sistema alcançou um equilíbrio energético e estrutural.

Ainda sobre a questão do confinamento da cddp no interior dos modelos de NHCh, uma última discussão envolveu a análise da estrutura molecular dos complexos cddp@NHCh utilizando as esferas de *van der Waals*, com o intuito de se investigar a não ocorrência do evento de liberação dos fármacos pelas *nanowindows* reduzidas. Para essa análise, selecionou-se o modelo de NHCh4 e a molécula de cddp para uma investigação da dimensão de suas superfícies de *van der Waals*, conforme apresentado na Figura 49.

Figura 49. Comparação das dimensões médias dos modelos de NHCh4 e das moléculas de cisplatina e água utilizando as representações *Ball and stick* (A) e *Van der Waals Spheres* (B).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com base na Figura 49, notou-se que embora o tamanho médio aproximado da *nanowindow* do NHCh4, pela representação estrutural *Ball and stick* (Figura 49A), seja

compatível com a dimensão média da molécula de cddp, nessa mesma representação, a não ocorrência do evento de translocação do fármaco por essa vacância pode ser compreendida ao se visualizar as representações das superfícies de *van der Waals* dessas duas espécies (Figura 49B). Essa última representação, que exibiu o tamanho molecular efetivo dessa *nanowindow* em torno de 3,2 Å, demonstrou claramente a incompatibilidade entre as dimensões médias da *nanowindow* do NHCh4 com a molécula de cddp e até mesmo com moléculas de água, o que impediu a ejeção da cddp confinada por essa vacância. Além do confinamento da cddp nas cavidades, as *nanowindows* geradas também impediram o fluxo de moléculas de água por essas vacância, novamente em função das dimensões incompatíveis com o tamanho efetivo das moléculas desse solvente.

Essa supressão do evento de liberação da cddp, a qual foi observada em todos os complexos do tipo cddp@NHCh, não descartou a relevância do processo de redução estudado, principalmente no que diz respeito à proteções químicas das *nanowindows* oxidadas que podem se tornar mais obstruídas, dependendo das condições do meio em que se encontra. Por fim, espera-se que o desenvolvimento de topologias de NHCox em estágios de oxidação mais avançados possa acarretar na obtenção de *nanowindows*, caracterizadas por um menor impedimento estérico, resultado esse que ainda poderá ser amenizado, em termos da diminuição dessa obstrução estrutural, com a aplicação do mecanismo de redução estudado nessa seção do trabalho

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho teve como foco o estudo do comportamento dinâmico e da estabilidade de complexos de inclusão constituídos pelo fármaco cisplatina encapsulado nas cavidades de topologias de *nanohorns* de carbono prístinos, oxidados e reduzidos, por meio de simulações por dinâmica molecular clássica em solução aquosa, visando a caracterização da potencialidade desses nanomateriais em quimioterapias do câncer.

Com relação à série de doze complexos com NHC prístinos, designados como cddp@NHC , os resultados das simulações mostraram que o ângulo de abertura do cone (θ), que é um parâmetro estrutural que caracteriza as diferentes topologias prístinas de NHC, pode modular a mobilidade do fármaco cddp , a camada interna de solvatação e as energias livre de ligação ($\Delta_b G$).

O grau de realismo dos modelos de NHC prístinos também foi incrementado a partir da elaboração de uma série de estruturas de NHC oxidados (NHCox), que foram construídas com base em um mecanismo teórico de oxidação com O_2 proposto anteriormente para NHC e NTC na presença de moléculas de água (DA SILVA Jr, et al., 2009; DE SOUZA, et al., 2017). No que tange aos complexos do tipo cddp@NHCox , os quais incluem topologias de NHCox, verificou-se que tanto a formação quanto o aumento das *nanowindows* contendo grupos funcionais polares acarretaram na diminuição sistemática da hidrofobicidade desses complexos inclusão, quando comparada com aqueles contendo NHC prístinos.

O processo de redução dos NHCox envolvendo fluxo de H_2 e temperatura de 1200°C , conforme proposto por AJIMA e colaboradores (AJIMA, et al., 2006), foi outro estudo experimental de base para a modelagem de uma série de topologias reduzidas de NHC (NHCh) partindo-se das estruturas de NHCox desenvolvidas. Nesse caso, além da redução promover uma proteção das vacâncias do ponto de vista experimental, constatou-se que o processo redução pode promover um aumento do tamanho efetivo das *nanowindows*, se comparadas com as oxidadas, por meio da eliminação dos grupos funcionais polares. Além disso, esse tratamento pós-síntese proporcionou a ampliação da área da superfície acessível ao solvente desses NHCh, resultando em uma redução da hidrofobicidade, em um nível menor do que a ocorrida com os NHCox, mas ainda superior aos NHC prístinos.

O cálculos de $\Delta_b G$ (MM-GBSA) indicaram que a formação de todos os complexos de inclusão das três séries simuladas (cddp@NHC , cddp@NHCox e cddp@NHCh) consistiu em

um processo termodinamicamente favorável e as principais contribuições foram provenientes das interações de *van der Waals* e das eletrostáticas.

No que se refere ao tempo de residência do fármaco cddp nos complexos estudados, as simulações mostraram que a metalodroga permaneceu confinada em todos os modelos de NHC, ao longo tempo total de simulação de 100 ns, inclusive até por 1,0 μ s, no caso de topologia envolvendo duas cddp encapsuladas em um NHCox. A supressão dos eventos de liberação controlada da cddp, a partir das *nanowindows* dos NHCox e NHCh, pôde ser compreendida com base na análise das superfícies de *van der Waals* desses nanomateriais de carbono que, por sua vez, demonstrou claramente uma incompatibilidade estrutural entre as dimensões médias das *nanowindows* e da molécula de cddp, o que impediu esses eventos de ejeção do fármaco.

Espera-se que os resultados desse trabalho possam preencher a lacuna de investigações teóricas relacionadas à dinâmica desses complexos de inclusão, além de fornecer subsídios e informações úteis ao campo experimental, com o intuito de contribuir para a pesquisa envolvendo o aprimoramento e compreensão dessa nanoterapia contra o câncer.

Como perspectivas, novos estudos poderiam envolver a elaboração de topologias de NHCox em estágios mais avançados de oxidação, ou seja, superiores ao grau de oxidação 4 que foi o limite da série estudada nesse trabalho. A ideia seria extrapolar esse processo, até obtenção de uma vacância com dimensões que possivelmente poderiam promover o processo de liberação controlado do fármaco cddp. A partir dessas topologias que também poderiam ser reduzidas, uma informação importante a se obter seria o perfil energético envolvido no processo de ejeção de moléculas de cddp a partir dessas novas *nanowindows* das topologias de NHC. Para isso, os potenciais de força média poderiam ser computados utilizando o método de *Umbrella Sampling* (KÄSTNER, 2011) com base em simulações por Dinâmica Molecular de Caminho Induzido (DMCI) com força modulada. Em outras palavras, esse novo método de dinâmica molecular, ao contrário do utilizado nesse presente trabalho, forçaria a ocorrência da liberação da cddp a partir dos NHC, visando, exatamente, a obtenção das barreiras de energias necessárias para a ocorrência desse evento de liberação controlada.

Outra possibilidade interessante seria o estudo da química de interação desses complexos de inclusão cddp@NHC, envolvendo NHC prístinos, oxidados e reduzidos, com modelos de membranas celulares, o que constitui um passo relevante tanto para a compreensão do comportamento desses sistemas com o organismo vivo, quanto para a

composição do conjunto de indícios em voga que caracterizam a potencialidade do emprego dos NHC nas quimioterapias do câncer, incentivando ainda mais futuras avaliações clínicas.

Em termos de produção científica desenvolvida ao longo do curso do mestrado, de 9 a 11 de novembro de 2018 houve a participação no XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais, na cidade de Juiz de Fora – MG, com a apresentação trabalho intitulado “Dinâmica molecular clássica de nanohorns de carbono: potenciais agentes carreadores de complexos antitumorais de Pt(II)” tendo como co-autor o professor Dr. Hélio Ferreira dos Santos. Além disso, parte do estudo desenvolvido resultou em um trabalho com autoria de Eduardo R. Almeida, Leonardo A. De Souza, Wagner B. De Almeida e Hélio F Dos Santos, o qual foi submetido no *Journal of Molecular Graphics and Modelling* e que encontra atualmente sob revisão.

REFERÊNCIAS

- ABU-SURRAH, A. S.; KETTUNEN, M.; Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1337-1357, 2006.
- ADAMO, C. & BARONE, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. **Journal of Physical Chemistry**, v. 110, n.13, p. 6158-6170, 1999.
- AJIMA, K.; et al. Carbon nanohorns as anticancer drug carriers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 2, n. 6, p. 475-480, 2005.
- AJIMA, K.; et al. Effect of functional groups at hole edges on cisplatin release from inside single-wall carbon nanohorns. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 11, p. 5773-5778, 2006.
- AJIMA, K.; et al. Enhancement of In Vivo Anticancer Effects of Cisplatin by Incorporation Inside Single-Wall Carbon Nanohorns. **ACS Nano**, v. 2, n. 10, p. 2057-2064, 2008.
- ALMEIDA, V. L.; et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não Específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMBOSS - **Medical Knowledge Distilled. United States** – New York, NY. Disponível em : <https://www.amboss.com/us/knowledge/Chemotherapeutic_agents>. Acessado em 22 de fevereiro de 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatments and side effects**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>>. Acessado em 26 de dezembro de 2018.
- ANAND, P.; et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.
- ARFKEN, G. B. & WEBER, H.J. **Mathematical methods for physicists**. Academic Press, 3 ed., 1985.
- BANERJEE, S.; HEMRAJ-BENNY, T.; WONG, S. S. Covalent surface chemistry of single-walled carbon nanotubes. **Advanced Materials**, v. 17, n. 1, p. 17-29, 2005.
- BASHFORD, D. & CASE, D.A. Generalized Born models macromolecular solvation effects. **Annual Review of Physical Chemistry**. v. 51, n. 1, p. 129-152, 2000.
- BATSANOV, S. S. Van der waals radius elements. **Inorganic Materials**, v. 37, n. 9, p. 871-885, 2001.

BAYLY, C. I.; et al. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 97, n. 40, p. 10269-10280, 1993.

BECKE, A. D.; Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, 1993.

BEEMAN, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. **Journal of Computational Physics**, v. 20, n. 2, p. 130-139, 1976.

BERENDSEN, H. J. C.; et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BEYDOKHTI, A. K.; HERIS, S. Z.; JAAFARI, M. R. Investigation of different methods for cisplatinloading using single-walled carbon nanotube. **Chemical engineering research and design**, v. 112, p. 56-63, 2016.

BOYS, S. F. & BERNARDI, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. **Molecular Physics**, v. 19, n. 4, p. 553-566, 1970.

BRAGA, J. P. **Fundamentos de química quântica**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2007.

BRENEMAN, C. M. & WIBERG, K. B. Determining Atom-Centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potentials. The Need for High Sampling Density in Formamide Conformational Analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 361-373, 1990.

BROOKS, B. R.; JANEŽIČ, D.; KARPLUS, M. Harmonic Analysis of Large Systems. I. Methodology. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 1522-1542, 1995.

CASE, D. A.; et al. AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.

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

CHAI, J. & GORDON, M. H. Long-range corrected hybrid density functional with damped atom-atom dispersion corrections. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 44, p. 6615-6620, 2008.

COELHO, L. W. et al. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 396-404, 1999.

DA SILVA, A. M. & DOS SANTOS, H. F. *To be published*, 2017.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.

DE SOUZA, L. A.; et al. DFT study of cisplatin@carbon nanohorns complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 129, p. 71-83, 2013.

DE SOUZA, L. A.; et al. Inclusion complexes between cisplatin and oxidized carbon nanostructures: A theoretical approach. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 178, p. 134-143, 2018.

DE SOUZA, L. A.; et al. Oxidized single-walled carbon nanotubes and nanocones: a DFT study. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, p. 1-11, 2017.

DOS SANTOS, H. F.; et al. Structure, Stability, and Infrared Spectrum of Capped Carbon Cones: A DFTB Study. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 118, n. 42, p. 24761-24768, 2014.

DUAN, X.; et al. Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 5, p. 776-791, 2016.

FRISCH, M. J.; et al. **Gaussian 09, revisão D.01.**; Gaussian, Inc.:Wallingford, CT, 2009.

GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2015.

GERBER, I.; et al. Theoretical and Experimental Studies on the Carbon-Nanotube Surface Oxidation by Nitric Acid: Interplay between Functionalization and Vacancy Enlargement. **Chemistry - a European Journal**, v. 17, n. 41, p. 11467-11477, 2011.

GUVEN, A.; et al. Cisplatin@US-tube carbon nanocapsules for enhanced chemotherapeutic delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1455-1461, 2012.

GUVEN, A.; et al. Carbon nanotube capsules enhance the in vivo efficacy of cisplatin. **Acta Biomaterialia**, v. 58, p. 466-478, 2017.

HAILE, J. M. **Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods**. 1 e.d., Wiley-Interscience, 1997.

HANSON, J. C. & NORDMAN, C.E. The crystal and molecular structure of corannulene, C₂₀H₁₀. **Acta Crystallographica**, B32, p. 1147-1153, 1976.

HANWELL, M. D., et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 17, 2012.

HARE, J. I.; et al. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: an industry perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 108, p. 25-38, 2017.

HARVEY, S. C., et al. The Flying Ice Cube: Velocity Rescaling in Molecular Dynamics Leads to Violation of Energy Equipartition. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 7, p.726-740, 1998.

HAWELEK, L.; et al. Structural modeling of Dahlia-Type single-walled carbon nanohorn aggregates by molecular dynamics. **The Journal of Physical Chemistry A**. v. 117, n. 37, p. 9057-9061, 2013.

HE, B.; et al. Single-walled carbon-nanohorns improve biocompatibility over nanotubes by triggering less protein-initiated pyroptosis and apoptosis in macrophages. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2393-2414, 2018.

HEHRE, W. L.; DITCHFIELD, R.; POPLE, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 56, n. 5, p. 2257-2261, 1972.

HESTENES, M. R. & STIEFEL, E. Methods of conjugate gradients for solving linear systems. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, v. 49, n. 6, p. 409-436, 1952.

HESS, B., et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p 435-447, 2008.

HILL, T. L. **An Introduction to Statistical Thermodynamics**. Dover Publications, 1987.

HINCHLIFFE, A. **Molecular Modelling for Beginners**. Wiley, 2 e.d., 2008.

HOMEYER, N.; GOHLKE, H. Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method. **Molecular Informatics**, v. 31, n. 2, p. 114-122, 2012.

HORNAK, V.; et al. Comparison of multiple amber force field and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**. v. 65, n. 3, p.712-725, 2006.

HUMPHREY, W.; DAKE, A.; SCHULTEN, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Modeling and Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

IJIMA, S.; et al. Nano-Aggregates of Single-Walled Graphitic Carbon Nanohorns. **Chemical Physics Letters**, v. 309, n. 3-4, p. 165-170, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Dia nacional de combate ao câncer**. Ministério da Saúde - Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>>. Acessado em 26 de fevereiro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2018 – **Incidência de Câncer no Brasil**. Ministério da Saúde – Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>. Acessado em 26 de dezembro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é o câncer? E Como se comportam as células cancerosas?** Ministério da Saúde- Rio de Janeiro. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acessado em 26 de fevereiro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tratamento do câncer.** Ministério da Saúde. Disponível em < <https://www.inca.gov.br/tratamento/quimioterapia>>. Acessado em 26 de dezembro de 2018.

JAIN, V.; JAIN, S.; MAHAJAN, S. C. Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. **Current drug delivery**, v. 12, n. 2, p. 177-191, 2015.

JAKALIAN, A.; JACK, D. B.; BAYLY, C. I. Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: II. Parameterization and Validation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 1623-1641, 2002.

JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926-935, 1983.

KAROUSIS, N.; et al. Structure, properties, functionalization, and Applications of carbon nanohorns. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 8, p. 4850-4883, 2016.

KÄSTNER, J. Umbrella Sampling. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 1, n. 6, p. 932-942, 2011.

KASUYA, D.; et al. Selective Production of Single-Wall Carbon Nanohorn Aggregates and Their Formation Mechanism. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 19, p. 4947-4951, 2002.

KUSHWAHA, S. K. S.; et al. Novel drug delivery system for anticancer drug: a review. **International Journal of PharmTech Research**, v. 4, n. 2, p. 542-553, 2012.

LAMBERTI, V. E., et al. A Hands-On Introduction to Molecular Dynamics. **Journal of Chemical Education**, v. 79, n. 5, 2002.

LAU, J. K. C. & ENSING, B. Hydrolysis of cisplatin – a first principles metadynamics study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 10348-10355, 2010.

LEE, B. & RICHARDS, F. M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 55, n. 3, p. 379-400, 1971.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G.; Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.

LEWARS, E. **Computational chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics.** Kluwer Academic Publishers, 2003.

LI, P.; MERZ Jr, K. M. Metal ion modeling using classical mechanics. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 3, p. 1564-1686, 2017.

LOPES, J. F.; et al. Theoretical study of the potential energy surface for the interaction of cisplatin and their aquated species with water. **The Journal of Chemical Physics**, v.128, n. 16, p. 16510-165117, 2008.

LOPES, J. F.; et al. Monte Carlo Simulation of Cisplatin Molecule in Aqueous Solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 24, p. 12047-12054, 2006.

LV, WL; ARNESANO F.; CARLONI, P; NATILE, G.; ROSSETTI, G. Effect of in vivo post-translational modifications of the HMGB1 protein upon binding to platinated DNA: a molecular simulation study. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 22, p. 11687-11697, 2018.

MAIA, V. R.; Protocolos de Enfermagem: Administração de Quimioterapia Antineoplásica no Tratamento de Hemopatias Malignas. **HEMORIO**, 1ed., 2010.

MANUAL DE BASES TÉCNICAS DA ONCOLOGIA, – SIA/SUS - Sistema de Informações ambulatoriais/ Sistema Único de Saúde, Oncologia. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/manual_oncologia_14edicao.pdf>. Acessado em 21 de fevereiro de 2019.

McKEAGE, M. J. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 10, n.1, p. 119-128, 2001.

MELCHIOR, A.; et al. Hydration of cisplatin studied by an effective ab initio pair potential including solute-solvent polarization. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 10, p. 4562-4573, 2013.

MEHRJOUEI, E.; et al. Delivery of Cisplatin Anti-Cancer Drug from Carbon, Boron Nitride, and Silicon Carbide Nanotubes Forced by Ag-Nanowire: A Comprehensive Molecular Dynamics Study. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 2273-2284, 2017.

MEJRI, A.; et al. Encapsulation into Carbon Nanotubes and Release of Anticancer Cisplatin Drug Molecule. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 2, p. 604-611, 2015.

MILBURN, G. H. W.; TRUTER, M. R. The Crystal Structures of cis- and trans-Dichlorodiammineplatinum(ii). **Journal of the Chemical Society A**, n. 0, p. 1609-1616, 1966.

MILLER, B. et al. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314-3321, 2012.

MIYAWAKI, J.; et al. Toxicity of single-walled carbon nanohorns. **ACS Nano**, v. 2, n. 2, p. 213-226, 2008.

MJOS, K. D. & ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014.

MØLLER, C. & PLESSET, M. S. Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems. **Physical Review**, v. 46, n. 7, p. 618-622, 1934.

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

MURAKAMI, T.; et al. Drug-loaded carbon nanohorns: absorption and release of dexamethasone in vitro. **Molecular pharmaceuticals**, v. 1, n. 6, p. 399-405, 2004.

MURATA, K.; HIRAHARA, K.; YUDASAKA, M.; IJIMA, S. Nanowindow-Induced Molecular Sieving Effect in a Single-Wall Carbon Nanohorn. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 49, p. 12668-12669, 2002.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What is cancer?** National Institutes of Health – USA.gov. Disponível em <[https://www.cancer.gov/about-cancer / understanding /what-is-cancer](https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer)>. Acessado em 26 de fevereiro de 2018.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Types of cancer treatment.** National Institutes of Health – USA.gov. Disponível em < <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> >. Acessado em 26 de fevereiro de 2018.

NEJAD, M. A.; URBASSEK, H. M. Diffusion of cisplatin molecules in silica nanopores: Molecular dynamics study of a targeted drug delivery system. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 86, p. 228-234, 2019.

NEVES, A. P. & VARGAS, M. D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

OLIVEIRA, C. R.; WERLANG, T. Ergodic hypothesis in classical statistical mechanics. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 29, n. 2, p. 189-201, 2007.

PEYRONE, M. "Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür" [On the action of ammonia on platinum chloride]. **Ann. Chem. Pharm**, v. 51, n. 1, p. 1-29, 1844.

NELSON, M. T.; et al. NAMD: a parallel, object-oriented molecular dynamics program. **International Journal of High Performance Computing Applications**, v. 10, n. 4, p. 251-268, 1996.

PORTO, A. B.; et al. Exploring the potential energy surface for reaction of SWCNT with NO₂⁺: A model reaction for oxidation of carbon nanotube in acid solution. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1088, p. 1-8, 2016.

PORTO, A. B.; et al. Oxidation of Single-Walled Carbon Nanotubes under Controlled Chemical Conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 11, p. 2387-2396, 2018.

RAPAPORT, D. C. **The Art of Molecular Dynamics Simulation**. 2 e.d., Cambridge University Press, 2004.

RINO, J. P.; STUDART, N. Um potencial de interação para o estudo de materiais e simulações por dinâmica molecular. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 838-845, 2001.

RIUL, S. & AGUILLAR, O. M. Quimioterapia antineoplásica: revisão da literatura. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 3, n. 1, p. 60-67, 1999.

ROE, D. R. & CHEATHAM III, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 7, p. 3084-3095, 2013.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.

RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p.327-341, 1977.

SAIZ, E. & TARAZONA, P. Molecular Dynamics and the Water Molecule: An Introduction to Molecular Dynamics for Physical Chemistry Students. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 11, 1997.

SCHLLTTER, J. Estimation of absolute and relative entropies of macromolecules using the covariance matrix. **Chemical Physics Letters**, v. 215,p. 617-621, 1993.

SEMINARIO, J. M. Calculation of Intramolecular Force Fields from Second-Derivative Tensors. **International Journal of Quantum Chemistry: Quantum Chemistry Symposium**, v. 60, n. 7, p. 1271-1277, 1996.

SHIMADA, M.; ITAMOCHI, H.; KIGAWA, J. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. **Cancer Management and Research**, v. 5, p. 67-76, 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Single-Walled Carbon Nanohorn Properties & Applications**. Disponível em: < <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/technology-spotlights/single-walled-carbon-nanohorns.html#references>>. Acessado em 27 de dezembro de 2018.

SILVA Jr., A. M.; JUNQUEIRA, G. M. A.; ANCONI, C. P. A.; DOS SANTOS, H. F. New Insights on Chemical Oxidation of Single-Wall Carbon Nanotubes: A Theoretical Study. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 23, p. 10079-10084, 2009.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2009.

TANAKA, M.; et al. Recommended table for the density of water between 0°C and 40°C based on recent experimental reports. **Metrologia**, v. 38, n. 4, p. 301-309, 2001.

TING, V. P.; SHMIDTMANN, M.; WILSON, C. C.; WELLER, M. T. Cisplatin: Polymorphism and Structural Insights into an Important Chemotherapeutic Drug. **Angewandte Chemie International**, v. 49, p. 9408-9411, 2010.

UBERUAGA, B. P.; ANGHEL, M.; Voter, A. F. Synchronization of trajectories in canonical molecular-dynamics simulations: Observation, explanation, and exploitation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 14, p. 6363-6374, 2004.

VARANDAS, A. J. C. **Introdução à mecânica quântica em química**. Universidade de Coimbra, 1997.

WANG, J.; et al. Development and Testing of a General Amber Force Field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.

WEISER, J.; SHENKIN, P. S.; STILL, W.C. Approximate Atomic Surfaces from Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO). **Journal Computational Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 217-230, 1999.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Guide to cancer early diagnosis**. Geneva: World Health Organization, Institutional Repository for Information Sharing. Disponível em <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/254500>>. Acessado em 22 de fevereiro de 2018.

WU, G. & LI, B. Thermal rectifiers from deformed carbon nanohorns. **Journal of Physics: Condensed Matter**. v. 20, n. 17, p. 175211-175214, 2008.

YESYLEVSKYY, S.; et al. Empirical force field for cisplatin based on quantum dynamics data: case study of new parameterization scheme for coordination compounds. **Journal of Molecular Modeling**. v. 21, n. 10, p. 268-277, 2015.

ZHANG, M.; et al. Biodegradation of carbon nanohorns in macrophage cells. **Nanoscale**, v. 7, n. 7, p. 2834-2840, 2015.

ZHAO, Y. & TRULAR, D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functional. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 120, n. 1-3, p. 215-241, 2008.

ZHENG, S.; et al. VFFDT: A New Software for Preparing AMBER Force Field Parameters for Metal-Containing Molecular Systems. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 4, p. 811-818, 2016.

A. APÊNDICE – FORMALISMO TEÓRICO

Nesse trabalho, a dinâmica molecular foi o método clássico central empregado para o estudo do comportamento dinâmico dos complexos de inclusão cddp@NHC , cddp@NHCox e cddp@NHCh , bem como de suas espécies individuais (cddp , NHC , NHCox e NHCh) em solução aquosa. Os detalhes gerais e específicos de uma simulação por dinâmica molecular serão abordados nas seções a seguir.

A.1 DINÂMICA MOLECULAR

Baseada nos fundamentos da mecânica clássica e da mecânica analítica, consolidadas por grandes nomes como Newton, Euler, Lagrange e Hamilton, a dinâmica molecular (DM) consiste em um método computacional que possibilita a análise da evolução temporal do conjunto de partículas que compõem um determinado sistema, em um dado estado físico, por meio do procedimento de integração numérica das equações do movimento (RAPAPORT, 2004). Essa análise está centrada no pensamento determinístico que constitui a essência da mecânica clássica. Nessa linha, a DM parte da ideia de que a determinação das condições iniciais de um sistema, caracterizadas por parâmetros dinâmicos em um dado instante, e das forças de interação entre as entidades, possibilita a obtenção da história dinâmica do sistema, i.e, posições e momentos de todas as partículas, que são perfeitamente localizáveis, por meio das equações da mecânica clássica e analítica (HAILE, 1997).

Fisicamente, o método da DM envolve o tratamento de um problema clássico de N corpos. Nessa perspectiva, considerando um sistema constituído por N partículas de massas m_1, m_2, \dots, m_N se movimentando no espaço tridimensional. A posição de cada partícula em um dado instante de tempo pode ser definida completamente pelas respectivas coordenadas $r_1(t), r_2(t), \dots, r_N(t)$ que são denominadas coordenadas generalizadas. O espaço definido por essas partículas localizáveis é conhecido como espaço de fases (VARANDAS, 1997). Em mecânica clássica, essa construção matemática expressa o estado dinâmico de cada partícula de um sistema. Assim, o objetivo central de uma simulação por DM é computar uma trajetória, isto é, um conjunto de coordenadas generalizadas, no espaço de fases.

O modelo clássico em que se aplica a DM trata os átomos de um sistema molecular, iônico ou de outra natureza, como um conjunto de esferas conectadas por forças de interação que são os potenciais de interação (NAMBA, *et al.*, 2008). Assim, considerando um sistema isolado, o que conseqüentemente indica que a energia total E se conserva, com um dado

número N de átomos em um volume V fixo. Na interpretação newtoniana da DM, o movimento translacional de um átomo i desse sistema é acarretado por uma força F_i resultante de algum agente externo. Fisicamente, essa força se correlaciona com o movimento com base na segunda lei de Newton (HAILE, 1997):

$$F_i(t) = m\ddot{r}_i(t) \quad (1)$$

Onde no contexto da DM, F_i refere-se à força no átomo i devido aos $N - 1$ átomos do sistema, m é massa atômica e \ddot{r}_i consiste em uma notação para a derivada segunda da posição com relação ao tempo que, por sua vez, corresponde à aceleração $a_i(t)$ do átomo i :

$$\ddot{r}_i(t) = \frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2} = a_i(t) \quad (2)$$

Considerando apenas forças conservativas entre os átomos que compõem o sistema considerado, a força F_i da Equação 1 pode ser escrita como o negativo do gradiente de uma função potencial $V(r)$, logo:

$$F_i(t) = m\ddot{r}_i(t) = -\frac{\partial V(r^N)}{\partial r_i} \quad (3)$$

Nessa última equação, o termo r^N engloba o conjunto das coordenadas atômicas de todos átomos do sistema, isto é, $r^N = \{r_1, r_2, r_3, \dots, r_N\}$. O procedimento de resolução numérica da Equação 3 representa a essência de uma simulação por DM puramente newtoniana.

Diante da Equação 3, pode-se notar que a determinação explícita das posições (r^N) dos átomos do sistema considerado, conjunto esse designado como a trajetória do sistema atômico, envolve o conhecimento da função de energia potencial $V(r)$ que rege o sistema, a qual será discutida em detalhes na próxima subseção.

A.1.1 Superfície de energia potencial

O termo $V(r)$ apresentado na Equação 3 é conhecido como a superfície de energia potencial ou o campo de forças do sistema de partículas. Em um sistema molecular, essa função multidimensional descreve a energia de uma molécula em termos de suas posições nucleares, isto é, de seus átomos (COELHO, *et al.*, 1999). Nessa perspectiva, cada ponto na

superfície de energia potencial compreende um conjunto de núcleos que estão submetidos aos potenciais de interação característicos da molécula em questão, constituindo assim uma específica estrutura molecular.

Do ponto de vista matemático, a superfície de energia potencial constitui um gráfico que estabelece a relação entre a energia potencial da molécula (E_p) e os parâmetros referentes à geometria da molécula (q). Por exemplo, no caso da molécula H_2O classificada com simetria C_{2v} , têm-se dois parâmetros geométricos que variam (q_1 e q_2) no tempo, logo a superfície potencial consiste em um gráfico de E_p (energia) *versus* q_1 referente ao comprimento da ligação O-H e q_2 referente ao ângulo da ligação H-O-H. Consequentemente, esse gráfico seria representado em um espaço tridimensional (E , q_1 e q_2). Em vista disso, pode-se perceber que essa superfície se torna cada vez mais complexa com o aumento do tamanho da molécula, uma vez que maior será o número de parâmetros geométricos do sistema que podem sofrer variações ao longo do tempo (LEWARS, 2003).

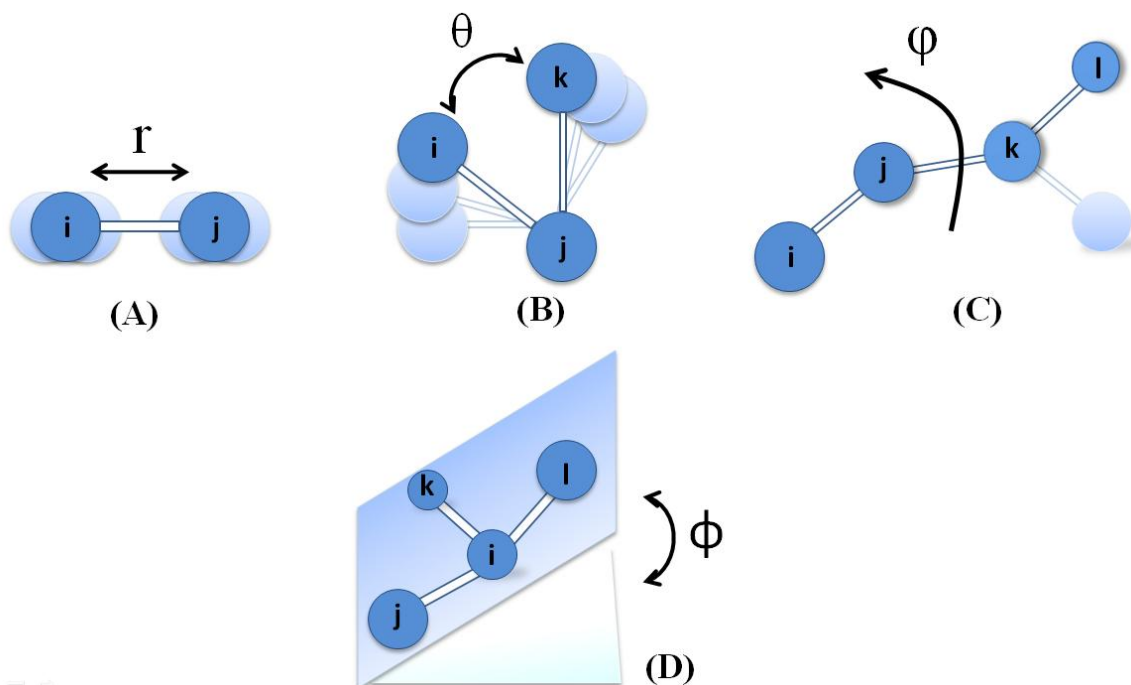
No presente trabalho, as forças F_i (ver Equação 3) atuando nos sistemas foram representadas por campo de forças construídos com base no modelo de potenciais de pares aditivos. Nesse modelo, a função de energia potencial $V(r)$ é escrita como uma soma de potenciais de interação entre os átomos ligados, constituindo os potenciais intramoleculares (V_{intra}), e entre átomos não-ligados, que compõem os potenciais intermoleculares (V_{inter}):

$$V(r) = \sum V_{intra}(r) + \sum V_{inter}(r) \quad (4)$$

Enquanto os potenciais intramoleculares (V_{intra}) descrevem as variações de energia potencial relacionadas com o comprimento de ligações (V^{lig}), deformação angular (V^{ang}) e a rotação diedral própria (V^{die}) e imprópria (V^{imp}), movimentos esses esquematizados na Figura A.1, os potenciais intermoleculares modelam as interações de curto e longo alcance como as interações de *van der Waals* (V^{vdW}) e as eletrostáticas (V^{elec}). Dessa forma, a Equação 4 é expandida nos seguintes termos:

$$V(r) = \sum_b V^{lig} + \sum_\theta V^{ang} + \sum_\varphi V^{die} + \sum_\emptyset V^{imp} + \sum_{i<j} V^{vdW} + \sum_{i<j} V^{elec} \quad (5)$$

Figura A.1. Movimentos modelados pelos potenciais intramoleculares: (A) Comprimento de ligação, (B) deformação angular, (C) Deformação diedral e (D) Deformação de diedros impróprios.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O modelo mais simples para se descrever a ligação entre dois átomos em uma molécula envolve a consideração desse sistema como um oscilador harmônico, o qual é regido pela lei de Hooke que estabelece que a força da ligação seja contrária e diretamente proporcional ao deslocamento dos corpos (átomos da molécula diatômica). Assim, o potencial $V(x)$ associado a essa força é um função quadrática cuja forma analítica é (LEWARS, 2003):

$$V(x) = \frac{1}{2}k(x - x_0)^2 \quad (6)$$

Onde k é a constante de força da ligação, x_0 é a posição de equilíbrio que corresponde ao comprimento de ligação e x é o deslocamento fora da posição de equilíbrio. O potencial harmônico é uma boa aproximação para descrever deslocamentos próximos a posição de equilíbrio dos átomos que constituem a ligação. Na forma analítica do campo de força $V(r)$ apresentado na Equação 5, que inclusive foi empregado nesse trabalho, os potenciais de interação V^{lig} , V^{ang} e V^{imp} foram construídos com base na aproximação harmônica, logo eles possuem as seguintes expressões:

$$V^{lig}(r) = \frac{1}{2}k_b(r - r_{eq})^2 \quad (7)$$

$$V^{ang}(\theta) = \frac{1}{2}k_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 \quad (8)$$

$$V^{imp}(\phi) = \frac{1}{2}k_{imp}(\phi - \phi_{eq})^2 \quad (9)$$

Na Equação 7, k_b é a constante de força de estiramento ($\text{kcal mol}^{-1} \text{Å}^{-2}$), r é um dado valor de distância de ligação fora da posição de equilíbrio (Å) e r_{eq} é o comprimento de ligação na posição de equilíbrio (Å). Já na Equação 8, k_θ é a constante de força de deformação angular ($\text{kcal mol}^{-1} \text{rad}^{-2}$), θ é um dado valor de ângulo de ligação fora da posição de equilíbrio (radianos) e θ_{eq} é o valor de equilíbrio do ângulo de ligação (radianos). Na Equação 9, k_{imp} é a constante de força da torção imprópria (kcal mol^{-1}), ϕ é um dado valor de ângulo fora posição de equilíbrio entre os dois planos que definem o diedro impróprio (radianos) e ϕ_{eq} corresponde ao valor do ângulo de equilíbrio entre os dois planos definidos (radianos).

Com relação ao potencial que descreve a rotação diedral própria V^{die} , a sua forma analítica assume uma função periódica envolvendo uma soma de cossenos (COELHO, *et al.*, 1999):

$$V^{die}(\varphi) = \frac{1}{2}k_\varphi[1 + \cos(n\varphi - \gamma)] \quad (10)$$

Onde o termo k_φ se relaciona com a barreira de energia associada ao movimento de torção (kcal mol^{-1}), n é a periodicidade da rotação, isto é, o número de ciclos em 360° , φ é o ângulo de torção (radianos) e γ é o ângulo de fase (radianos) no qual o potencial atinge o seu valor mínimo (NAMBA, *et al.*, 2008). Uma vez que o termo n pode assumir valores inteiros que, em geral, não excedem o valor 3, a componente torsional (V^{die}) é usualmente escrita como uma expansão da série de Fourier:

$$V^{die}(\varphi) = \sum \left[\frac{1}{2}V_1(1 + \cos \varphi) + \frac{1}{2}V_2(1 + 2 \cos \varphi) + \frac{1}{2}V_3(1 + 3 \cos \varphi) + \dots \right] \quad (11)$$

Onde os parâmetros V_1 , V_2 e V_3 , que se conectam a barreira de torção, são obtidos por

meio de procedimentos de ajustes com dados experimentais (COELHO, *et al.*, 1999).

No que tange aos potenciais intermoleculares da Equação 5, o primeiro termo se refere às interações de *van der Waals* (V^{vdW}) que usualmente podem ser modeladas pelo potencial de *Lennard-Jones* (Equação 12), e o segundo termo descreve as interações eletrostáticas de longo alcance (V^{elec}) que podem ser representadas pelo potencial de *Coulomb* (Equação 13).

$$V^{vdW} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (12)$$

$$V^{elec} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (13)$$

Enquanto na Equação 12, ϵ_{ij} é profundidade do poço de potencial para a interação entre os átomos não-ligados i e j (kcal \AA^6 / mol), σ_{ij} é a distância entre os átomos não-ligados i e j onde o potencial se anula (\AA), na Equação 13, q_i e q_j são as cargas pontuais dos átomos i e j (unidades atômicas), ϵ é a constante dielétrica ($\text{C V}^{-1} \text{m}^{-1}$). Em ambas as Equações 12 e 13, o termo r_{ij} consiste na distância que separa os átomos não-ligados i e j (\AA). Computacionalmente, o potencial de Lennard-Jones (LJ) é implementado nos campos de força com a seguinte forma analítica (NAMBA, *et al.*, 2008):

$$V^{vdW} = \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{A_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (14)$$

Nesse novo formato do potencial de LJ apresentado na Equação 14, os parâmetros “ B_{ij} ” e “ A_{ij} ” englobam os parâmetros da forma original do potencial, “ ϵ_{ij} ” e “ σ_{ij} ”, por meio das relações onde $B_{ij} = 4\epsilon_{ij}\sigma_{ij}^{12}$ e $A_{ij} = 4\epsilon_{ij}\sigma_{ij}^6$.

Com a definição das formas analíticas dos potenciais de interação intramoleculares e intermoleculares, o campo de forças $V(r)$ para um sistema molecular, expresso inicialmente na Equação 5, assume o seguinte formato geral:

$$\begin{aligned}
V(r) = & \sum_b \frac{1}{2} k_b (r - r_{eq})^2 + \sum_\theta \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\
& + \sum_\varphi \frac{1}{2} k_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_\emptyset \frac{1}{2} k_{imp} (\emptyset - \emptyset_{eq})^2 \\
& + \sum_{i < j}^{\text{átomos}} \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{A_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{i < j}^{\text{átomos}} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right)
\end{aligned} \tag{15}$$

Vale ressaltar que a escolha dos potenciais de interação desempenha um papel fundamental na modelagem de um sistema, pois esta etapa define a precisão da superfície de energia potencial possibilitando a obtenção de resultados mais acurados e em melhor concordância com a realidade experimental (NAMBA, *et al.*, 2008).

Nessa perspectiva, um passo importante em uma simulação por DM consiste na determinação explícita dos parâmetros que compõem a superfície de energia potencial apresentada na Equação 15, como por exemplo, k_b , k_θ , k_φ , k_{imp} , r_{eq} , θ_{eq} , φ , \emptyset , r_{ij} , B_{ij} , A_{ij} e q_i . O conjunto de procedimentos envolvidos na obtenção desses parâmetros é conhecido como parametrização de campos de força. Os métodos de parametrização podem envolver, por exemplo, procedimentos de ajuste de funções analíticas com dados experimentais provenientes de técnicas espectroscópicas, e por meio de cálculos mecânico-quânticos englobando métodos *ab-initio* e semiempíricos.

Nesse momento, de posse do conceito e da forma analítica do campo de força $V(r)$, torna-se possível a compreensão do algoritmo de uma simulação por DM puramente newtoniana que será o tema da próxima subseção.

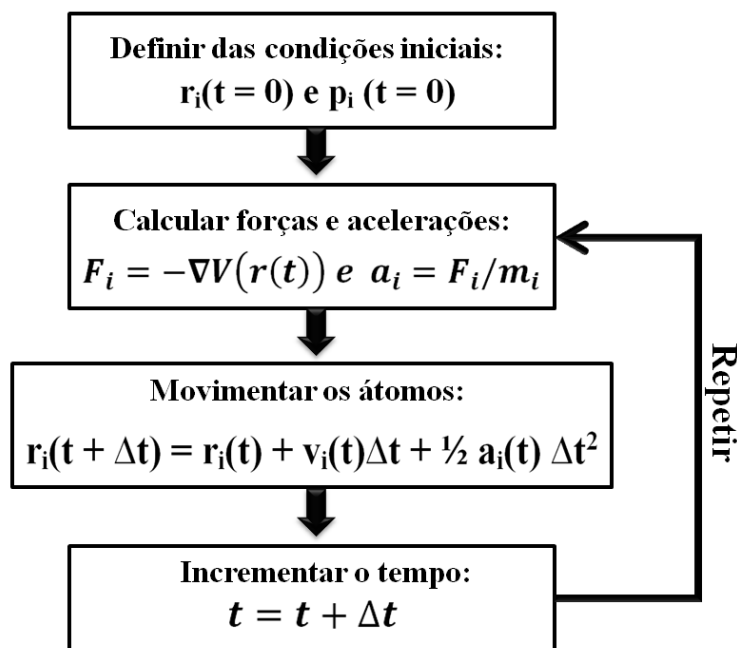
7.1.2 Dinâmica molecular clássica

A definição de campo de força $V(r)$, discutida ao longo da subseção anterior, é um dos elementos fundamentais para a resolução das equações clássicas do movimento, como a indicada na Equação 3, a qual constitui o cerne do método da DM clássica. Sob essa ótica, de posse da superfície de energia potencial molecular $V(r)$ pode-se calcular as forças F_i que agem sobre as partículas e, conseqüentemente as suas respectivas acelerações a_i ; e por meio do procedimento de integração das equações do movimento, obtêm as velocidades e posições em

função do tempo, permitindo assim a obtenção da trajetória do sistema (NAMBA, *et al.*, 2008).

A equação clássica do movimento representada na Equação 3 consiste em um conjunto de $3N$ equações diferenciais de segunda ordem em coordenadas cartesianas (x,y,z) (SAIZ & TARAZONA, 1997). Entretanto, para um sistema molecular constituído por um número N de partículas, que usualmente são átomos esféricos no contexto da DM, essas equações do movimento não possuem soluções analíticas, requerendo assim, a utilização de métodos numéricos de integração. O emprego de um procedimento de resolução numérica é necessário tanto em função do fato do movimento das partículas serem acoplados, caracterizando assim um problema de muitos corpos, quanto devido à sensibilidade de trajetórias atômicas frente a pequenas perturbações (RAPAPORT, 2004; SAIZ & TARAZONA, 1997). Em face disso, a DM se consolida como um método computacional cujos principais detalhes de seu algoritmo base serão discutidos a seguir, seguindo o fluxograma apresentado na Figura A.2.

Figura A.2 Etapas principais de um algoritmo de simulação por dinâmica molecular clássica.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como mostrado na Figura A.2, o primeiro passo em um simulação por DM envolve o estabelecimento das condições iniciais que são parâmetros dinâmicos, como as coordenadas atômicas (r_i) e os momentos lineares (p_i) iniciais do sistema ($t = 0$). No que se referem às coordenadas atômicas, as configurações nucleares, em uma estrutura molecular, podem ser

obtidas tanto empiricamente, a partir de técnicas espectroscópicas como, por exemplo, a difração de raios-X e a ressonância magnética nuclear, quanto teoricamente por meio de programas de modelagem molecular como o Avogadro[®] (HANWELL, *et al.*, 2012). Além disso, coordenadas atômicas também podem ser encontradas em bancos de dados como *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN, *et al.*, 2000). Outro parâmetro dinâmico a se definir nas condições iniciais são as velocidades dos átomos que, no fluxograma da Figura A.2, estão representadas pelos momentos lineares p_i ($p_i = m_i v_i$). Em geral, os valores das velocidades atômicas são atribuídos aleatoriamente utilizando, por exemplo, sementes aleatórias ou a distribuição de Maxwell-Boltzmann (CASE, *et al.*, 2012). Ainda nessa etapa de definição das condições iniciais, a caixa de simulação, onde as partículas permanecem restritas, também é definida, podendo assumir diferentes geometrias como a cúbica, esférica, octaédrica truncada, ortorrômbica (NAMBA, *et al.*, 2008).

Definidas as condições iniciais, o próximo passo na simulação por DM, (Figura A.2) envolve a determinação das forças que atuam sobre o sistema molecular, cujo cálculo é derivado do negativo do gradiente (∇ na Equação 16) da função de energia potencial molecular, isto é, do campo de forças do sistema, cuja forma foi discutida na subseção anterior. Vale ressaltar que o gradiente de uma função $f(x,y,z)$ genérica é definido como (BRAGA, 2007):

$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial x} \vec{i} + \frac{\partial f}{\partial y} \vec{j} + \frac{\partial f}{\partial z} \vec{k} \quad (16)$$

Após a obtenção das forças atuando sobre cada átomo do sistema e, conseqüentemente, das acelerações de cada partícula, a próxima etapa na simulação envolve a integração numérica das equações clássicas do movimento. Usualmente, os algoritmos de integração são baseados em métodos de diferenças finitas, onde o tempo total da simulação é discretizado em intervalos de tempo Δt (*time step*), de tal modo que partir de um conjunto de condições iniciais pode-se obter uma solução incremental no tempo. Em outras palavras, de posse de parâmetros como as posições e as velocidades em um tempo t , o método permite computar as respectivas posições e velocidades em um tempo $t + \Delta t$ (LAMBERTI, *et al.*, 2002; NAMBA, *et al.*, 2008). Nesse contexto, existe uma série de algoritmos de integração numérica de equações diferenciais como, por exemplo, o algoritmo de *Verlet* (HAILE, 1997), o algoritmo de *Beeman* (BEEMAN, 1976) e os algoritmos do tipo *Runge Kutta* (HAILE,

1997). Nesse trabalho, o *software* empregado para as simulações por DM utiliza o algoritmo *Leapfrog* (HINCHLIFFE, 2003), cujos detalhes serão descritos a seguir.

No algoritmo do método *Leapfrog*, a aceleração de uma partícula é substituída por uma função escada (*stair function*) a qual é construída a partir da divisão do intervalo de integração Δt (*time step*) em metades ($\Delta t/2$), e do pressuposto de que o valor da aceleração permanece constante no intervalo de $t - \Delta t/2$ a $t + \Delta t/2$ (SAIZ & TARAZONA, 1997). Além disso, as próximas velocidades são estimadas fazendo-se uma expansão de Taylor em torno de função das velocidades $v_i(t)$:

$$v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i(t) + \left(\frac{dv_i}{dt}\right)_t \frac{\Delta t}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2 v_i}{dt^2}\right)_t \left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2 + \dots \quad (17)$$

$$v_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i(t) - \left(\frac{dv_i}{dt}\right)_t \frac{\Delta t}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2 v_i}{dt^2}\right)_t \left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2 + \dots \quad (18)$$

A equação de atualização de velocidades pode ser obtida subtraindo e depois rearranjando as Equações 17 e 18, cujas séries foram truncadas até os termos de segunda ordem:

$$v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \Delta t a_i(t) \quad (19)$$

No algoritmo *Leapfrog*, essas velocidades em $t + \Delta t/2$ são utilizadas para o cálculo das posições das partículas em $t + \Delta t$. Seguindo o mesmo procedimento com uma expansão de Taylor para as coordenadas $r(t)$ em $t + \Delta t/2$, temos a expressão para as novas posições (HINCHLIFFE, 2003):

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t + \dots \quad (20)$$

Usualmente o fator de integração Δt empregado em simulações por DM é da ordem de um a dois femtossegundos (10^{-15} s). As equações (19) e (20) constituem a base do algoritmo *Leapfrog*, que recebe esse nome exatamente em função da não simultaneidade no cálculo das posições e velocidades.

Seguindo um procedimento iterativo, as equações (19) e (20) são resolvidas passo a passo até o tempo total definido para a simulação permitindo assim, a obtenção da trajetória no espaço de fases do sistema molecular, isto é, do conjunto de coordenadas e velocidades em função do tempo. Essas trajetórias, por sua vez, podem ser analisadas a fim de se investigar a evolução e estabilidade do sistema no tempo. Entretanto, não é possível obter propriedades macroscópicas do sistema, como a pressão P e a temperatura T , com base nessas trajetórias, uma vez que essas propriedades não pertencem a moléculas individuais, mas sim a um dado conjunto de moléculas. Nessa perspectiva, simulações por DM que possibilitam o cálculo de propriedades macroscópicas levam em consideração um conceito chave na termodinâmica estatística e que será o tema da próxima subseção – o *ensemble*. Cabe enfatizar que a simulação por DM descrita até o momento é dita “puramente newtoniana” exatamente pelo fato dela envolver apenas o procedimento de integração das equações do movimento, sem a possibilidade da extração de propriedades macroscópicas.

A.1.3 *Ensembles*

O cálculo de propriedades macroscópicas a partir de um sistema molecular remete a um grande impasse na termodinâmica, surgido em meados do século XIX, que deu origem à termodinâmica estatística: como tratar sistemas reais, sendo que o número total de partículas é da ordem do número de Avogadro (10^{23} partículas)? Cálculos nesse sentido são impraticáveis tanto quanticamente como classicamente (HILL, 1987).

Foi então que Josiah Willard Gibbs, associado com os trabalhos de Ludwig Boltzmann e James Clerk Maxwell, introduziu o Método do *Ensemble* com a distribuição canônica que trouxe a função de partição canônica. Em linhas gerais, esse método conecta o tempo médio desejado para uma propriedade mecânica de interesse com o *ensemble* médio dessa mesma propriedade, sendo que a validade dessa ideia é ratificada pelo acordo entre experimento e teoria (deduções).

Especificamente, o *ensemble* é uma coleção (mental) ou um conjunto de um número η grande de sistemas, que consistem em réplicas do sistema termodinâmico a partir do qual as propriedades estão sendo investigadas. Embora os sistemas (réplicas) que compõem o *ensemble* sejam idênticos de um ponto de vista termodinâmico, o mesmo não ocorre em uma perspectiva molecular. Isso decorre exatamente do fato de que cada uma das η réplicas do *ensemble* ainda é compartimentalizada em uma série de estados quânticos. Essa característica

expressa a conexão da Mecânica Quântica aos fundamentos da Termodinâmica Estatística. A título de exemplo, para o cálculo da pressão P na termodinâmica estatística, o valor calculado seria, em geral, diferente nos N estados quânticos em que se encontram as η réplicas do *ensemble*. No entanto, o *ensemble* médio da pressão é a média ao longo desses valores instantâneos de P , com o mesmo peso para cada sistema η do *ensemble* (HILL, 1987).

O método de *ensemble* de Gibbs é baseado em dois postulados citados em detalhes no livro de HILL, 1987:

1º Postulado:

A média temporal (em um longo tempo) de uma variável mecânica M em um sistema termodinâmico de interesse é igual ao ensemble médio de M no limite com $\eta \rightarrow \infty$, dado que os sistemas do ensemble replicam o estado termodinâmico e o ambiente do real sistema de interesse.

2º Postulado:

Em um ensemble ($\eta \rightarrow \infty$) representativo de um sistema termodinâmico isolado, as réplicas (sistemas) do ensemble são distribuídas uniformemente, ou seja, com igual probabilidade ou frequência, ao longo dos estados quânticos consistentes com os valores especificados de N , V e E .

Em outras palavras, os postulados indicam que a aproximação no *ensemble* $\eta \rightarrow \infty$ possibilita a simulação do sistema real em equilíbrio. A partir disso, define-se a chamada “Hipótese Ergódica”, que consiste princípio central na mecânica estatística (OLIVEIRA & WERLANG, 2007). No contexto ergódico, o valor médio de uma dada propriedade macroscópica $f(r^N, p^N)$ envolve o *ensemble* estatístico definido por uma função de densidade de estados $\rho(r^N, p^N)$:

$$\langle f \rangle = \frac{\int f(r^N, p^N) \rho(r^N, p^N) d^3 r^N d^3 p^N}{\int \rho(r^N, p^N) d^3 r^N d^3 p^N} \quad (21)$$

$$\langle f \rangle = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_0^{\tau} f(t) dt \quad (22)$$

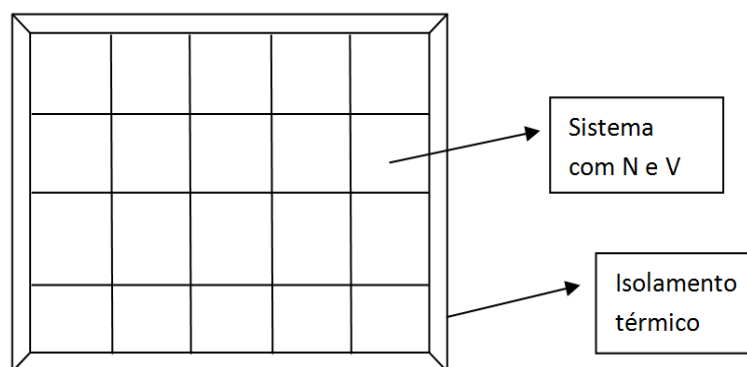
Nesse sentido, as propriedades macroscópicas de interesse em uma simulação por DM podem ser calculadas como médias temporais das trajetórias (RINO & STUDART, 2001).

Existem várias classes de *ensembles* como o canônico (NVT), o microcanônico (NVE) e o isobárico-isotérmico (NPT) cuja seleção depende das características do sistema termodinâmico a ser modelado. A título de exemplo, o *ensemble* canônico e o microcanônico serão descritos a seguir.

***Ensemble* canônico (NVT)**

O sistema modelado por esse *ensemble* tem um volume V fixo, um número fixo N de partículas (podendo ser $N_1, N_2 \dots$ para o caso de multicomponentes) e está imerso em um grande banho térmico na temperatura T . O fato do banho térmico ser grande está em consonância com o limite de réplicas $\eta \rightarrow \infty$ sugerido no 1º postulado. Como o sistema não é isolado, o contato com o banho térmico possibilita a flutuação da energia E , logo os estados quânticos pertencentes a diferentes níveis de energia E deverão ser levados em conta. Ressalta-se que as variáveis mecânicas têm valores bem definidos em um dado estado quântico. Nesse sentido, a próxima tarefa se resume em determinar a fração de sistemas em um dado estado quântico. O tratamento inicial desse *ensemble* pode ser baseado em um protótipo experimental, como mostrado na Figura A.3 (HILL, 1987).

Figura A.3 *Ensemble* canônico com η réplicas, cada uma com N partículas e volume V .



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com base no sistema da Figura A.3, pode-se imaginar η sistemas macroscópicos como aqueles do *ensemble*, cada um com N e V empilhados em uma rede. As paredes entre diferentes sistemas (réplicas) no *ensemble* são condutoras de calor e impermeáveis a todas as

moléculas (matéria). Todos esses sistemas estão imersos em um grande banho térmico em uma T. Após o equilíbrio ser atingido, o isolamento térmico é definido nas paredes externas do *ensemble* e esse é removido do banho. Todo o *ensemble* passa a ser agora um sistema isolado com volume ηV , número de moléculas ηN e energia total E_T . Como agora o *ensemble* é um sistema isolado, podemos aplicar o 2º postulado para todo o *ensemble*. Esse novo sistema caracterizado pelas variáveis ηV , ηN e E_T será denominado supersistema. Todos os possíveis estados quânticos são igualmente prováveis. Assim, escolhendo um único sistema do *ensemble* canônico e levando-se em consideração apenas dos estados estacionários, define-se n como o número de sistemas encontrados em um dado estado energético. Por exemplo, n_1 é o número de sistemas encontrados no estado E_1 . Dessa forma, uma das muitas distribuições possíveis é o conjunto de n_1, n_2, n_3, \dots , logo (HILL, 1987):

$$\sum_j n_j = \eta \quad (23)$$

$$\sum_j n_j E_j = E_T \quad (24)$$

O número de estados $\Omega_T(n)$ de um supersistema é dado pela seguinte fórmula combinatória:

$$\Omega_T(n) = \frac{(n_1 + n_2 + \dots)!}{n_1! n_2! \dots} = \frac{\eta!}{\prod_j n_j!} \quad (25)$$

A probabilidade P de um estado E_j é dada pela distribuição de Boltzmann: $P_j = n_j/\eta$, logo o *ensemble* médio de uma propriedade x é dado por:

$$\bar{p} = \sum_j P_j p_j \quad (26)$$

Agora estamos prontos para calcular as propriedades termodinâmicas de um sistema fechado e isotérmico modelado pelo *ensemble* canônico (NVT), de tal modo que a probabilidade P_j de um sistema ser encontrado em um particular estado de energia E_j é:

$$P_j(N, V, T) = \frac{e^{-E_j(N, V)/KT}}{Q(N, V, T)} \quad (27)$$

Na Equação 27, o parâmetro K é a constante de Boltzmann e termo Q é a função de partição do *ensemble* canônico que possui o seguinte formato:

$$Q(N, V, T) = \sum_j e^{-E_j(N, V)/KT} \quad (28)$$

Para representar a degenerescência no nível $E_i(N, V)$, a Equação 28 recebe o termo $\Omega_i(N, V)$:

$$Q(N, V, T) = \sum_j \Omega_j(N, V) e^{-E_j(N, V)/KT} \quad (29)$$

***Ensemble* microcanônico (NVE)**

Esse *ensemble* trata um sistema isolado com uma dada E , V e N (caso tenha mais de um componente teremos N_1, N_2, \dots). Como o nome sugere, o *ensemble* microcanônico é um *ensemble* canônico degenerado onde todos os sistemas possuem a mesma energia. Assim, partindo do *ensemble* canônico, podemos imaginar que selecionando apenas as réplicas com nível de energia E , depois impondo um isolamento térmico sobre elas e removendo-as dos demais sistemas no *ensemble* canônico, obtemos esse *ensemble* microcanônico, onde cada sistema é restrito a ter apenas um valor E de energia. Ou seja, os únicos estados quânticos acessíveis são aqueles com energia E (HILL, 1987).

No *ensemble* microcanônico, a entropia S é a função termodinâmica característica para as variáveis N , V e E :

$$S = k \ln \Omega \quad (30)$$

Onde $\Omega(N, V, E)$ é a degenerescência do nível de energia E .

Novamente, a fração de sistemas P_j em um dado estado quântico (energia E) é proporcional ao fator de Boltzmann $e^{-E/kT}$, mas como a E é a mesma para todos os estados quânticos, P_j também é igual. Assim:

$$\sum_j P_j = 1$$

$$P_j = 1/\Omega$$
(31)

Consequentemente, a expressão da entropia (Equação 30) passa a ser escrita como:

$$S(N, V, E) = -k \sum_j P_j \ln P_j = -k \Omega \left(\frac{1}{\Omega} \ln \frac{1}{\Omega} \right) = k \ln \Omega(N, V, E)$$
(32)

Essa relação de S será utilizada para derivar todas as funções termodinâmicas de interesse desse *ensemble* (HILL, 1987).

Por fim, ressalta-se que nesse trabalho empregou-se o *ensemble* canônico (NVT) e o *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT), visto que a maior parte dos experimentos é conduzida em condições de número de partículas N , pressão P e temperatura T constantes.

A.1.4 Etapas da simulação por dinâmica molecular

Por meio da implementação de *ensembles* em algoritmos de DM, torna-se possível a simulação de sistemas moleculares em diferentes condições de temperatura e pressão, bem como a extração de propriedades macroscópicas como, por exemplo, a entalpia (H), a energia livre de Gibbs (G), o potencial químico (μ), capacidade calorífica (c), entre outras. Essa classe de DM tem uma grande aplicação em termos de simulações de sistemas biológicos e materiais (NAMBA, *et al.*, 2008; RINO & STUDART, 2001).

De um modo geral, essas simulações por DM envolvem quatro etapas que serão discutidas a seguir: a minimização, o aquecimento, a equilibração e a produção.

A.1.4.1 Minimização

Em geral, antes de iniciar uma simulação por DM propriamente dita, realiza-se uma etapa preliminar de minimização de energia do sistema, a qual possibilita uma relaxação do sistema como um todo, visando a eliminação de interações instáveis, como as distorções em ligações e ângulos e a sobreposição de átomos (NAMBA, *et al.* 2008). O procedimento de minimização de energia é realizado por algoritmos de otimização, como o algoritmo *Steepest Descent* e o Método dos Gradientes Conjugados que foram empregados pelo *software* utilizado nesse trabalho (AMBER12[®]).

No que se refere ao algoritmo *Steepest Descent*, a derivada primeira é empregada para se localizar o mínimo. Assim, a convergência é lenta e pode ficar presa em mínimos locais. Dadas as coordenadas iniciais, o passo seguinte do algoritmo é dado por:

$$\vec{r}_{i,n+1} = \vec{r}_{i,n} + \Delta\vec{r}_{i,n} \quad (33)$$

Onde r_i é a posição do n -ésimo átomo e $\Delta\vec{r}_{i,n}$ é o incremento do átomo i . O passo ou incremento é dado na direção e sentido da força resultante sobre este átomo.

$$\Delta\vec{r}_{i,n} = K_n \frac{\vec{F}_{i,n}}{|\vec{F}_{i,n}|} \quad (34)$$

Onde $\vec{F}_{i,n}$ é a força resultante no átomo i , podendo ser calculada pelo gradiente do potencial

$$\vec{F}_{i,n} = -\nabla V_{ri,n} \quad (35)$$

Na Equação 34, o termo $\frac{\vec{F}_{i,n}}{|\vec{F}_{i,n}|}$ é o vetor diretor e K_n é o parâmetro de ajuste do tamanho do passo do algoritmo. Computacionalmente, o algoritmo funciona da seguinte forma:

Se $V_{n,ri} < V_{n-1,ri}$, então ele aumenta o próximo passo $K_{n+1} = n * K_n$, se não, $K_{n+1} = K/2$.

Em cada passo do algoritmo verifica-se a diferença entre os valores de $V_{n,ri}$ e $V_{n-1,ri}$. Quando essa diferença for menor do que um fator de convergência estipulado, o algoritmo é terminado (NAMBA, *et al.* 2008).

Um método de otimização mais eficiente e refinado do que o *Steepest Descent* é o Método dos Gradientes Conjugados, no qual o passo seguinte é dado em função do gradiente anterior e do gradiente no ponto atual. O primeiro passo nesse algoritmo é equivalente ao referente no *Steepest Descent*, mas a busca é aplicada em uma linha constituída pela mistura do atual negativo do gradiente com a direção da pesquisa anterior.

$$d_i = -g_i + \beta_i d_{i-1} \quad (36)$$

Existem várias formas de escolher o termo β_i associadas a métodos como Fletcher-Reeves, Polak-Ribiere (PR). De um modo geral, o Método dos Gradientes Conjugados se destaca pelas características de convergência superiores ao *Steepest Descent*

A.1.4.2 Aquecimento e equilíbrio

Após a minimização, a próxima etapa na simulação envolve a introdução artificial do sistema em um “banho térmico” com o intuito de elevar a temperatura do sistema até um valor de interesse. No caso dos sistemas simulados nesse trabalho, o aquecimento foi realizado de 0 a 310 K, a fim de se atingir essa temperatura média do meio fisiológico onde o sistema real está imerso. Cabe ressaltar que esse passo é importante, por exemplo, no caso de uma estrutura catalogada no pdb, a qual se baseia na temperatura de cristalização da biomolécula. Durante essa etapa de aquecimento, as velocidades atômicas são re-escaladas a cada passo de integração, visando ajustar a energia cinética do sistema até a temperatura definida de interesse (NAMBA, *et al.* 2008). No presente trabalho, o aquecimento foi conduzido com base no *ensemble* canônico (NVT). E cada passo, o *ensemble* é construído, as propriedades são calculadas e assim se prossegue para os demais passos até atingir a T de interesse.

Depois das etapas de minimização de energia e aquecimento do sistema, a próxima etapa da simulação, conhecida como equilíbrio, envolve estabilização das propriedades do sistema como a temperatura T, a pressão P, a energia E e a densidade ρ até valores desejáveis,

reduzindo possíveis instabilidades. As etapas de equilibração dos sistemas simulados nesse trabalho levaram em consideração o *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT).

Ambas as etapas de aquecimento e equilibração são conduzidas com base em algoritmos de controle de temperatura e de pressão, que serão brevemente discutidos a seguir:

Controle de Temperatura

Na ótica da termodinâmica estatística, a temperatura de um sistema está intimamente relacionada com a energia cinética média das partículas e, conseqüentemente, com a velocidade média das entidades do sistema molecular pela relação:

$$\bar{E}_{cin} = G \frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle \quad (37)$$

Na Equação 37, que envolve o princípio da equipartição de energia, G é o número de graus de liberdade, k_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), m é a massa da partícula e $\langle v^2 \rangle$ é o valor médio da velocidade denominada velocidade quadrática média. Entretanto, durante a etapa de aquecimento, o aumento da energia cinética na simulação, faz com que a temperatura do sistema aumente em um nível que possa acarretar em instabilidades como, por exemplo, flutuações drásticas na energia total do sistema e até mesmo em erros numéricos. Para evitar esses problemas, realiza-se um controle da temperatura por meio de algoritmos acoplamento de temperatura, denominados termostatos, que, em linhas gerais, acoplam o sistema simulado a um banho térmico em uma temperatura fixa T_0 (RAPAPORT, 2004). Os termostatos de Berendsen e o de Andersen são exemplos de métodos de escalonamento de velocidades (HARVEY, *et al.*, 1998).

Nos termostatos em geral, as equações clássicas do movimento são modificadas, obtendo uma relação entre temperatura T e a temperatura de referência T_0 do sistema, como mostra a equação a seguir:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \tau_T^{-1} [T_0 - T(t)] \quad (38)$$

Onde o parâmetro τ_T é o tempo de relaxação característico, o qual é responsável pela transmissão de energia entre o banho e o sistema. Além disso, o controle da temperatura pode

ser implementado por meio de uma modificação nas velocidades das partículas que, usualmente, é conduzida por fator de correção $\lambda(t)$:

$$\lambda(t) = \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left[\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right] \right]^{1/2} \quad (39)$$

Controle de pressão

Assim como a temperatura, a pressão P é outro parâmetro que deve ser controlado durante a simulação a fim de se alcançar o valor de interesse e reduzir, na medida do possível, amplas flutuações ao longo da simulação. O controle da P é realizado na etapa da equilibração, na qual se utiliza o *ensemble* NPT, *ensemble* isobárico-isotérmico, para possibilitar a relaxação/equilibração da densidade do solvente. Nesse caso, o volume da caixa de simulação é ajustado, em pequenas quantidades de passo a passo para fazer com que a pressão computada se aproxime da pressão alvo (CASE, *et al.*, 2012). Nesse trabalho, a pressão de referência foi de 1 bar ($\approx 0,987$ atm).

Nas simulações por DM, o controle da pressão é realizado por algoritmos conhecidos como barostatos como, por exemplo, o algoritmo de Berendsen (BERENDSEN, *et al.*, 1984). Assim como nos termostatos, os barostatos modificam as equações de movimento para obter a pressão de relaxamento P , por meio de uma aproximação de primeira ordem próximo ao valor de referência P_0 :

$$\frac{dP(t)}{dt} = \tau_P^{-1} [P_0 - P(t)] \quad (40)$$

Pela termodinâmica, a pressão pode ser definida utilizando a relação com o virial $W(t)$:

$$P(t) = \frac{2 E_{cin}(t) - W(t)}{3 V(t)} \quad (41)$$

Onde $V(t)$ é o volume da caixa de simulação e o coeficiente do virial $W(t)$ do sistema é dado por:

$$W(t) = -\frac{1}{2} \sum_{\alpha < \beta}^N R_{\alpha\beta}(t) F_{\alpha\beta}(t) \quad (42)$$

Nessa última equação, o termo $R_{\alpha\beta}$ representa a distância entre os centros de massa das moléculas α e β em um dado instante t , e $F_{\alpha\beta}$ é a força sobre o centro de massa da molécula α sobre a molécula β .

Se nos termostatos, o sistema é acoplado a um banho térmico e o controle da temperatura envolve um escalonamento das velocidades, nos barostatos, o sistema é acoplado a um banho de pressão constante, de tal modo que esse acoplamento envolve um escalonamento das coordenadas atômicas e do o tamanho da caixa de simulação por um fator de escala de pressão μ :

$$\mu(t) = \left[1 - K_T \frac{\Delta t}{\tau_P} [P_0 - P(t)] \right]^{1/3} \quad (43)$$

Onde τ_P é o tempo de relaxamento da P , K_T é com a compressibilidade, P_0 é a pressão de referência e Δt é o passo de integração (BERENDSEN, *et al.*, 1984).

A.1.4.3 Produção e análises

Na fase final da simulação por DM, o sistema em questão, que está otimizado e equilibrado na temperatura e pressão de interesse, será simulado por um tempo que é da ordem da ocorrência do evento a ser analisado. É com base na trajetória dessa etapa que o sistema será analisado. Uma vez que as trajetórias de uma simulação consistem em um conjunto de estruturas (*frames*), as grandezas macroscópicas são extraídas como medias temporais seguindo a ideia do método dos *ensembles* (RINO & STUDART, 2001). Além do cálculo de propriedades termodinâmicas como, por exemplo, a temperatura (T), pressão (P), volume (V), densidade (ρ), energia cinética (E_{cin}), energia potencial (E_{pot}), entropia (S), propriedades estruturais como o desvio quadrático médio RMSD (*root-mean-squared deviation*) e as funções de distribuição radial RDF (*radial distribution functions*) também podem ser avaliadas. Uma vez que o presente trabalho envolveu a análise de RMSD e RDF dos sistemas estudados, os conceitos gerais dessas análises serão discutidos a seguir.

RMSD – Desvio Quadrático Médio

O desvio quadrático médio (RMSD) é uma medida do desvio médio das coordenadas de uma estrutura em relação às coordenadas de uma estrutura de referência. Matematicamente, o RMSD é definido como:

$$RMSD(t) = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [r_i(t) - r_i(0)]^2 \right]^{1/2} \quad (44)$$

Onde N é o número de átomos do domínio considerado, $r_i(t)$ é a posição do átomo i no instante t e $r_i(0)$ é a posição inicial do átomo i . Nesse sentido, um $RMSD = 0$ indicaria uma sobreposição perfeita, isto é, uma variação estrutural nula (NAMBA, *et al.* 2008). O RMSD pode ser calculado tanto em momentos intermediários na trajetória de uma simulação, permitindo a comparação das conformações nos respectivos momentos (eventos), como em função de todos os *frames* da trajetória, possibilitando uma verificação da oscilação estrutural média do sistema molecular ao longo do tempo total de simulação.

RDF – Função de distribuição radial

A função de distribuição espacial (RDF), também denominada função de correlação de pares, descreve a organização espacial das moléculas em torno de uma molécula central. Em outras palavras, a RDF fornece uma assinatura da estrutura do ambiente molecular, seja ele no estado sólido, líquido ou gasoso. Matematicamente, essa função expressa a probabilidade de se encontrar uma determinada partícula A em uma camada esférica dr , a uma determinada distância r da partícula B (HAILE, 1997). O esquema de uma RDF está ilustrado na Figura A.4.

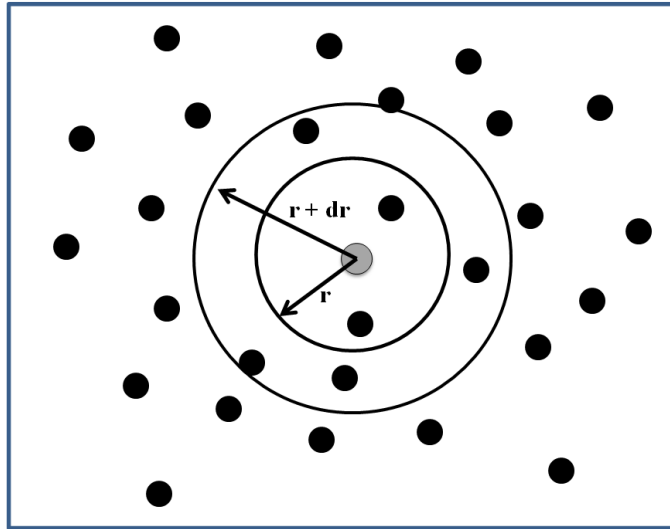
As correlações entre as duas partículas α e β (ou partículas em cinza e em preto na Figura A.4) são definidas pela seguinte relação:

$$\langle n_{\alpha\beta}(r) \rangle \Delta r = 4\pi r^2 \rho c_{\beta} g_{\alpha\beta}(r) \quad (45)$$

Onde o termo $\langle n_{\alpha\beta}(r) \rangle \Delta r$ refere-se ao número de partículas da espécie β contidas em uma casca esférica entre r e $r + \Delta r$ em torno da partícula de referência α . A notação “ $\langle \dots \rangle$ ”

remete tanto à média do *ensemble*, quanto à média das partículas β . Em vista disso, $g_{\alpha\beta}(r)$ indica a probabilidade de se encontrar uma partícula da espécie β a uma distância r de uma partícula α (RINO & STUDART, 2001).

Figura A.4. Esquema da definição de uma função de distribuição radial (RDF).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ainda sobre a Equação 45, a densidade (ρ) também pode ser definida de tal modo que $\rho = N/\Omega$, onde $N = N_{\alpha} + N_{\beta}$, e c_{β} é a concentração de partículas β sendo que $c_{\beta} = N_{\beta}/N$ e Ω é o volume do sistema. Com base nisso, a RDF $g(r)$ é dada por:

$$g(r) = \sum_{\alpha\beta} c_{\alpha}c_{\beta}g_{\alpha\beta}(r) \quad (46)$$

O número de partículas β contido em uma camada, também denominado de número de coordenação $C_{\alpha\beta}(r)$ das camadas de solvatação, é obtido por meio da integração da RDF (RINO & STUDART, 2001):

$$C_{\alpha\beta}(r) = 4\pi\rho \int_0^r g_{\alpha\beta}(x)x^2 dx \quad (47)$$

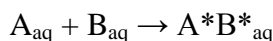
Quando $g(r) = 1$, pode-se concluir que não existe uma correlação entre as duas partículas, o que significa que uma delas não exerce uma influência uma sobre a outra.

Além de ser derivada das simulações por DM como um valor médio ao longo das trajetórias, as RDF podem ser extraídas de experimentos de raios-X , difração de nêutrons e espalhamento de luz de suspensões coloidais (HAILE, 1997).

A.2 METODOLOGIA MM-GBSA

Outra análise relevante que pode ser conduzida, com base nas trajetórias de simulações por DM, refere-se ao cálculo das energias livre de ligação ($\Delta_b G$) que permitem a estimativa de afinidades de ligação e estabilidades relativas entre sistemas (HOMEYER & GOHLKE, 2012). Os métodos da mecânica molecular MM-PBSA (*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*) e MM-GBSA (*Molecular Mechanics Generalized-Born Surface Area*) são abordagens populares para o cálculo de energia livre de ligação entre ligantes pequenos em macromoléculas biológicas (GENHEDEN & RYDE, 2015). Uma vez que o método MM-GBSA foi empregado no presente trabalho, uma discussão dos aspectos principais desse método será conduzida a seguir.

O objetivo central desses métodos envolve o tratamento energético da associação entre duas moléculas A e B em solução:



Onde A_{aq} refere-se à estrutura da molécula A livre em solução, B_{aq} refere-se à estrutura da molécula B livre em solução e $A^*B^*_{aq}$ indica o complexo formado a partir das moléculas A e B, levando em consideração tanto as variações estruturais dessas moléculas (A^* e B^*), quanto a reorganização do solvente (aq^*) que pode ocorrer no processo de formação do complexo (CASE, *et al.*, 2012).

Especificamente, a energia livre de ligação para uma associação não-covalente de duas moléculas, como a mostrada anteriormente, pode ser escrita como:

$$\Delta_b G_{solvatado} = G_{AB,solvatado} - G_{A,solvatado} - G_{B,solvatado} \quad (48)$$

A energia livre de uma molécula genérica X pode ser decomposta em uma contribuição proveniente do soluto e outra do solvente:

$$G(X) = G^{soluta}(X) + G^{solvente}(X) \quad (49)$$

Por sua vez, a contribuição da energia livre do soluto ($G^{soluta}(X)$) pode ser expressa em termos da entalpia H e da entropia S, pela relação termodinâmica $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$:

$$G^{soluta}(X) = H(X) - TS(X) \quad (50)$$

Como a entalpia H é definida como $H = U + PV$:

$$G^{soluta}(X) = U(X) + PV(X) - TS(X) \quad (51)$$

Onde U é a energia interna do sistema, P é a pressão e V é o volume. Negligenciando as variações nos volumes ao longo do processo $A + B \rightarrow AB$, temos:

$$G^{soluta}(X) = U(X) - TS(X) \quad (52)$$

A energia interna, por sua vez, pode ser escrita como uma energia mecânico-molecular média extraída do campo de forças definido para o sistema molecular:

$$U(X) = \langle E(X) \rangle = \langle E_{intra} + E_{inter} \rangle \quad (53)$$

Para os sistemas simulados nesse trabalho, a energia intramolecular (E_{intra}) envolve a contribuição energética das ligações (E_{lig}), ângulos (E_{ang}) e torções próprias (E_{die}) e impróprias (E_{imp}):

$$E_{intra} = E_{lig} + E_{ang} + E_{die} + E_{imp} \quad (54)$$

Na Equação 53, a energia intermolecular envolve a soma da energia das interações de *van der Waals* (E_{vdW}), com o potencial de LJ, e eletrostáticas (E_{ele}) pelo potencial coulombiano.

$$E_{inter} = E_{vdW} + E_{ele} \quad (55)$$

As formas funcionais de cada uma das componentes energéticas das Equações 54 e 55 foram apresentadas na Equação 15. Cabe ressaltar que o termo $\langle E(X) \rangle$ da Equação 53 é calculado como um valor médio das energias ao longo dos frames (estruturas) que compõem a trajetória da simulação. Matematicamente, temos que (CASE, *et al.*, 2012):

$$\langle E(X) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1, N} E(X_i) \quad (56)$$

A entropia $S^{\text{soluto}}(X)$, a qual é incluída no último termo $-T\Delta S(X)$ da Equação 52, é decomposta em uma soma de contribuições entrópicas resultantes dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais (MILLER, *et al.*, 2012):

$$S(X) = S_{\text{trans}} + S_{\text{rot}} + S_{\text{vib}} \quad (57)$$

Na Equação 57, as entropias S_{trans} e S_{rot} são calculadas a partir da função de partição Q do ensemble considerado na simulação. A título de exemplo, no caso da função de partição do gás ideal, temos, pela termodinâmica estatística:

$$S_o = k \ln Q - \left(\frac{\partial \ln Q}{\partial k_B T} \right)_v \quad (58)$$

$$Q_{\text{trans}} = \frac{V}{h(k_B T / 2\pi m)^{3/2}} \quad (59)$$

$$Q_{\text{rot}} = \left(\frac{\pi^{1/2}}{\sigma} \right) \left(\frac{1}{hck_B T} \right)^{3/2} \left(\frac{1}{I_A I_B I_C} \right)^{1/2} \quad (60)$$

Nas Equações 58, 59 e 60, V é o volume, h é a constante de Planck, k_b é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, m é a massa molecular, σ é o número de simetria, c é a velocidade da luz e I_x são as três constantes rotacionais inerciais.

Ainda sobre a Equação 57, S_{vib} é a contribuição entrópica do movimento vibracional do sistema, cujo cálculo depende da determinação das frequências vibracionais do sistema molecular que, por sua vez, podem ser derivadas a partir de dois métodos: análise de modos

normais ou pela abordagem quase-harmônica (MILLER, *et al.*, 2012). No presente trabalho, a entropia vibracional foi estimada baseando-se na aproximação quase-harmônica (SCHLLTTER, 1993; BROOKS, *et al.*, 1995) por meio da avaliação da matriz covariância de 3N coordenadas e, finalmente, da função de partição vibracional (Q_{vib}):

$$S_{vib} = \sum_{i=1}^{3N-6} \left[\frac{h\nu_i}{K_B T (e^{h\nu_i/K_B T} - 1)} - \ln \left(1 - e^{-h\nu_i/K_B T} \right) \right] \quad (61)$$

Retornando na Equação 49, a outra componente da energia livre é referente à contribuição do solvente $G^{solvente}(X)$, sendo também conhecida como energia livre de solvatação:

$$G^{solvente}(X) = G_{polar}^{solvente} + G_{npolar}^{solvente} \quad (62)$$

Onde G_{polar} é a contribuição polar ou eletrostática para a energia livre de solvatação, e G_{npolar} é contribuição não-polar ou não-eletrostática para a energia livre de solvatação. A G_{polar} pode ser obtida pelo modelo de solvatação implícita GB (*Generalized-Born*). A forma analítica da contribuição polar para a energia livre de solvatação utilizando o modelo GB é:

$$\Delta G_{polar}^{solvente} \approx \Delta G_{GB} = -\frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{f_{GB}(r_{ij}, \alpha_i, \alpha_j)} \left(1 - \frac{e^{-\kappa f_{GB,ij}}}{\epsilon_w} \right) \quad (63)$$

Onde r_{ij} é a distância entre os átomos i e j e α_i e α_j correspondem aos respectivos raios efetivos de Born dos átomos do sistema, f_{GB} é uma *smooth function*:

$$f_{GB} = \left[r_{ij}^2 + \alpha_i \alpha_j \exp \left(\frac{-r_{ij}^2}{4\alpha_i \alpha_j} \right) \right]^{1/2} \quad (64)$$

Onde o raio efetivo de Born (α_i) é definido como:

$$\alpha_i^{-1} = \tilde{\rho}_i^{-1} - \rho_i^{-1} \tanh(\alpha\Psi - \beta\Psi^2 + \gamma\Psi^3) \quad (65)$$

Na Equação 65, $\tilde{\rho}_i^{-1} = \rho_i - 0,09\text{\AA}$, $\Psi = I\tilde{\rho}_i$ e I é definido como:

$$I = \frac{1}{4\pi} \int_{vdW} \theta(|r| - \tilde{\rho}_i) \frac{1}{r^4} d^3r \quad (66)$$

Onde α , β e γ são parâmetros adimensionais ajustados com os seguintes valores implementados no AMBER12[®]: $\alpha = 0,8$, $\beta = 0$ e $\gamma = 2,91$.

No que se refere à contribuição não-eletrostática para a energia livre de solvatação (G_{npolar}) da Equação 62, temos:

$$G_{npolar}^{solvente}(X) = \gamma SASA(X) + b \quad (67)$$

Onde γ é a tensão superficial ($\gamma = 0,0072$ para o modelo de solvatação implícita GB no AMBER12[®]), $SASA(X)$ é a área da superfície acessível ao solvente da molécula X (soluto), a qual é determinada pelo algoritmo LCPO (WEISER, *et al.*, 1999), e b é um valor parametrizado para o modelo GB ($b = 0$ no AMBER12[®]).

Por fim, cabe ressaltar que os cálculos MM-GBSA são conduzidos em *ensembles* conformacionais derivados de simulações por DM. Assim as energias são médias ao longo das contribuições energéticas de todas as conformações na trajetória (HOMEYER & GOHLKE, 2012).