



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

RICARDO GOBATO

BENZOCAÍNA, UM ESTUDO COMPUTACIONAL

LONDRINA – PR

2008

RICARDO GOBATO

BENZOCAÍNA, UM ESTUDO COMPUTACIONAL

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Física, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Simões Filho.

LONDRINA – PR

2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G574b Gobato, Ricardo.

Benzocaína, um estudo computacional / Ricardo Gobato. –
Londrina, 2008.

172f. : il.

Orientador: Manuel Simões Filho.

Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação
em Física, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Biofísica – Teses. 2. Anestésicos – Teses. 3. Dinâmica molecular – Teses.
I. Simões Filho, Manuel. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de

RICARDO GOBATO

BENZOCAÍNA, UM ESTUDO COMPUTACIONAL

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Física, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Simões Filho.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. André Tsutomu Ota
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Manuel Simões Filho
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Kleber Carlos Mundim
Universidade de Brasília

Londrina, _____ de _____ de 2008.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores que participaram direta ou indiretamente nesta jornada.

Ao pessoal da Secretaria da Física e da pós-graduação do CCE que sempre me atenderam muito bem.

Aos meus colegas de mestrado e doutorado, Marcelo Hidalgo (em especial), Márcio Daldin, Leonardo Marques, Daniel Ferreira, Ademar de Oliveira, Ricardo Mendes, João Lucas, Paulo José, Rafael Elias, Marcelo Pagoro, Cristiane, Kleber, Marilena, Rômulo, André Naves, Elder, Luciana, Paulo Rogério, Rodrigo, dentre outros.

Aos meus colegas de mestrado e doutorado da UFRJ, Pitta, Reinaldo, Rafael Bernardi (em especial, Obrigado), Diego, Cubano, e outros.

Ao professor Dr. Pedro Geraldo Pascutti, por me receber em seu laboratório na UFRJ e aceitar participar desta banca.

Ao professor Dr. Kleber Carlos Mundim, Muito Obrigado.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Eduardo Di Mauro, meu Muito Obrigado.

Agradeço muito em especial aos professores Dr. André Tsutomu Ota e Dr. Manuel Simões Filho, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, meu Muito Obrigado.

A CAPES pela ajuda financeira.

Obrigado a todos.

DEUS,

Muito Obrigado.

A meus filhos Alekssander e Desire, e minha esposa Márcia.

GOBATO, Ricardo. **Benzocaína, um estudo computacional**. 2008. 172 p. Dissertação (Mestrado em Física), Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

RESUMO

Hoje em dia os anestésicos locais são fármacos muito utilizados, entre os quais a benzocaína. Seu ingrediente ativo se encontra no mercado em diversas pomadas e cremes. A ação dos anestésicos locais foi testada amplamente, e a hipótese a do receptor de Hille, indica que os anestésicos locais agem principalmente pela inibição do influxo do íon Na^+ . A forma catiônica do anestésico se liga dentro do canal ou bloqueia este, interrompendo o influxo. Em geral, o pKa de um anestésico local varia entre 7,5 e 9,0. Isto implica que em condições fisiológicas, o anestésico local terá a forma neutra e ionizada. A benzocaína tem um pKa aproximado de 2,5, portanto, em condições fisiológicas apresenta somente a forma neutra. Compreender a ação de um anestésico local que apresenta somente a forma neutra, a benzocaína, é nosso objetivo. O estudo partiu da simulação computacional da dinâmica molecular da benzocaína, utilizando a Teoria do Funcional da Densidade, seguido do cálculo clássico, a Mecânica Molecular, onde foram parametrizados os campos de forças, para o estudo da dinâmica molecular em solução aquosa e meio fisiológico. Os resultados indicam que a benzocaína forma agregados, induzindo um aumento de sua hidrofobicidade, o que provavelmente permite sua ação com maior intensidade, não necessitando a forma protonada para penetração em meio à membrana celular.

Palavras-chave: anestésicos locais, agregados, benzocaína, dinâmica molecular, modelagem molecular.

GOBATO, Ricardo. **Benzocaine, a study computational**. 2008. 172 p. Dissertação (Mestrado em Física), Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

ABSTRACT

Nowadays the local anesthetics drugs are widely used, including benzocaine a local anesthetic of topic use. Its active ingredient is on the market in various ointments and creams. The action of local anesthetics was tested extensively, and one of the assumptions of the Hille's receptor modulator, indicates that the local anesthetics acts primarily by the inhibition of ion Na^+ influx. The shape of cationic anesthetic binds within the channel or blocks it, stopping the influx. In general, the pKa of a local anesthetic varies between 7.5 and 9.0. This implies that in physiological conditions, the local anesthetic will be neutral and cationic. The Benzocaine has approximately pKa 2.5. This means that it a present only the neutral form. To Understand is the action of local anesthetics that presents only the neutral form, benzocaine, it is our goal. The study started the computer simulation of the molecular dynamics of benzocaine, using the Density Functional Theory, obtain positions and charges of the benzocaine that were used to parameterize the Molecular Mechanics Force Fields. The force field so parameterized were used the in aqueous solutions and physiological environments of the benzocaine. The results indicate that benzocaine molecules form clusters, inducing an increase of its hydrophobicity, which probably allows your action with greater intensity, not needing the cationic form.

Key-words: Benzocaine, Clusters, Local Anesthetics, Molecular Dynamics, Molecular Modeling.

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

Figura I1	Estrutura da benzocaína (BZC).....	21
Figura I2	Estrutura da benzocaína, com deslocamento de cargas.....	24
Figura M1	Campo de reação de Onsager	26
Figura M2	Posição da molécula de BZC frente à membrana de DPPC	29
Figura M3	A base dupla Zeta	49
Figura P1	Representação dos potenciais	70
Figura H1	Representação da ligação de hidrogênio	74
Figura G1	RDF e a capa de hidratação.....	77
Figura G2	g_rdf no Gromacs.....	80
Figura C1	Estrutura da BZC obtida através do cálculo quântico.....	83
Figura C2	Estrutura da BZC para entrada no Gromacs	83
Figura C3	Estrutura da BZC com cargas, obtidas do cálculo quântico	86
Figura C3a	Estrutura tridimensional da BZC.....	86
Figura C4	Gráfico das cargas dos grupos amina, anel, éster e etil.....	87
Figura C5	Gráfico das cargas dos átomos ou pequenos grupos da BZC ..	88
Figura RI1	Gráfico da função de distribuição radial g(r) pela distância de 1 (uma) molécula de BZC com solvente água.....	91
Figura RI1a	Gráfico da distância mínima provável de 1 (uma) molécula de BZC em relação à solução aquosa.....	92
Figura R2	Gráfico da função de distribuição radial g(r) pela distância do terminal NH2 com solvente água.....	93
Figura R3	Gráfico da função de distribuição radial g(r) pela distância do Anel aromático com a água.....	94

Figura R4	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do grupo O5_C4_O3 com a água.....	95
Figura R5	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do terminal -CH2-CH3, etil, com o solvente água.....	96
Figura R6	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do terminal -CH3 com a parte do oxigênio da água	97
Figura R7	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do grupo -CH2 com a parte do Oxigênio da água	98
Figura R8	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do átomo C6 com a água	99
Figura R9	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do átomo C9 com o solvente água	100
Figura R10	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do nitrogênio N10, do terminal amina com os (H_w^*), hidrogênios da água	101
Figura R11	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância dos hidrogênios, H11 e H12 do terminal amina com os oxigênios (O_w) do solvente água	102
Figura R12	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do oxigênio, O5 do grupo éster com os hidrogênios (H_w^*) do solvente água	103
Figura R13	Gráfico da distância mínima do átomo de oxigênio, O5 com os hidrogênios (H_w^*) da solução aquosa.....	104
Figura R14	Gráfico da distância mínima dos átomos de hidrogênio, H11 e H12 com os oxigênios (O_w) da solução aquosa	105

Figura R15	Gráfico do número médio de possíveis ligações de hidrogênio com 1 (uma) molécula de BZC em solução aquosa.....	106
Figura R16	Gráfico do número médio de possíveis ligações de hidrogênio do grupo O5-C4-O3 em solução aquosa.....	107
Figura R17	Gráfico do número médio de possíveis ligações de hidrogênio do terminal NH2 em solução aquosa.....	108
Figura RC0	Gráfico da MD de todas as BZCs de 1 a 27 e a formação dos agregados.....	115
Figura RC1	Gráfico da distância (nm) entre cada BZC, na MD de 16, em relação às outras 15 BZCs em função do tempo (ps)	116
Figura RC2	Gráfico da distância (nm) entre cada BZC, na MD de 18, em relação às outras 17 BZCs em função do tempo (ps)	117
Figura RC3	Gráfico da distância (nm) entre cada BZC, na MD de 22, em relação às outras 21 BZCs em função do tempo (ps)	118
Figura RC4	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada BZC no agregado de 20 moléculas com a água.....	118
Figura RC5	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada agregado de moléculas de BZC, nas simulações de 1 a 20 moléculas de BZC com o solvente água	120
Figura RC5a	Figura RC-5 com apenas uma aproximação “zoom”, para facilitar a visualização das $g(r)$ dos agregados.....	121
Figura RC5b	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada agregado de moléculas de BZC com 1 a 29 moléculas e 40 moléculas de BZC	122
Figura RC6	Gráfico do valor médio de $g(r)$ a uma distância de 0.4 nm das	

	moléculas em simulação, isto é, $g(r)$ para cada uma das MD com 1 a 29 moléculas e 40 moléculas de BZC.....	123
Figura RC7	Gráfico da distância (nm) entre cada BZC, na MD de 20, em relação às outras 19 BZCs em função do tempo (ps)	124
Figura RC8	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância do oxigênio O5, com os hidrogênios (Hw*) das moléculas de água, para as 20 simulações.....	125
Figura RC9	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância dos hidrogênios, H11 e H12, do terminal amina, com os oxigênios das moléculas de água, para as 20 simulações	126
Figura RC10	Gráfico da distância mínima (nm) entre o Oxigênio, O5 com os hidrogênios (Hw*) das moléculas de água.....	127
Figura RC11	Gráfico da distância mínima (nm) entre os hidrogênios H11 e H12 do terminal amina, com os oxigênios (Ow) das moléculas de água	128
Figura RC12	Gráfico da temperatura nas MD com 16, 18 e 22 moléculas de BZC em função do tempo.....	129
Figura RC13	Gráfico da energia cinética nas MD com 16, 18 e 22 moléculas de BZC em função do tempo.....	130
Figura RC14	Gráfico da energia potencial nas MD com 16, 18 e 22 moléculas de BZC em função do tempo.....	131
Figura RC15	Gráfico da energia total nas MD com 16, 18 e 22 moléculas de BZC em função do tempo.....	132
Figura RC11	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada agregado de moléculas de BZC, nas simulação de 1 a	

	10 moléculas de BZC em solução aquosa a 0,9% de NaCl	136
Figura RCI2	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância dos hidrogênios do terminal amina, com os oxigênios da água, nas simulação de 1 a 10 moléculas de BZC em solução aquosa a 0,9% de NaCl	137
Figura RCI3	Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância do O5, com os (HW*) das moléculas de água, para as 20 simulações, nos agregados, na MD em meio aquoso a concentração 0,9% de NaCl	138
Figura RCI4	Gráfico da distância mínima dos átomos H11 e H12 com os (Ow) da água, na MD em meio aquoso a concentração 0,9% de NaCl	139
Figura RCI5	Gráfico da distância mínima (nm) entre o O5, com os (Hw*) das moléculas de água, na MD em meio aquoso a concentração 0,9% de NaCl	140
Figura RCI6	Gráfico da distância (nm) entre uma molécula de BZC, em meio aquoso a concentração 0,9% de NaCl, e as outras 4 moléculas em função do tempo (ps)	141
Figura RCI7	Gráfico da distância (nm) entre 1 (uma) molécula de BZC, em meio aquoso a concentração 0,9% de NaCl, e as outras 9 moléculas em função do tempo (ps)	142
Figura RCI8	Gráfico do valor médio de $g(r)$ a uma distância de 0,4 nm do CM das moléculas de BZC, nas MD com 1 a 10 moléculas de BZC, meio aquoso puro e salino.	143
Figura RCI9	Gráfico da distância mínima (nm) entre os H11 e H12, do	

	terminal amina, com os íons Cl^- da solução iônica	145
Figura RM0	Representação da estrutura atômica da membrana DPPC.....	147
Figura RM1	Gráfico da distância (nm) entre o terminal $-\text{CH}_3$, da BZC, com dois átomos de fósforo da membrana DPPC.....	148
Figura RM2	Gráfico da distância (nm) entre o $-\text{CH}_3$, da BZC, com um átomo de fósforo da membrana DPPC	149
Figura RM3	Gráfico da distância (nm) entre o anel aromático da BZC, com um dos átomos de fósforo da membrana DPPC	150
Figura RM4	Gráfico da distância (nm) entre o $-\text{CH}_3$ e o N10 da BZC, com dois átomos de fósforo da membrana DPPC	151
Figura RM5	Figura RM4 com apenas uma aproximação “zoom”	152
Tabela C1	Cargas dos átomos da BZC após cálculo quântico	84
Tabela C2	Tabela de equivalência de Estrutura Quântica e Clássica, da BZC com suas cargas	85
Tabela C3	Cargas dos grupos da BZC	87
Tabela RCI1	Tabela comparativa entre os agregados na MD em meio aquoso sem íons e com íons de Na^+ e Cl^-	144
Tabela AN1	Tabela com as cargas da benzocaína - usado como base o PRODRUG.	168
Tabela AN2	Tabela com as cargas e coordenadas dos átomos da BZC, de acordo com a Figura C1	169
Tabela AN3	Tabela com as coordenadas relativas entre todos os átomos da molécula da BZC	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Adiabatic Connection Formula - Fórmula de Conexão Adiabática;
B3.....	Becke 3;
B3LYP	Funcional Becke-style3, com correlação de Lee-Yang-Parr;
BZC	Benzocaína;
CGTO.....	CGTOs, contracted GTO;
CHelpG	CHarges from Electrostatic Potential using a Grid based method;
CM.....	Centro de Massa;
DFT	Density Functional Theory – Teoria do Funcional da Densidade;
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine - Dipalmitoil Fosfatidilcolina;
DZ	Double Zeta - Duplo Zeta;
ECGGA	Exchange Correlation Generalized Gradient Approximation;
EDFT.....	Exchange Density Functional Theory - correlação-troca (exchange);
ESP	ElectroStatic Potential - Potencial Eletrostático;
FF.....	Force Field – Campo de Forças;
GGA.....	Generalized Gradiente Approximation (Expansão de Gradientes Generalizados);
GROMACS.....	Groningen Machine for Chemical Simulations;
GTO	Gaussian Type Orbitals - Orbitais do tipo Gaussianas;
CGTOs	contracted GTO;

KSKohn-Sham;
LA.....Local Anesthetic – Anestésico Local;
LA's ou LAsLocal Anesthetics – Anestésicos Locais;
LDALocal Density Approximation;
LH.....Ligação de Hidrogênio;
LSDA.....Local Spin Density Approximation;
LYPLee-Yang-Parr;
MD.....Molecular Dynamics – Dinâmica Molecular;
MMMolecular Mechanics – Método clássico de mecânica
molecular;
MOMolecular Orbital – Orbitais moleculares;
NOnatural orbitals – orbitais naturais;
PGTOsPrimitive GTO;
pH.....Potencial Hidrogenionico;
QMQuantum Mechanics;
RDFRadial Distribution Function – Função de Distribuição Radial;
SPC.....Single Point Charge. (Modelo de água);
SCP-216.....Modelo de água;
STOOrbitais do tipo Slater;
svb.....split valence basis;
TFThomas-Fermi;
TFDThomas-Fermi-Dirac;
TZ.....Zeta Tripla;
u.e.c.unidade eletrostática de carga.

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Propriedades gerais das caínas	19
1.2. Descrição Bioquímica	22
1.3. A benzocaína.....	23
2. MÉTODOS	25
2.1. Teoria do funcional da densidade.....	29
2.2. Métodos de Densidade Local	41
2.3. A base 6.31G**	44
2.4. Classificação das funções de Base	47
2.5. O método ChelpG.....	52
2.6. Potencial do campo de forças	56
2.7. Dinâmica Molecular	58
2.7.1. Ensemble Microcanônico (NVE)	61
2.7.2. Ensemble Canônico (NVT)	62
2.7.3. Ensemble Isotérmico-isobárico (NPT)	62
2.7.4. Algoritmo de Verlet	64
2.7.5. Soma de Ewald.....	66
2.8. Potenciais.....	68
2.8.1. Anatomia do campo de forças na MM	70
2.9. Abordando as ligações de Hidrogênio	74
2.10. Função de distribuição radial $g(r)$	76
3. RESULTADOS, DISCUSSÕES E ANÁLISES	82
3.1. Cargas e estrutura obtidas	82
3.2. A molécula da benzocaína (BZC) em meio aquoso	88
3.3. Análise de uma BZC.....	91

3.4. Análise dos grupos Amina, Anel, Éster e Etil da BZC	92
3.5. Análise individual dos átomos ou pequenos grupos de átomos da BZC.....	97
3.5.1. Análise resumida	108
3.6. A molécula da benzocaína (BZC) e a formação de agregados	109
3.7. Resultados dos agregados	112
3.8. Água no interior dos agregados.....	114
3.9. Análise dos gráficos na MD de agregados	115
3.10. Uma síntese dos resultados.....	133
3.11. A molécula da BZC em solução aquosa a 0,9% de NaCl	134
3.12. Penetração da BZC na interface água/membrana DPPC/água	146
4. CONCLUSÃO	154
5. REFERÊNCIAS	156
ANEXOS	168

1. INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais (LA), são substâncias químicas derivadas da cocaína e extensamente usadas na supressão da sensação de dor. A sua literatura é uma das maiores que podemos encontrar, dando conta da sua história [1-3], da sua química, do seu mecanismo de ação, dos efeitos secundários no organismo, além daqueles estritamente médicos como dosagem, indicações e contra-indicações. Os trabalhos sobre os mecanismos de ação são baseados em resultados bioquímicos experimentais. Já a bibliografia médica e farmacológica indica os efeitos resultantes da sua aplicação em pacientes variados. Só recentemente apareceram trabalhos cristalográficos destas substâncias, onde são exploradas as relações entre as estruturas cristalinas polimórficas e o comportamento fenomenológico destas moléculas [4]. Resumindo, podemos afirmar que estudos da relação entre o comportamento fenomenológico e estrutura molecular somente tem sido realizados apenas nestes últimos anos. Esta lacuna cria uma situação *sui-generis*¹ na qual temos um grande conjunto de informações técnicas, grande produção e consumo humano destas drogas, conhecimento de alguns efeitos deletérios e inesperados, mas um desconhecimento quase completo dos detalhes de sua ação. Aliás, nem mesmo a estrutura química de algumas destas drogas é conhecida de maneira inequívoca. Schmidt, A.C. , no trabalho supracitado termina concluindo que “*to understand the phenomenological behavior in more detail on a molecular level, more structural information must be collected and analyzed by computational methods*”.

Estimulados em parte pela situação descrita acima, propusemo-nos a realizar um estudo sistemático das caínas, mais particularmente, a benzocaína (BZC),

¹ significa literalmente "de seu próprio gênero", ou seja, "único em seu gênero". Usa-se como adjetivo para indicar que algo é único.

usando as técnicas de dinâmica molecular (MD), e depois comparando nossos resultados com alguns dados experimentais. Para isto, levantamos dados sobre o comportamento geral das cáinas, suas propriedades químicas, seus mecanismos de ação. De outro lado, desenvolvemos uma metodologia que nos permitiu analisar qualitativamente os resultados dos cálculos que efetuamos. Podemos afirmar que nossos resultados são coerentes com os da literatura, o que nos permite afirmar que nossa metodologia, em linhas gerais, está correta.

Sabemos que o trabalho computacional a que nos propusemos é puramente teórico, isto é, matemático em sua essência, mas acreditamos que poderá servir de um guia na interpretação de dados experimentais. Somente um desenvolvimento metodológico acompanhado de um desenvolvimento da técnica computacional poderá solucionar certas questões que não podemos abordar por limitações impostas pela tecnologia. Estamos afirmando que nossos cálculos, baseados fundamentalmente na mecânica de Newton, tem um vício de base que é o de não tratar corpos microscópicos com a mecânica quântica em todos os seus aspectos. Em outros termos, nossos resultados quando forem corretos, são apenas aproximadamente corretos.

1.1. Propriedades gerais das cáinas

Existem muitas divergências de informações quanto ao real modo de ação dos LA, principalmente quanto ao local onde agem e qual é a forma estrutural ativa. A dinâmica das interações droga-membrana são investigadas usando-se os mais variados métodos físicos, entre os quais podemos citar, a difração de raios-X [1, 5], Ressonância Magnética Nuclear [6-19], Ressonância Paramagnética Eletrônica

[20-25], e Espectroscopia de Infravermelho [26]. Estes métodos, apesar de darem uma boa resolução espacial, são muito lentos e não podem fornecer nenhuma resposta do processo cinético nesta interação. Além disso, estes estudos não respondem a questões como o estado físico da membrana ou sua composição molecular afeta a adsorção da LA, ou como o estado de ionização da droga afeta sua afinidade e a posição da ligação, e finalmente, como uma alteração da ionização da droga pode ocorrer pela adsorção da membrana, isto é, o pKa efetivo da membrana-droga difere do pKa da droga na solução aquosa.

Não abordamos estas e outras questões. Usamos apenas informações primárias tidas como indiscutíveis e com algumas interpretações diferentes. Acredita-se que a ação dos LA's acontece pelo bloqueio dos canais de sódio, pois eles podem ser antagonizados pelo cálcio. Isto indicaria que tanto os LA's quanto o Ca^{++} competem pelos mesmos sítios ligantes. Esta ação se daria pelo bloqueio destes canais, invadindo a região de fluxo do cálcio e impedindo o livre fluxo deles e, por conseguinte, cortando a transmissão do sinal de dor [27]. Outro fato que reforça esta hipótese de bloqueio do canal de sódio é que os anestésicos locais costumam ser ineficazes em áreas inflamadas. Neste caso, o pH mais ácido nestas áreas facilita a ionização das moléculas do anestésico e, conseqüentemente, dificultaria a sua penetração nas células nervosas [2]. Defende-se aqui a hipótese de que a forma ionizada dos LA's não atravessariam a barreira formada pelas membranas, enquanto que a forma neutra se infiltraria atravessando as membranas onde ela atuaria. Esta é a descrição de um dos modelos aceitos. Outro modelo propõe que os anestésicos locais atravessam as bainhas de mielina (células de Schwann) na forma não-ionizada, mas interagem com o sítio receptor situado na membrana neural na forma ionizada, e assim estabilizam o potencial da membrana, bloqueando a condução

nervosa. Os LA's despolarizam a membrana neural, bloqueando a transmissão do impulso nervoso [6, 8, 28]. Acredita-se que nesta despolarização aconteça a interferência no fluxo de íons Na^+ e K^+ através de canais iônicos da membrana. O bloqueio do fluxo normal destes íons corresponde ao bloqueio do sinal de dor. Não haveria desenvolvimento de um potencial elétrico negativo para a transmissão de um impulso [29].

Outros mecanismos de ação são propostos como alguns que indicam que os LA's desorganizam a estrutura da bicamada lipídica. Isto aumenta a permeabilidade de água nas membranas que pode estar ligado de alguma maneira diretamente ao efeito anestésico. A toxicidade destas drogas estaria diretamente ligada à capacidade de desorganizar a membrana [6, 17, 26]. Uma hipótese alternativa a estas duas afirma que a forma catiônica dos LA's deve interagir com o receptor na membrana que poderia ser uma proteína nela localizada, concorrendo com os íons Cálcio e bloqueando o fluxo deste último.

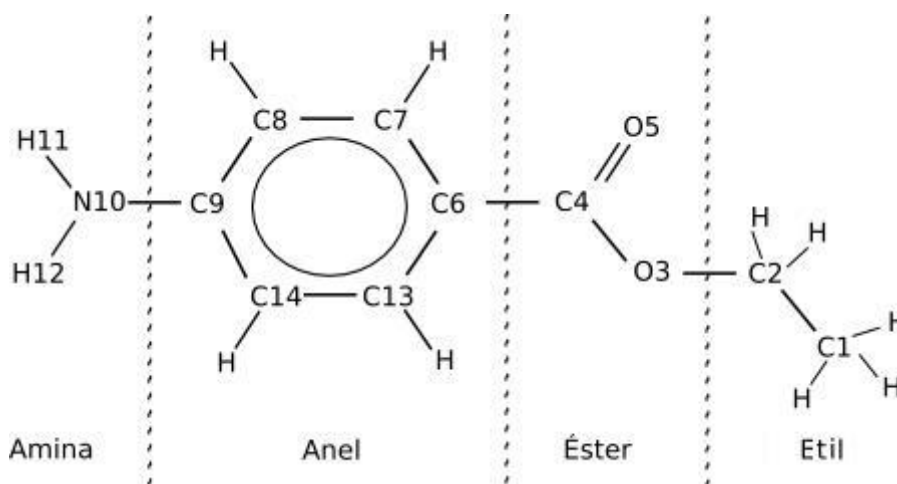


Figura 11. Estrutura da benzocaína, no qual está identificado cada parte de sua estrutura, bem como a numeração utilizada para identificação dos átomos ou grupo de átomos.

1.2. Descrição bioquímica

LA's são moléculas anfifílicas de aminas terciárias, e algumas delas tem propriedades coloidais em solução aquosa. Anfifílica (do grego $\alpha\mu\phi\iota\varsigma$, amphis: ambos e $\phi\iota\lambda\iota\alpha$, philia: amigo) é um termo que descreve um composto químico possuindo propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas simultâneas. As moléculas anfifílicas são compostas na parte hidrofóbica, em geral, de hidrocarbonos, e na parte hidrofílica que pode ser um grupo funcional não carregado ou iônico. Devido aos diferentes locais de ligação dos grupos hidrofóbico e hidrofílico que se unem a um LA, estes são divididos em duas classes: amino-amidas e amino-ésteres. Em relação aos ésteres podemos ter uma classificação segundo a estrutura do anel benzênico. Um grande grupo é o dos ésteres do ácido para-aminobenzóico. Deste grupo fazem parte os subgrupos da benzocaína, da procaína e da tetracaína. Um outro grupo é dos ésteres do ácido para-oxi-benzóico como por exemplo a butoxicaína.

Em geral, o pKa de um LA varia entre 7,5 e 9,0. Isto significa que nas condições fisiológicas, pH ~7,0, a droga terá duas formas, uma eletricamente neutra e outra positivamente carregada com a ligação de um átomo de hidrogênio no terminal amina. Esta inserção de uma carga extra modificará sua interação com o meio aquoso tornando-o menos hidrofóbico do que a molécula neutra. A ação desta molécula carregada (quimicamente denominada protonada) é que permitiria a entrada da molécula neutra que atravessa inteiramente a camada lipídica. A forma carregada ficaria acoplada na membrana nas proximidades da interface com a água.

1.3. A benzocaína

(BZC)

A benzocaína ², *ethyl 4-aminobenzoate* (BZC) [30], nº. CAS 94-09-7 ³, é um LA do grupo éster do ácido para-aminobenzóico, de amina primária, tem um pKa aproximado de 2,5. Isto significa que nas condições fisiológicas ela aparece somente na forma eletricamente neutra. Entretanto, o comportamento anestésico da molécula segue o mesmo padrão das outras caínas. Como acontece a ação da benzocaína, porque ela prescinde da molécula carregada para sua ação? Os modelos que colocam a ação das drogas anestésicas dependentes da forma protonada não explicam bem o comportamento da benzocaína.

Este caráter especial da benzocaína em relação às outras moléculas atraiu uma atenção particular de nossa parte. Algumas perguntas que formulamos foram, além da citada no parágrafo anterior, se a ação dela prescinde da forma carregada, será que uma molécula faria o papel da droga carregada para que uma outra atue no interior da membrana como as outras caínas? A resposta a esta questão exige uma dinâmica molecular (MD) de duas ou mais moléculas de BZC diante de uma membrana-modelo. Ainda mais, se a droga entra em contato com o meio fisiológico, a ação dos íons sódio e cloro devem de alguma maneira afetar a distribuição das cargas na molécula. De que maneira isto acontece, como ela afeta a molécula em sua ação? Outra questão é se a BZC interage de algum modo com a membrana celular. Neste caso, não apenas precisamos fazer uma simples MD, mas uma simulação QM/MM, ou seja, uma que envolve a mecânica quântica calculando em

² Etil 4-aminobenzoato, Sólido cristalino branco, inodoro, de comprimento ~10,5Å, solubilidade em água 1310mg/l, ponto de fusão 92°C.

³ O modelo computacional da BZC foi construído de acordo com o Pub-Chem, registro nº. 2337 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

cada passo a interação entre todos os átomos. Este tipo de cálculo é longo e sua implementação complicada e, no momento, não temos condições de realizar.

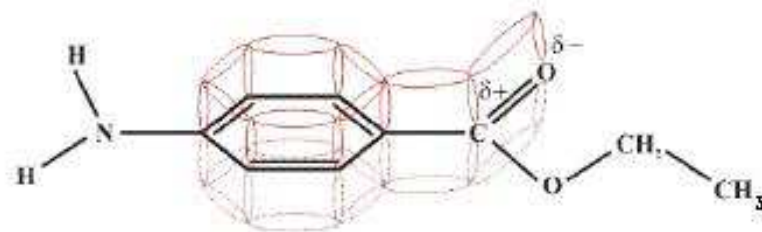


Figura 12. O grupo carbonila (OC=O) é ativado pela presença de carga positiva parcial no átomo de carbono. Isso é possibilitado pelas ligações conjugadas, que permitem uma deslocalização das nuvens eletrônicas do anel aromático até o oxigênio da carbonila, o oxigênio (O5) da carbonila adquire uma carga parcial negativa, o que dá origem à carga parcial positiva no carbono da carbonila.

Resumindo, neste estudo pretendemos entender como a benzocaína se comporta em solvente aquoso e as possíveis interações diante de uma membrana fisiológica, apesar de sua diferença química (pK_a ~2,5) em relação às outras caínas.

2. MÉTODOS

Para responder às questões sobre a BZC (Como acontece a ação da BZC? Os modelos de ação das drogas anestésicas estão corretas? A BZC interage de algum modo com a membrana celular?) aplicamos um conjunto de cálculos matemáticos envolvendo métodos quânticos e métodos clássicos. Quanticamente, usamos cálculos da Teoria do Funcional Densidade (DFT)/B3LYP [31-34], na base 6-31 G** [35, 36], e, classicamente, usamos a Dinâmica Molecular(MD). Os cálculos quânticos foram feitos para obtermos a estrutura molecular e as cargas de cada átomo através da otimização da geometria. O método para determinação das cargas foi o ChelpG [37]. As cargas e a geometria obtidas pelos cálculos quânticos serviram para construção dos arquivos de entrada da dinâmica molecular.

Os cálculos quânticos são feitos no vácuo. Nem sempre os resultados obtidos destes cálculos são bons quando utilizados em estudos com solventes. Os cálculos da estrutura geométrica e a distribuição das cargas elétricas da molécula foram feitos tanto no vácuo quanto no campo de reação de Onsager [38-42]. Este último simula o efeito do solvente por meio de uma constante dielétrica uniforme ϵ , o campo de reação. O soluto ocupa uma cavidade esférica de raio fixo a_0 . O momento de dipolo na molécula induzirá um dipolo no meio, na direção oposta, e o campo elétrico aplicado pelo momento de dipolo do solvente irá, por sua vez, interagir com o dipolo da molécula, conduzindo a uma estabilização final.

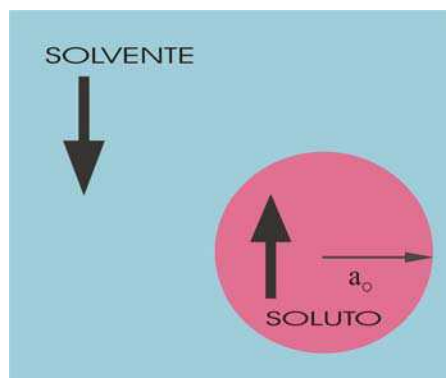


Figura M1. Representação do campo de reação do solvente diante da presença do soluto. Em nosso caso o solvente é a água e a BZC o soluto.

$$\vec{R} = \frac{2(\varepsilon - 1)\vec{\mu}}{(2\varepsilon + 1)a_0^3} \quad (\text{M-1})$$

\vec{R} = Campo de reação

a_0 = raio da cavidade

$\vec{\mu}$ = momento de dipolo da molécula.

Os dois resultados foram comparados, e usamos os resultados do método de Onsager, apesar das diferenças serem praticamente desprezíveis, porque a base utilizada 6-31 G** conduz a um resultado próximo ao da molécula em meio solvente.

Os dados obtidos nos cálculos quânticos acima foram utilizados para modificar o campo de forças original e criarmos um campo específico para a simulação da BZC. A MD foi realizada em uma caixa cúbica contendo 4618 moléculas de água, no ensemble NPT, com pressão de 1 (um) bar e temperatura de 300K. O modelo de água utilizado foi o SPC-216 (Single Point Charge) [43]. Utilizamos a caixa de água cúbica com condições periódicas de contorno para evitar problemas de superfície. O solvente foi inicialmente colocado no centro da caixa de água. Para reduzir as tensões iniciais, foi feita a minimização da energia, que serviu

de passo inicial para a dinâmica de 5,0 ns. As interações de longo alcance (Coulomb e Van der Waals) foram limitadas a 0,9 nm para Coulomb e 1,0 nm de distância (raio de corte) para van der Waals, para diminuir o tempo computacional. Quando usamos um raio de corte geramos um ruído, e isto foi evitado usando a soma de Ewald [44, 45].

A análise dos resultados foi feita com o auxílio da função de distribuição radial $g(r)$. O inverso desta função nos fornece a força de interação entre os pares considerados. Como nosso interesse era saber o comportamento da BZC em meio aquoso, esta função nos fornece um bom parâmetro de análise. Um valor maior do que a unidade (a função foi normalizada a um) indica que a molécula é hidrofílica e menor do que um, ela é hidrofóbica. O potencial de interação entre as moléculas do nosso soluto – BZC – e as moléculas de água é dado por:

$$A(r) = -k_B T \ln g(r) + \text{constante} \quad (\text{M-2})$$

Esta equação (conhecida pela sigla PMF - Potential of Mean Force, que está ligada ao potencial de Helmholtz [46, 47], para descrever a energia de solubilidade de uma molécula em um meio solvente) mostra claramente que para $g(r)$ menor do que um ela é repulsiva, e maior do que um é atrativo, ou, em termos de água-BZC, hidrofóbica ou hidrofílica.

A mesma análise foi realizada com mais moléculas de BZC. Inicialmente, com duas e a seguir com três, depois com quatro moléculas, e, assim, sucessivamente, as BZCs foram colocadas aleatoriamente na caixa de água. Este cálculo foi realizado porque o fato dela não ter a forma protonada em meio fisiológico implica que sua ação poderia se dar aos pares, ou melhor, em conjunção entre algumas

moléculas de BZC. Novamente, analisamos o resultado usando a mesma função $g(r)$, onde temos um resultado muito relevante que é formação de agregados, no qual a BZC atua em conjunto nestes aglomerados, sendo este o enfoque principal do nosso trabalho.

Analisamos ainda o comportamento da BZC em meio salino, de maneira a simular o meio fisiológico, isto é, 0,9% de solução de NaCl. O meio fisiológico possui entre outras coisas, sais diluídos, e seu efeito na molécula pode conduzir a uma mudança tanto na geometria quanto na distribuição eletrônica de cargas. Esperávamos em meio fisiológico uma diminuição da diferença na distribuição das cargas, diminuindo o efeito hidrofóbico/hidrofílico da BZC, e, também descrevendo a existência hidroclorada deste tipo de molécula.

Finalmente, construímos uma membrana com 64 moléculas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), modelo de Tieleman [48], e 3822 moléculas de água. O interesse nesta construção é mostrar o comportamento dinâmico da BZC, isto é, permitir uma visualização de seu movimento frente a um modelo matemático mais realístico. A análise neste caso é feita a partir de um gráfico da trajetória dos grupos de nosso interesse. Por exemplo, um gráfico da trajetória do nitrogênio do terminal amina deve ser feita somente na direção da coordenada Z, que pode ser feita em relação à posição do fósforo da DPPC. O formato da membrana, Figura (M2), fica "praticamente" contido no plano XY.

O trabalho segue com uma rápida exposição dos métodos matemáticos usados, a análise dos resultados, as conclusões, e referências bibliográficas.

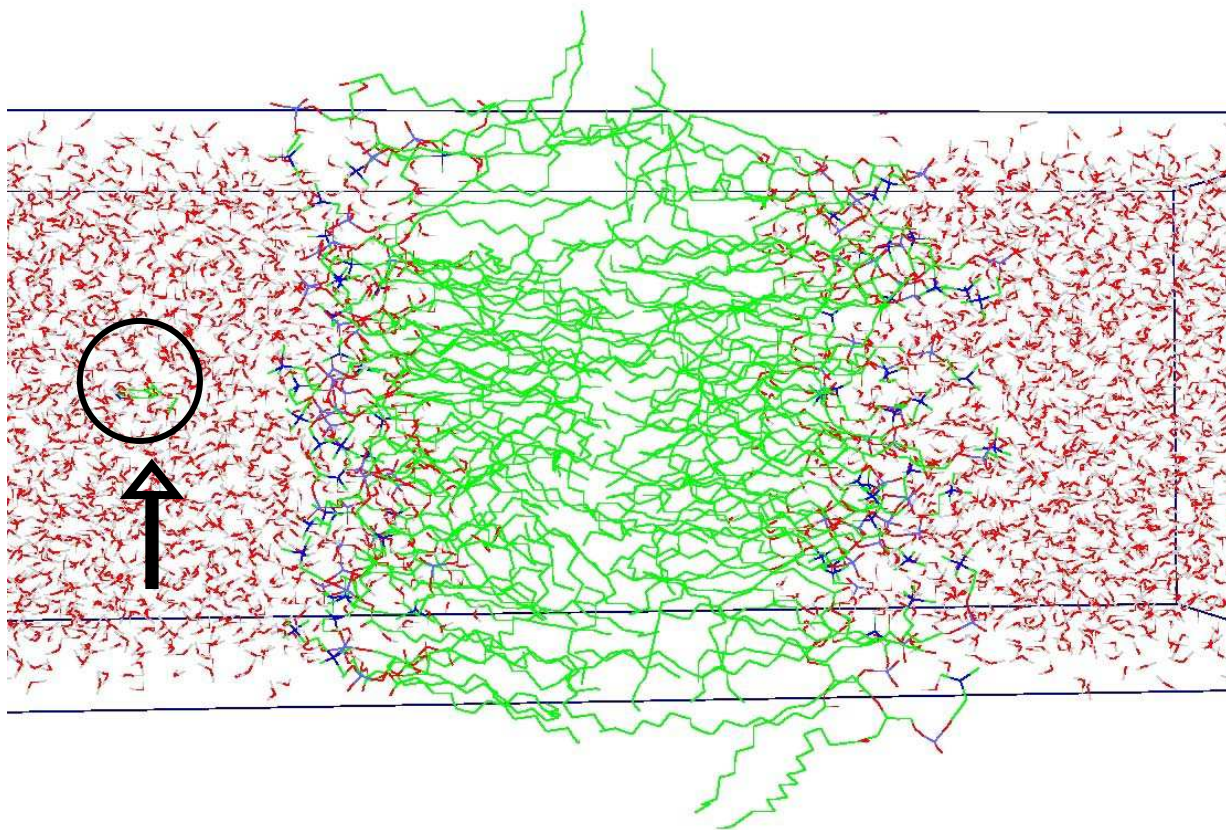


Figura M2. Posição inicial da molécula de BZC frente à membrana de DPPC [48]. Em verde no centro a bicamada da membrana, com a parte hidrofílica que contém o fósforo (representado na cor azul), em volta em ambos os lados do eixo temos as moléculas de água (representada nas cores vermelho e cinza), e no lado esquerdo da figura, em verde a molécula de BZC, indicada pela seta em destaque no círculo preto.

2.1. A teoria do funcional da densidade

DFT (Density Functional Theory)

Para sistemas de muitos elétrons, pode-se mostrar [33] que o sistema pode ser estudado pela teoria de Hartree-Fock, que transforma o problema de N corpos

em N problemas de um corpo. Este método (Hartree-Fock) se utiliza da função de onda total dos N elétrons. Outro método de estudar este problema é usando a teoria da funcional densidade. A base da teoria da funcional densidade (Density Functional Theory - DFT) de Hohenberg e Kohn [33] é a prova de que a energia eletrônica do estado fundamental é determinada completamente pela densidade eletrônica de cargas. Em outras palavras, existe uma correspondência biunívoca entre a densidade eletrônica de um sistema e a energia. A importância desta prova pode ser vista pela comparação dela (densidade eletrônica) e a função de onda. Uma função de onda para um sistema de N elétrons contém $3N$ coordenadas, três para cada elétron (4 se as coordenadas de spin forem incluídas). A densidade eletrônica é o quadrado da função de onda, integrada sobre $N-1$ coordenadas eletrônicas, que dependem somente de três coordenadas, independentemente do número de elétrons. Enquanto a complexidade de uma função de onda aumenta com o número de elétrons, a densidade eletrônica tem o mesmo número de variáveis, independentemente do tamanho do sistema. O "único" e grande problema é que embora se prove que cada densidade diferente corresponde a uma energia diferente do estado fundamental, a funcional que liga estas duas quantidades não é conhecida. O objetivo dos métodos DFT é obter funcionais ligando a densidade eletrônica com a energia [49-53].

Uma função é uma prescrição para produzir um número a partir de um conjunto de variáveis (coordenadas). Uma funcional é similar à prescrição para produzir um número a partir de uma função, que por seu turno depende das variáveis. Uma função de onda e uma densidade eletrônica são, portanto, funções, enquanto uma energia dependente da função de onda é uma funcional.

Comparando com a mecânica ondulatória, a funcional da energia deve ser dividida em três partes, a energia cinética, $T[\rho]$, a atração entre o núcleo e os elétrons, $E_{ne}[\rho]$, a repulsão elétron-elétron, $E_{ee}[\rho]$ (a repulsão núcleo-núcleo na aproximação de Bohr-Oppenheimer é uma constante). A $E_{ee}[\rho]$ deve ser dividida em duas partes, a parte coulombiana e a parte de troca (exchange), $J[\rho]$ e $K[\rho]$, incluindo implicitamente a energia de correlação em todos os termos. As funcionais $E_{ee}[\rho]$ e $J[\rho]$ são dadas por suas expressões clássicas, onde o fator $\frac{1}{2}$ é incluído em $J[\rho]$, pois a interação em todo o espaço é feita duas vezes.

$$E_{ne}[\rho] = \sum_a \int \frac{Z_a \rho(\vec{r})}{|\vec{R}_a - \vec{r}|} d\vec{r} \quad (\text{M-3a})$$

onde, $|\vec{R}_a - \vec{r}|$ = distância entre o núcleo – elétrons, Z_a = número atômico.

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}d\vec{r}' \quad (\text{M-3b})$$

Tentativas antigas para a dedução das funcionais para as energias cinética e de troca consideravam um gás de elétrons uniforme não interagentes. Para tal sistema, pode-se mostrar que $T[\rho]$ e $K[\rho]$ são dadas por:

Equações (M-4):

$$T_{if}[\rho] = C_F \int \rho^{5/3}(\vec{r}) d\vec{r} \quad (\text{M-4a})$$

$$C_F = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{2/3} \quad (\text{M-4b})$$

$$K_D[\rho] = -C_X \int \rho^{4/3}(\vec{r}) d\vec{r} \quad (\text{M-4c})$$

$$C_X = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/3} \quad (\text{M-4d})$$

A funcional energia $E_{\text{TF}}[\rho] = T_{\text{TF}}[\rho] + E_{\text{ne}}[\rho] + J[\rho]$ é a conhecida teoria de Thomas-Fermi (TF) do átomo, incluindo a parte de troca $K_D[\rho]$ (obtida por Block [54] mas associada ao nome de Dirac [55], e conhecida na literatura como modelo de Thomas-Fermi-Dirac (TFD)). A teoria de TF baseia-se em algumas aproximações que podemos resumir como:

- a) despreza as correções relativísticas,
- b) no átomo há um campo efetivo dependente apenas da distância da carga nuclear,
- c) os elétrons estão distribuídos uniformemente no espaço de fase, e,
- d) o potencial é determinado pela carga nuclear e sua distribuição eletrônica.

A hipótese de um gás de elétrons uniforme não interagentes não concorda com sistemas atômicos ou moleculares. Energias totais aparecem com erros de 15 a 50%, mas ainda mais complicado é que nem a teoria de TF nem a teoria TFD prevêem ligações. As moléculas simplesmente não devem existir! As funcionais das energias T e K devem ser obtidas pela adição de termos que dependem da densidade, mas, também, de suas derivadas. Isto é equivalente a considerar um gás de elétrons não-uniforme a partir de uma expansão da densidade do tipo Taylor. Estas correções do tipo gradiente melhoram os resultados. Por exemplo, ligações agora são permitidas, mas em geral este não é um método capaz de transformar

resultados obtidos nos modelos DFT comparáveis aos daqueles da mecânica quântica.

O problema fundamental nos modelos clássicos (TF e TFD) é que a energia cinética está representada de maneira limitada. Kohn e Sham [34] introduziram orbitais, baseados nos trabalhos de Slater, partindo da hipótese de que a funcional da energia cinética pode ser dividida em duas partes, uma que pode ser calculada exatamente, e uma parte que representa um pequeno termo de correção. Podemos resumir os trabalhos de Hohenberg e Kohn e de Kohn e Sham da seguinte maneira: o potencial externo sentido pelos elétrons é uma funcional única da densidade eletrônica, e a energia do estado fundamental é mínima quando esta densidade é exata.

O operador Hamiltoniano pode ser escrito como

$$\mathbf{H}_\lambda = \mathbf{T} + \mathbf{V}_{\text{ext}}(\lambda) + \lambda \mathbf{V}_{\text{ee}} \quad (\text{M-5})$$

onde o operador \mathbf{V}_{ext} é igual à \mathbf{V}_{ne} para $\lambda = 1$, e para valores intermediários de λ , entretanto, é assumido que o potencial externo $\mathbf{V}_{\text{ext}}(\lambda)$ é ajustado de tal maneira que a mesma densidade é obtida tanto para $\lambda = 1$ (o sistema real) quanto para $\lambda = 0$ (um sistema hipotético com elétrons não-interagentes). Para $\lambda = 0$ a solução exata da equação de Schrödinger é dada por um determinante de Slater (Nota: A contribuição fundamental de Slater foi mostrar que o potencial de troca (exchange) deve depender fundamentalmente da densidade eletrônica, sendo portanto análogo ao gás de elétrons livres composto de orbitais moleculares, ϕ_i , para os quais a funcional da energia cinética exata é dada como

$$T_S = \sum_{i=1}^N \langle \phi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \phi_i \rangle \quad (\text{M-6})$$

O subscrito S denota que é a energia cinética calculada a partir de um determinante de Slater. O caso $\lambda = 1$ corresponde a elétrons interagindo, e a equação (M-6) é somente uma aproximação à energia cinética real, mas já apresenta uma substancial melhoria sobre a equação de TF (equação M-4).

Outra maneira de justificar o uso da equação (M-6) para o cálculo da energia cinética é referindo-nos as orbitais naturais (auto-vetores da matriz densidade). A energia cinética exata pode ser calculada a partir das orbitais naturais (natural orbitals - NO), obtidas da matriz densidade exata. Onde os ϕ_i^{NO} , são as orbitais moleculares naturais, e ∇^2 o operador Laplaciano.

$$T[\rho_{exata}] = \sum_{i=1}^{\infty} \langle \phi_i^{NO} | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \phi_i^{NO} \rangle \quad (\text{M-7a})$$

$$\rho_{exata} = \sum_{i=1}^{\infty} n_i |\phi_i^{NO}|^2 \quad (\text{M-7b})$$

$$N = \sum_{i=1}^{\infty} n_i \quad (\text{M-7c})$$

O número de ocupação da orbital n_i (auto-valor da matriz densidade) estará entre 0 e 1, correspondendo ao número de elétrons na orbital. Note que a representação da densidade exata normalmente exigirá um número infinito de orbitais naturais. Os primeiros números de ocupação N (N sendo o número total de elétrons no sistema) estará, normalmente próximo a 1, e o restante próximo a 0.

Como a matriz densidade exata não é conhecida, a densidade aproximada é escrita em termos de um conjunto de funções auxiliares de orbitais de um elétron,

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N |\phi_i^{NO}|^2 \quad (\text{M-8})$$

Isto corresponde às equações (M-7) com número de ocupação exatamente 1 ou 0. A energia cinética "perdida" da equação (M-6) é então devida ao desvio do número de ocupação de 1 ou 0.

A chave da teoria de Kohn-Sham é então o cálculo da energia cinética sob a hipótese de elétrons não interagentes da equação (M-6). Na realidade, os elétrons estão interagindo, e a equação (M-6) não fornece a energia cinética total. Entretanto, exatamente como a teoria Hartree-Fock fornece uma resposta que está ~99% correta, a diferença entre a energia cinética exata e a calculada pela hipótese de orbitais não-interagentes é pequena. A energia cinética restante é absorvida em um termo de correlação-troca (exchange-correlation), e a expressão geral da energia DFT pode ser escrita como

$$E_{\text{DFT}}[\rho] = T_{\text{S}}[\rho] + E_{\text{ne}}[\rho] + J[\rho] + E_{\text{ct}}[\rho] \quad (\text{M-9})$$

Igualando E_{DFT} à energia exata, esta expressão deve ser tomada como a definição da $E_{\text{XC}}[\rho]$. Ela é a diferença após a subtração da energia cinética não-interagente e os termos das energias potenciais $E_{\text{ne}}[\rho] + J[\rho]$.

$$E_{\text{XC}}[\rho] = (T[\rho] - T_{\text{S}}[\rho]) + (E_{\text{ee}}[\rho] - J[\rho]) \quad (\text{M-10})$$

O primeiro parêntese da equação (M-10) deve ser considerado como representando a energia cinética de correlação, enquanto o segundo contém ambas as energias potenciais de troca e de correlação. A energia de troca é de longe a que mais contribui para a E_{XC} . Para o átomo de neônio, por exemplo, a energia de troca é -12,11 a.u. (unidades atômicas), enquanto que a energia de correlação é -0,39 a.u. (calculada pelos métodos tradicionais ab-initio). Como a energia de troca domina E_{ct} , pode-se imaginar que poderíamos calculá-la "exatamente" a partir das orbitais - analogamente à energia cinética - através das fórmulas conhecidas da mecânica quântica, e calcular somente a parte computacionalmente complicada, a energia de correlação, usando a DFT. Isto foi tentado, e os resultados foram medíocres. O problema básico é que as definições da DFT das energias de correlação e de troca não são completamente equivalentes às suas correlatas da mecânica quântica [56]. A energia de correlação é definida na mecânica quântica como a diferença entre a energia exata e o correspondente valor do cálculo Hartree-Fock, e a energia de troca é a repulsão total dos elétrons menos a energia de Coulomb. Estas energias têm ambas um termo de curto e longo alcance (em termos de distâncias entre dois elétrons). O termo de correlação de longo alcance é essencialmente uma energia de correlação "estática" (isto é, a parte de "multi-referência") enquanto que a parte de curto alcance é a correlação "dinâmica". A parte de longo alcance da energia de troca na mecânica quântica cancela efetivamente a parte de longo alcance da energia de correlação. As definições de troca e correlação em DFT são locais (curto alcance), eles dependem somente da densidade em um dado ponto e nas vizinhanças imediatas (através das derivadas da densidade). O cancelamento das de longo alcance são implicitamente feitas na funcional de correlação e troca.

Calculando a energia de troca pela mecânica quântica e a energia de correlação via DFT destrói o cancelamento.

A vantagem do método DFT está em que somente a densidade total é necessária. Para calcular a energia cinética com precisão suficiente, devem ser introduzidas as orbitais. O custo computacional do método DFT é semelhante à teoria Hartree-Fock, com a possibilidade de resultados mais fiéis (em princípio, exatos).

A maior dificuldade no método DFT são as fórmulas para o termo de correlação-troca. Assumindo que tal funcional é encontrada, o problema é semelhante àquele da teoria Hartree-Fock da mecânica quântica: determinar um conjunto de orbitais ortogonais que minimizem a energia (a exigência de orbitais ortogonais se baseia no princípio de Pauli). Desde que as funcionais $J[\rho]$ (e $E_{xc}[\rho]$) dependem da densidade total, uma determinação das orbitais envolvem uma seqüência iterativa. A ortogonalidade das orbitais pode ser feita através do método de Lagrange, em analogia com os métodos da mecânica quântica.

$$L[\rho] = E_{DFT}[\rho] - \sum_{ij}^N \lambda_{ij} [\langle \phi_i | \phi_j \rangle - \delta_{ij}] \quad (\text{M-11})$$

A exigência de que a variação de L se anule fornece um conjunto de equações envolvendo um operador efetivo de um elétron (\mathbf{h}_{KS}), similar ao operador de Fock

$$\mathbf{h}_{KS}\phi_i = \sum_j^N \lambda_{ij} \phi_j \quad (\text{M-12.a})$$

$$\mathbf{h}_{KS} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + \mathbf{V}_{\text{eff}} \quad (\text{M-12b})$$

$$\mathbf{V}_{\text{eff}}(\mathbf{r}) = \mathbf{V}_{\text{ne}}(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' + \mathbf{V}_{\text{xc}}(\mathbf{r}) \quad (\text{M-12c})$$

Podemos escolher novamente uma transformação unitário que diagonalize a matriz dos multiplicadores de Lagrange, produzindo um conjunto de orbitais canônicos Kohn-Sham (KS). As equações resultantes das equações dos pseudo auto-valores são conhecidas como equações de Kohn-Sham:

$$\mathbf{h}_{KS} \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad (\text{M-13})$$

Os multiplicadores de Lagrange podem ser associados novamente com as energias das orbitais moleculares, e a energia da orbital mais alta ocupada é o potencial de ionização (teorema de Koopman), mas se somente a funcional exata de correlação-troca é usada. Como este não é o caso nos cálculos reais, as energias das orbitais na prática não têm o mesmo significado da teoria Hartree-Fock [57]. As orbitais KS desconhecidas devem ser determinadas por métodos numéricos, ou expandida em um conjunto de funções de base, analogamente aos métodos Hartree-Fock.

Embora esteja claro que existem muitas semelhanças entre a teoria Hartree-Fock da mecânica quântica e a teoria DFT, há uma diferença importante. Se for conhecida a $\mathbf{E}_{\text{xc}}[\rho]$ exata, os métodos DFT darão uma energia total exata, incluindo a correlação entre os elétrons. Os métodos DFT têm, portanto, o potencial de inclusão da parte difícil computacionalmente na mecânica quântica, a energia de

correlação, a um esforço computacional semelhante àquele para a determinação da energia não correlacionada nos métodos Hartree-Fock. Mas, sabe-se que o esforço computacional para resolver a funcional $E_{xc}[p]$ exata é tão complicada, que resolver as equações de KS terá dificuldades similares às da solução exata da equação de Schrödinger. Como, porém, as soluções exatas não são disponíveis em ambos os métodos, a questão importante é qual o custo computacional para gerar uma solução com certa precisão. E esta questão favorece os métodos DFT.

É possível provar que o potencial de correlação-troca é uma funcional única, válida para todos os sistemas, mas uma forma funcional explícita deste potencial não existe ainda. A diferença entre os métodos DFT é a escolha da forma funcional da energia de correlação-troca. A teoria fornece pequenas indicações de como estas funcionais devem ser escolhidas, e conseqüentemente muitas potências diferentes podem ser propostas. As formas das funcionais são sempre obrigadas a ter um certo comportamento limite (por exemplo, o limite de um gás de elétrons uniforme), e resultados para parâmetros de dados conhecidos acuradamente. Qual é a funcional melhor será tirada do resultado pela comparação com os dados experimentais ou com cálculos de alto-nível da mecânica quântica.

Uma das mais recentes formas de obter as funcionais E_{xc} está baseada na inversão da equação (M-9). Uma densidade eletrônica precisa de ser calculada por métodos de mecânica quântica avançada, e o conjunto das orbitais KS que delimitam esta densidade devem ser determinadas pelo método da "procura vinculada" envolvendo uma minimização da energia cinética. A idéia foi originalmente introduzida por Levy e Perdew [58] e foi elaborada por Parr e co-autores [59]. Implementações e aplicações recentes foram reportadas por Baerends et al. e Handy et al [60]. Isto permite um cálculo da energia de correlação-troca

(subtraindo-se T , V_{ne} e J da energia DFT total), dando a dependência direta de V_{xc} na densidade $[\rho]$. Como os métodos DFT é algo novo em física atômica e molecular, não existe até a presente data, um método "padrão" e a calibração dos diferentes métodos é muito menos desenvolvida.

Costuma-se separar a E_{XC} em duas partes, uma parte de troca pura E_X e uma parte de correlação E_C , embora não esteja claro que esta seja uma hipótese válida. Cada uma destas energias pode ser escrita em termos de energia por partícula (densidade de energia, ε_X e ε_C).

$$E_{XC}[\rho] = E_C[\rho] + E_X[\rho] = \int \rho(\vec{r})\varepsilon_X[\rho(\vec{r})]d\vec{r} + \int \rho(\vec{r})\varepsilon_C[\rho(\vec{r})]d\vec{r} \quad (M-14)$$

As correspondentes energias potenciais exigidas na equação (M-12) são dadas como as derivadas da energia com relação à densidade

$$\mathbf{V}_{XC}(\mathbf{r}) = \frac{\partial E_{XC}[\rho]}{\partial \rho(\vec{r})} = \varepsilon_{XC}[\rho(\mathbf{r})] + \rho(\mathbf{r}) \frac{\partial \varepsilon_{XC}(\vec{r})}{\partial \rho} \quad (M-15)$$

Como sabemos, a correlação entre elétrons de spins paralelos é diferente dos spins antiparalelos. A energia de troca é "por definição" dada como a soma das contribuições das densidades dos spins alfa e beta. As energias cinética, a atração núcleo-elétron e os termos Coulombianos são separáveis trivialmente.

$$E_X[\rho] = E_X^\alpha[\rho_\alpha] + E_X^\beta[\rho_\beta] \quad (M-16a)$$

$$E_C[\rho] = E_C^{\alpha\alpha}[\rho_\alpha] + E_C^{\beta\beta}[\rho_\beta] + E_C^{\alpha\beta}[\rho_\alpha, \rho_\beta] \quad (M-16b)$$

A densidade total é a soma das contribuições de α e β , $\rho = \rho_\alpha + \rho_\beta$, e para o singlete de camada fechada elas são idênticas ($\rho_\alpha = \rho_\beta$). As funcionais para as energias de correlação e de troca podem ser formuladas em termos de densidades de spin separadas; entretanto, costuma-se formulá-las como funções da polarização de spin η (diferença normalizada entre ρ_α e ρ_β), e o raio do volume efetivo contendo um elétron, r_s .

$$\zeta = \frac{\rho^\alpha - \rho^\beta}{\rho^\alpha + \rho^\beta} \quad (\text{M-17a})$$

$$\frac{4}{3} \pi r_s^3 = \rho^{-1} \quad (\text{M-17b})$$

Nas fórmulas acima assumimos implicitamente que a energia de troca é a soma sobre ambas as densidades alfa e beta.

2.2. Métodos de Densidade Local.

Na aproximação LDA (Local Density Approximation) assume-se que a densidade pode ser tratada localmente como um gás de elétrons uniforme, ou equivalentemente, que a densidade é uma função que varia lentamente. No caso mais geral, onde as densidades dos elétrons α e β não são iguais, usa-se o método LSDA (Local Spin Density Approximation) que é dada como a soma das densidades individuais.

$$E_X^{LSDA}[\rho] = -2^{1/3} C_X \int [\rho_\alpha^{4/3} + \rho_\beta^{4/3}] d\vec{r} \quad (\text{M-18})$$

$$\varepsilon_X^{LSDA}[\rho] = -2^{1/3} C_X [\rho_\alpha^{1/3} + \rho_\beta^{1/3}] \quad (\text{M-19})$$

$$\varepsilon_X^{LSDA}[\rho] = -\frac{1}{2} C_X \rho^{1/3} [(1 + \zeta)^{4/3} + (1 - \zeta)^{4/3}] \quad (\text{M-20})$$

$$\varepsilon_{X_\alpha}[\rho] = -\frac{3}{2} \alpha C_X \rho^{1/3} \quad (\text{M-21})$$

A aproximação LSDA subestima a energia de troca em aproximadamente 10%, criando um erro maior na energia de correlação. A correlação eletrônica é sobreestimada, geralmente por um fator próximo a dois, e as ligações são por consequência sobreestimadas. Para melhorar os resultados, temos de considerar o gás de elétrons não uniforme, e uma correção nas energias de troca e de correlação que dependiam somente da densidade eletrônica, agora dependem, também, das derivadas desta dela. Estes métodos são conhecidos como Correção de Gradiente, ou Expansão de Gradientes Generalizados (GGA - Generalized Gradient Approximation). Existem várias propostas da funcional de correção de gradiente para a energia de correlação. Uma funcional mais popular é devida da Lee, Yang e Parr(LYP) [61-69].

$$\varepsilon_c^{LYP} = -a \frac{\gamma}{(1 + d\rho^{-1/3})} - ab \frac{\rho e^{-c\rho^{-1/3}}}{9(1 + d\rho^{-1/3})\rho^{8/3}}$$

$$\mathbf{x} \left[18(2^{2/3}) C_F (\rho_\alpha^{8/3} + \rho_\beta^{8/3}) - 18\rho t_W + \rho_\alpha (2t_W^\alpha + \nabla^2 \rho_\alpha) + \rho_\beta (2t_W^\beta + \nabla^2 \rho_\beta) \right] \quad (\text{M-19})$$

$$\gamma = 2 \left[1 - \frac{\rho_\alpha^2 + \rho_\beta^2}{\rho^2} \right] \quad (\text{M-19a})$$

$$t_W^\sigma = \frac{1}{8} \left(\frac{|\nabla \rho_\sigma|^2}{\rho_\sigma} - \nabla^2 \rho_\sigma \right) \quad (\text{M-19b})$$

onde a , b , c e d são parâmetros determinados pelos gráficos de dados para o átomo de Hélio. O funcional t_w é conhecido como a densidade de energia cinética local de Weizsacker. O fator gama se torna zero quando todos os spins estão alinhados ($\rho = \rho_\alpha$, $\rho_\beta = 0$), isto é a funcional LYP não prevê qualquer correlação de spins paralelos (a energia de correlação no tripleto de Hélio é zero).

A partir da função hamiltoniana na equação (M-5) e a definição da energia de troca e correlação na equação (M-10), uma ligação exata pode ser feita entre esta energia e o potencial correspondente conectando a referência não-interagente e o sistema real. A equação resultante é denominada de Fórmula de Conexão Adiabática (Adiabatic Connection Formula - ACF) [70]. Desde que a função de onda exata é um determinante de Slater composto de orbitais de KS, neste caso, a energia de troca é exatamente a que é dada pela teoria de Hartree-Fock. Se as orbitais KS são idênticas às orbitais de HF, a troca "exata" é precisamente a energia de troca calculada pelos métodos de Hartree-Fock.

Modelos que incluem trocas exatas são denominadas métodos híbridos, e os nomes Modelos de Conexão Adiabática e parâmetros funcionais de Becke 3 (B3) são exemplos de modelos definidos pela equação (M-20)

$$E_{XC}^{B3} = (1-a)E_X^{LSDA} + aE_X^{exact} + b\Delta E_X^{B88} + E_C^{LSDA} + c\Delta E_C^{GGA} \quad (M-20)$$

Os parâmetros a , b e c são determinados por meio de dados experimentais e dependem da forma escolhida para E_C^{GGA} e têm valores típicos entre $a \sim 0,2$, $b \sim 0,7$ e $c \sim 0,8$, constituindo-se portanto uma forma semi-empírica de tratar o problema.

2.3. A base 6-31G**

Os métodos *ab initio*⁴ tentam obter informações resolvendo a equação de Schrödinger sem apelar para dados experimentais. Atualmente, estes métodos *ab initio* também fazem uso de dados experimentais, mas de uma maneira mais sutil. Existem muitos métodos de aproximação diferentes para resolver a equação de Schrödinger, e para um problema específico previamente escolhido, compara-se com dados experimentais bem estabelecidos. Dados experimentais são guias para a seleção dos modelos matemáticos, ao invés de entrar diretamente no procedimento computacional.

Uma das aproximações inerentes a todos os métodos *ab initio* é a introdução de um conjunto de bases. Expandir uma função desconhecida, tais como uma orbital molecular em um conjunto de funções conhecidas não é uma aproximação, se a base é completa. Entretanto, uma base completa significa que um número infinito de funções deve ser usado, o que é impossível de se realizar na prática. Uma orbital molecular (MO) pode ser imaginada como uma função em um sistema de coordenadas infinita estendida por um conjunto de base completa. Quando uma base finita é usada, somente as componentes da MO ao longo daqueles eixos

⁴ “Primeiros princípios”

coordenados correspondendo a uma base selecionada pode ser representada - menor base, a representação mais pobre. O tipo de funções de base usada também influencia na precisão. Uma função de base simples é capaz de reproduzir a função desconhecida. A menor são funções de base para conseguir reproduzir um dado nível de precisão. Sabendo que o esforço computacional dos métodos *ab initio* aumentam na escala de M^4 pelo menos, é de importância fundamental construir conjunto de bases a menor possível sem que isto comprometa a precisão.

Existem dois tipos de funções de base (também denominadas de orbitais atômicos, AO, embora em geral elas não sejam soluções de uma equação atômica de Schrödinger) comumente usadas nos cálculos de estrutura eletrônica: Orbitais do tipo Slater (STO) e Orbitais do tipo Gaussianas (GTO).

As orbitais do tipo Slater tem a funcional da forma

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r,\theta,\varphi) = N Y_{l,m}(\theta,\varphi) r^{n-1} e^{-\zeta r} \quad (\text{M-21})$$

N é uma constante de normalização e $Y_{l,m}$ são as funções harmônicas esféricas. A dependência exponencial na distância entre o núcleo e o elétron espelha a orbital exata para o átomo de hidrogênio. Entretanto, STOs não tem qualquer nó radial, e estes são introduzindo fazendo-se uma combinação linear de STOs. A dependência exponencial assegura uma convergência rápida com o aumento do número de funções, mas o cálculo das integrais de três e quatro centros de dois elétrons não pode ser feito analiticamente. STOs são usados primariamente para sistemas monoatômicos e diatômicos onde é exigida alta precisão, e nos métodos semi-empíricos todas as integrais de três e quatro centros são desprezadas.

As orbitais do tipo gaussianas podem ser escritas em termos de coordenadas polares ou cartesianas

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r,\theta,\varphi) = NY_{l,m}(\theta,\varphi)r^{(2n-2-1)}e^{-\zeta r^2} \quad (\text{M-22a})$$

$$\chi_{\zeta,l_x,l_y,l_z}(x,y,z) = Nx^{l_x}y^{l_y}z^{l_z}e^{-\zeta r^2} \quad (\text{M-22b})$$

onde a soma dos l_x , l_y , l_z , determina o tipo da orbital (por exemplo, $l_x + l_y + l_z = 1$ é uma orbital tipo p). Embora uma GTO pareça semelhante nos dois conjuntos de coordenadas há uma diferença sutil. Uma GTO do tipo d escrita em termos de funções nas coordenadas esféricas temos cinco componentes ($Y_{2,2}$, $Y_{2,1}$, $Y_{2,0}$, $Y_{2,-1}$, $Y_{2,-2}$), mas ela aparece com seis componentes nas coordenadas cartesianas (x^2 , y^2 , z^2 , xy , xz , yz). Estas seis funções, entretanto podem ser transformadas em cinco funções esféricas d e uma função adicional s ($x^2 + y^2 + z^2$). De maneira semelhante, existem 10 funções cartesianas f que podem ser transformadas em sete funções esféricas f e um conjunto de funções esféricas p. Programas modernos para resolver integrais de dois elétrons são gerados em coordenadas cartesianas, e elas produzem funções esféricas d puras pela transformação das seis componentes das coordenadas cartesianas em cinco funções esféricas. Quando somente uma função d está presente por átomo, o tempo de remoção da função s extra é pequeno, mas se muitas funções d e/ou momentos angulares maiores (funções f, g, h, etc.) estão presentes, este tempo pode ser substancial. Ainda mais, somente o uso de componentes esféricas reduz o problema da dependência linear para grandes conjuntos de bases.

A dependência em r^2 na exponencial torna a GTO inferior a STO em dois aspectos. No núcleo a GTO podem ser escolhidos para formar uma base com inclinação zero, em contraste com a STO que tem uma "cúspide" (derivada descontínua), e as GTOs apresentam problemas na representação do comportamento próximo ao núcleo. O outro problema é que a GTO cai mais rapidamente longe do núcleo comparado com a STO, e o "rabo" da função de onda é representado mais pobremente. Ambas STO e GTO podem ser escolhidas para formar uma base completa, mas as considerações acima indicam que mais GTOs são necessárias para se chegar a um resultado com certa precisão quando comparadas às STOs. Uma guia grosseira é de que são necessárias três vezes mais GTOs do que as STOs para obter-se o mesmo nível de precisão. O aumento do número de funções de base, entretanto, é mais do que compensado por causa de que as integrais necessárias podem ser calculadas. Em termos de eficiência computacional, GTOs são as preferidas e usadas universalmente como funções de base nos cálculos de estrutura eletrônica. E mais, essencialmente todas as aplicações toma as GTOs centradas nos núcleos. Para certos tipos de cálculos o centro de uma função de base pode ser tomada sem coincidir com um núcleo, por exemplo, colocando-a no centro de uma ligação.

2.4. Classificação das funções de Base

Tendo decidido sobre o tipo de função (STO/GTO) e a localização (núcleos), o fator mais importante é o número de função a ser usado. O menor número possível de funções é um conjunto de bases mínima. Somente funções necessárias são empregadas para os elétrons do átomo neutro. Para o hidrogênio e o hélio, isto

significa uma única função s. Para a primeira coluna na tabela periódica significa duas funções s (1s e 2s) e um conjunto de funções p ($2p_x$, $2p_y$ e $2p_z$). Lítio e Berílio exigem formalmente somente duas funções s, mas um conjunto de funções p é usualmente adicionada. Para a segunda coluna, três funções s (1s, 2s e 3s) e dois conjuntos de funções p (2p e 3p) são usadas.

O próximo passo nos conjuntos de base é dobrar todas as funções de base, produzindo uma base do tipo *Duplo Zeta* (DZ - *Double Zeta*). O termo zeta vem do fato de que o expoente das funções de base STO é sempre denotado pela letra ζ . Uma base DZ emprega duas funções s para o hidrogênio (1s e 1s'), quatro funções s (1s, 1s', 2s e 2s') e duas funções p (2p e 2p') para os elementos da primeira coluna, e seis funções s e quatro funções p para os elementos da segunda coluna. A importância de uma DZ sobre uma base mínima pode ser ilustrada considerando a ligação no HCN. A ligação C-H será primariamente formada de uma orbital s do hidrogênio e da orbital p_z do carbono. A ligação π entre o carbono e o nitrogênio consistirá das orbitais p_x (e p_y) do carbono e do nitrogênio. A ligação π terá uma distribuição mais difusa do elétron do que a ligação σ de C-H. O expoente ótimo para a orbital p do carbono será então a menor para a direção x do que para a direção z. Se somente um único conjunto de orbitais p está disponível (base mínima) um compromisso será necessário. Uma base DZ, entretanto, tem dois conjuntos de orbitais p com expoentes diferentes. A função menor (expoente maior) pode entrar na ligação σ do C-H com um grande coeficiente, enquanto que a função mais difusa (expoente menor) pode ser usada para descrever a ligação π de C-N. Uma variação da base tipo DZ somente dobra o número das orbitais de valência, produzindo uma base de valência desdobrada (svb - split valence basis). Em cálculos reais, dobrar as

orbitais centrais raramente serão considerados, e o termo DZ é também usado para o svb.

Essa técnica de aumentar os conjuntos de base é feita até a *Zeta Quintupla* (5Z e não QZ). A *Zeta Tripla* (TZ) contém três vezes mais funções que a base mínima, isto é, seis funções s e três funções p para os elementos da primeira coluna. Algumas das orbitais podem ser salvas com o único trabalho de separar a valência, produzindo uma base de separação tripla de valência.

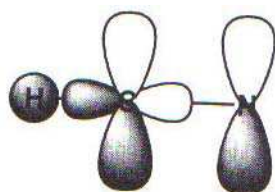


Figura M3. A base dupla Zeta, com diferentes ligações em diferentes direções. [71]

As funções s e p para cada átomo valem para átomos da primeira e segunda colunas. Funções de momentos angulares maiores também podem ser importantes, e são denominadas funções de polarização. Por exemplo, no HCN, a ligação C - H é descrita por uma orbital s do hidrogênio e as orbitais s e p_z do carbono. Entretanto, se um conjunto de orbitais p é acrescentada ao hidrogênio, a componente p pode ser usada para melhorar a descrição da ligação H - C . A orbital p introduz uma polarização da orbital s. Semelhantemente, orbitais d podem ser usadas para polarização das orbitais p, orbitais f para polarização das orbitais d, etc.. Uma vez acrescentada a orbital p a uma orbital s do hidrogênio, pode-se perguntar que a orbital p deva agora ser polarizada pela adição de uma orbital d, que deva ser polarizada por uma orbital f, etc. Para um determinante único das funções de onda, onde a correlação eletrônica não é considerada, o primeiro conjunto de funções de

polarização (isto é, funções p para o hidrogênio e funções d para átomos mais pesados) está longe de ser o mais importante, e serão descritos geralmente pelos efeitos de polarização das cargas.

Dois tipos de correlação eletrônica podem ser identificados, um "in-out" e um "angular". A correlação "in-out" ou radial refere-se à situação onde um elétron está próximo ao núcleo, e o outro longe. Para descrever esta situação, o conjunto de funções de base são do mesmo tipo, mas com expoentes diferentes. A correlação angular refere-se à situação onde dois elétrons estão em lados opostos ao núcleo. As funções de base, neste caso, necessitam ter os mesmos expoentes, mas momentos angulares diferentes. Normalmente, somente as funções de correlação de valência dos elétrons é considerada, e o expoente das funções de polarização devem ser de mesma magnitude das funções de valência s e p .

Combinando um conjunto completo de funções de base, conhecidas como GTO primitivas (Primitive GTO ou PGTO), em um conjunto de funções menores formando combinações lineares conhecidas como conjunto de base contraída, (CGTOs, contracted GTO). As bases contraídas são muito úteis para orbitais descrevendo elétrons interiores, já que eles exigem um número relativamente grande de funções para representar a função de cúspide próximo ao núcleo, e grandemente independente do meio. Isto reduz o custo computacional a precisão é aceitável.

O conjunto de bases STO- nG é uma base mínima onde os expoentes dos PGTOs são determinados pelo "fitting"⁵ das STOs, ao invés de otimização do procedimento variacional. Embora tenham sido usados conjuntos de bases com $n = 2$ a 6 , encontrou-se que usar um número maior do que três PGTOs para representar

⁵ "ajuste"

as STOs aumenta muito pouco a precisão, e a base STO-3G é usada como a base mínima. Este tipo de conjunto de bases tem sido determinadas para muitos elementos da tabela periódica. A designação para a base STO-3G carbono/hidrogênio é $(6s3p/3s) \rightarrow [2s1p/1s]$ Pople e co-autores adotaram uma denominação hoje universal nesta área.

3-21G e 6-31G são bases de desdobramento de valência, onde as orbitais do interior são contraídas em três e seis PGTOs respectivamente, e a parte interior das orbitais é contraída em 2 e 3 PGTOs a valência mais externa é representada por uma PGTO. A designação da base carbono/hidrogênio é $(6s3p/3s) \rightarrow [3s2p/2s]$ A base 3-21G contém o mesmo número de GTOs primitivas quanto à base STO-3G, mas é mais flexível do que esta porque tem duas vezes mais funções de valência que podem ser combinadas livremente para construir as orbitais moleculares (MO). Para a base 6-31 G a designação do carbono/hidrogênio é $(10s4p/4s) \rightarrow [3s2p/2s]$; Em termos de funções bases contraídas ela contém o mesmo número da 3-21G, mas a representação de cada função é muito melhor pois mais PGTOs são usadas.

A base 6-311G separa a valência em três, e onde as orbitais internas são uma contração de seis PGTOs e a valência é dividida em três funções, representadas por três, uma e uma PGTOs, respectivamente.

A cada um destes conjuntos de bases podem ser adicionadas funções difusas e/ou funções de polarização. Funções difusas são normalmente funções s e p , e estas conseqüentemente aparecem antes do G. Elas são denotadas por + ou ++, onde o primeiro + indica um conjunto de funções difusas s e p nos átomos pesados, e o segundo indica que uma função difusa s também está adicionada ao hidrogênio. Os argumentos para adicionar somente funções difusas em átomos que não o hidrogênio é o mesmo que é o usado para adicionar somente funções de

polarização a estes. O hidrogênio costuma ter um papel "passivo", ficando ao final da ligação e não toma parte ativa na propriedade de interesse. Os erros introduzidos pela não inclusão das funções de polarização do hidrogênio são algo constantes, e eles tendem a se cancelar. Também os hidrogênios costumam ser em grande número em um sistema, e eliminar três funções de base para cada hidrogênio é significativo. Se um hidrogênio tem um papel importante nas propriedades de interesse, devemos colocar as polarizações no hidrogênio. Funções de polarização são indicadas após o G, comum à designação separada para átomos pesados e hidrogênio. Assim, 6-31++G(d) é uma base que separa a valência em um conjunto de funções difusas sp para os átomos pesados e uma polarização do tipo do átomo pesado. 6-311++G(2df,2pd) é uma separação de valência tripla nas funções difusas s e duas p e uma d no hidrogênio. O estilo das funções de base padrão Pople é 6-311++G(3df,3pd). Se somente um conjunto de funções de polarização é usada, uma notação alternativa é usada. A base 6-31G* é idêntica à base 6-31G(d), e 6-31G** é idêntica a 6-31G(d,p).

2.5. O método ChelpG

Os métodos descritos acima produzem soluções da equação de Schrödinger mais ou menos acurada. A determinação da energia é o resultado mais natural do cálculo da função de onda eletrônica. Mas, outras propriedades podem ser obtidas. Uma destas propriedades é a carga atômica. Os métodos usados para obter uma carga para um dado átomo podem ser feitos a) particionando a função de onda em termos das funções de base; b) esquema de comparação de dados. Dentre estes métodos, um dos mais populares é o de Mulliken e Löwdin, que apesar de darem

cargas atômicas diferentes, nada indica qual é o melhor método de partição dentre os dois.

A densidade eletrônica (probabilidade de encontrar um elétron) em certa distância \mathbf{r} de uma única orbital molecular contendo um elétron é dada como o quadrado da orbital molecular (MO - molecular orbital)

$$\rho_i(\vec{r}) = \phi_i^2(\vec{r}) \quad (\text{M-23})$$

assumindo que a MO é expandida em um conjunto de funções de base normalizadas, mas não ortogonais, ela pode ser escrita como

$$\phi_i = \sum_{\alpha}^{AO} c_{\alpha i} \chi_{\alpha} \quad (\text{M-24a})$$

$$\phi_i^2 = \sum_{\alpha}^{AO} c_{\alpha i} c_{\beta i} \chi_{\alpha} \chi_{\beta} \quad (\text{M-24b})$$

A integração seguida da soma sobre todos os MOs ocupados obtemos o número total de elétrons N , para as equações (M-24a, M-24b),

$$\sum_i^{MO} \int \phi_i^2 d\vec{r} = \sum_i^{MO} \sum_{\alpha\beta}^{AO} c_{\alpha i} c_{\beta i} \int \chi_{\alpha} \chi_{\beta} d\vec{r} = \sum_i^{MO} \sum_{\alpha\beta}^{AO} c_{\alpha i} c_{\beta i} S_{\alpha\beta} = N \quad (\text{M-24c})$$

Podemos generalizar este resultado introduzindo um número de ocupação (número de elétrons), n , para cada MO. Para o determinante de uma função de onda simples o resultado pode ser 0, 1 e 2, enquanto que ele deve ser um número fracionário para a função de onda correlacionada.

$$\sum_i^{MO} n_i \int \phi_i^2 d\vec{r} = \sum_{\alpha\beta}^{AO} \left(\sum_i^{MO} n_i c_{\alpha i} c_{\beta i} \right) S_{\alpha\beta} = \sum_{\alpha\beta}^{AO} D_{\alpha\beta} S_{\alpha\beta} = N \quad (M-25)$$

A equação (M-26) soma do produto dos coeficientes dos MOs e os números de ocupação é a matriz densidade.

$$D_{\alpha\beta} = \sum_j^{occ.MO} c_{\alpha j} c_{\beta j} \quad (M-26)$$

A soma sobre o produto da densidade e os elementos da matriz de superposição é o número de elétrons. A análise de população de Mulliken [72] usa da matriz \mathbf{DS} para a distribuição dos elétrons nas contribuições atômicas (isto é, OA matriz dos produtos dos elementos e não os elementos do produto da matriz). Um elemento diagonal $\mathbf{D}_{\alpha,\alpha} \mathbf{S}_{\alpha,\alpha}$ é o número de elétrons na orbital atômica α , e um elemento fora da diagonal $\mathbf{D}_{\alpha,\beta} \mathbf{S}_{\alpha\beta}$ ($1/2$) do número de elétrons dividido pelas orbitais atômicos (α e β) (existem os elementos equivalentes $\mathbf{D}_{\beta\alpha} \mathbf{S}_{\beta\alpha}$). As contribuições de todas as AOs localizadas em um dado átomo A deve ser somada sobre um dado número de elétrons associados com este átomo. Isto exige uma decisão em como uma contribuição envolvendo funções de base nos diferentes átomos devem ser divididas. A mais simples, e a mais usada é o esquema de Mulliken, que faz a divisão da contribuição igual entre os dois átomos. A população eletrônica de Mulliken é definida como

$$\rho_A = \sum_{\alpha \in A}^{AO} \sum_{\beta}^{AO} D_{\alpha\beta} S_{\alpha\beta} \quad (M-27)$$

A carga no átomo A é a soma das contribuições eletrônica e nuclear

$$Q_A = Z_A - \rho_A \quad (\text{M-28})$$

Löwdin [73] reescreve a matriz **DS** (equação M-25)

$$\Sigma \mathbf{DS} = N \quad (\text{M-29a})$$

$$\Sigma \mathbf{S}^{1/2} \mathbf{D} (\mathbf{S}^{1/2} \mathbf{S}^{1/2}) = \mathbf{S}^{1/2} N \quad (\text{M-29b})$$

$$\Sigma \mathbf{S}^{1/2} \mathbf{D} \mathbf{S}^{1/2} (\mathbf{S}^{1/2} \mathbf{S}^{-1/2}) = \mathbf{S}^{1/2} N \mathbf{S}^{-1/2} \quad (\text{M-29c})$$

$$\Sigma \mathbf{S}^{1/2} \mathbf{D} \mathbf{S}^{1/2} = N \quad (\text{M-29d})$$

e isto é equivalente a uma análise da população da matriz densidade em um conjunto de bases ortogonalizadas, formadas pela transformação das funções originais por $\mathbf{S}^{-1/2}$.

Apesar de sua ampla utilização devido à rapidez computacional, este método cede lugar a outros devido aos problemas que apresenta e o mais grave é que as funções de base centradas no átomo A devem ter um expoente pequeno de maneira a descrever a função de onda longe do átomo A. Entretanto, a densidade eletrônica é contada somente pertencendo a A. Além disso, os momento de dipolo, quadrupolo, etc não são conservados, isto é, um conjunto de cargas da população atômica não reproduz os momentos originais. Cargas calculadas não convergem a um valor constante quando o tamanho do conjunto de bases cresce. Aumentar as funções de base leva a uma mudança imprevisível nas cargas atômicas. Estes e outros problemas levaram ao desenvolvimento de outros métodos.

2.6. Potencial do campo de forças

Os métodos dos campos de força (FF - Force Field) foram desenvolvidos para simulação de moléculas usando física clássica. Uma parte significativa de interações não ligadas entre moléculas polares é descrita em termos de interações eletrostáticas entre fragmentos tendo uma assimetria na distribuição eletrônica. A interação fundamental é entre o Potencial Eletrostático (ElectroStatic Potential - ESP) gerada por uma molécula (ou fração dela) e uma partícula carregada. O potencial eletrostático à distância r é dada como uma soma das contribuições dos núcleos e da função de onda eletrônica,

$$V_{ESP}(\vec{r}) = \sum_A^{\text{núcleo}} \frac{Z_A}{|\vec{r} - \vec{R}_A|} - \int \frac{|\psi(\vec{r}_i)|^2}{|\vec{r} - \vec{r}_i|} d\vec{r}_i \quad (\text{M-30})$$

A primeira parte deste potencial é calculada trivialmente a partir das cargas nucleares e suas posições, mas a contribuição eletrônica exige um conhecimento da função de onda. Isto não é possível nos métodos de FF, e a maneira mais simples de modelar o potencial eletrostático é assinalar cargas parciais a cada átomo. Cargas atômicas podem ser tratadas como parâmetros regulares de FF, e os valores são determinados a partir de dados experimentais, tais como momentos de dipolo, quadrupolo, octopolo, etc.; mas os dados experimentais raramente são suficientes para permitir um único valor de carga para um dado átomo, ou um sistema de átomos.

A maneira mais usual de obter cargas atômicas parciais em campos de forças é escolher um conjunto de parâmetros que geram o melhor resultado para um

potencial eletrostático real quando comparado com o calculado a partir de uma função de onda eletrônica [74]. O potencial eletrostático vai além das dimensões moleculares (a interação Coulombiana cai com R^{-1} no caso da carga ou com R^{-3} no caso de um dipolo), mas a região mais importante é exatamente há região um pouco além do raio de van der Waals. O potencial é construído a partir de um "grid" de pontos em torno de cada núcleo com distâncias que começam a partir do raio de van der Waals até duas vezes esta distância. Uma construção típica terá algumas centenas de pontos para cada átomo. As cargas atômicas são determinadas de maneira que os parâmetros que reproduzam o potencial eletrostático tão próximo quanto possível nestes pontos, sujeitos aos vínculos de que a soma seja igual á carga molecular total. Em alguns casos, a carga atômica deve também ser obrigada a reproduzir o momento de dipolo. Os vários esquemas de derivar as cargas atômicas diferem no número e localização dos pontos usados nos gráficos, e quais os vínculos adicionais, além da conservação da carga, devem ser acrescentadas.

O potencial eletrostático depende diretamente da função de onda e desta maneira como o conjunto de base converge e como o acréscimo da correlação eletrônica é tratada. Neste sentido, encontra-se que, em geral, o cálculo da carga atômica não necessita de um tratamento sofisticado. Embora a inclusão de cargas em todos os átomos não melhore significativamente os resultados em relação ao com um parâmetro reduzido, o desvio absoluto entre os potenciais eletrostáticos verdadeiro e o calculado pode ser grande.

Os três esquemas para selecionar os potenciais eletrostáticos normalmente usados para criar as entradas para cargas nos cálculos de MM: CHelp [75], CHelpG [37] e Merz-Kollman [76], que utiliza o algoritmo de Connolly [77] para gerar cinco superfícies esféricas de pontos aleatórios ao redor de cada átomo.

2.7. Dinâmica Molecular

Dinâmica Molecular (Molecular Dynamic - MD) é uma forma de simulação computacional onde os átomos e moléculas interagem durante um período de tempo segundo leis físicas conhecidas, fornecendo dessa maneira, uma maneira de visualizar o movimento atômico. Como os sistemas moleculares são constituídos de um número enorme de átomos, é impossível encontrar algumas de suas propriedades utilizando unicamente métodos analíticos, e assim a MD “resolve” esta questão usando métodos numéricos. Podemos entender como um método de experimento virtual, ou ainda como experimento “*in silicum*”⁶.

O método conhecido como dinâmica molecular usa leis e teorias oriundas da matemática, física e química, emprega algoritmos computacionais sendo, portanto essencialmente, um método multidisciplinar. Concebido inicialmente por físicos teóricos na década de 50 do século passado, sua principal aplicação é na área de ciência dos materiais e em biomoléculas.

A modelagem molecular é uma área especializada da dinâmica molecular e/ou simulação computacional baseada na Mecânica Estatística; a principal justificativa do método MD é que as médias no ensemble estatístico são iguais às médias temporais do sistema (hipótese ergódica⁷). A MD também é denominada “mecânica estatística numérica” e obedece à visão de Laplace da mecânica newtoniana da previsão do futuro e das forças da natureza. Esta maneira “Laplaciana” de encarar a natureza é que nos permite ter uma visão do movimento molecular em escala atômica. Simulações longas conduzem a resultados que podem estar errados, devido ao acúmulo de erros na integração numérica

⁶ Experimento computacional.

⁷ As médias no ensemble estatístico são iguais às médias temporais do sistema.

(aproximações). Isto pode ser minimizado com uma seleção de algoritmos e parâmetros cuidadosos, mas que sempre estarão presentes as aproximações.

Existem algumas diferenças nas nomenclaturas usadas por físicos e químicos. Em química e biofísica, a interação entre as partículas é descrita tanto por um “campo de forças” (MD clássica), um modelo quântico ou uma mistura das duas. Estes termos não são usados em física, onde as interações são descritas pelo nome da teoria ou, ainda, pela energia potencial, ou simplesmente potencial. A MD serve como uma ferramenta na determinação da estrutura de proteínas e refinamento dos dados experimentais obtidos em cristalografia de raios-X e de NMR, e, também, na previsão da estrutura das proteínas.

A MD deve levar em conta o poder computacional disponível. O tamanho da simulação depende do número de partículas ⁸, o passo temporal e o tempo total de duração devem ser selecionados tal que o cálculo termine depois de um período razoável, mas de maneira que as simulações sejam longas o suficiente para terem relevância na escala de tempo dos processos naturais em estudo. Para as conclusões terem validade estatística, o tempo da simulação deve refletir a cinética dos processos naturais, isto é, os dados das simulações devem ser de nanosegundos a microsegundos. Em termos de computadores, isto representa dias de CPU (Unidade Central de Processamento) ou meses de CPU.

A solicitação mais intensa da CPU em uma simulação clássica é a evolução do potencial (campo de forças) como uma função das coordenadas internas das partículas. A maior parte deste tempo é usado na parte não ligada ou não covalente. A escala da MD é da ordem de n^2 ($O(n^2)$), onde n é o número de operações, se todos os pares das interações eletrostática e de van der Waals forem calculadas

⁸ Partícula: aqui usamos indistintamente átomos e íons.

explicitamente. Este custo computacional pode ser reduzido usando-se métodos eletrostáticos tais como o método de Ewald ⁹ [78] ($O(n\log(n))$) ou um bom raio de corte esférico), isto é, limitar estas interações dentro de certa esfera da ordem $O(n)$ operações.

Outro fator de impacto no tempo de CPU é o tamanho do passo de tempo da integração. Este é o tempo entre duas evoluções do potencial. O passo do tempo deve ser pequeno suficiente para permitir que os erros da sua discretização sejam desprezíveis (isto é, tão pequeno quanto à frequência de vibração mais rápida do sistema – em geral o átomo de hidrogênio). Estes passos temporais para a MD são da ordem de 10^{-15} segundos. Este tempo pode ser estendido usando-se algoritmo como o SHAKE [3, 45], que fixa as vibrações dos átomos de hidrogênio.

Para a simulação de moléculas em um solvente, uma escolha deve ser feita entre solvente explícito e implícito. Partículas do solvente explícito, tais como os modelos de água TIP3 e SPC/E são calculadas expansivamente pelo campo de forças, enquanto que os solventes implícitos usam a aproximação de campo médio. Apesar do aumento do tempo de CPU, o solvente explícito é essencial para reproduzir as propriedades das moléculas do soluto.

Em todos os tipos de simulações de dinâmica molecular, o tamanho da caixa, isto é, os limites das moléculas da vizinhança, deve ser grande o suficiente para que as condições de contorno possam ser desprezadas. Isto é feito empregando condições periódicas de contorno, onde um lado da simulação “vê” o lado oposto exatamente como sua continuidade, imitando desta forma a realidade que é muito maior do que o modelo pode simular.

⁹ A soma de Ewald foi o primeiro método introduzido para calcular as interações de termos a longa distância em cristais periódicos.

2.7.1. Ensemble Microcanônico (NVE)

No ensemble microcanônico, ou ensemble NVE , o sistema é isolado para mudanças no número de moles (N), no volume (V) e na energia (E). Este ensemble corresponde a um processo adiabático, isto é, sem trocas de calor. Uma trajetória dinâmica neste ensemble pode ser visto como uma troca de energias cinética e potencial, com a conservação da energia total. Para um sistema de n partículas com coordenadas X e velocidades \vec{v} , os pares de equações diferenciais de primeira ordem podem ser escritas como:

$$\vec{F}(x) = -\nabla V(x) = M \dot{\vec{v}}(t) \quad (\text{M-31})$$

onde M é a massa atômica,

$$\dot{V}(t) = \dot{x}(t) \quad (\text{M-32})$$

A energia potencial $V(x)$ do sistema é uma função das coordenadas das partículas X . Ela é conhecida em física simplesmente como potencial ou em química como “campo de forças”. A primeira equação (M-31) é a lei de Newton; a força \vec{F} atuando em cada partícula no sistema pode ser calculada como a negativa do gradiente do potencial $V(x)$.

Para cada passo temporal, cada posição da partícula X e velocidade \vec{v} pode ser integrada com um método como por exemplo, o método de Verlet. A evolução temporal de X e \vec{v} é chamada de trajetória. Dadas às posições iniciais (por exemplo, a partir de informações teóricas) e as velocidades iniciais (a partir de números

aleatórios), podemos calcular todas as posições e velocidades futuras (ou passadas).

A temperatura em MD é uma quantidade estatística. Se há um número suficiente de átomos, a temperatura estatística pode ser estimada da temperatura instantânea, que se encontra igualando-se a energia cinética do sistema a $nk_B T/2$ onde n é o número de graus de liberdade do sistema, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

2.7.2. Ensemble Canônico (NVT)

No ensemble canônico são conservados o número de moles (N), o volume (V) e a temperatura (T). Neste ensemble, a energia de processos exotérmico e endotérmicos são trocados por meio de um termostato. Existe uma variedade de métodos termostáticos para adicionar e remover energia das vizinhanças. A técnica usada pelo programa Gromacs [79] é o termostato de Nosé-Hoover [80, 81] e, também, através da dinâmica de Langevin [82, 83].

2.7.3. Ensemble Isotérmico-isobárico (NPT)

Este foi o ensemble que utilizamos onde o número de moles (N), a pressão (P) e a temperatura (T) são conservadas. Em adição a um termostato, é necessário acrescentar um barostato. O interessante, para o nosso caso, é que as condições de um frasco experimental, no ambiente de laboratório de química, são simuladas, isto é, a temperatura e pressão são mantidas constantes.

A função de partição do ensemble isotérmico-isobárico, pode ser expresso como a função de partição canônica $Z(N,V,T)$ é dada por

$$\Delta(N, P, T) = \frac{1}{V_0} \int_0^{\infty} dV e^{-\beta PV} Z(N, V, T) \quad (\text{ME-1})$$

onde V_0 é constante do volume e β é dada por $\beta = \frac{1}{k_B T}$, T é a temperatura, k_B a constante de Boltzmann, assim $\Delta(N,P,T)$,

$$\Delta(N, P, T) = \frac{1}{V_0 N! h^{3N}} \int_0^{\infty} dV \int dx e^{-\beta(\Pi(x) + PV)} \quad (\text{ME-2})$$

a energia livre de Gibbs G ,

$$G(N, P, T) = -\frac{1}{\beta} \ln \Delta(N, P, T) \quad (\text{ME-3})$$

o volume V

$$V = -kT \left(\frac{\partial \ln \Delta(N, P, T)}{\partial P} \right)_{N,T} \quad (\text{ME-4})$$

a capacidade térmica C_P a pressão constante

$$C_P = \left(\frac{\partial \bar{H}}{\partial T} \right)_{N,P} = k\beta^2 \frac{\partial^2}{\partial \beta^2} \ln \Delta(N, P, T). \quad (\text{ME-5})$$

2.7.4. Algoritmo de Verlet

Este algoritmo desenvolvido pelo físico francês Loup Verlet em 1967, bem como outros métodos numéricos, resolve as equações de movimento de Newton no formalismo de Hamilton para cada incremento de tempo, para isto baseia-se no método de integração de Euler. Num cálculo de MD a avaliação das forças para obtenção das acelerações é o processo que mais consome tempo computacional, pois se efetua a derivada da função potencial. A partir destes cálculos, as acelerações pode ser inseridas nas equações de movimento, que por sua vez indicam as trajetórias de cada um dos átomos analisados. O problema deste método é que somente funciona para funções suaves, ou seja, funções contínuas das posições atômicas.

Para evitar esse tipo de problema, isto é, o incremento dado a cada passo fosse muito impreciso, devido ao fato deste ser muito pequeno comparado à distância entre duas posições. Foi criado o algoritmo de meio-passo a partir de uma modificação do algoritmo básico de Verlet [19]. Então, dando-se passos menores, este algoritmo torna-se menos suscetível a erros e ocupa menos espaço na memória, tornando-o assim mais estável e eficiente.

As velocidades nos meio-passos

$$t + \frac{\delta t}{2} \quad \text{e} \quad t - \frac{\delta t}{2} \quad (\text{M-34})$$

podem ser definidas, desprezando-se os termos de ordem superior, como:

$$v(t_0 + \delta t / 2) = \frac{x(t_0 + \delta t) - x(t_0)}{\delta t} \quad (\text{M-35})$$

e também como:

$$v(t_0 - \delta t / 2) = \frac{x(t_0) - x(t_0 - \delta t)}{\delta t} \quad (\text{M-36})$$

A propagação das posições é obtida destas equações diretamente, de forma que:

$$x(t_0 + \delta t) = x(t_0) + v(t_0 + \frac{\delta t}{2})\delta t \quad (\text{M-37})$$

A equação (M-37) é mais precisa por não lidar com diferenças entre grandes valores, comparados às pequenas variações nas posições atômicas entre t_0 e $t_0 + \delta t$. A maior vantagem deste algoritmo talvez seja o fato de as velocidades aparecerem no cálculo das novas posições, o que torna o sistema acoplável a um banho térmico por correções nas velocidades. Controlar as velocidades, neste caso, significa controlar diretamente, além da energia cinética, também a energia potencial e logo a energia total do sistema, pois o potencial é uma função das posições e a variação destas depende necessariamente das velocidades. Então um tratamento estatístico nos leva a equação do Teorema da Equipartição:

$$\frac{3}{2} N_{at} kT = \left\langle \sum_{i=1}^{N_{at}} \frac{1}{2} m_i v_i^2(t) \right\rangle \quad (\text{M-38})$$

onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, m_i é a massa e v_i é a velocidade.

Pode-se tirar a temperatura T do sistema. O acoplamento a um banho térmico se dá a partir da comparação da temperatura T a cada ciclo de N_{steps} (este número geralmente varia entre 20 e 50 passos, dependendo do número de átomos do

sistema (N_{at}), com uma temperatura de referência T_o .) No caso de haver um desvio ΔT muito grande, na maioria das vezes da ordem de 10% de T_o , então as novas velocidades serão corrigidas por um fator:

$$v_i(t + \frac{\delta t}{2}) = v_i(t - \frac{\delta t}{2}) \sqrt{\left(\frac{T_o}{T}\right)} \quad (M-39)$$

As correções nas velocidades também podem ser muito úteis no início de dinâmicas de modo aliviar tensões localizadas do sistema. As velocidades iniciais são geralmente sorteadas assumindo uma distribuição de Maxwell-Boltzmann, porém átomos com velocidades muito superiores aos demais podem atrapalhar a dinâmica, desta forma, geralmente faz-se necessária uma pequena dinâmica para estabilizar o sistema e então seguir o cálculo.

2.7.5. Soma de Ewald ¹⁰

A soma de Ewald [84] é dada pela energia total eletrostática¹¹ de N partículas com suas imagens periódicas é dado por

$$V = \frac{f}{2} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} \sum_i^N \sum_j^N \frac{q_i q_j}{r_{ij, \vec{n}}} \quad (M-40)$$

q_i e q_j são as cargas, $(n_x, n_y, n_z) = \vec{n}$ é o índice do vetor da caixa, e o asterisco indica que os termos com $i = j$ podem ser omitidos quando $(n_x, n_y, n_z) = (0, 0, 0)$. À distância

¹⁰ Paul Peter Ewald, físico e cristalógrafo alemão, pioneiro em métodos de difração de raios-X

¹¹ Potencial de Coulomb.

$\vec{r}_{ij,n}$ é a distância real entre as cargas e não as imagens mínimas. Esta soma é condicionalmente convergente, mas converge muito lentamente. Introduzindo os termos a seguir a soma torna-se mais rápida.

$$\mathbf{V} = \mathbf{V}_{dir} + \mathbf{V}_{rec} + \mathbf{V}_o \quad (\text{M-41})$$

$$V_{dir} = \frac{f}{2} \sum_{i,j}^N \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta_{r_{ij,n}})}{r_{ij,n}} \quad (\text{M-41a})$$

$\text{erfc}(\beta_{r_{ij,n}})$ é a função de erro complementar.

$$V_{rec} = \frac{f}{2\pi V} \sum_{i,j}^N q_i q_j \sum_{m_x} \sum_{m_y} \sum_{m_z^*} \frac{\exp(-(\pi \vec{m} / \beta)^2 + 2\pi i \vec{m} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j))}{m^2} \quad (\text{M-41b})$$

$$V_o = -\frac{f\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i^N q_i^2 \quad (\text{M-41c})$$

β é o parâmetro que determina o peso relativo para as somas diretas recíproca e $\vec{m} = (m_x, m_y, m_z)$. Dentro deste caso pode-se usar um raio de corte aproximado de 1 nm.

A soma de Ewald foi o primeiro método introduzido para calcular as interações de termos a longa distância para as imagens em cristais periódicos [78].

2.8. Potenciais

Uma dinâmica molecular exige a definição de uma função potencial, ou a descrição de termos pelos quais as partículas simulam a interação das partículas. Este potencial é conhecido como campo de forças. Os potenciais podem ser definidos no nível de exigência da precisão física. Em geral, elas reproduzem mudanças estruturais e conformacionais, mas não podem reproduzir, por exemplo, reações químicas.

A aproximação da descrição quântica para a clássica está baseada em duas aproximações básicas. Uma é a aproximação de Born-Oppenheimer, que estabelece que a dinâmica dos elétrons seja tão rápida, que podem ser consideradas instantâneas em relação ao movimento de seus núcleos, ou, em termos práticos, podemos desprezar o movimento dos elétrons e cuidar unicamente do movimento dos núcleos. Estes, sendo muito mais pesados do que os elétrons, seguem a mecânica newtoniana do ponto material. O efeito dos elétrons é aproximado a uma superfície de energia potencial, representando o estado fundamental.

Muitos dos campos de forças são empíricos e são constituídos de uma soma de forças de ligação constituídos com ligações químicas, ângulos de ligação e ângulos diedrais, e forças não ligadas, associadas às forças de van der Waals e da carga eletrostática. Potenciais empíricos representam efeitos quânticos como um caso limite através de aproximações “*ad hoc*”¹². Estes potenciais, contém parâmetros livres tais como cargas atômicas, parâmetros de van der Waals que refletem raios atômicos estimados, tamanho da ligação de equilíbrio, ângulos e ângulos diedrais. Eles são obtidos através do gráfico obtido de cálculos eletrônicos

¹² A expressão latina **ad hoc** significa literalmente *para isto*, por exemplo, um instrumento *ad hoc* é uma ferramenta elaborada especificamente para uma determinada ocasião ou situação (“cada caso é um caso”). Num senso amplo, poder-se-ia traduzir *ad hoc* como *específico* ou *especificamente*.

através de simulações quânticas ou propriedades físicas experimentais tais como constantes elásticas e medidas espectroscópicas.

As ligações de natureza não local das interações não ligadas (elétricas e de van der Waals) envolvem todas as partículas do sistema. Aqui está um dos grandes problemas das simulações de MD. Para diminuir o custo computacional, empregamos uma série de aproximações, dentre as quais destacamos o raio de corte, algoritmos de campos de reação e a soma de Ewald [84]. Nas simulações de MD, as ligações entre os átomos não podem ser quebradas (ligações covalentes) e assim as reações químicas não podem ser simuladas explicitamente.

As funções potenciais representando a energia não ligada são formuladas como uma soma sobre interações entre as partículas do sistema. A energia potencial total é calculada como a soma de todas as interações dos pares de partículas, é o método usado. Um exemplo do uso deste método é o potencial de Lennard-Jones, V_{LJ} entre dois átomos,

$$V_{LJ}(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \quad (\text{P-1})$$

usado para o cálculo das forças de van der Waals,

$$\vec{F}_i(\vec{r}_{ij}) = \left(12 \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - 6 \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \right) \frac{\vec{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (\text{P-2})$$

Uma aproximação muito usada é a de átomo unido, isto é, a substituição de alguns grupos de átomos, por um único “átomo”. Por exemplo, CH₂ é um grupo constituído de um carbono e dois hidrogênios. Este grupo é substituído por um único

“átomo”, com a massa combinada dos átomos, carga aproximada a do conjunto e colocado na posição ocupada pelo carbono.

2.8.1 Anatomia do campo de forças na MM e a descrição dos potenciais

Modelagem Molecular Clássica é a que está implementada no pacote computacional GROMACS 3.3.1 (*Groningen Machine for Chemical Simulations*) que utilizamos nos cálculos de dinâmica molecular.

Neste modelo consideram-se o comportamento dos átomos como esferas e as ligações como molas. Matematicamente a deformação causada na mola é tratada usando-se a Lei de Hooke, tratada de modo adequado nas ligações de *estiramento*, *angular*, *diedral impróprio* e *torção*.

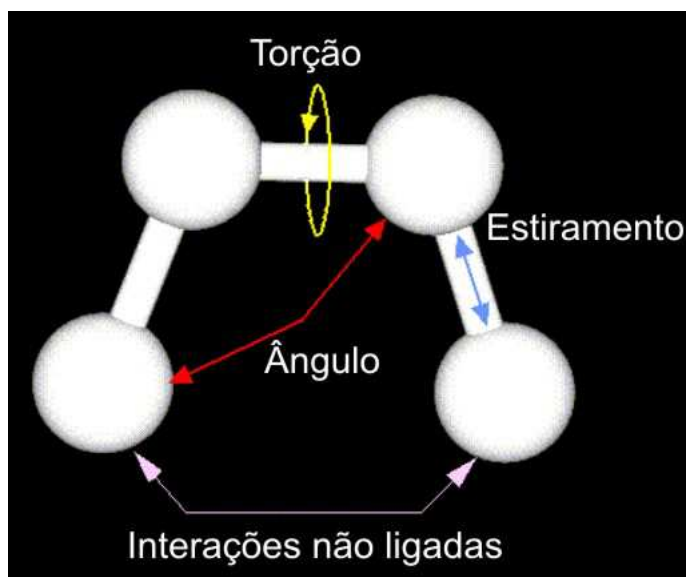


Figura P1. Representação dos potenciais a serem consideradas. Átomos ligados e átomos não ligados.

Na MM descrevemos a energia H na forma Hamiltoniana como a soma da energia cinética com a potencial $V(\vec{R})$, sendo que esta parte potencial é descrita

pela soma de um conjunto de termos representando cada tipo de potencial apresentado na molécula:

$$\mathbf{V} = \mathbf{V}_{\text{ligados}} = \mathbf{V}_{\text{estiramento}} + \mathbf{V}_{\text{angular}} + \mathbf{V}_{\text{impróprio}} + \mathbf{V}_{\text{torção}} \quad (\text{P-3})$$

$$V_{\text{ligados}}(\vec{R}) = \sum_{\text{estiramento}} k_l (l - l_0)^2 + \sum_{\text{angular}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{impróprio}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{torção}} A_n [1 + \cos(n\phi - \theta_0)] \quad (\text{P-3a})$$

$$\mathbf{V} = \mathbf{V}_{\text{não-ligados}} = \mathbf{V}_{\text{van der Waals}} + \mathbf{V}_{\text{Coulomb}} \quad (\text{P-4})$$

$$V_{\text{não-ligados}}(\vec{R}) = \sum_{i < j} \left(\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}} \right) \quad (\text{P-4a})$$

Em resumo, os termos da equação acima podem ser divididos em dois grupos de potenciais: os ligados (covalentes), tratados pela lei de Hooke apropriada e os não-ligados (não-covalentes) que são ligações de longo alcance, de Lennard-Jones e eletrostáticos.

Aplicamos a lei Hooke, usada para descrever oscilações, isto se deve, ao fato de os átomos oscilarem próximos a um valor de equilíbrio. Fazem parte deste potencial os termos da equação [P-3, P3a].

a. O termo $\mathbf{V}_{\text{estiramento}}$ representa a energia necessária para comprimir ou alongar as ligações químicas do tipo covalente, ou seja, depende diretamente do raio entre um átomo e o outro (Figura P1). A equação matemática para esta energia

potencial é dada, para uma molécula, como a soma das energias potenciais de todos os primeiros vizinhos de cada átomo da mesma, ou seja, todos os átomos j diretamente ligados a cada átomo i . Pois, à temperatura ambiente, os comprimentos das ligações químicas devem oscilar próximos ao seu valor de equilíbrio, obedecendo a uma função aproximada à lei de Hooke, como mostra a equação abaixo:

$$V_{\text{estiramento}} = \sum_{1,2} V_{\text{estiramento},ij} = \frac{1}{2} k_{IJ} (l_{ij} - l_{ij}^0)^2 \quad (\text{P-5})$$

onde I e J representam quais tipos de átomos estão sendo ligados, ou seja, representam valores de referência para os átomos i e j da ligação. Note que a constante de força k_{IJ} e o comprimento de referência l_{ij}^0 , são valores fixos para cada tipo de ligação. A constante de Hooke (k_{IJ}) pode ser calculada, por exemplo, analisando-se o espectro de absorção de infravermelho da molécula, comparando-o com as energias potenciais obtidas para cada estado vibracional, utilizando-se a equação de Schroedinger.

b. O termo V_{angular} é a contribuição na energia potencial que representa o ângulo entre as ligações, como na Figura P1.

Este termo é dado para a molécula, como sendo a soma de todas as energias potenciais $V_{\text{angular},ijk}$ possíveis na interação de cada átomo i com os seus dois primeiros vizinhos j e k , onde:

$$V_{\text{angular},ijk} = \frac{1}{2} k_{IJK} (\theta_{ij} - \theta_{IJK}^0)^2 \quad (\text{P-6})$$

com k_{IJK} é a constante de restituição do ângulo de equilíbrio θ_{IJK}^0 .

c. O termo $V_{\text{impróprio}}$. Para representar, e manter a estrutura tridimensional de alguns agrupamentos de átomos da molécula, temos a contribuição no potencial devido ao ângulo diedral impróprio, $V_{\text{impróprio}}$, que nos mostra a contribuição, na energia potencial, do ângulo ω de desvio de um plano, formado pelos átomos i, j, k , em relação ao outro, formado pelos átomos j, k, l .

Então para representarmos matematicamente a energia potencial, devemos somar todos os potenciais de cada par de planos, com a equação para representar cada um destes potenciais de Hooke, como sendo do tipo:

$$V_{\text{impróprios}} = \frac{1}{2} k_{\text{impróprios}} \omega_{\text{impróprios}}^2 \quad (\text{P-7})$$

onde, $k_{\text{impróprio}}$ é uma constante parametrizada a partir de valores empíricos.

d. $V_{\text{torção}}$ é o termo da contribuição torcional, que representa os movimentos harmônicos em torno das ligações químicas, como mostra a Figura P1. Ele descreve simetria rotacional pelas barreiras e mínimos de energia para a torção de cada ligação química com liberdade de rotação, sendo dado matematicamente como a soma dos potenciais de todos os possíveis ângulos de torção da molécula $V_{\text{torção},ijkl}$, que por sua vez é dado por:

$$V_{\text{diedraisimpróprios},ijkl} = \frac{1}{2} [V_1(1 + \cos \varphi) + V_2(1 - \cos \varphi) + V_3(1 + \cos 3\varphi) + \dots] \quad (\text{P-8})$$

onde φ é o ângulo diedral próprio e V_1 , V_2 , V_3 são parâmetros definidos dependendo de quais tipos de átomos são i , j , k e l .

2.9. Abordando as ligações de Hidrogênio

A chamada ligação de hidrogênio (LH) desempenha um papel fundamental em muitos processos biológicos, especialmente em reações catalisadas por diversas enzimas. A compreensão do funcionamento e a função da água em sistemas biológicos é fundamental para o entendimento de processos que estão ocorrendo entre a nossa molécula a BZC e a água, ou seja, a forma como soluto interage com o solvente.

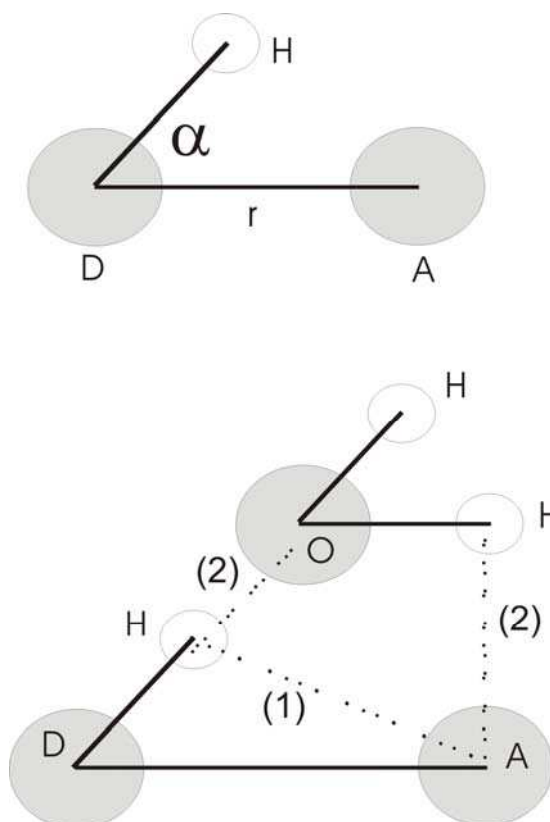


Figura H1. Representação da ligação de hidrogênio. (1) Ligação de hidrogênio entre dois resíduos. (2) Ligação de hidrogênio entre resíduo e água. D é o doador e A receptor. [84]

Ligações de hidrogênio (LH) são ligações formadas pelo recobrimento de um par eletrônico de um átomo de oxigênio com a carga positiva de um átomo de hidrogênio. As energias destas LH encontram-se na faixa de -15 a -5 kcal/mol e a distância entre os átomos de oxigênio e de hidrogênio $r_{HB} \leq 3,5 \text{ \AA}$, e o ângulo formado entre o átomo de hidrogênio e oxigênio $\alpha_{HB} \leq 30^\circ$. A presença de uma ou mais moléculas nesta distância é mostrada pela função de distribuição radial que indica a possibilidade formação desse tipo de ligação.

Mas as ligações de hidrogênio, elas existem?

Como ocorrem aproximações de moléculas de água, com o resíduo, estas ligações existem por certo intervalo de tempo, calculado pela função de auto correlação $C(\tau)$. [84]

O tempo de vida de uma ligação de hidrogênio é calculado pela medida sobre todas as funções de auto correlação para funções existentes (tanto para zero ou um) para todas as ligações de hidrogênio:

$$C(\tau) = \langle s_i(t)s_i(t+\tau) \rangle \quad (\text{H-1})$$

com $s_i(t) = \{0, 1\}$ para ligações de hidrogênio de i até o tempo t . A integral sobre $C(\tau)$ é um valor simples estimado do tempo de vida das ligações de hidrogênio τ_{HB} :

$$\tau_{HB} = \int_0^{\infty} C(\tau) d\tau \quad (\text{H-2})$$

Ambos a integral a função completa de auto correlação $C(\tau)$ pode ser extraída, assim uma análise mais sofisticada (exemplo: usando um ajuste multi-exponencial) pode ser usado para obter uma melhor aproximação do τ_{HB} .

Na prática a as funções de correlação calculam com dados baseados em discretos intervalos Δt , assim a função de auto correlação simulada é dada por:

$$C_f(j\Delta t) = \frac{1}{N-j} \sum_{i=0}^{N-1-j} f(i\Delta t)f((i+j)\Delta t) \quad (\text{H-3})$$

para um τ_f

$$\tau_f = \int_0^{\infty} C_f(\tau)d\tau \quad (\text{H-4})$$

onde N é o número de passos a ser realizados no cálculo.

2.10. Função de distribuição radial $g(r)$

Qual a importância do $g(r)$? Conhecendo claramente a função de distribuição radial de cada átomo, grupo de átomos, em relação à densidade de átomos de Oxigênio (O) ou átomos de Hidrogênio (H), próximos ao soluto, pode-se verificar as afinidades possíveis para ligações de hidrogênio do solvente com o soluto.

A função de distribuição radial (RDF), também conhecida como RDF¹³. Especificamente, é a probabilidade de encontrar uma partícula a uma distância de r

¹³ É uma medida para determinar a correlação entre partículas de um sistema.

até $r + dr$ afastada de uma determinada partícula de referência, isto é, quantas partículas possíveis podem ser encontradas nesta região distante r até $r + dr$. [85]

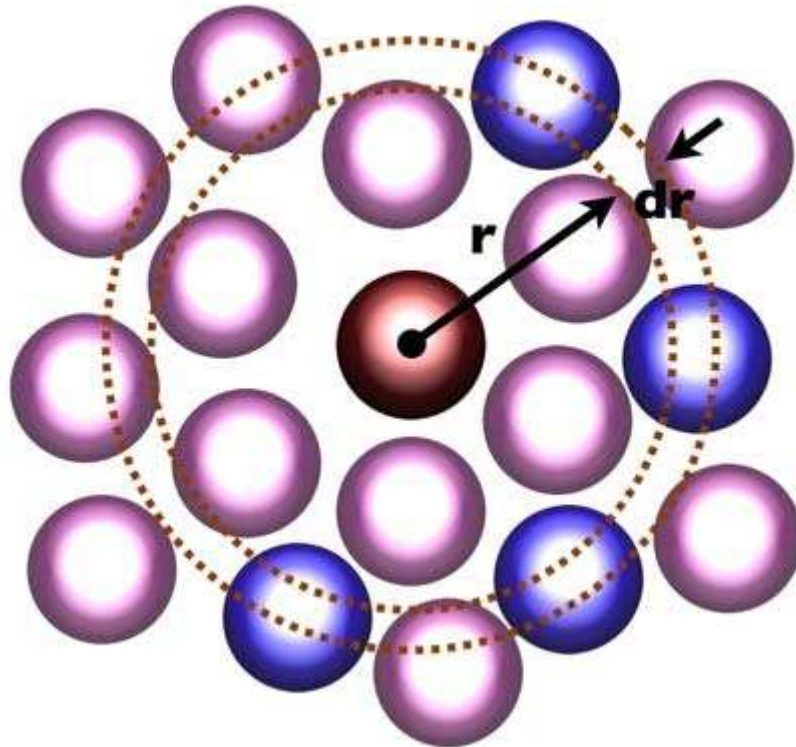


Figura G1. Figura ilustrando a capa de hidratação (em nosso caso), de encontrar uma determinada molécula de água, a partir da partícula de referência, representada aqui na cor vermelha, no centro da figura, e na cor azul as partículas que estão na capa, pontilha em vermelho da figura, localizada a uma distância r até $r + dr$. [85]

A RDF é usualmente determinada calculando a distância de todos os pares de partículas distantes r até $r + dr$, exibindo estes através de um histograma. Este histograma é então normalizado com um respectivo líquido ou gás ideal, onde as partículas são correlacionadas. Tridimensionalmente, esta normalização é a densidade de um sistema multiplicado pelo volume da casca esférica, que matematicamente pode ser expresso por $N(r) = 4\pi r^2 \rho dr$, onde ρ é a densidade.

A função de distribuição radial é definida pela equação (G-1) [86] e [87]

$$g_{AW}(\vec{r}) = \frac{n_w(\vec{r})V}{\Delta V N_w} \quad (\text{G-1})$$

onde A corresponde aos átomos do soluto e w, aos átomos de hidrogênio (Hw) ou de oxigênio (Ow) das moléculas de água; $n_w(r)$ é o número médio de átomos W encontrados no volume ΔV a uma distância r do átomo A. V é o volume total do sistema que contém N_w átomos do tipo w.

O número de hidratação é o número de moléculas de água presente na primeira camada de solvatação do átomo. Uma vez que

$$\frac{N_w}{V} g_{AW}(\vec{r}) \quad (\text{G-2})$$

representa o número de moléculas de água a uma distância r de A, o número de hidratação, N_h [86] e [87], será a integral:

$$N_h = \frac{N_w}{V} 4\pi \int_0^{r_{\min}} g_{AW}(\vec{r}) r^2 d\vec{r} \quad (\text{G-3})$$

onde r_{\min} é a posição do primeiro mínimo de $g_{AW}(r)$, que identifica a espessura da camada de hidratação.

Então a função de distribuição radial $g(r)$, nos dá a probabilidade, pela mecânica estatística, de encontrarmos uma capa de hidratação (moléculas de água que se aproximam) ao redor de um átomo ou grupo de átomo. Quando o valor da função de distribuição radial $g(r)$ é menor que 1 (um), ($g(r) < 1$), este átomo ou grupo

de átomos é caracterizado por apresentar propriedades hidrofóbicas, e do contrário quando o valor da função de distribuição radial $g(r)$ é maior que 1 (um), ($g(r) > 1$), hidrofílicas.

Quando $g_{AW}(r)$ apresenta um pico nas regiões apropriadas e N_h maior que 0,1, sugere-se a possibilidade de existência de uma LH, ou não, pela distribuição de energia correspondente.

De modo geral a $g(r)$ é calculada como descrito anteriormente, mas o programa Gromacs utilizado em nossa MD vai mais além à precisão, utilizando a função $\delta(r_{ij} - r)$ que irá considerar os átomos que estão na extremidade de $r + dr$, além de calcular a $g_{AB}(r, \theta)$. A função de distribuição radial (RDF) ou função correlação de par $g_{AB}(r)$ entre partículas dos tipos A e B é definido do seguinte modo:

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \quad (G-4)$$

$$g_{AB}(r) = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (G-5)$$

com $\langle \rho_B(r) \rangle$ a densidade da partículas do tipo B até a distância r ao redor da partícula A com raio r_{max} (ver Figura G2).

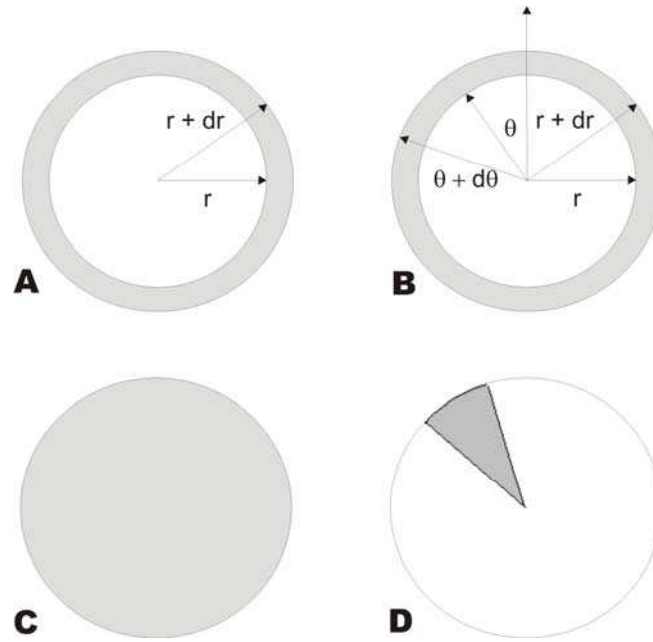


Figura G2. Definição das fatias do g_rdf (função $g(r)$ utilizada pelo Gromacs): A. $g_{AB}(r)$. B. $g_{AB}(r, \theta)$. A fatia está representada em cinza. C. Normalização de $\langle \rho_B \rangle_{local}$. D. Normalização de $\langle \rho_B \rangle_{local, \theta}$. Normalização do volume está representada em cinza.

Usualmente o valor de r_{max} é de meio comprimento da caixa. Calculando a média em função do tempo. Na prática a análise do programa g_rdf divide o sistema dentro de fatias esféricas (de r até $r + dr$, Figura Xa), e faz um histograma fixando um uma função δ . Com g_rdf também é possível calcular o ângulo dependente de RDF $g_{AB}(r, \theta)$, quando o ângulo θ é definido em relação a um determinado eixo e, Figura XB.

$$g_{AB}(r, \theta) = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local, \theta}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A}^{N_A} \sum_{j \in B}^{N_B} \frac{\delta(r_{ij} - r) \delta(\theta_{ij} - \theta)}{2\pi r^2 \sin(\theta)} \quad (G-6)$$

$$\cos(\theta_{ij}) = \frac{\vec{r}_{ij} \cdot \vec{e}}{\|\vec{r}_{ij}\| \|\vec{e}\|} \quad (G-7)$$

O $g_{AB}(r, \theta)$ é usualmente utilizado para analisar sistemas anisotrópicos. Note que neste caso a normalização $\langle \rho_B \rangle_{local, \theta}$ é a densidade média em todas as fatias de ângulos de θ até $\theta + d\theta$ acima de r_{max} , para o ângulo dependente.

Mas a $g(r)$ também é importante para calcular propriedades termodinâmicas, usando a Lei de distribuição de Boltzmann,

$$g(\vec{r}) = e^{-\phi(\vec{r})/KT} \equiv e^{-H(\vec{q}, \vec{p})/KT} \quad [88] \quad (G-8)$$

se $\phi(\vec{r}) = 0$ (zero) para todo \vec{r} , isto é, se as moléculas não exercem influência uma sobre as outras, $g(r) = 1$ para todo \vec{r} . Tem-se que a Hamiltoniana é dada por

$$H(\vec{q}, \vec{p}) = \sum_{i=1}^n (\vec{p}_i^2 / 2m) \quad (G-9)$$

e apropriada expressão para a função de partição $Q_N(V, T)$ no ensemble canônico, será

$$Q_N(V, T) = \frac{1}{N! h^{3N}} \int e^{H(\vec{q}, \vec{p})/KT} d^{3N} \vec{q} d^{3N} \vec{p} \quad (G-10)$$

a RDF é de grande importância dentro da termodinâmica para quantidades termodinâmicas macroscópicas, sendo que estas podem ser calculadas usando a $g(r)$, como exemplo, a *equação de virial* para a pressão:

$$P = \rho K_B T - \frac{2}{3} \pi v^2 \int_0^\infty d\vec{r} \frac{du(\vec{r})}{d\vec{r}} r^3 g(\vec{r}) \quad (\text{G-11})$$

onde $u(\vec{r})$ é o par potencial, ρ é número de densidade, K_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura.

3. RESULTADOS, DISCUSSÕES E ANÁLISES

3.1. Cargas e estrutura obtidas

Para mostrar os resultados obtidos, é apresentada uma pequena introdução da estrutura da BZC e suas cargas calculadas através do cálculo quântico e aplicadas no cálculo clássico. Na seqüência apresentamos a estrutura da BZC, com a posição, numeração e cargas dos átomos obtidas após o cálculo quântico, assim como uma tabela de cargas obtidas no cálculo quântico, para cada átomo ou grupo de átomos.

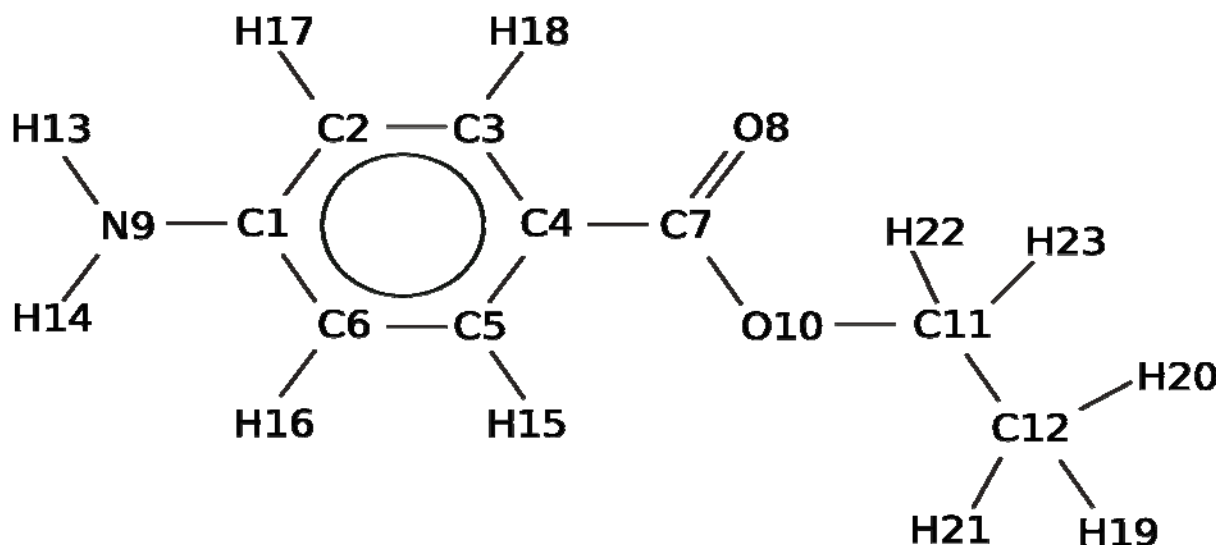


Figura C1. Estrutura da BZC utilizada no cálculo quântico, com a respectiva numeração dos átomos utilizada. As cargas são dadas pela Tabela C1.

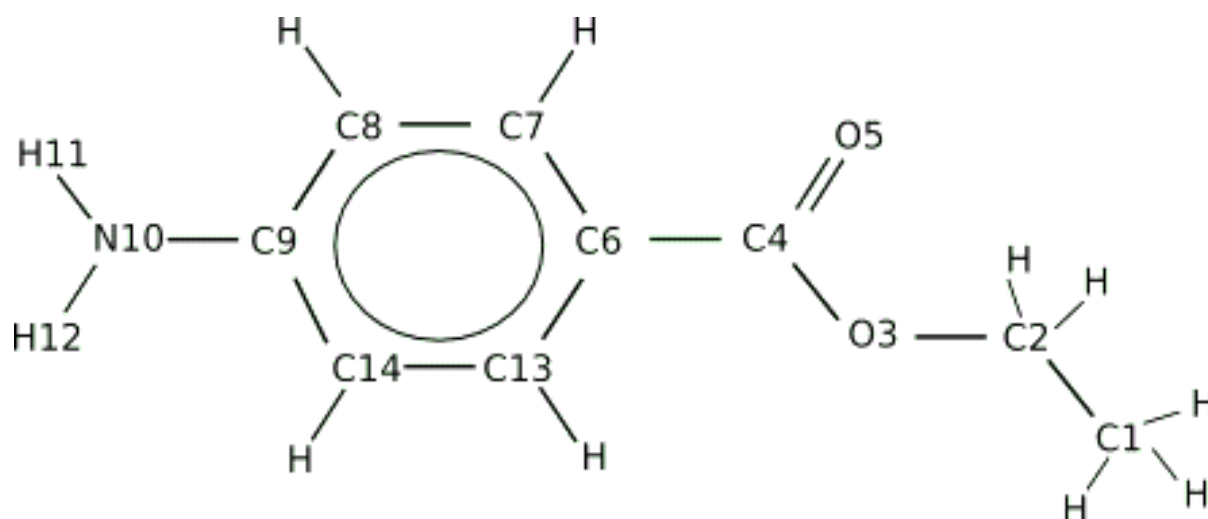


Figura C2. Estrutura da BZC, utilizada como entrada do Gromacs [26], para o cálculo clássico, com a respectiva numeração dos átomos utilizados. Esta numeração dos átomos é utilizada como padrão, para os cálculos e análises na MD.

A Figura C1 representa a estrutura da BZC, obtida através do cálculo quântico, no qual podemos encontrar suas respectivas cargas na Tabela C1, colocada aqui para uma melhor visualização da numeração dos átomos, bem como através da Figura C3, esta com a estrutura, numeração e cargas.

A Tabela C2 serve como referência de comparação entre os respectivos átomos das Figuras C1 e C2, com equivalência de cargas.

Segue a Tabela C1, com as cargas obtidas através do cálculo quântico, de acordo com a Figura C1.

Cargas obtidas através do cálculo quântico

Átomo	Carga e (u.e.c.)	Átomo	Carga e (u.e.c.)
C1	0,409661	H13	0,348409
C2	-0,269957	H14	0,345254
C3	-0,020567	H15	0,087154
C4	-0,143842	H16	0,129817
C5	-0,037112	H17	0,130774
C6	-0,261077	H18	0,093244
C7	0,644199	H19	0,070265
O8	-0,523816	H20	0,072454
N9	-0,801297	H21	0,047727
O10	-0,415491	H22	-0,003882
C11	0,331889	H23	0,001318
C12	-0,235122		

Tabela C1. Cargas dos átomos após cálculo quântico, como mostra a Figura C1, para estrutura da BZC. Quanticamente, usamos cálculos da Teoria do Funcional Densidade (DFT)/B3LYP [31-34], na base 6-31 G** [35, 36]. O método para determinação das cargas foi o ChelpG [37].

Tabela de equivalência de Estrutura Quântica e Clássica com as cargas

Átomo ou Grupo de átomos (Figura C2)	Átomos da Tabela C1 (Figura C1 ou C3)	Carga e(u.e.c.)
C1 c/ 3 hidrogênios (Grupo CH3)	C12 + H19 + H20 + H21	-0,044676
C2 c/ 2 hidrogênios (Grupo CH2)	C11 + H22 + H23	0,329325
O3	O10	-0,415491
C4	C7	0,644199
O5	O8	-0,523816
C6	C4	-0,143842
C7	C3 + H18	0,072677
C8	C2 + H17	-0,139183
C9	C1	0,409661
C13	C5 + H15	0,050042
C14	C6 + H16	-0,131260
N10	N9	-0,801297
H11	H13	0,348409
H12	H14	0,345254

Tabela C2. Equivalência da estrutura obtida pelo cálculo quântico (Figura C1), com a de entrada no programa Gromacs [84], cálculo clássico, (Figura C2). A primeira coluna representa os átomos de acordo com a Figura C2, observando como exemplo o grupo CH3, é formado pelo carbono C1 com três hidrogênios, o grupo CH2, é formado pelo carbono C2 com dois hidrogênios. A segunda coluna representa os átomos da Figura C1 ou C3, como o grupamento CH3, equivale aos átomos, C12 + H19 + H20 + H21 da Figura C1. A terceira coluna representa a carga equivalente dos átomos ou grupo de átomos da Figura C2 e C1.

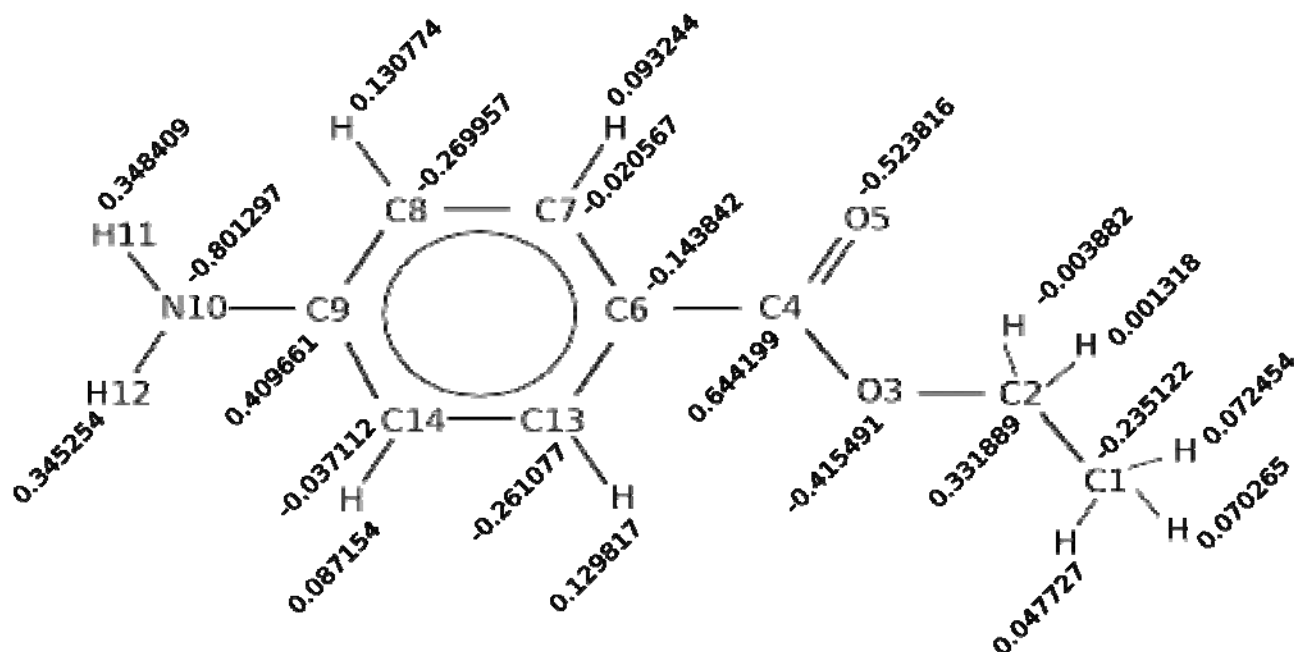


Figura C3. Estrutura da BZC obtida através do cálculo quântico com a respectiva posição, numeração e carga de cada átomo em e(u.e.c.). Esta numeração dos átomos é utilizada como padrão, para os cálculos e análises na MD.

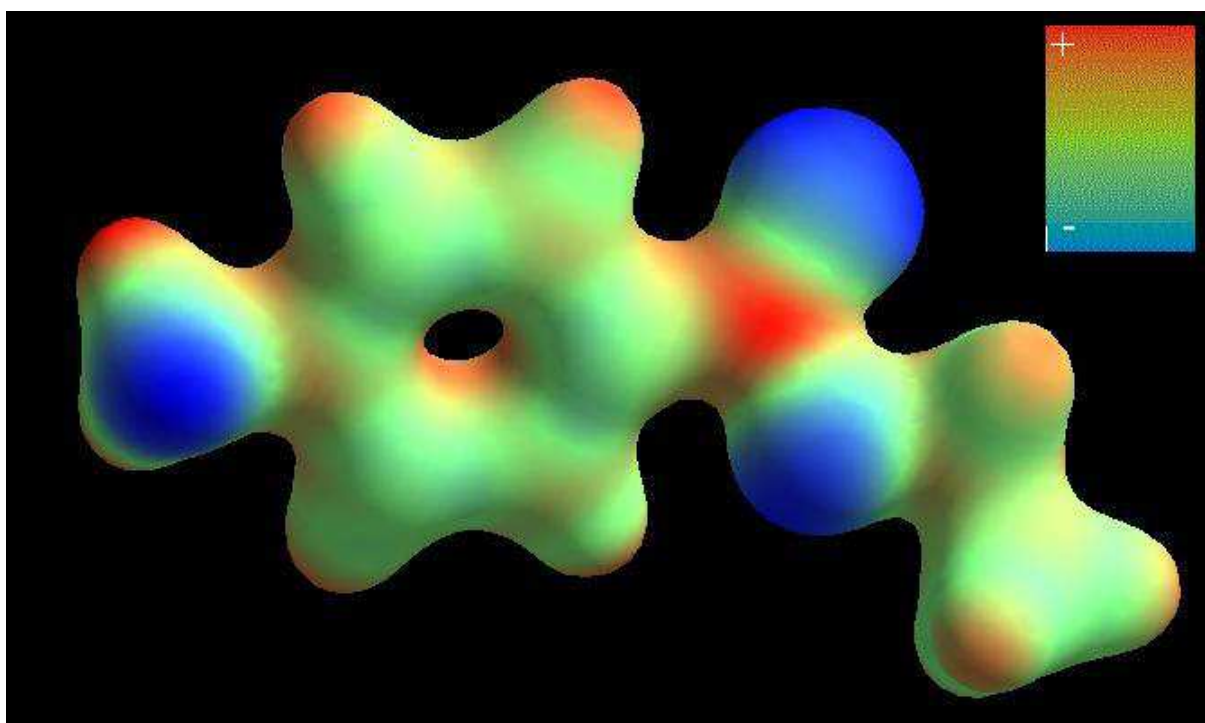


Figura C3a. Estrutura tridimensional da BZC com a distribuição de cargas. Em dégradé, carga negativa em azul, indo ao vermelho positivo.

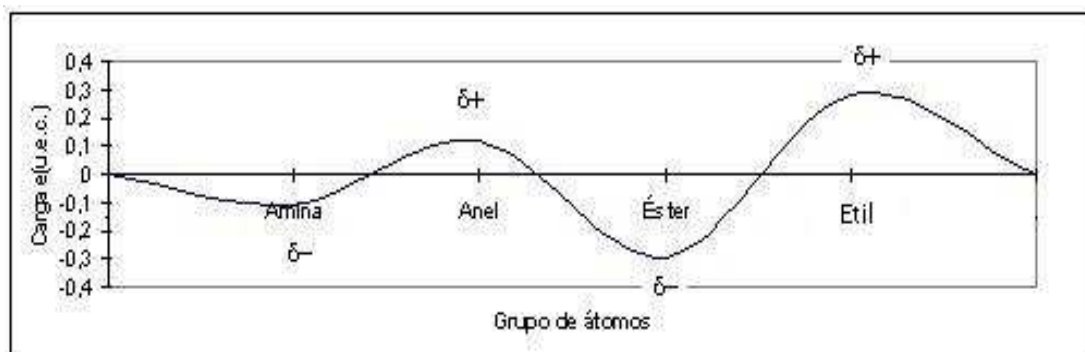


Figura C4. Gráfico representando as cargas dos respectivos grupos de átomos da BZC, Figura I1. O grupo amina tem um δ^- (carga $-0,108e$) de pequena intensidade, o anel um δ^+ (carga $+0,118e$) de pequena intensidade, o éster com um δ^- (carga $-0,295e$) de intensidade aproximadamente três vezes maior que o terminal amina e o grupo etil com um δ^+ (carga $+0,285e$) aproximadamente 2,5 vezes maior que o anel.

Amina	Anel	Éster	Etil
- 0,107634 e	+ 0,118095 e	- 0,295108 e	+ 0,284649 e
(-) Negativa	(+) Positiva	(-) Negativa	(+) Positiva

Tabela C3. Cargas dos respectivos grupos da BZC, Figura I1. Tem-se alternadamente grupos com cargas negativas e positivas. Esta tabela foi adicionada para facilitar a visualização dos valores da Figura C4.

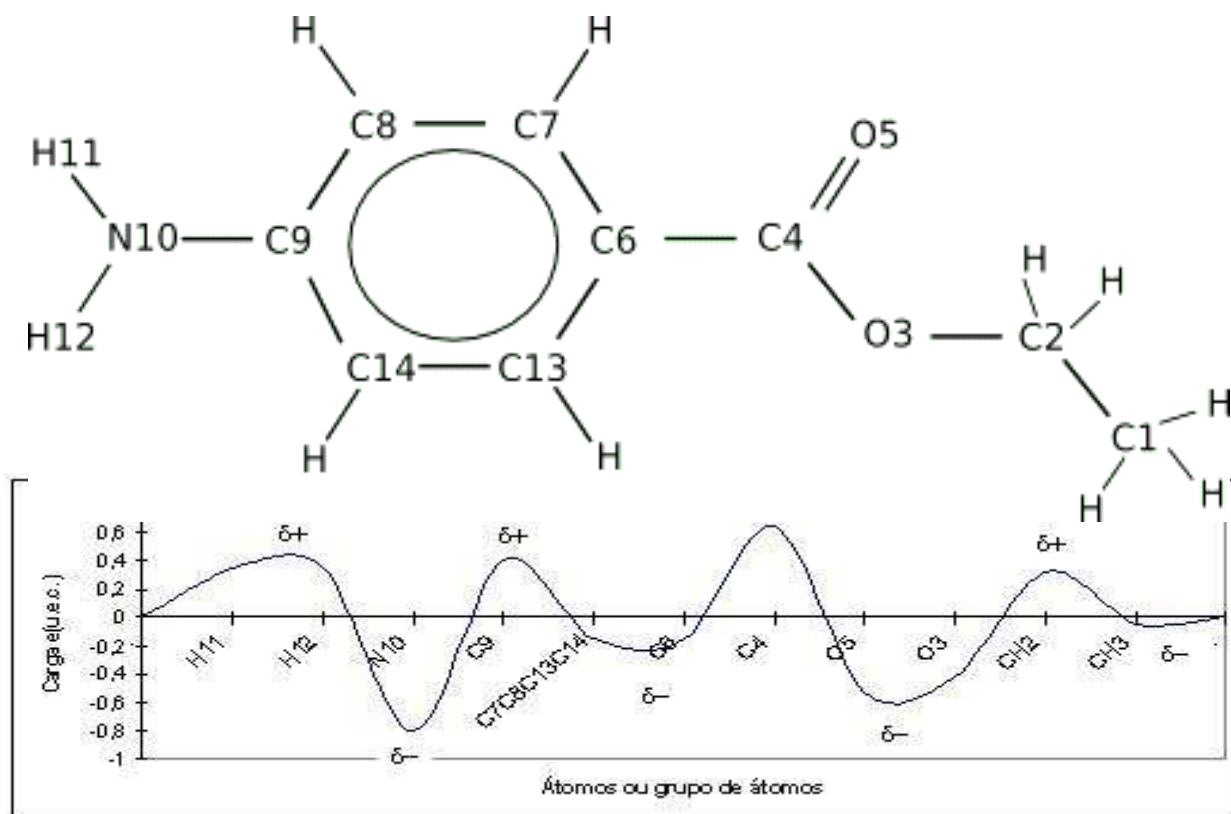


Figura C5. Gráfico da Figura C3a no plano, representando as cargas dos respectivos átomos ou pequenos grupos de átomos, como os C7_C8_C13_C14 pertencentes ao anel da BZC. Tem-se alternadamente δ^- e δ^+ por toda a extensão da molécula da BZC.

A partir de agora todas as análises terão como padrão a numeração dos átomos representados pelas Figuras [I1, C3a, C3] esta última apresenta as cargas de cada átomo.

3.2. A molécula da benzocaína (BZC) em meio aquoso

Recordando que utilizamos quanticamente o (DFT)/B3LYP [31-34], onde os cálculos da estrutura geométrica e a distribuição das cargas elétricas da molécula foram feitos usamos o campo de reação de Onsager [38-42]. A determinação das

cargas o ChelpG [37], com a base utilizada 6-31 G** [35, 36]. Os dados obtidos nos cálculos quânticos foram utilizados para modificar o campo de forças original e criarmos um campo específico para a simulação da BZC.

A MD foi realizada em uma caixa cúbica contendo 4618 moléculas de água, no ensemble NPT, com pressão de 1 (um) bar e temperatura de 300K. O modelo de água utilizado foi o SPC-216 [43]. Condições periódicas de contorno foram utilizadas para evitar problemas de superfície. O solvente foi inicialmente colocado no centro da caixa de água. Para reduzir as tensões iniciais, foi feita a minimização da energia, que serviu de passo inicial para uma dinâmica de 5,0 ns. As interações de longo alcance foram limitadas a 0,9 nm para Coulomb e 1,0 nm de distância (raio de corte) para van der Waals. Quando usamos um raio de corte geramos um ruído, e isto foi evitado usando a soma de Ewald [44, 45].

A análise dos resultados foi feita com o auxílio da função de distribuição radial $g(r)$ ¹⁴, seção 2.9. O inverso desta função nos fornece a força de interação entre os pares considerados. Um valor maior do que a unidade (a função foi normalizada a um) indica que a molécula é hidrofílica e menor do que um, ela é hidrofóbica. O potencial de interação entre as moléculas do nosso soluto – BZC – e as moléculas de água é dado pela equação (M-2). Esta equação está ligada ao potencial de Helmholtz [46, 47], para descrever a energia de solubilidade de uma molécula em um meio solvente, mostra claramente que para $g(r)$ menor do que um ela é repulsiva, e maior do que um é atrativo, ou, em termos de água-BZC, hidrofóbica ou hidrofílica.

¹⁴ A função de distribuição radial $g(r)$, seção 2.9, nos indica pela mecânica estatística a capa de hidratação (moléculas de água que se aproximam) ao redor de um átomo ou grupo de átomo analisado. Quando encontrado um valor da função $g(r) < 1$, este átomo ou grupo de átomos é caracterizado por apresentar propriedades hidrofóbicas, e do contrário $g(r) > 1$, hidrofílicas.

As análises dos cálculos efetuados com uma molécula de BZC em meio aquoso nos mostram que a BZC apresenta um caráter anfifílico, levemente hidrofóbico, (Figura R1).

Quando analisados isoladamente, os grupos componentes da BZC, que são: amina, anel, éster e etil, sendo os três primeiros grupos amina, anel e éster, (Figuras [R2-R4]), indicam pela função de distribuição radial $g(r)$, seção 2.9, serem levemente hidrofóbicos, com o grupo etil, (Figura R5), com indicação de ser hidrofílico, esta propriedade hidrofóbico-hidrofílica, isto é, um grupo é hidrofóbico, e outro hidrofílico, separa a molécula em duas partes. Quando analisados os átomos em separado, (Figuras [R6-R17]), estes apresentam a propriedade hidrofóbica/hidrofílica, em alternância por toda molécula, ou seja, um átomo/pequeno grupo é hidrofóbico e outro é hidrofílico, e assim sucessivamente, em contradição com a do grupo a que pertencem.

Como a função de distribuição radial $g(r)$, indica que $g(r) < 1$ o grupo é hidrofóbico, e $g(r) > 1$ hidrofílica, o terminal $-NH_2$ amina é levemente hidrofóbico com $g(r) < 1$ como um todo, (Figuras [C3a, R2]), mas ainda assim os hidrogênios deste terminal amina, indicam para possíveis ligações de hidrogênio com o oxigênio da água, o qual está imerso a molécula de BZC. O Anel aromático é levemente hidrofóbico, (Figuras [C3a, R3]) apresentando a função de distribuição radial $g(r) < 1$. O grupo O5_C4_O3, (Figuras [C3a, R4]) é hidrofóbico com $g(r) < 1$, ainda assim o oxigênio O5, deste terminal amina, indica para possível ligação de hidrogênio com o hidrogênio da água, já o terminal etil $-CH_2-CH_3$, (Figuras [C3a, R5]) é hidrofílico com $g(r) > 1$, mesmo assim não apresenta indicação de possível ligação de hidrogênio.

3.3. Análise de uma BZC

A análise prossegue utilizando como base os gráficos a seguir das Figuras [R1-R17].

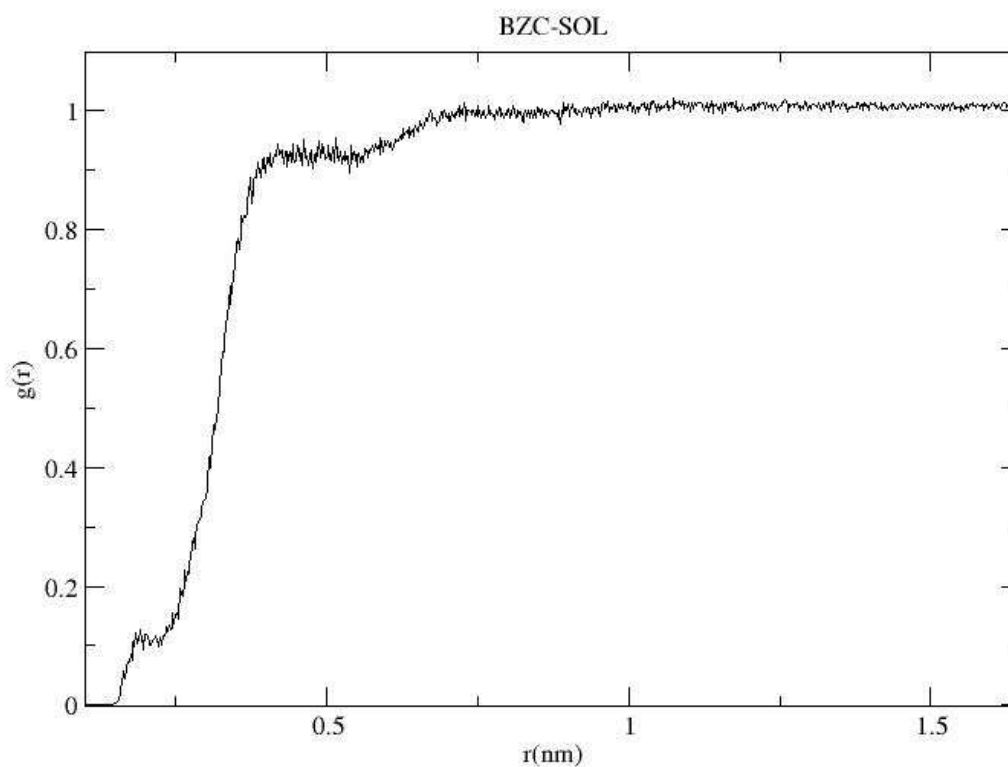


Figura R1. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de 1 (uma) molécula de BZC com solvente água. A função de distribuição radial $g(r)$, indica que a BZC é levemente hidrofóbica, com um valor de $g(r)$ pouco menor que 1 como um todo. Um discreto pico de 0,12 no entorno de 0,18 nm indicando uma possível ligação de hidrogênio em alguma parte da molécula. Quando a distância é muito grande, temos a distribuição normal das moléculas de água, isto é, $g(r) = 1$.

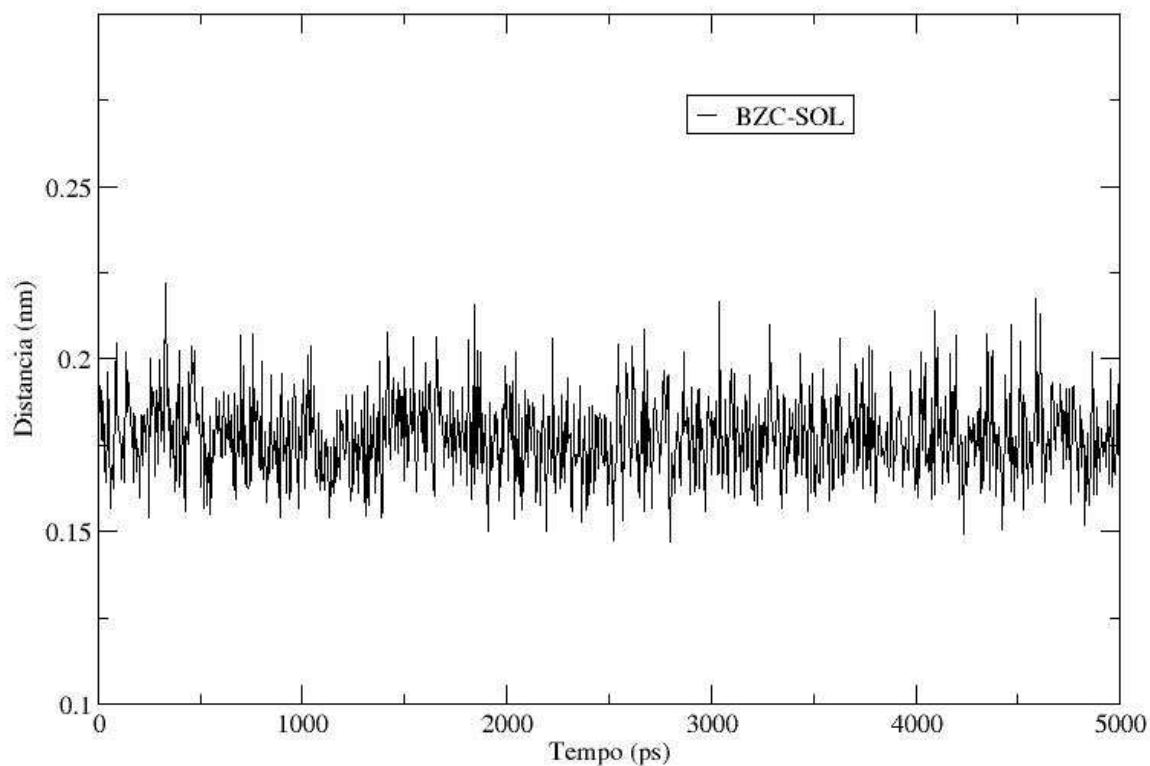


Figura R1a. Gráfico da distância mínima provável de 1 (uma) molécula de BZC em relação à solução aquosa, ou seja, em relação às moléculas de água solvente. Parece indicar que, apesar da BZC ser levemente hidrofóbica, Figura R1, a distância mínima provável para as moléculas de água, aponta para uma capa de hidratação com aproximações com parte da molécula e a BZC, indicando que provavelmente, podem ocorrer ligações de hidrogênio com a BZC, tendo estas uma distância mínima média de 0,18 nm, seção 2.8.

3.4. Análise dos grupos Amina, Anel, Éster e Etil da BZC, utilizando os potenciais da Figuras [C3a, C4] e Tabela C3.

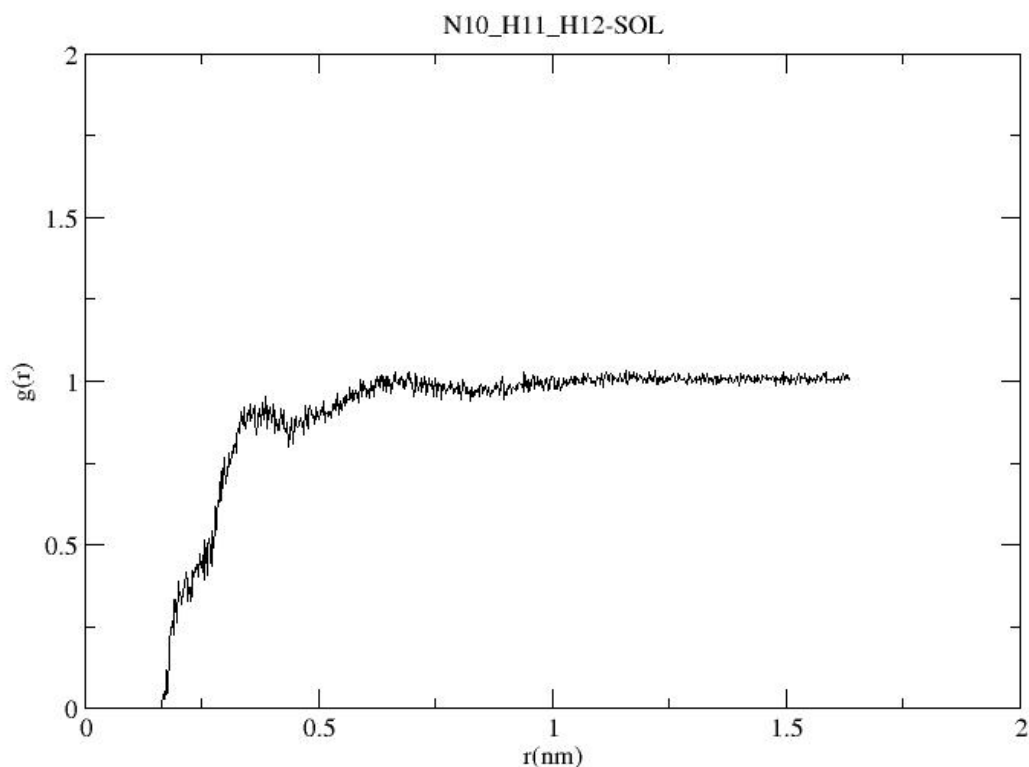


Figura R2. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do terminal NH2 com solvente água. A função de distribuição radial $g(r)$, seção 2.9, indica que o terminal NH2 é levemente hidrofóbico $g(r) < 1$. Aqui um discreto pico de 0,4 no entorno de 0,2 nm influenciado pelos hidrogênios do terminal, com outro pico de 0,9 no entorno de 0,4 nm, devido ao N10, seguido de um pequeno vale. O terminal amina $-NH_2$ tem resultante um δ^- , carga negativa $-0,1076e$, o que indica que os hidrogênios da água estariam voltados na direção deste terminal, para o nitrogênio N10. A primeira camada de água serve para afastar de suas proximidades as outras moléculas de água, por isso, vemos este vale em torno de 0,4 nm, e depois um novo pico possivelmente influenciado pelo C9 com pequena tendência hidrofílica, (Figura R9).

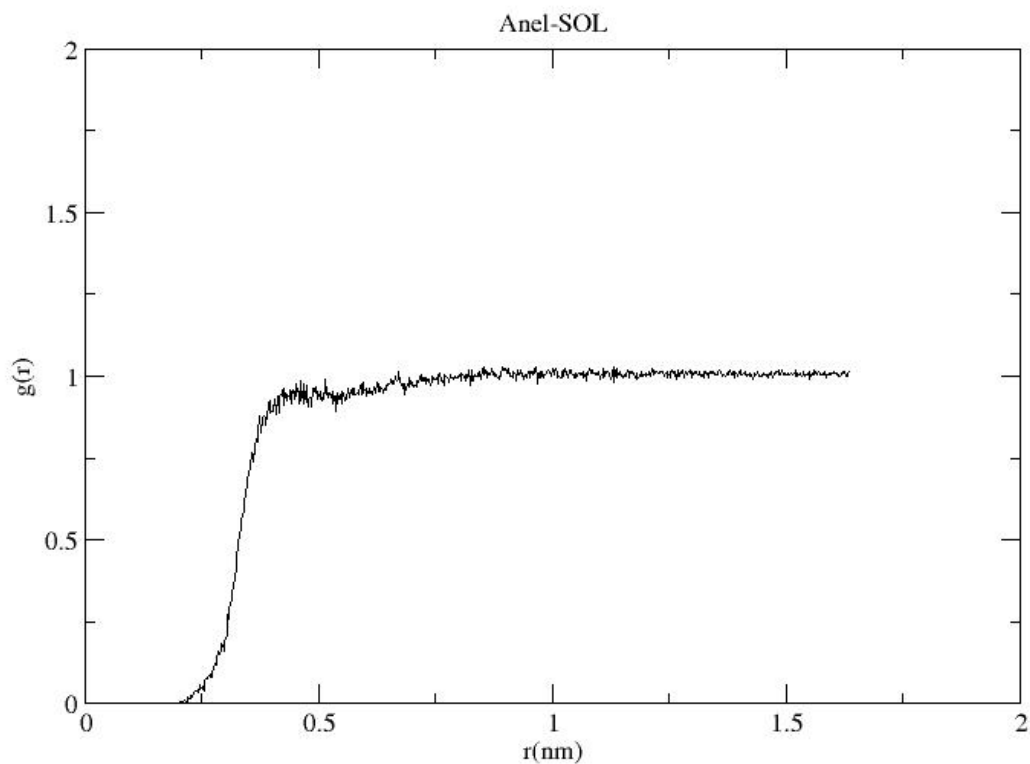


Figura R3. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do Anel aromático com a água (solvente). A função de distribuição radial $g(r)$, indique que $g(r) < 1$, e o Anel aromático é levemente hidrofóbico. Quando a distância é muito grande, $g(r) = 1$.

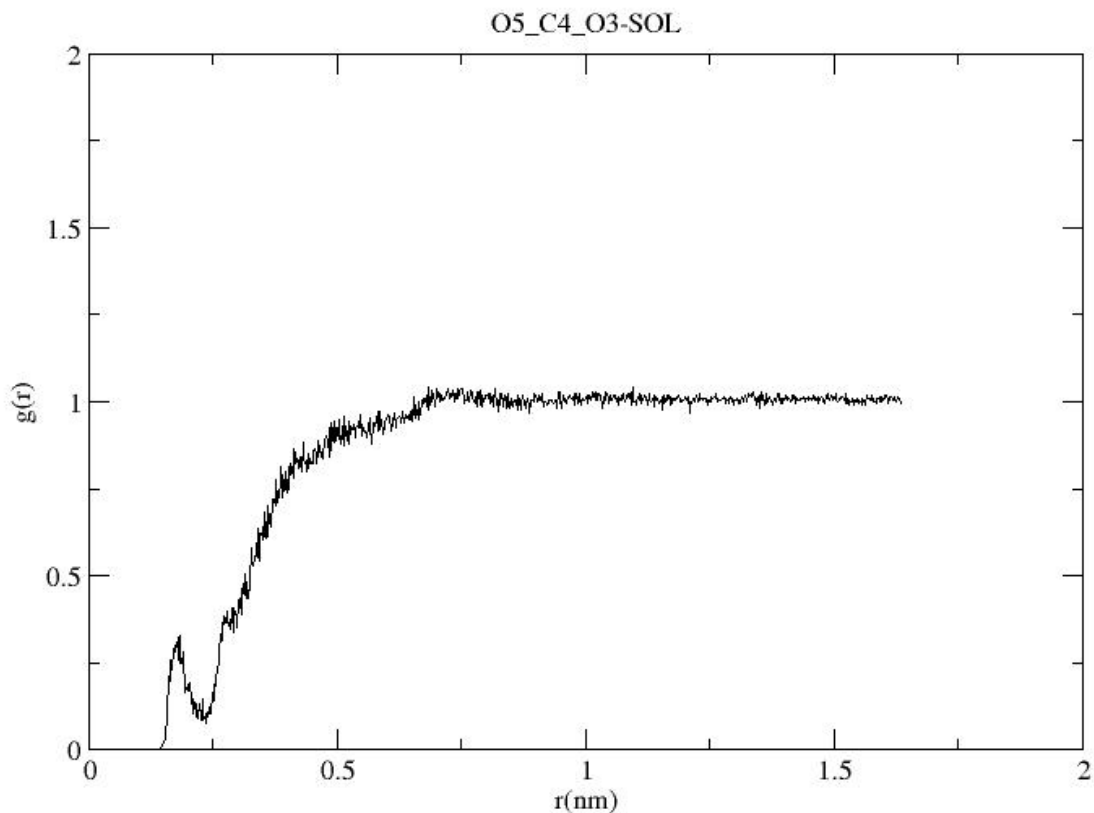


Figura R4. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do grupo O5_C4_O3 com a água (solvente). Tem-se um pequeno pico de 0,3 no entorno de 0,17 nm indicando que as moléculas de água na parte constituída pelos hidrogênios (Hw*) são atraídas para as proximidades deste terminal, ficando os oxigênio Ow da água apontando no sentido contrário ao grupo O5_C4_O3. Isso nos indica uma atração com os oxigênios do grupo com os (Hw*) da água. Este pico é pequeno, sofre a influência do potencial positivo do C4, enquanto os O5 e O3 têm um potencial negativo, como mostra a Figura C4. Como visto a função de distribuição radial $g(r)$, indique que $g(r) < 1$, o grupo O5_C4_O3 é hidrofóbico.

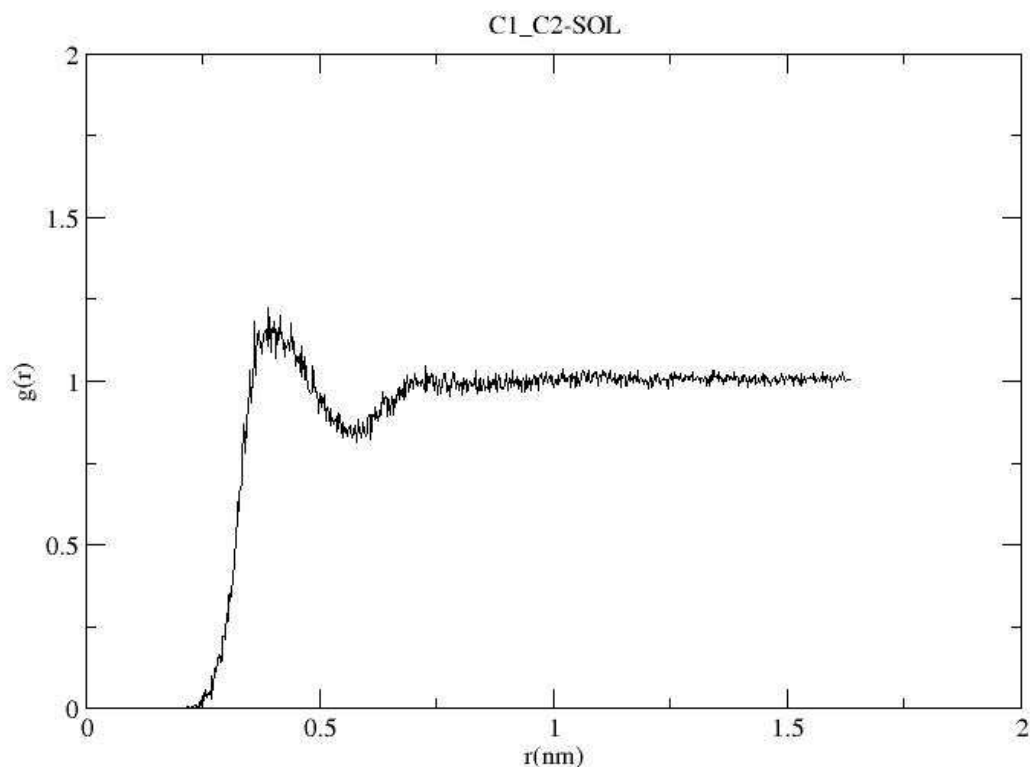


Figura R5. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do terminal $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$, etil, com a água. Aqui um pico de 1,2 no entorno de 0,35 nm indicando que o terminal etil $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ é hidrofílico com $g(r) > 1$, isso indica que as moléculas de água na parte constituída pelo Oxigênio são atraídas para as proximidades deste terminal, ficando os hidrogênios da água apontando no sentido contrário ao terminal $-\text{CH}_3$. A primeira camada de água serve para afastar de suas proximidades as outras moléculas de água, por isso, vemos um vale em torno de 0,6 nm. Com o aumento da distância, temos a distribuição normal das moléculas de água. A Figura C4 dá um δ^+ para terminal, com +0,28e, o que indica uma provável atração pelo átomo de oxigênio da água.

3.5. Análise individual dos átomos ou pequenos grupos de átomos da BZC, com os potenciais da Figura [C5] e a distribuição espacial de cargas da Figura [C3a].

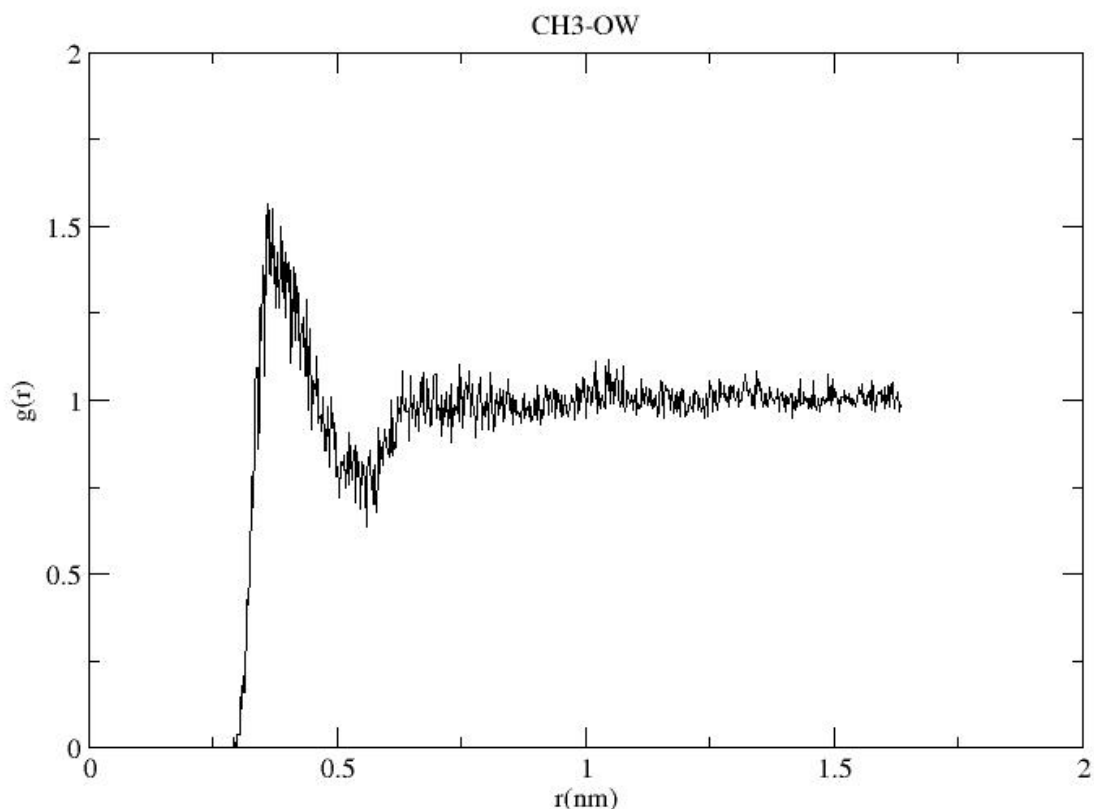


Figura R6. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do terminal $-CH_3$ com a parte do oxigênio da água (solvente). Aqui um pico de 1,55 no entorno de 0,3 nm indicando que as moléculas de água na parte constituída pelo oxigênio (Ow) são atraídas para as proximidades deste terminal, ficando os hidrogênios da água apontando no sentido contrário ao terminal $-CH_3$. A primeira camada de água serve para afastar de suas proximidades as outras moléculas de água, por isso, vemos um vale em torno de 0,6 nm, e depois um novo pico e assim sucessivamente. Quando a distância é muito grande, temos a distribuição normal das moléculas de água, e não sua concentração próxima de alguma posição geométrica, $g(r) = 1$. O terminal $-CH_3$ é hidrofílico com $g(r) > 1$. As Figuras [C3a, C5] dá um pequeno δ^- , uma carga $-0,05e$, o que indicaria uma atração com os hidrogênios da água, e repulsão do oxigênio.

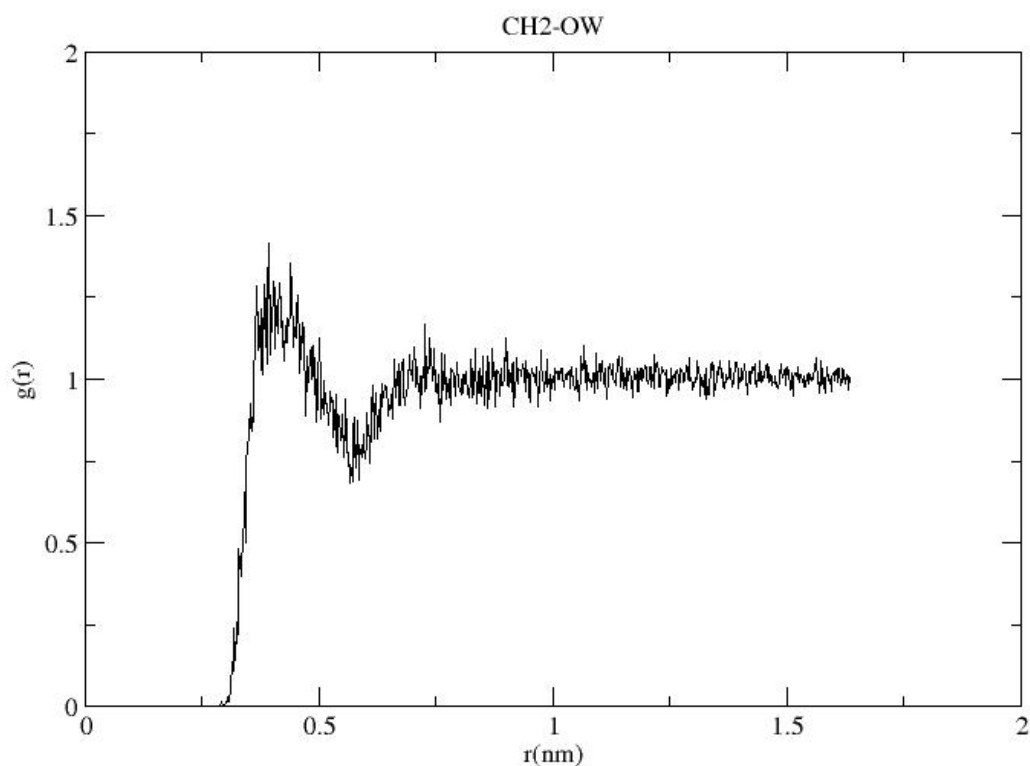


Figura R7. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do grupo $-CH_2$ com a parte do oxigênio da água (solvente). Temos aqui um pico médio de 1,3 no entorno de 0,35 nm, indicando que o grupo conforme a função de distribuição radial $g(r)$, hidrofílica, $g(r) > 1$, e pelas Figuras [C3a, C5], que as moléculas de água na parte constituída pelo oxigênio (Ow) são atraídas para as proximidades deste grupo, no qual apresenta um δ^+ , carga 0,33e, Tabela C2, ficando os hidrogênios da água apontando no sentido contrário ao grupo $-CH_2$. A camada de água serve para afastar de suas proximidades as outras moléculas de água, por isso, vemos um vale próximo de 0,6 nm, e logo em seguida um pico discreto devido ao terminal $-CH_3$. Quando a distância é muito grande, temos a distribuição normal das moléculas de água, e função se normaliza.

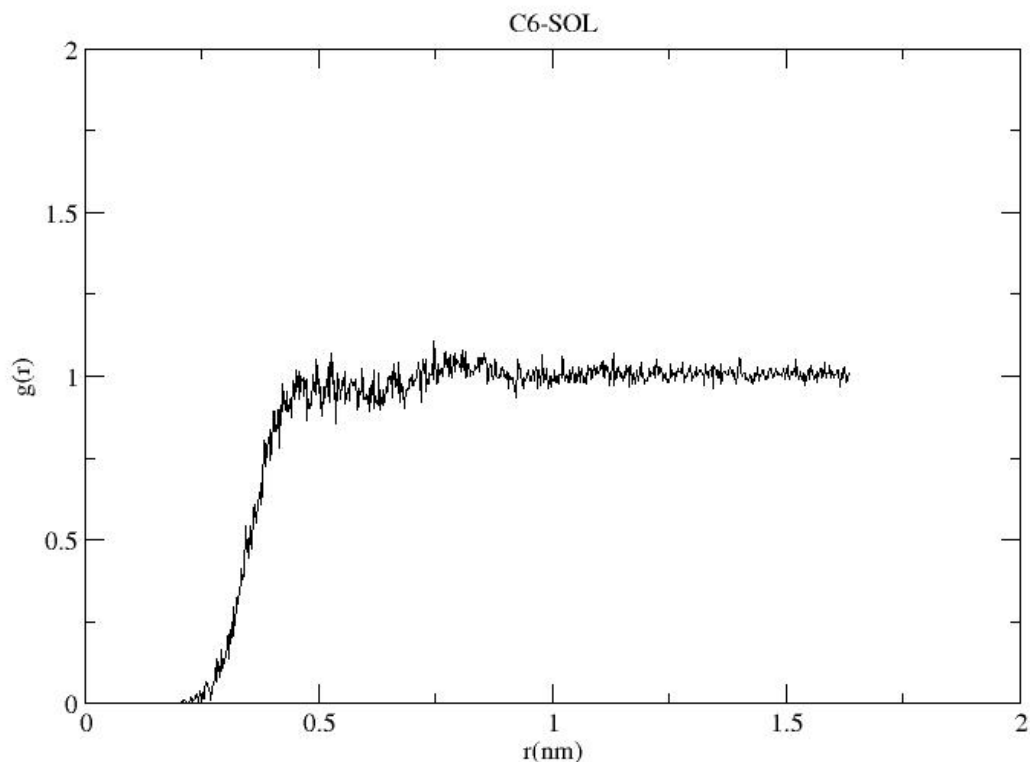


Figura R8. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do átomo C6 com a água (solvente). Aqui um discreto pico entorno de 0,5 nm, seguido por um leve vale e outro pico a 0,8 nm, observado as Figuras [C3a, C5] a alternância de C6 com δ^- , carga $-0,14e$, C4 com δ^+ , carga $0,64e$, e o O5 com δ^- , carga $-0,52e$, são aqui discretamente mostrados. Quando a distância é muito grande, temos a distribuição normal das moléculas de água, e não sua concentração próxima de alguma posição geométrica, e $g(r)$ indicando que C6 é discretamente hidrofílico, e não concordando com o anel de que faz parte.

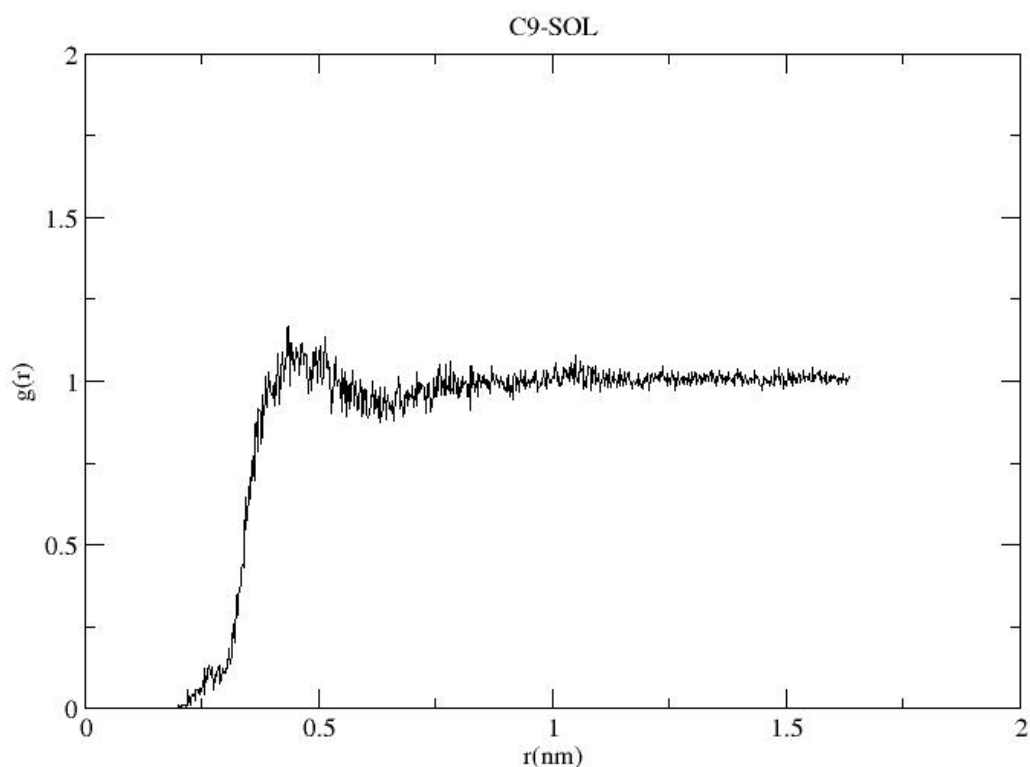


Figura R9. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do átomo C9 com o solvente água. Tem-se um pico de 1,2 no entorno de 0,4 nm indicando que as moléculas de água na parte constituída pelo oxigênio são atraídas para as proximidades deste átomo, das Figuras [C3a-C5], o C9 é hidrofílico com $g(r) > 1$, o vale a seguir no entorno de 0,6 nm, indica a provável influência do anel aromático no qual C9 faz parte. Quando a distância é muito grande, $g(r) = 1$, e a função se normaliza.

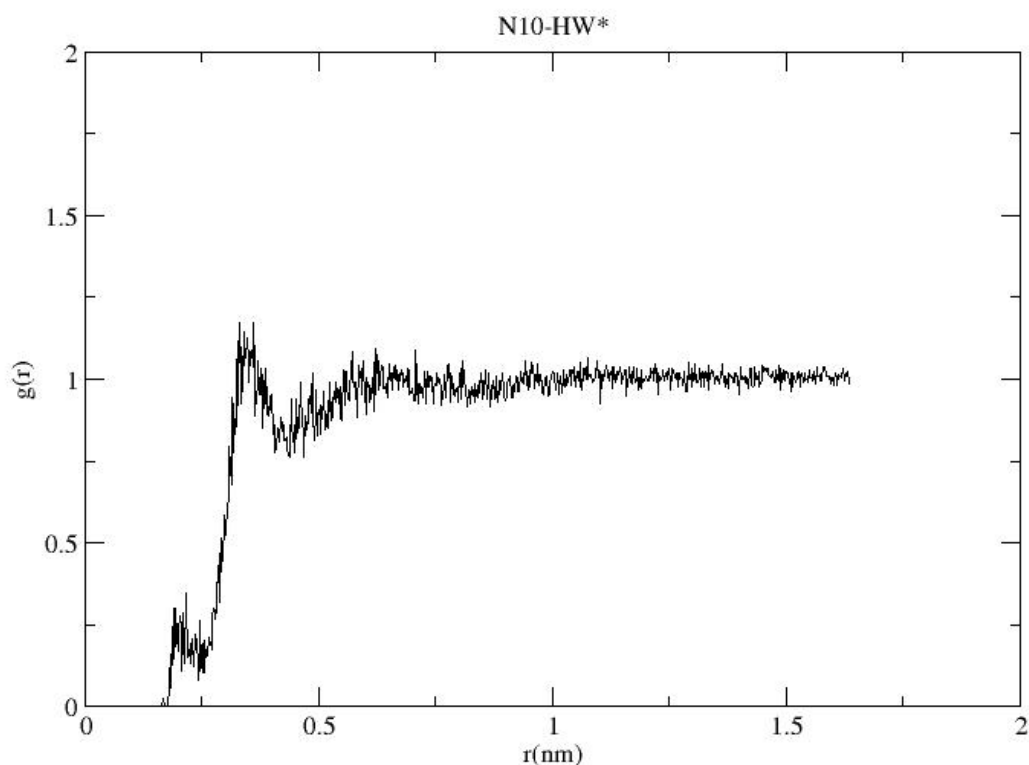


Figura R10. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ do nitrogênio N10 do terminal amina com os (Hw*), hidrogênios da água. Aqui um pico de 1,2 no entorno de 0,35 nm, onde N10, nas Figuras [C3a, C5], apresenta um δ^- , carga $-0,80e$, indica que as moléculas de água na parte constituída pelos hidrogênios da água são atraídas para as proximidades deste grupo, ficando o oxigênio da água apontando no sentido contrário a átomo N10. Como N10 está ligado aos hidrogênios do terminal amina, do qual o N10 faz parte, isso possivelmente induz a um aumento da possibilidade de ligações de hidrogênio, do oxigênio da água com os hidrogênios do terminal amina. A primeira camada de água afasta de suas proximidades as outras moléculas de água, por isso, vemos um vale em torno de 0,4 nm. Quando a distância é muito grande, temos a distribuição normal das moléculas de água, e a função se normaliza. A função de distribuição radial indica que N10 é hidrofílico, isto é, $g(r) > 1$.

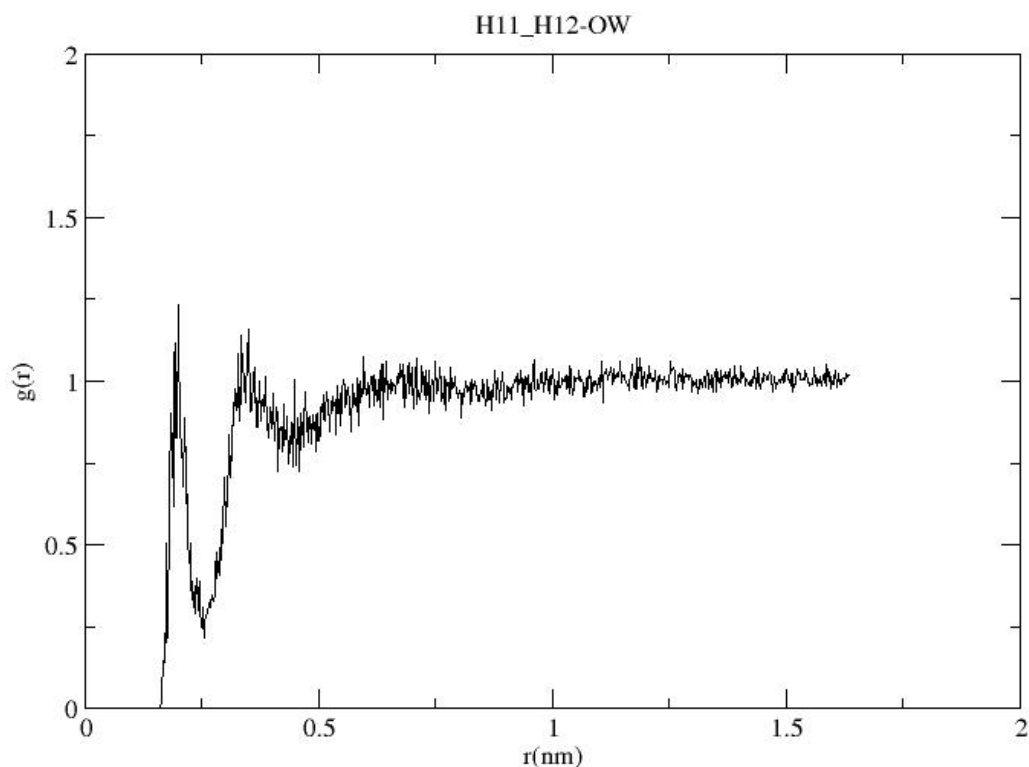


Figura R11. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do hidrogênios H11 e H12 do terminal amina com os oxigênios (Ow) do solvente água. Tem-se aqui um pico de 1,25 no entorno de 0,2 nm indicando que as moléculas de água na parte constituída pelo oxigênio são atraídas para as proximidades deste terminal, ficando os hidrogênios da água apontando no sentido contrário ao terminal amina, em conformidade com os potenciais da Figura C5 e distribuição espacial de cargas da Figura C3a, onde os H11 e H12 têm um δ^+ , carga +0,69e. Isso indica uma grande possibilidade de ligações de hidrogênio na distância encontrada, seção 2.8. A primeira camada de água afasta de suas proximidades as outras moléculas de água, por isso, um vale em torno de 0,25 nm, e depois um outro pico devido à presença do N10, e assim sucessivamente conforme a distância aumenta, temos a distribuição normal das moléculas de água, e não sua concentração próxima de alguma posição determinada.

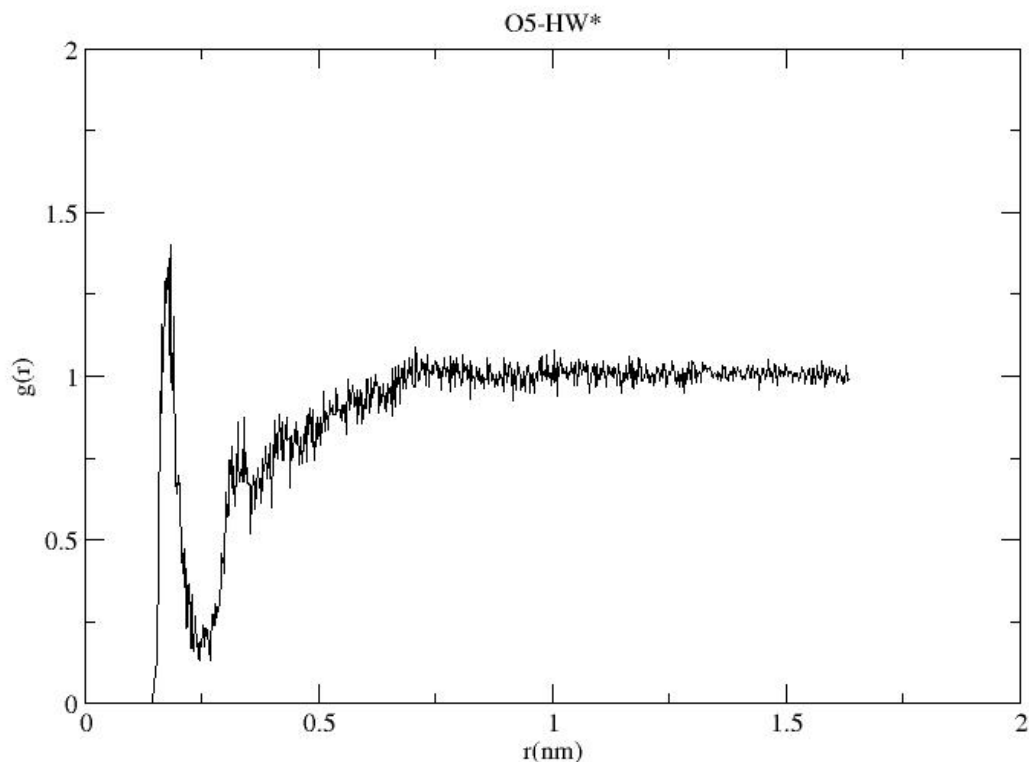


Figura R12. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância do oxigênio do grupo éster com os hidrogênios (Hw*) do solvente água. Tem-se aqui um pico de 1,45 no entorno de 0,175 nm indicando que as moléculas de água na parte constituída pelos hidrogênios são atraídas para as proximidades deste terminal, em conformidade com o potencial negativo, δ^- , carga $-0,52e$, Figuras [C3a, C5], ficando os oxigênios da água apontando no sentido contrário ao grupo éster. Isso indica uma grande possibilidade de ligações de hidrogênio na distância encontrada, 0,175 nm, seção 2.8. A primeira camada de hidratação afastar de suas proximidades as outras moléculas de água, por isso, um vale em torno de 0,25 nm, e depois um outro pico discreto devido à presença do oxigênio O3, e assim sucessivamente conforme a distância aumenta, temos a distribuição normal das moléculas de água. A normalização seguida indica que o grupo do qual O5 faz parte é hidrofóbico como um todo, apresentando $g(r) < 1$, como indica a função de distribuição radial $g(r)$, seção 2.9.

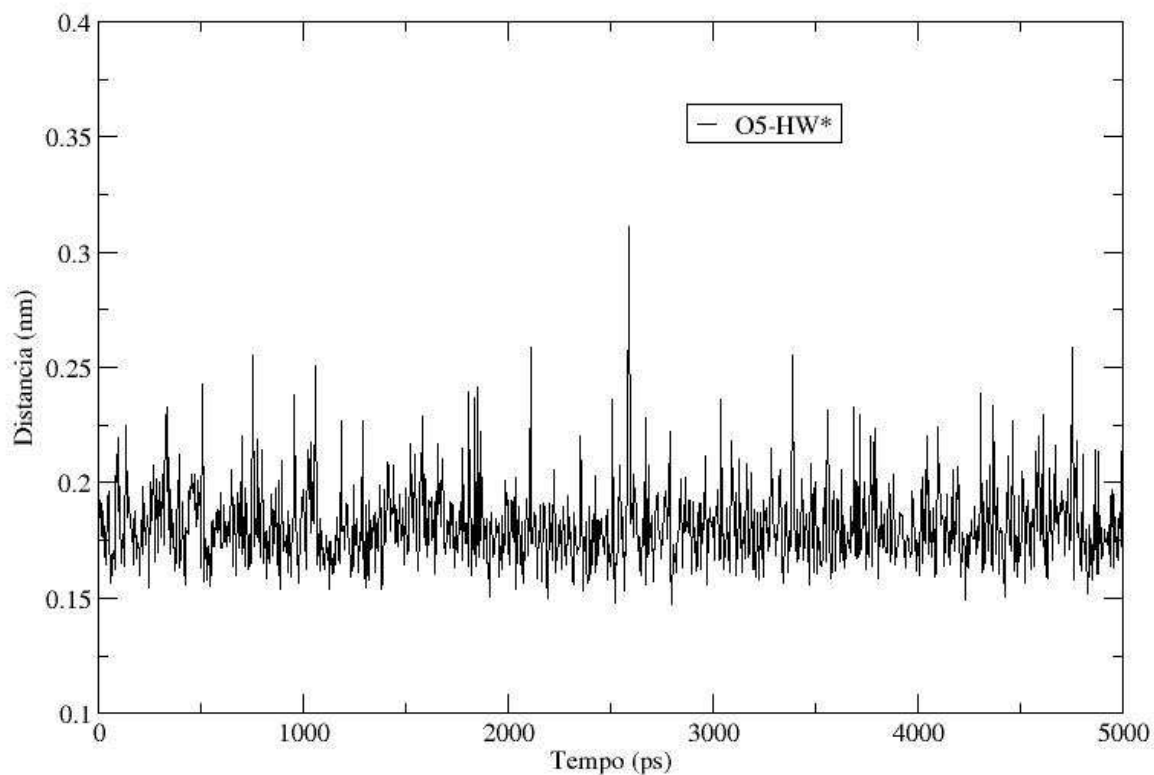


Figura R13. Gráfico da distância mínima do átomo de oxigênio O5 com os hidrogênios (HW*) da solução aquosa. Indica uma possível ligação de Hidrogênio do átomo O5, do grupo éster, com os hidrogênios das moléculas de água, atraindo estes, pois apresenta um potencial atrativo δ^- , carga $-0,52e$, Figuras [C3a, C5], e repelindo os oxigênios da água, ficando estes dispostos em sentido contrário ao grupo. A distância média mínima em torno de 0,175 nm, em conformidade com a Figura R12, reforça essa possibilidade de ligação de hidrogênio.

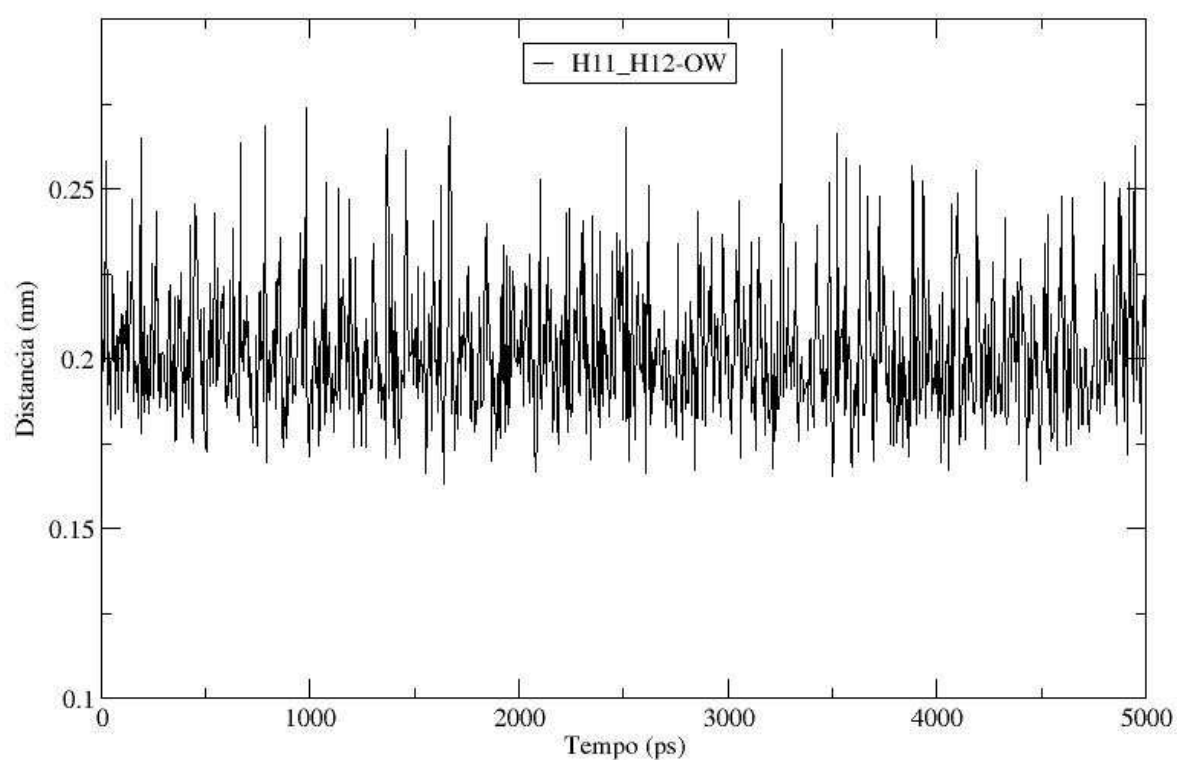


Figura R14. Gráfico da distância mínima dos átomos de hidrogênio, H11 e H12 com os oxigênios (Ow) da solução aquosa. Com um potencial positivo, $\delta+$, carga +0,69e, Figuras [C3a, C5], aponta uma possível ligação de hidrogênio com os hidrogênios, H11 e H12, do terminal amina, com o oxigênio da molécula de água, atraindo estes, repelindo os hidrogênios da água, ficando estes dispostos em sentido contrário ao grupo. A distância média mínima em torno de 0,20 nm, em conformidade com a Figura R11, reforça essa possibilidade de ligação de hidrogênio.

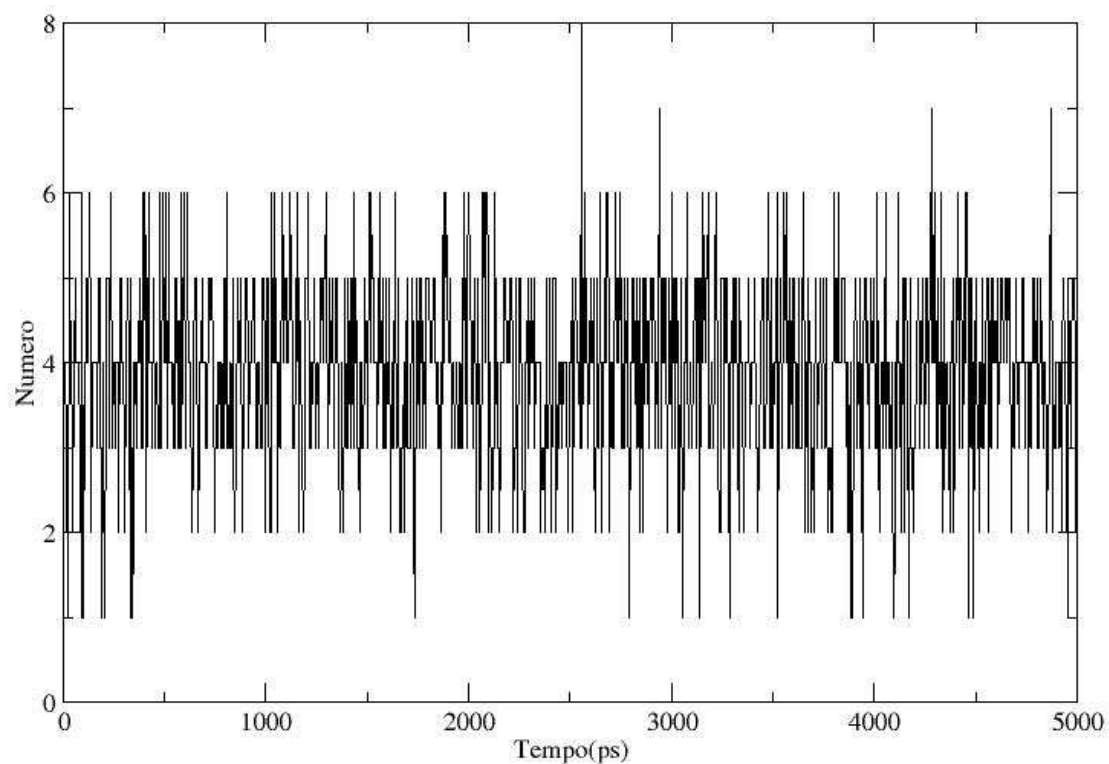


Figura R15. Gráfico do número médio de aproximações do hidrogênio da água, com a molécula de BZC em solução aquosa para possíveis ligações de hidrogênio [79, 84], com raio de corte 0,35 nm. O número total de aproximações possíveis de moléculas de água encontrado é 3,915 para a molécula de BZC.

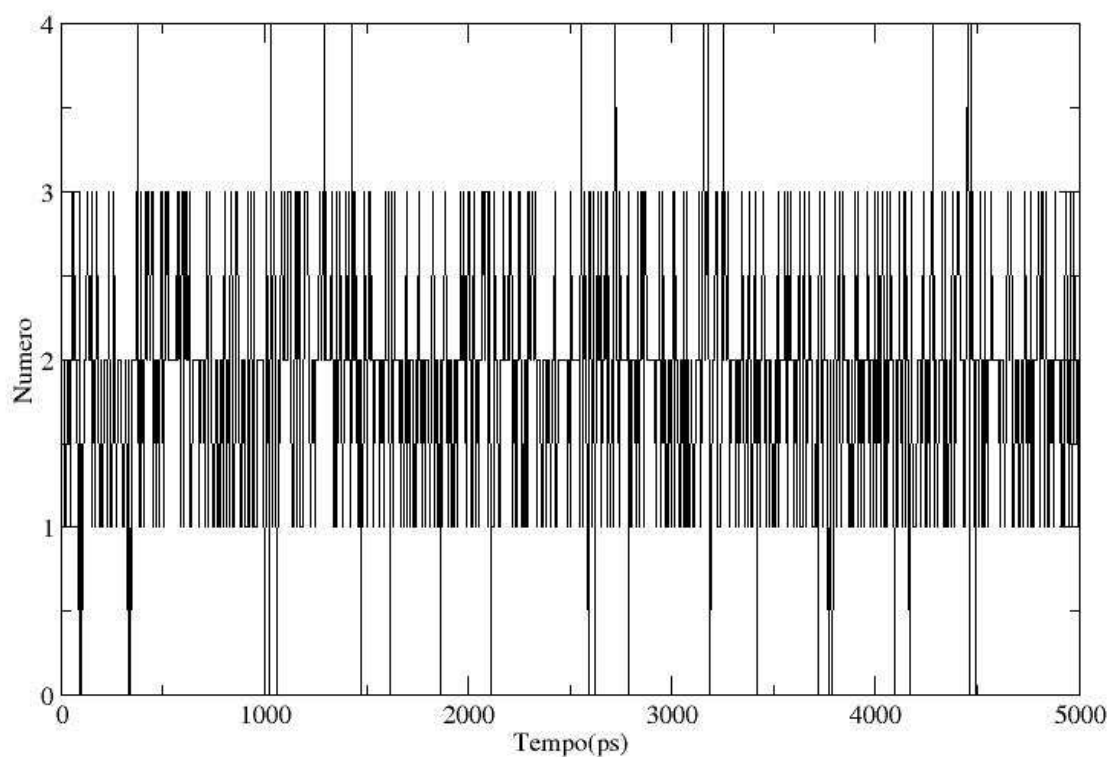


Figura R16. Gráfico do número médio de aproximações do átomo de hidrogênio da água com o grupo O5-C4-O3 em solução aquosa, com raio de corte 0,35 nm, para possíveis ligações de hidrogênio [79, 84]. O número total de aproximações do hidrogênio das moléculas de água encontrado é 1,888 para este grupo éster.

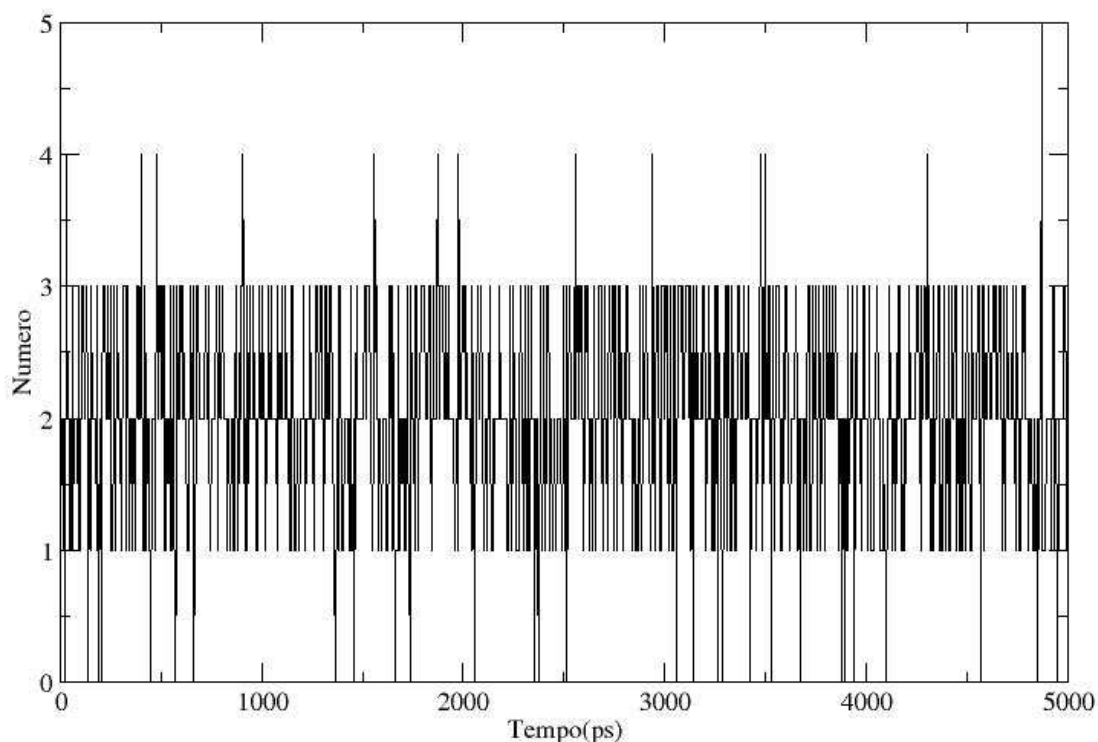


Figura R17. Gráfico do número médio de aproximações do átomo de hidrogênio da água com o terminal NH₂ em solução aquosa, com raio de corte 0,35 nm, para possíveis ligações de hidrogênio [79, 84]. O número total de aproximações do hidrogênio das moléculas de água encontrado é de 2,003 para o terminal amina -NH₂.

3.5.1. Análise resumida

Verificamos que temos uma aproximação máxima de 4 (quatro) moléculas de água que formaria a camada de hidratação, Figuras [R15-R17]. Esta aproximação ocorre principalmente no terminal amina e grupo éster, Figuras [R17, R16] respectivamente e visualizado mais facilmente pela distribuição espacial de cargas, (Figura C3a). O terminal amina, Figuras [C23a, R2], o anel aromático Figuras [C3a, R3], e o grupo éster, Figuras [C3a, R4], apesar de alguns

átomos atraírem individualmente a água, apresentam a tendência repulsiva às moléculas de água, apresentando um caráter levemente hidrofóbico. O terminal etil, Figuras [C3a, R5], apresenta a tendência atrativa de moléculas de água, com características hidrofílicas. A BZC é, então, uma molécula que tem duplo caráter, atrativo e repulsivo. Do ponto de vista geral a BZC é levemente repulsiva a água, Figuras [C3a, R1].

Somente estas análises, não nos permitem compreender como ela atua sem ter a molécula protonada, o que nos leva a necessidade de novos cálculos.

3.6. A molécula da benzocaína (BZC) e a formação de agregados

Como já mencionado, o anestésico local Benzocaína (BZC) tem um pKa perto de 2,5, e em meio fisiológico não apresenta a forma protonada, e para compreender sua ação, simulamos sua dinâmica molecular com aumento de concentração da BZC. Com o aumento da concentração a BZC forma agregados, aumentando sua hidrofobicidade. Essa característica mais hidrofóbica permitiria a ação da BZC na forma não protonada.

Para discutir nossos resultados, vamos rever as hipóteses conhecidas da ação dos LAs, e discutir a formação de agregados encontra em nossos cálculos para as moléculas de BZC.

A ação dos LAs foi estudada dentro dos potenciais de voltagem dos canais de sódio segundo a hipótese do receptor de Hille [89-91], indica que LA's agem principalmente pela inibição do influxo através dos canais do sódio. Quando o influxo

de sódio é interrompido, o sinal de condução é inibido. Perto do pKa fisiológico a forma protonada e não protonada da molécula do LA existem em equilíbrio, mas somente a forma não protonada da molécula se difunde facilmente através da membrana celular. Uma vez dentro da célula o anestésico local entrará em equilíbrio, com a forma protonada (forma ionizada), o qual não volta facilmente para fora da célula. Dentro, a forma protonada do anestésico se liga ao canal ou o bloqueia este, próximo ao canal de íons do citoplasma [5, 28, 92]. Outra possível ação dos LAs é a afinidade de ligação da forma neutra com a membrana celular, perturbando a estrutura da bicamada fosfolipídica e conseqüentemente alterando as funções do canal iônico; alterando a organização interna da bicamada lipídica e aparentemente sua constituição geral e o mecanismo de modulação das funções da membrana protéica [37, 46, 83], interrompendo o sinal. O *ethyl 4-aminobenzoate* [1], conhecido como benzocaína (BZC), apesar de apresentar um pKa perto de 2.5, e não apresentar a forma protonada em meio fisiológico, é ativo e com as mesmas propriedades gerais dos outros LAs. Assim, essa última hipótese geral não funciona bem no nosso caso.

Para compreender algumas das propriedades da BZC, fizemos cálculos da dinâmica molecular (MD) em meio aquoso com o sucessivo aumento da concentração da BZC. As MD foram realizadas por nós com o incremento de 2 (duas), 3 (três), assim sucessivamente até 27 (vinte e sete) moléculas de BZC e em 40 (quarenta) moléculas de BZC. Em todos os casos, às moléculas de BZC formaram agregados, com de 3 (três) e 4 (quatro) moléculas de BZC. Dentro do primeiro caso (3 moléculas de BZC), elas não formaram agregado de modo algum, e com 4 (quatro) moléculas os agregados se separaram perto do final da dinâmica. Nós não compreendemos por que ocorrem essas exceções. Observamos que não

existe claramente uma seqüência de agregação de moléculas, e nem o número de moléculas que se podem encontrar livres, isto é, fora dos agregados formados.

A disposição das moléculas nos agregados formados, não são lineares, ou seja, quando adicionamos mais moléculas à simulação não apresentaram uma relação clara de agrupamento nestas dinâmicas. Encontramos algumas vezes dois agregados, às vezes somente um grande agregado, às vezes umas ou duas moléculas fora do agregado, e às vezes nenhuma molécula fora do agregado. Não encontramos uma seqüência regular.

Quando adicionado mais e mais moléculas, geralmente o agregado se separa em dois, o que indica que a BZC não forma cristais com o aumento de sua concentração. As propriedades físicas estudadas dos agregados indicam que não dependem somente da quantidade de moléculas que adicionamos aos agregados, mas também do número de moléculas que não fazem parte dos agregados. Quando adicionados 3 (três) moléculas na dinâmica, estas não formaram agregados de modo algum, e suas propriedades físicas como a função de distribuição radial, apresentam os mesmos valores de uma simples molécula, indicando neste caso, que as moléculas agem sozinhas.

A agregação de moléculas de BZC sinaliza para nós que elas agem cooperativamente como uma única “grande molécula”. Compreender a ação desta “grande molécula” é importante para interpretar como este LA age, embora não tenha a forma protonada, a BZC provavelmente age de acordo com o modelo de Hille. Provavelmente, uma ou mais moléculas de BZC se ligam aos canais de sódio da membrana celular.

3.7. Resultados dos agregados

A seguir, fazemos uma análise mais detalhada da simulação de 16 (dezesesseis), 18 (dezoito) e 22 (vinte e duas) moléculas de BZC que tiramos como padrão para as análises. Quando colocamos 16 (dezesesseis) moléculas, o resultado é a formação de 14 (quatorze) moléculas em um agregado e duas moléculas fora deste; com 18 (dezoito) moléculas um simples agregado foi formado, e nenhuma molécula fora deste agregado, e com 22 (vinte e duas) moléculas 2 (dois) agregados são formados, com uma molécula fora destes (ver Figura RC0). Nas Figuras [RC1-RC3], são apresentados os gráficos das distâncias entre uma molécula de BZC e as outras 15 (quinze), 17 (dezesete) e 21 (vinte e uma) outras moléculas de BZC. As moléculas na dinâmica foram inseridas aleatoriamente dentro da caixa da água. Os resultados de todas as simulações encontram-se no gráfico representado na Figura RC0.

Os gráficos, Figuras [RC4-RC6], apresentam função de distribuição radial $g(r)$. Estas funções representam as distâncias das moléculas de BZC e as moléculas de água, indicando a distância da primeira camada de hidratação. A Figura RC4 representa a função $g(r)$ de todas 20 moléculas de BZC, na simulação com 20 moléculas e a $g(r)$ para cada uma das 20 moléculas no agregado. Nesta Figura RC4, cada molécula de BZC apresenta um valor diferente para $g(r)$ ao final da MD. A molécula de número 15 (quinze) apresenta o maior $g(r)$, indicando que a mesma permanece mais tempo de dinâmica fora do agregado, já a moléculas de número 9 (nove) e 14 (quatorze) mostram-se com $g(r)$ menores que todas as das outras na dinâmica, indicando que estas moléculas permaneceram durante um maior tempo no interior do agregado, Figura RC7. A Figura RC4, indica apenas um resultado

geral da função $g(r)$ de cada molécula na simulação com 20 (vinte) moléculas, mas não indica nada sobre as moléculas de água no interior do agregado. A Figura RC5, é descrita a função de distribuição radial $g(r)$ para a MD das simulações independentes de 1 (uma) a 20 (vinte) moléculas. Assim, podemos compreender melhor a tendência de cada simulação quando adicionamos mais moléculas nela. O mais interessante dentro deste resultado é que a dinâmica com 3 (três) moléculas apresenta o mesmo resultado quando simulado com uma única molécula, indicando que neste caso as moléculas agem sozinhas, e não formam agregados em nenhum momento da dinâmica.

O gráfico da Figura RC6 representa o valor da função de distribuição radial $g(r)$ a uma distância de 0,4 nm. Vemos que os agregados com dois, cinco, sete, doze, vinte e vinte e cinco, apresentam um valor de $g(r)$ menor do que com uma, três, quatro, seis, oito, nove, dez, onze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, vinte e um, vinte e dois, vinte e três e vinte e quatro, respectivamente. Isto indica que os agregados formados nestas simulações são mais compactos, com menos número de moléculas fora do agregado, com maior tempo de simulação juntas ou com dois agregados (Figura RC0). Com menos moléculas fora do agregado este se mostra mais hidrofóbico. As moléculas são mais hidrofóbicas quanto maior sua concentração, e quanto menor, isto é, mais compacto for agregado formado. As moléculas apresentam uma cooperação entre elas repelido as moléculas de água em suas proximidades. Quanto mais moléculas, mais distantes estas ficam da água.

3.8. Água no interior dos agregados

A mesma função $g(r)$ foi utilizada para analisar a presença ou não de moléculas de água no agregado. A Figura RC8, representa a função de distribuição radial $g(r)$ para distância do oxigênio O5 da carbonila, com hidrogênio da água (Hw^*) para as 20 simulações, isto é, de 1 (uma) a 20 (vinte) moléculas. Isto é importante por que, nos dá o pico característico de uma possível ligação de hidrogênio. O pico característico de ligações de hidrogênio possíveis, é visível para uma distância entorno de 0,15 nm e 0,17 nm, com valor médio de 0,155 nm, Figura RC10. A distância indicada 0,15 nm a 0,17 nm indica a provável ligação de hidrogênio como que esta fosse “fixa” entre o oxigênio O5, da carbonila, e o hidrogênio (Hw^*) das moléculas de água, independente da quantidade de moléculas de BZC acrescentadas na simulação dos agregados, e seu caráter hidrofóbico menor das moléculas de BZC no agregado não é forte o suficiente para quebrar essa possível ligação de hidrogênio “fixa”. Essa mesma conclusão podemos assumir com os hidrogênios, H11 e H12, do terminal amina com o oxigênio da água, Figura RC9, no qual apresenta o pico característico de provável ligação de hidrogênio, agora dos hidrogênios do terminal amina, com o oxigênio do solvente água, para as 20 simulações, isto é, de 1 (uma) a 20 (vinte) moléculas. A forma característica da ligação de hidrogênio é menos intensa com o aumento do número de BZC nas simulações, porém mantém sempre a mesma distância, ou seja, esta distância não se altera, seja qual for a quantidade de moléculas acrescida na MD simulada. Isto indica provavelmente que, dentro dos agregados encontram-se moléculas de água, próximas ao terminal amina e ao oxigênio O5 carbonila.

3.9. Análise dos gráficos na MD de agregados

Segue uma análise individual dos gráficos, Figuras [RC0-RC15] na dinâmica da BZC com agregados.

A seguir à Figura RC0, a qual representa a formação de agregados na MD de todas as BZCs de 1 a 27.

MD de todas as BZCs de 1 a 27

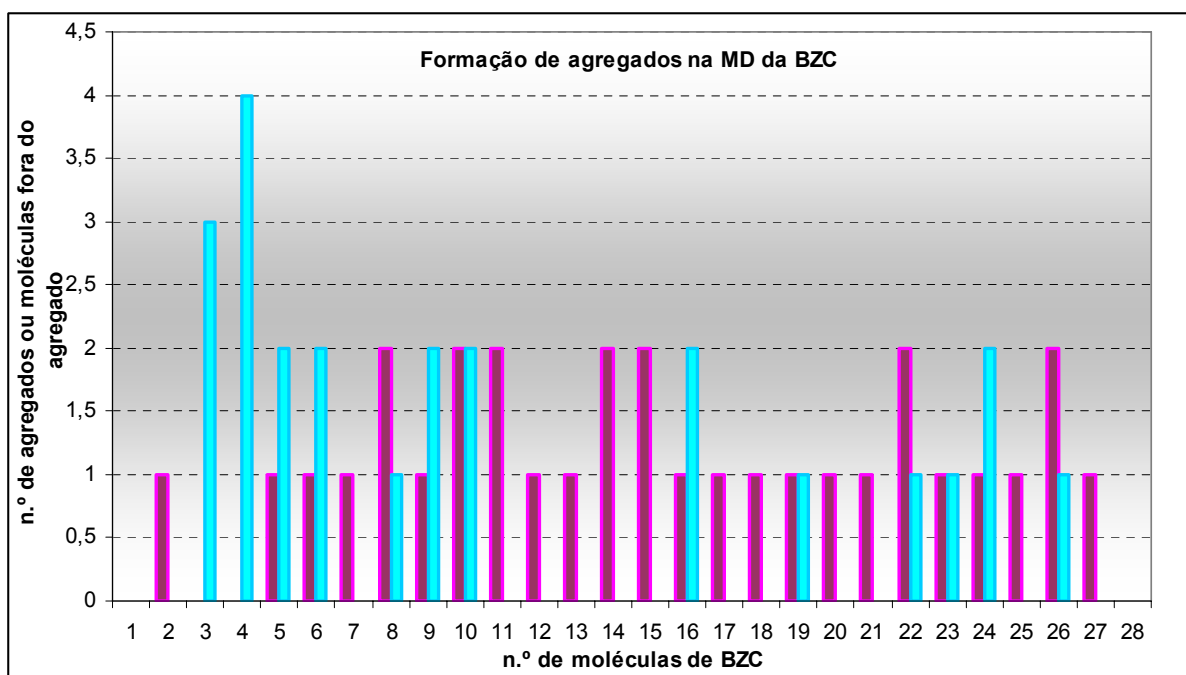


Figura RC0. Este gráfico representa a MD de todas as BZCs de 1 a 27, com o número de agregados formados em cada MD e a quantidade de moléculas fora dos agregados. A cor azul representa o número de moléculas que se encontram fora do agregado, e na cor lilás o número de agregados formados em cada simulação ao final da MD.

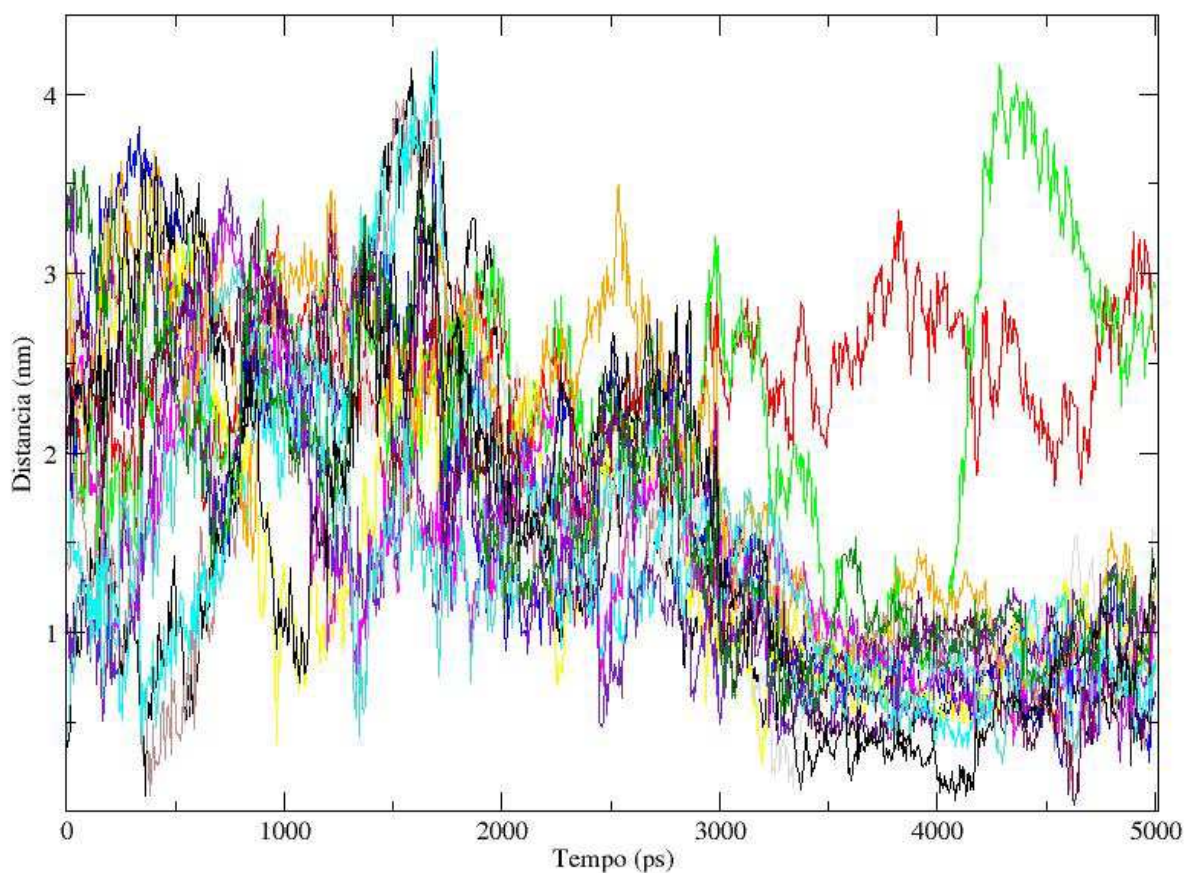


Figura RC1. Gráfico da distância (nm) do CM entre 1 (uma) molécula de BZC, e as outras 15 (quinze) moléculas em função do tempo (ps). Cada cor representa um gráfico da distância do CM de cada uma das 16 (dezesesseis) moléculas em relação às outras moléculas da MD. Forma-se no final da dinâmica um agregado de 14 moléculas com diâmetro médio de 1 nm, com duas moléculas fora deste agregado. Tem-se que no entorno de 3800 ps a 4000 ps havia a formação de um agregado de 15 moléculas e uma fora deste, e após este pequeno período uma delas se separa do agregado e este se mantém com 14 moléculas no agregado e duas fora deste e, ambas, próximas uma da outra.

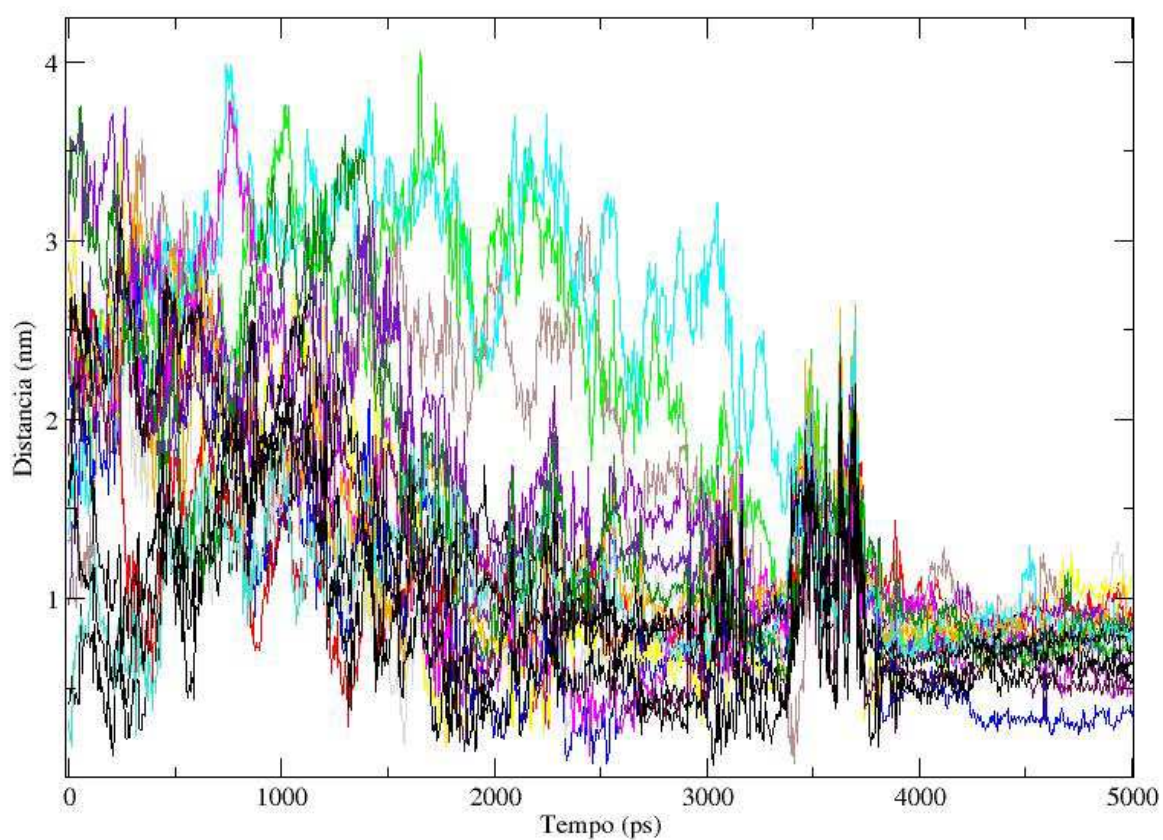


Figura RC2. Gráfico da distância (nm) do CM entre 1 (uma) molécula de BZC, e as outras 17 moléculas em função do tempo (ps). Cada cor representa um gráfico da distância do CM de cada uma das 18 moléculas em relação às outras moléculas da MD. Forma-se no final desta dinâmica um agregado de 18 moléculas com diâmetro médio de 0,5 nm, e nenhuma molécula fora deste agregado.

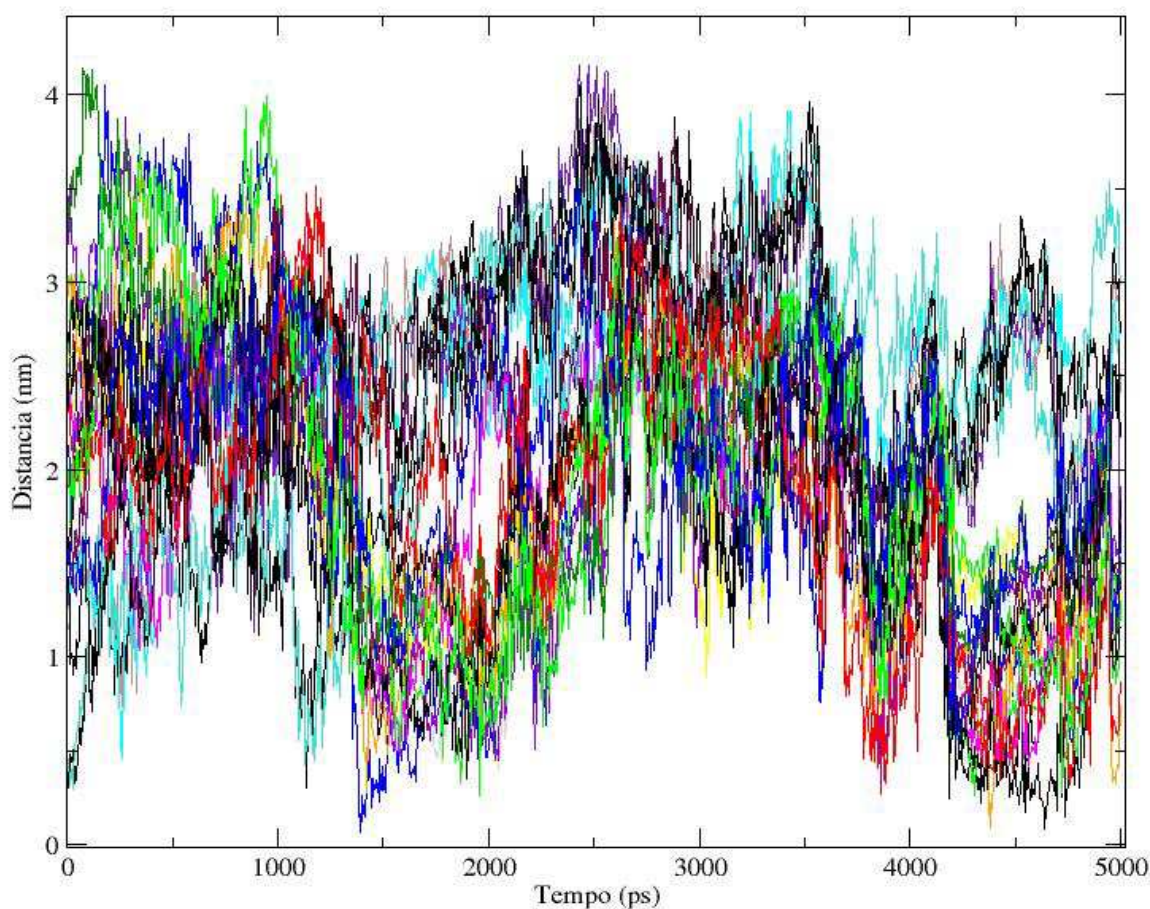


Figura RC3. Gráfico da distância (nm) do CM entre 1 (uma) molécula de BZC, e as outras 21 (vinte e uma) moléculas em função do tempo (ps). Cada cor representa o gráfico da distância do CM de cada uma das 22 moléculas em relação às outras moléculas da DM. Forma-se no final desta dinâmica, dois agregados, sendo um com 18 moléculas com diâmetro médio de 1,2 nm, outro agregado com 3 moléculas com diâmetro de 0,3 nm e uma molécula fora dos agregados. Nesta dinâmica, foram formados dois agregados, e o agregado maior de 18 moléculas, e as distâncias médias entre as moléculas deste são maiores. Isto se reflete em sua função de distribuição radial.

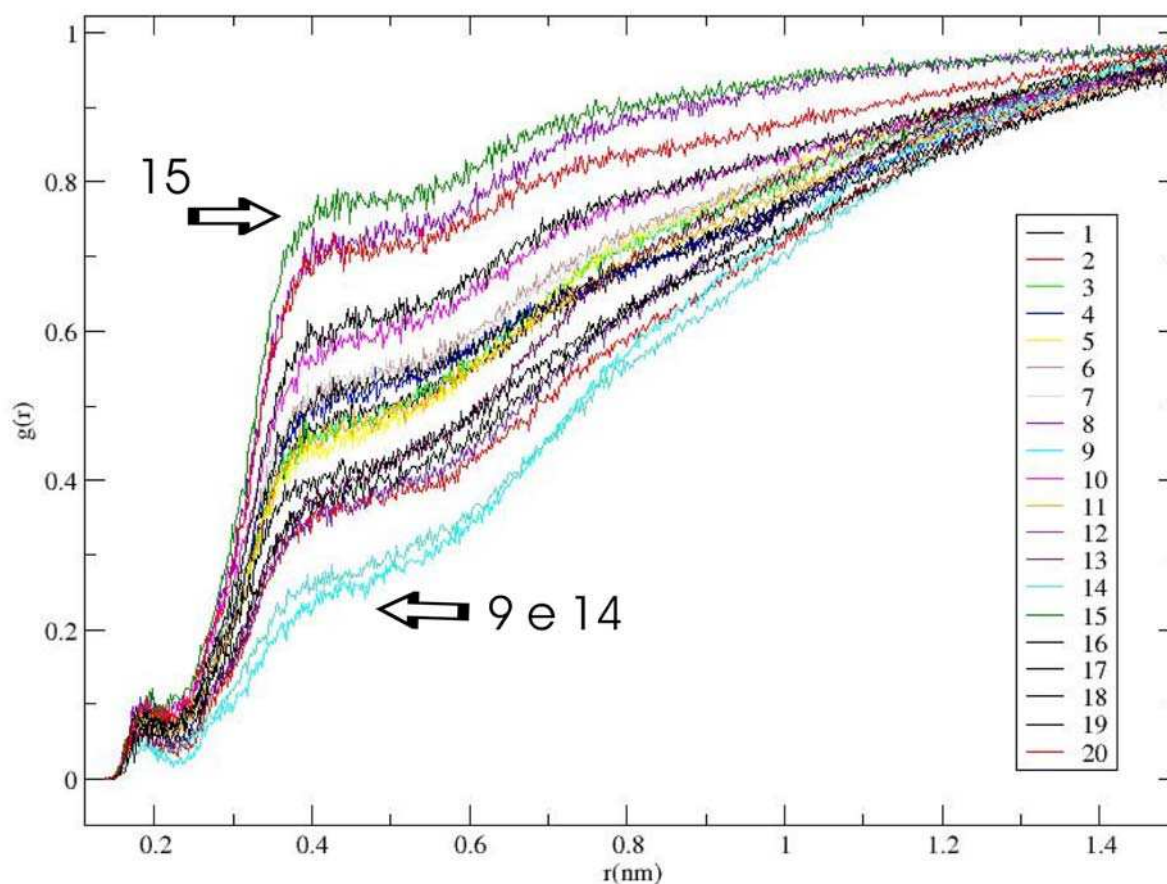


Figura RC4. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada BZC no agregado de 20 moléculas com a água (solvente). Aqui um discreto pico entorno de 0,1 no entorno de 0,18 nm, indicando um provável ligação de hidrogênio com alguma parte da molécula de BZC. Nesta Figura RC4, cada molécula de BZC apresenta um valor diferente para $g(r)$ ao final da MD. A molécula de número 15 apresenta o maior $g(r)$, indicando que a mesma permanece mais tempo de dinâmica fora do agregado, já a moléculas de números 9 e 14 mostra-se com $g(r)$ menor que todas as outras na dinâmica, indicando que estas moléculas, permaneceram durante um maior tempo no interior do agregado, (Figura RC7). Quando a distância é muito grande, temos a distribuição normal das moléculas de água, e $g(r) = 1$.

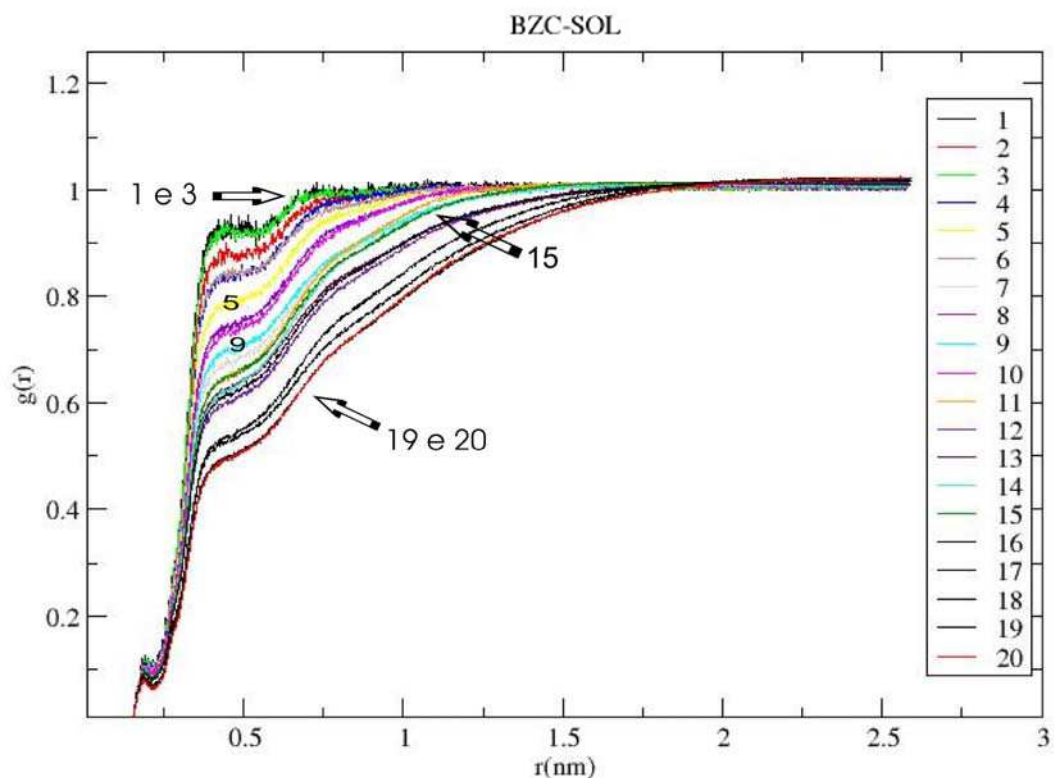


Figura RC5. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada agregado de moléculas de BZC, nas simulações de 1 a 20 moléculas de BZC com a água. Aqui um discreto pico no entorno de 0,08 a 0,12 no entorno de 0,2 nm, indicando uma provável ligação de hidrogênio com alguma parte da molécula de BZC. Nesta figura, cada agregado de moléculas de BZC apresenta um valor diferente para $g(r)$ ao final da MD. As simulações com uma molécula de BZC, e com três moléculas de BZC apresentam o mesmo valor para a $g(r)$. A simulação com três moléculas de BZC, não formou nenhum agregado, e as moléculas então estão agindo independentes, sozinhas. Com o aumento da distância, temos a distribuição normal das moléculas de água.

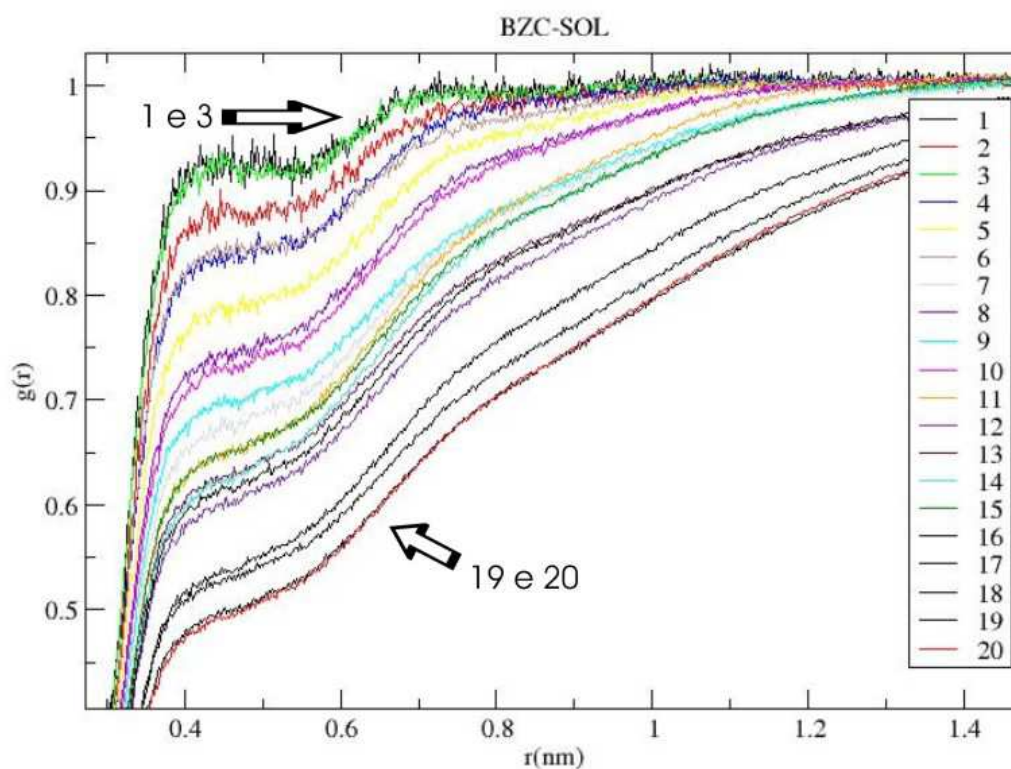


Figura RC5a. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada agregado de moléculas de BZC, nas simulações de 1 a 20 moléculas de BZC com a água, com apenas uma aproximação “zoom”, para facilitar a visualização das $g(r)$ dos agregados.

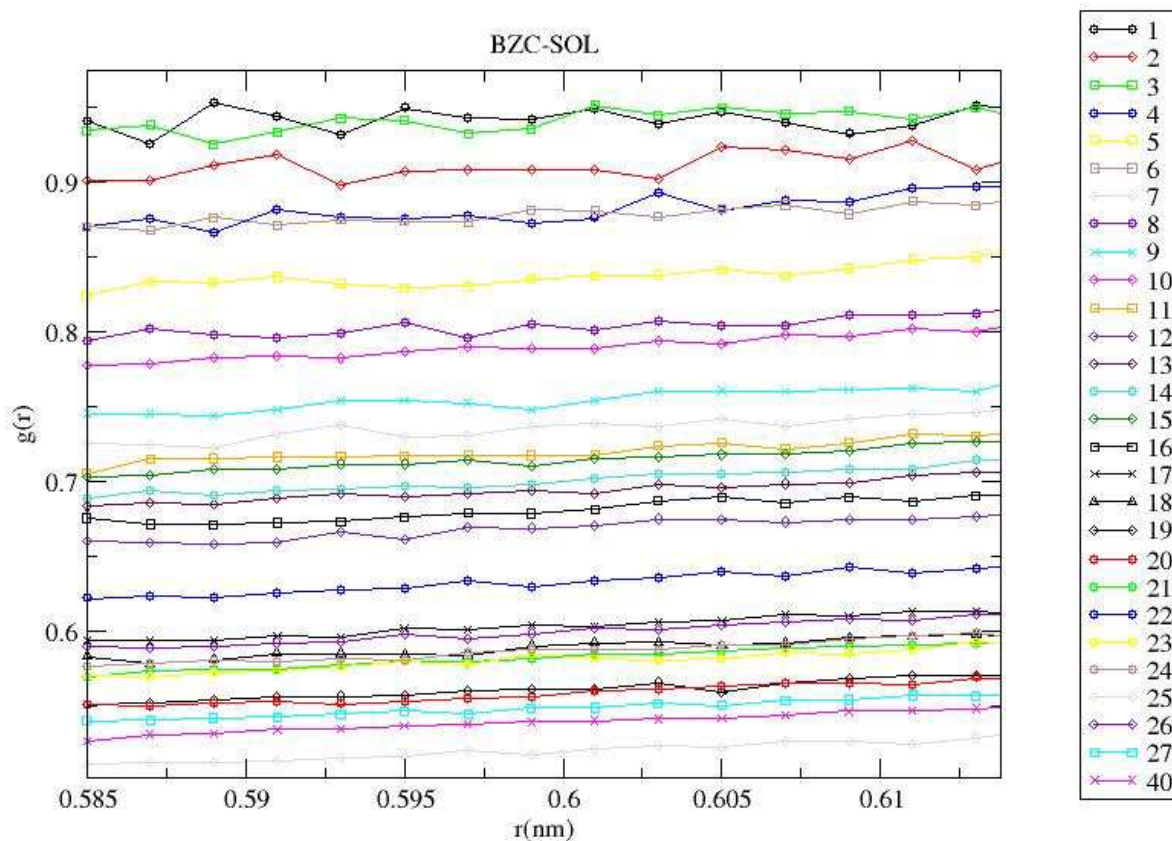


Figura RC5b. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada agregado de moléculas de BZC com 1 (uma) a 29 (vinte e nove) moléculas, e 40 (quarenta) moléculas de BZC com a água, com apenas um “zoom” aproximação, para facilitar a visualização dos valores de $g(r)$ dos agregados. O eixo horizontal varre uma distância em torno de 0,585 nm e 0,615 nm das moléculas em simulação, isto é, $g(r)$ para cada uma das MD nesta distância. Visualizamos que com de 25 (vinte e cinco) moléculas ao final da MD temos, um único agregado, o que conduz a um valor de $g(r)_{25}$ menor do que todas os outros agregados simulados, indicando que o agregado é mais hidrofóbico dentre todos.

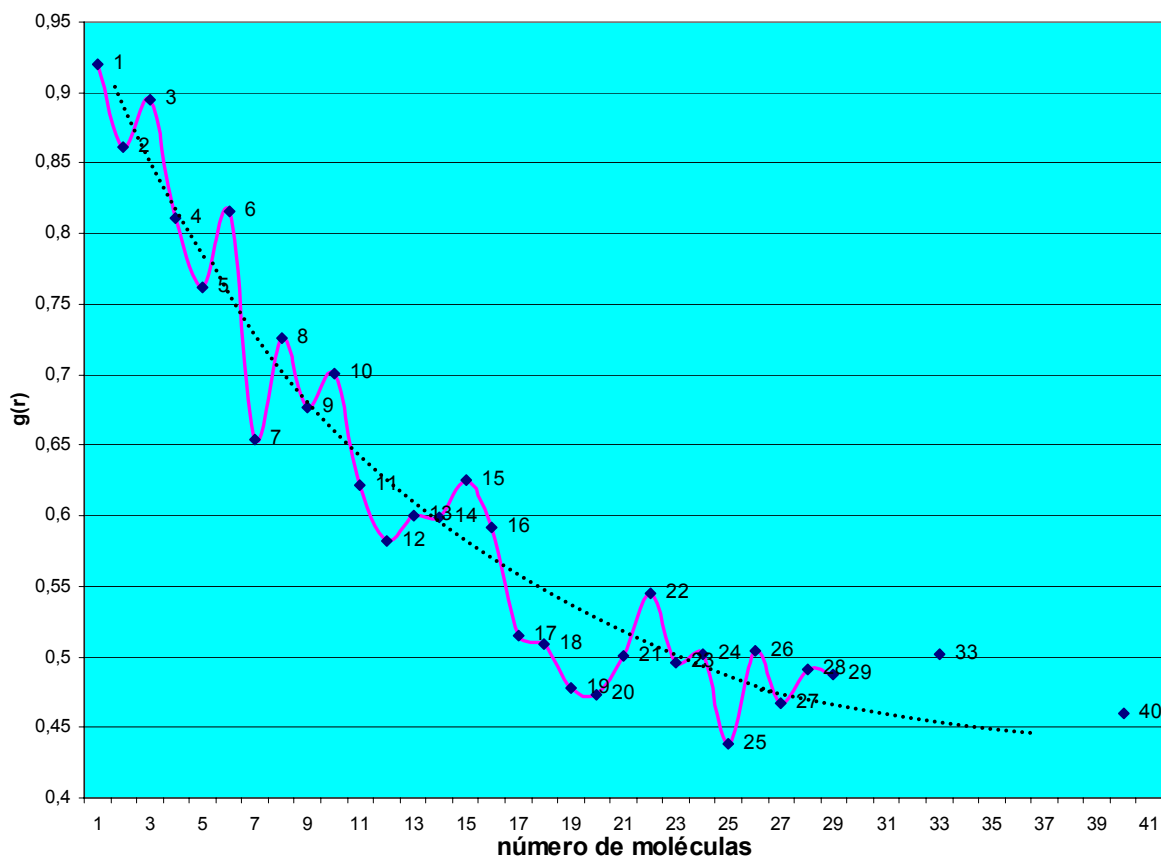


Figura RC6. Gráfico do valor médio de $g(r)$ a uma distância de 0,4 nm das moléculas em simulação, isto é, $g(r)$ para cada uma das MD com 1 a 29 moléculas, 33 e 40 moléculas. Vemos que os agregados com dois, cinco, sete, doze, vinte e vinte e cinco, apresentam um valor de $g(r)$ menor que os valores da MD com número de moléculas próximas. Isto indica que os agregados formados nestas simulações são mais compactos, com menos número de moléculas fora do agregado, com maior tempo de simulação juntas no agregado, ou com dois agregados (Figura RC1). O eixo horizontal representa o número de moléculas e o eixo na vertical o valor da função de distribuição radial $g(r)$ a distância de 0,4 nm.

O gráfico da Figura RC6 nos indica que o sistema provavelmente ainda não entrou em equilíbrio, possivelmente devido ao tempo de 5 ns da MD ser insuficiente para tal. Isto é observado pelas variações do valor de $g(r)$, mas indica que a $g(r)$ converge em uma curva exponencial a um valor limite, a concentração de moléculas de BZC na solução.

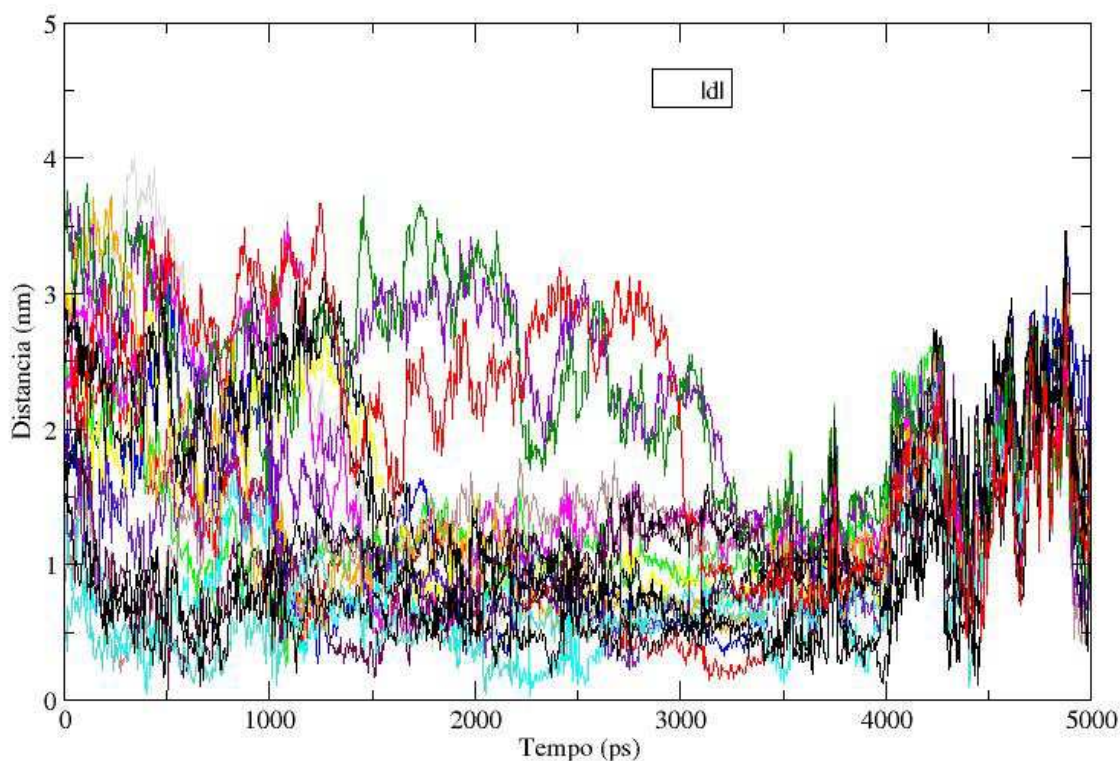


Figura RC7. Gráfico da distância (nm) do CM entre 1 (uma) molécula de BZC, e as outras 19 moléculas em função do tempo (ps). Cada cor representa a distância do CM de cada uma das 20 (vinte) moléculas em relação às outras moléculas de BZC. No entorno de 1,8 ns um agregado de 17 moléculas é formado, e três moléculas estão fora, no entorno de 3,2 ns as três moléculas livres se juntam ao agregado, permanecendo juntas até o fim da dinâmica. O agregado final tem diâmetro aproximado de 1,0 nm.

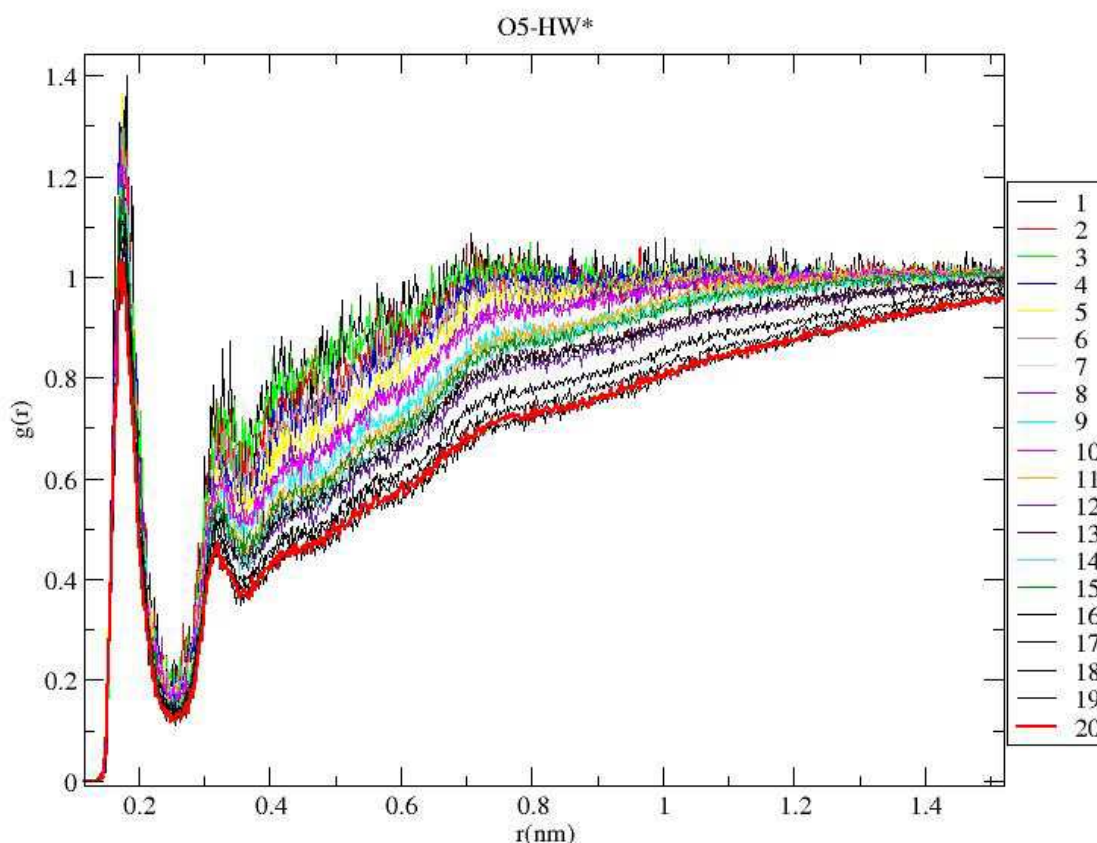


Figura RC8. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância do oxigênio O5, com os hidrogênios (Hw*) das moléculas de água, para as 20 simulações, isto é, de 1 (uma) a 20 (vinte) moléculas simuladas nos agregados. O pico característico de ligação de hidrogênio possíveis é visível para uma distância entorno de 0,15 nm e 0,17 nm, com valor médio de 0,155 nm. A distância indicada 0.15 nm a 0.17 nm indica a provável “permanente” ligação de hidrogênio entre o oxigênio O5, da carbonila, independente da quantidade de moléculas de BZC acrescidas na simulação dos agregados. A distribuição espacial de cargas, (Figura C3a), indica que o oxigênio O5, representado na cor azul, com carga negativa, (Figura C3), atrai moléculas de água, com os hidrogênios destas apontando na direção de O5, enquanto os oxigênios da água apontam na direção oposta.

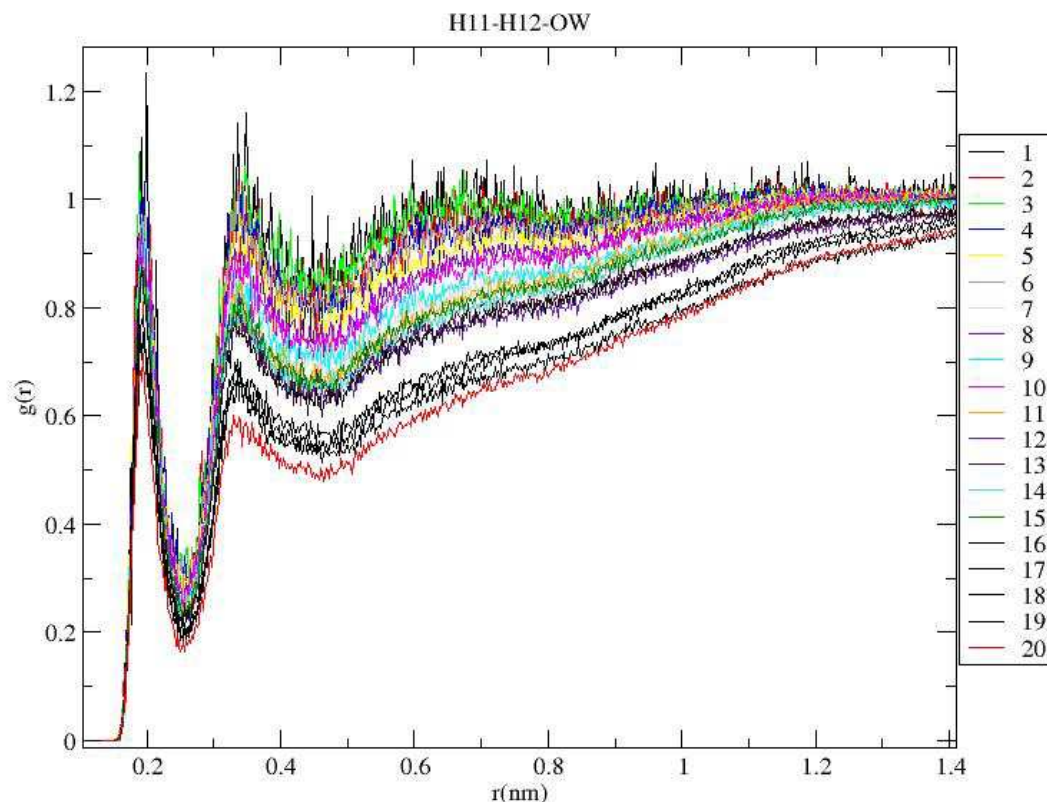


Figura RC9. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância dos hidrogênios, H11 e H12, do terminal amina, com os oxigênios das moléculas de água, para as 20 simulações, isto é, de 1 (uma) a 20 (vinte) moléculas simuladas nos agregados. O pico característico de ligação de hidrogênio possíveis é visível para uma distância entorno de 0,16 nm e 0,19 nm, com valor médio de 0,175 nm. À distância 0,16 nm a 0,19 nm, indica à provável “permanente” ligação de hidrogênio entre o hidrogênio, H11 e H12, do terminal amina, com os Oxigênio da água, independente da quantidade de moléculas de BZC acrescentadas na simulação dos agregados. A distribuição espacial de cargas Figura C3a, indica que o nitrogênio representado na cor azul, com carga negativa, (Figura C3), atrai moléculas de água, com os hidrogênios destas apontando na direção de N10, enquanto os oxigênios da água apontam para os H11 e H12, se aproximando e possivelmente fazendo ligações de hidrogênios com estes, como indica a Figura RC9.

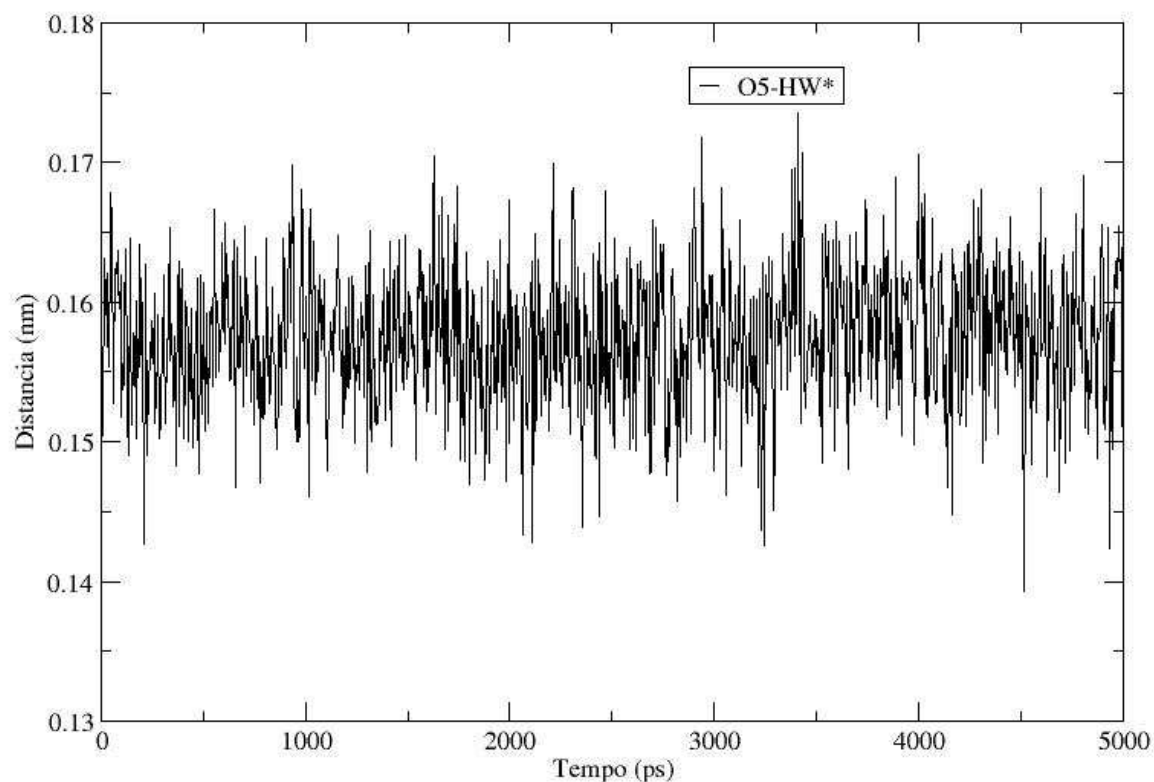


Figura RC10. Gráfico da distância mínima (nm) entre o oxigênio O5 carbonila, com os hidrogênios Hw* das moléculas de água. O pico característico de ligação de hidrogênio possíveis na Figura RC8, com valor médio de 0,155 nm, nesta figura, pode ser confirmada, indicado a “provável permanência” de ligação de hidrogênio “fixa” entre o oxigênio O5 carbonila, com os hidrogênios da água, é independente da quantidade de moléculas de BZC acrescentadas na simulação dos agregados.

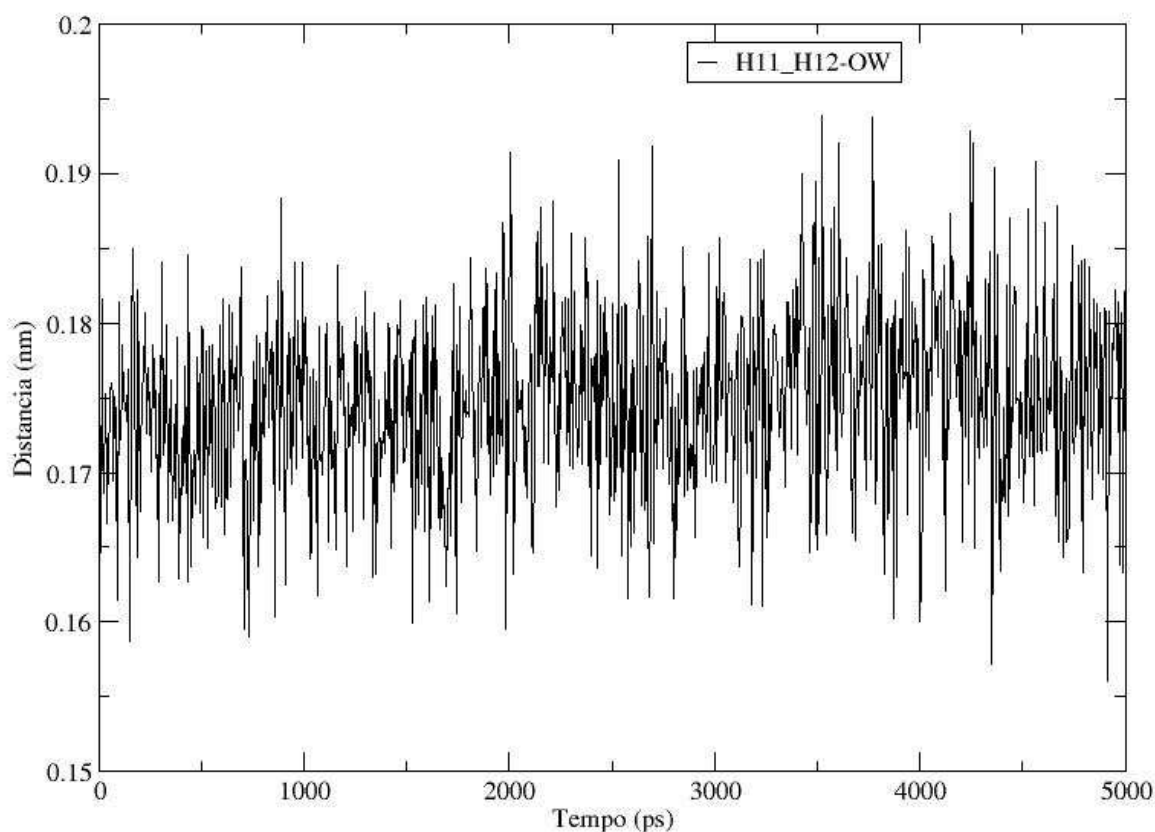


Figura RC11. Gráfico da distância mínima (nm) entre os hidrogênios H11 e H12 do terminal amina, com os oxigênios (Ow) das moléculas de água. O pico característico de ligação de hidrogênio possíveis na Figura RC9, com valor médio de 0,175 nm, nesta figura, pode ser confirmada, indicado a “provável permanência” de ligação de hidrogênio “fixa” entre os hidrogênios H11 e H12 do terminal amina, com os oxigênios das moléculas de água, é independente da quantidade de moléculas de BZC acrescentadas na simulação dos agregados.

Temperatura

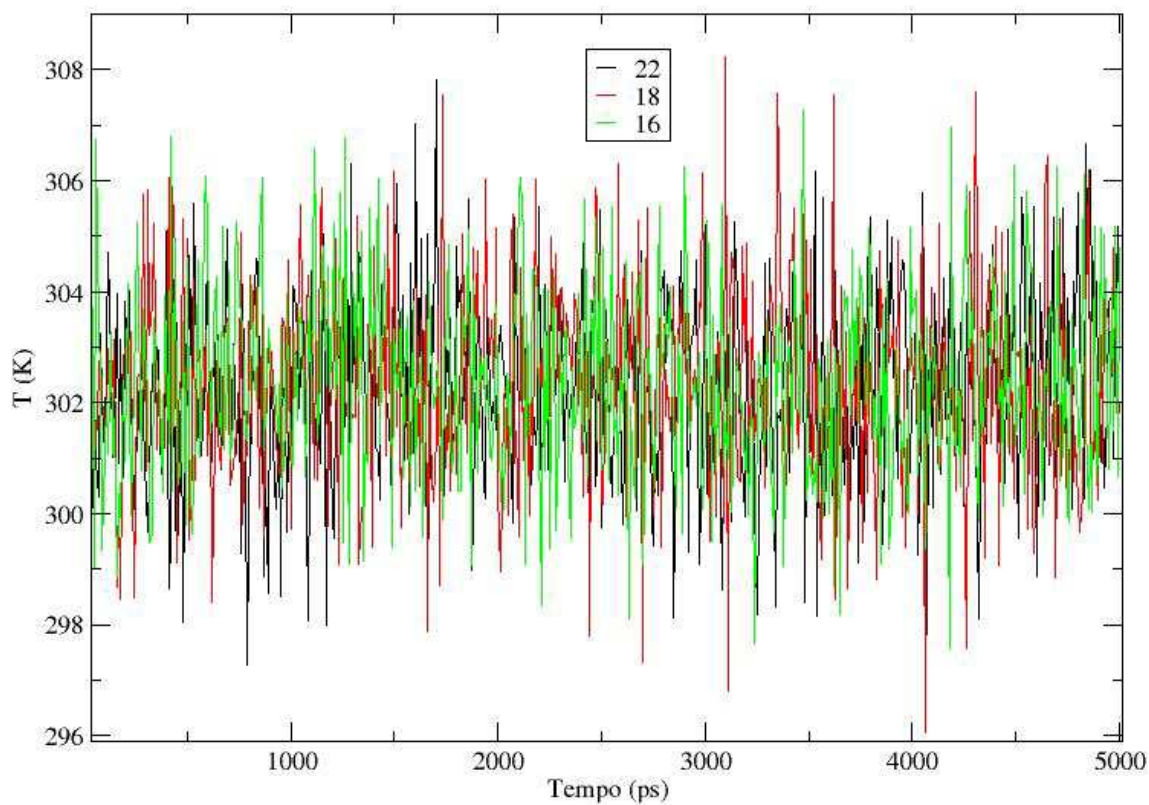


Figura RC12. Gráfico da temperatura (K) em função do tempo (ps) para as dinâmicas de 16 (dezesesseis), 18 (dezoito) e 22 (vinte e duas) moléculas de BZC, na MD dos agregados. O valor médio obtido para a temperatura na MD de 5 ns, é de 302,314K para 16 (dezesesseis), de 302,311K para 18 (dezoito) e de 302,290K para 22 (vinte e duas) moléculas de BZC na formação dos agregados.

Energia Cinética

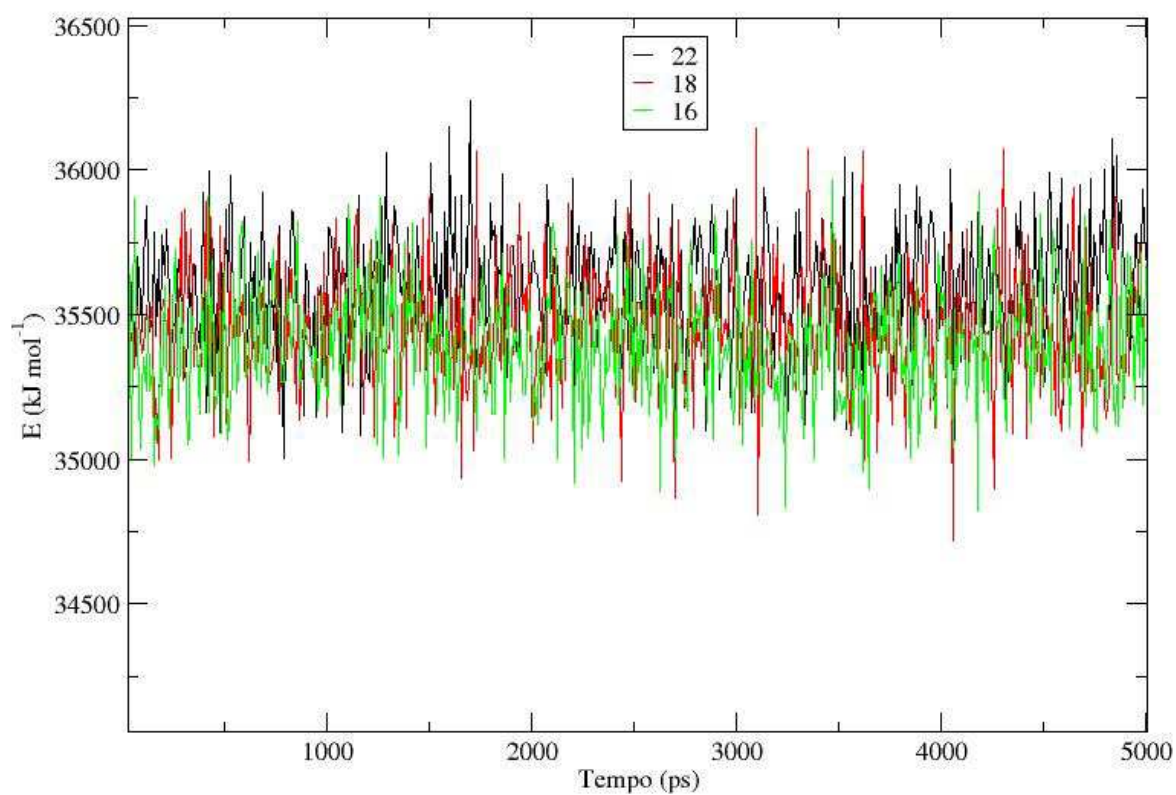


Figura RC13. Gráfico da energia cinética (kJ.mol^{-1}) em função do tempo (ps) para as dinâmicas de 16 (dezesesseis), 18 (dezoito) e 22 (vinte e duas) moléculas de BZC, na MD dos agregados. O valor médio obtido para a energia cinética na MD de 5 ns, é de $3,54.10^4 \text{kJ.mol}^{-1}$ para 16 (dezesesseis), de $3,55.10^4 \text{kJ.mol}^{-1}$ para 18 (dezoito) e de $3,56.10^4 \text{kJ.mol}^{-1}$ para 22 (vinte e duas) moléculas de BZC na formação dos agregados.

Energia Potencial

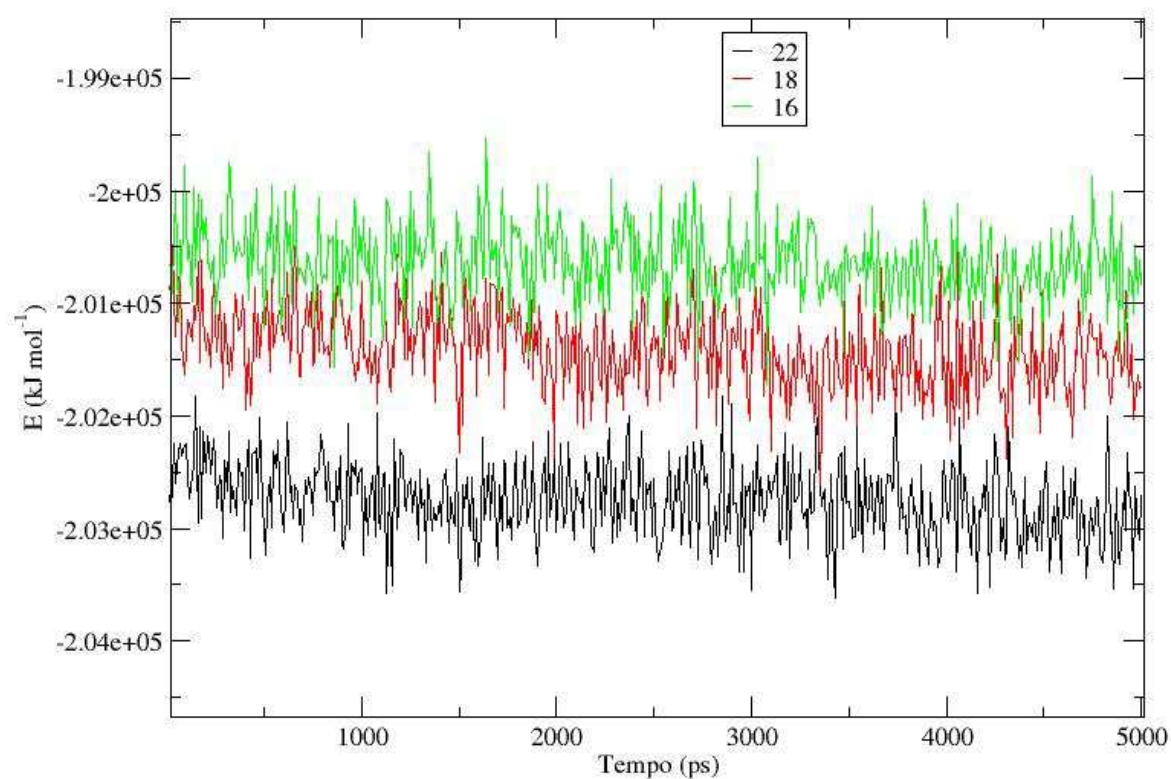


Figura RC14. Gráfico da energia potencial (kJ.mol^{-1}) em função do tempo (ps) para as dinâmicas de 16 (dezesesseis), 18 (dezoito) e 22 (vinte e duas) moléculas de BZC, na MD dos agregados. O valor médio obtido para a energia potencial na MD de 5 ns, é de $-2,01.10^5 \text{kJ.mol}^{-1}$ para 16 (dezesesseis), de $-2,01.10^5 \text{kJ.mol}^{-1}$ para 18 (dezoito) e de $-2,03.10^5 \text{kJ.mol}^{-1}$ para 22 (vinte e duas) moléculas de BZC na formação dos agregados.

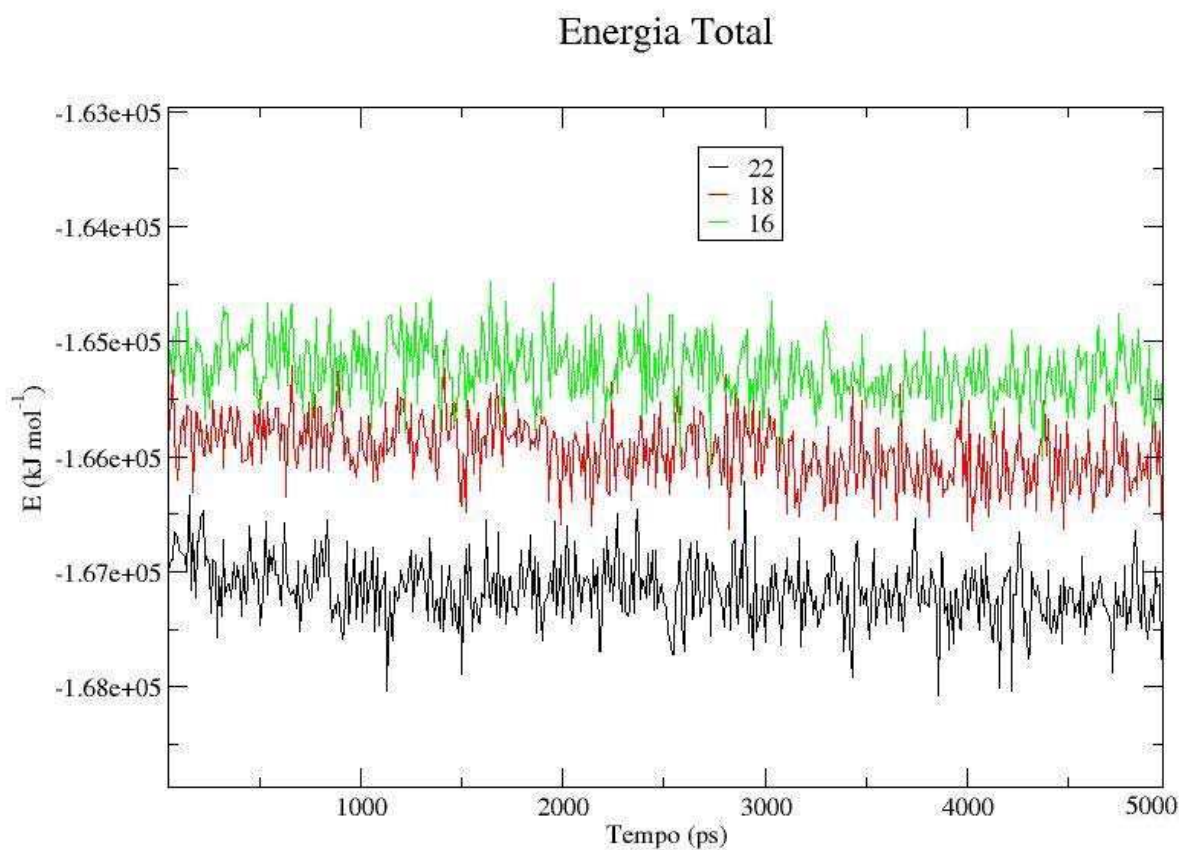


Figura RC15. Gráfico da energia total ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), isto é, energia cinética mais energia potencial, em função do tempo (ps) para as dinâmicas de 16 (dezesesseis), 18 (dezoito) e 22 (vinte e duas) moléculas de BZC, na MD dos agregados. O valor médio obtido para a energia total na MD de 5 ns, é de $-1,65\cdot 10^5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para 16 (dezesesseis), de $-1,66\cdot 10^5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para 18 (dezoito) e de $-1,67\cdot 10^5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para 22 (vinte e duas) moléculas de BZC na formação dos agregados..

3.10. Uma síntese dos resultados

A análise computacional da MD molécula de BZC, necessita ser cuidadosa, demonstrou ser este um LA diferente devido ao baixo pKa. Em meio fisiológico não apresenta a forma protonada. Assim a ação desta não é facilmente compreendida. O estudo computacional com alta concentração, mostrou a formação de agregados. As moléculas de BZC formam agregados, e estes mostraram que a moléculas de BZC são mais hidrofóbicas nos agregados, que quando sozinhas. O aumento da concentração, e conseqüentemente sua hidrofobicidade provavelmente permite a ação da BZC com maior intensidade, não necessitando da forma protonada para penetração em meio lipofílico.

A simulação da MD da BZC em meio aquoso, para a concentração aplicada, nos indica que o sistema provavelmente ainda não entrou em equilíbrio, possivelmente devido ao tempo de 5 ns da MD ser insuficiente para tal, mas indica que a RDF, $g(r)$, cai em curva exponencial e converge a um valor limite, com o aumento da concentração de moléculas da BZC na solução. Provavelmente uma MD de 20 ns seria o suficiente para o sistema chegar ao equilíbrio, e os pontos obtidos no gráfico da Figura RC6 seriam mais próximas à curva exponencial, chegando, portanto as mesmas conclusões, podendo ainda obter uma função para esta curva.

3.11. A molécula da BZC em solução aquosa a 0,9% de NaCl

Uma breve descrição com relação ao ensemble utilizado na DM, nos cálculos efetuados com 1 (uma) a 10 (dez) moléculas de BZC em solução aquosa de a 0,9% NaCl, simulando o meio fisiológico, aqui se faz necessária.

A MD efetuada da BZC com solução aquosa a 0,9% de NaCl teve como objetivo a simulação das propriedades da BZC em meio fisiológico. A MD foi realizada em uma caixa cúbica contendo 4598 moléculas de água, 10 íons Na^+ , 10 íons Cl^- . Os íons foram introduzidos aleatoriamente dentro da caixa de água, no ensemble NPT, com pressão de 1 (um) bar e temperatura de 300K. O modelo de água utilizado foi o SPC-216, com uma simulação de 1 (uma) a 10 (dez) moléculas de BZC em meio fisiológico, isto é, aumentada à concentração de BZC, na solução iônica, para verificação de seu comportamento e a formação de agregados.

As propriedades hidrofóbica/hidrofílica já descritas de cada átomo e grupo da BZC em solvente aquoso puro, mudaram em solução iônica aqui simulada, possivelmente mudando a distribuição de cargas da molécula. Na Figura RCI8, podemos verificar a diferença entre os valores de $g(r)$ em solvente aquoso puro e solvente aquoso a 0,9% de NaCl. Verificamos que a BZC é mais hidrofóbica quando nas MD com 1 (uma), 4 (quatro) e 10 (dez) moléculas de BZC, e com duas, três, cinco, seis, sete, oito e nove moléculas de BZC, apresentaram-se menos hidrofóbica, em meio iônico, que em meio aquoso puro.

A formação de agregados foi alterada, diferenciando-se do meio aquoso puro, Não ocorreram à formação de agregados no final da dinâmica com duas, três e quatro moléculas de BZC no meio iônico. A função de distribuição radial $g(r)$ indica,

(Figura RCI1), que na dinâmica com 6 (seis) moléculas, o seu valor de $g(r)$ é menor que com 4 (quatro) e 5 (cinco) moléculas. As possíveis ligações de hidrogênio com o oxigênio O5, e com os hidrogênios H11 e H12, do terminal amina, se mantiveram inalteradas, indicando que, encontra-se possivelmente água entre as moléculas que formam o agregado, quando da simulação em solução aquosa iônica. A formação de mais de um agregado, como mostra a Tabela RCI1, também ocorreu, indicando que a molécula de BZC, possivelmente não se cristaliza no meio iônico na concentração da MD utilizada.

Provavelmente pode ocorrer a formação de molécula de BZC na forma hidroclorada, com a possível ligação do íon cloro, com os hidrogênios do terminal amina, através das forças de van der Waals, como mostra a Figura RCI9. A distância mínima entre os H11 e H12, com os íons Cl^- , variam no entorno, para a MD de 1 (uma) molécula de BZC, de 0,26 nm a 2,5 nm, enquanto que para a MD de 10 (dez) moléculas de BZC, se encontra no entorno de 0,25 nm a 2,0 nm, indicando que quanto maior a quantidade de moléculas de BZC adicionadas à dinâmica em meio iônico, menor será a distância mínima, para que ocorra a possibilidade de formação de BZC na forma hidroclorada no aglomerado.

A análise dos resultados a seguir utiliza como base os gráficos das Figuras [RCI1-RCI9].

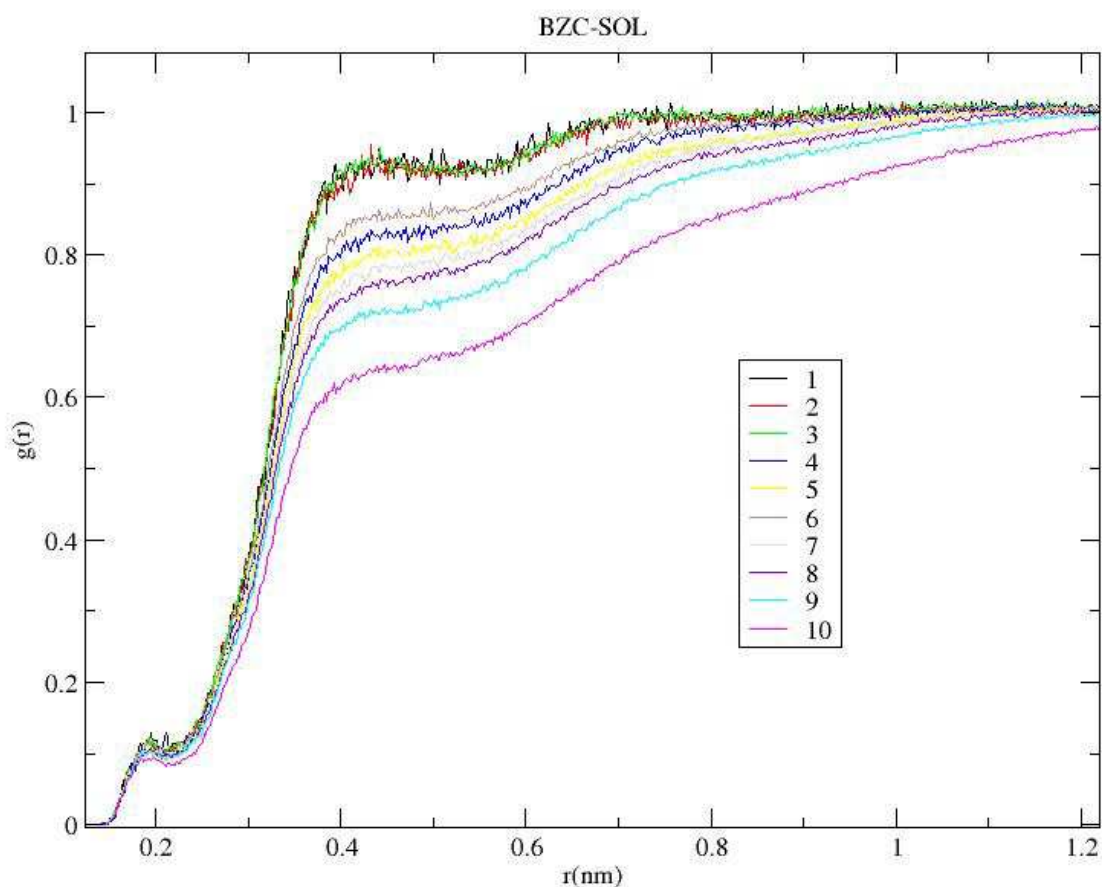


Figura RC11. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ pela distância de cada agregado de moléculas de BZC, nas simulações de 1 a 10 moléculas de BZC em solução aquosa a 0,9% de NaCl. Aqui um discreto pico no entorno de 0,08 a 0,12 no entorno de 0,2 nm, indicando possibilidade de ligação de hidrogênio com alguma parte da molécula de BZC. Nesta figura, cada agregado de moléculas de BZC, é representada por cada uma das cores no gráfico, apresenta um valor diferente para cada $g(r)$ durante a MD. A simulação com uma, duas e três moléculas de BZC apresentam aproximadamente o mesmo valor para o $g(r)$, não ocorrendo à formação de agregado. Elas agem independentes, sozinhas, apresentando então o mesmo valor aproximado de $g(r)$.

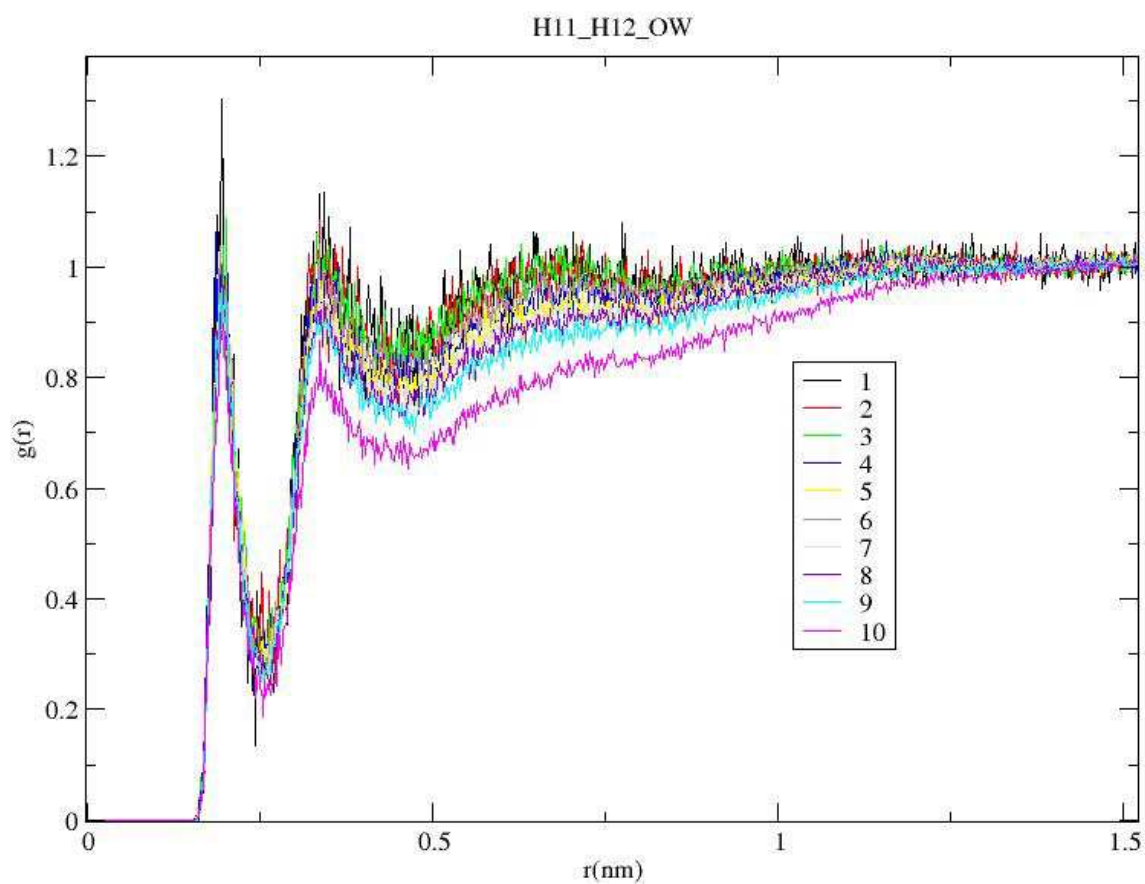


Figura RC12. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância dos hidrogênios, H11 e H12, do terminal amina, com os oxigênios das moléculas de água, para as 10 (dez) simulações, isto é, de 1 (uma) a 10 (dez) moléculas simuladas nos agregados, na MD em meio fisiológico. O pico característico de possíveis ligações de hidrogênio é visível para uma distância entorno de 0.16 nm e 0.22 nm, com valor médio de 0.20 nm, (Figura RC14). À distância 0,16 nm a 0,22 nm, indica à provável "permanente" ligação de hidrogênio do terminal amina, com o oxigênio da água, independente da quantidade de moléculas de BZC acrescentadas na simulação dos agregados. Esta possível ligação de hidrogênio no terminal amina é independente do solvente da MD, tanto em solvente aquoso puro, quanto em meio fisiológico. A amplitude do pico característico varia, diminuindo de modo geral com a quantidade de moléculas de BZC acrescentadas à dinâmica, no entorno de 1,3 nm a 0,9 nm.

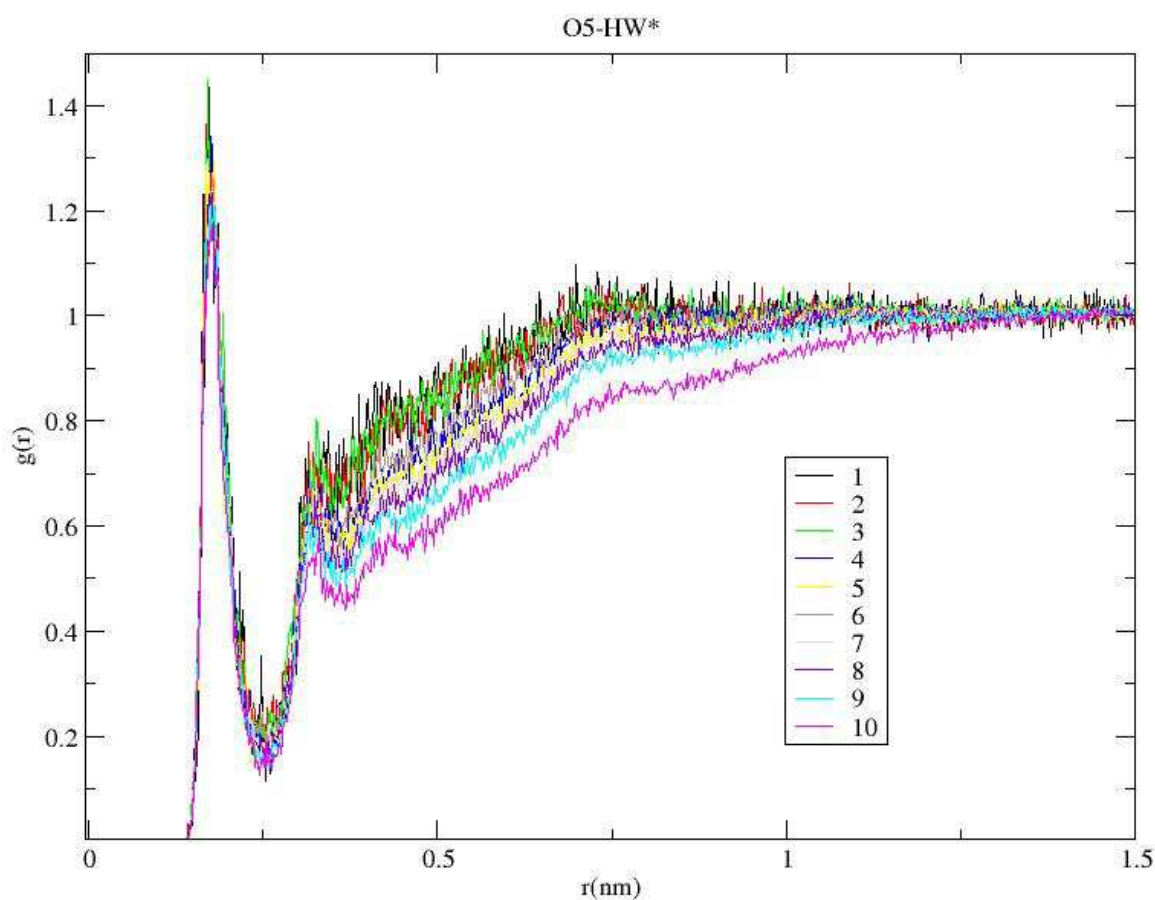


Figura RC13. Gráfico da função de distribuição radial $g(r)$ para a distância do oxigênio O5, com os hidrogênios (Hw*) das moléculas de água, para as 10 (dez) simulações, isto é, de 1 (uma) a 10 (dez) moléculas simuladas nos agregados, na MD em meio fisiológico. O pico característico de provável ligação de hidrogênio é visível para uma distância no entorno de 0,15 nm e 0,19 nm, com valor médio de 0,18 nm, (Figura RC15). À distância 0,15 nm a 0,19 nm indica a provável “permanente” ligação de hidrogênio entre o oxigênio O5, da carbonila, independente da quantidade de moléculas de BZC acrescentadas na simulação dos agregados. Esta possível ligação de hidrogênio no O5 independe do solvente da MD aqui utilizada, tanto em solvente aquoso puro, quanto em solvente aquoso a 0,9% de NaCl, apresentando o mesmo pico característico. Sua amplitude varia com o acréscimo de moléculas de BZCs, diminuindo o pico de 1,45 nm a 1,2 nm.

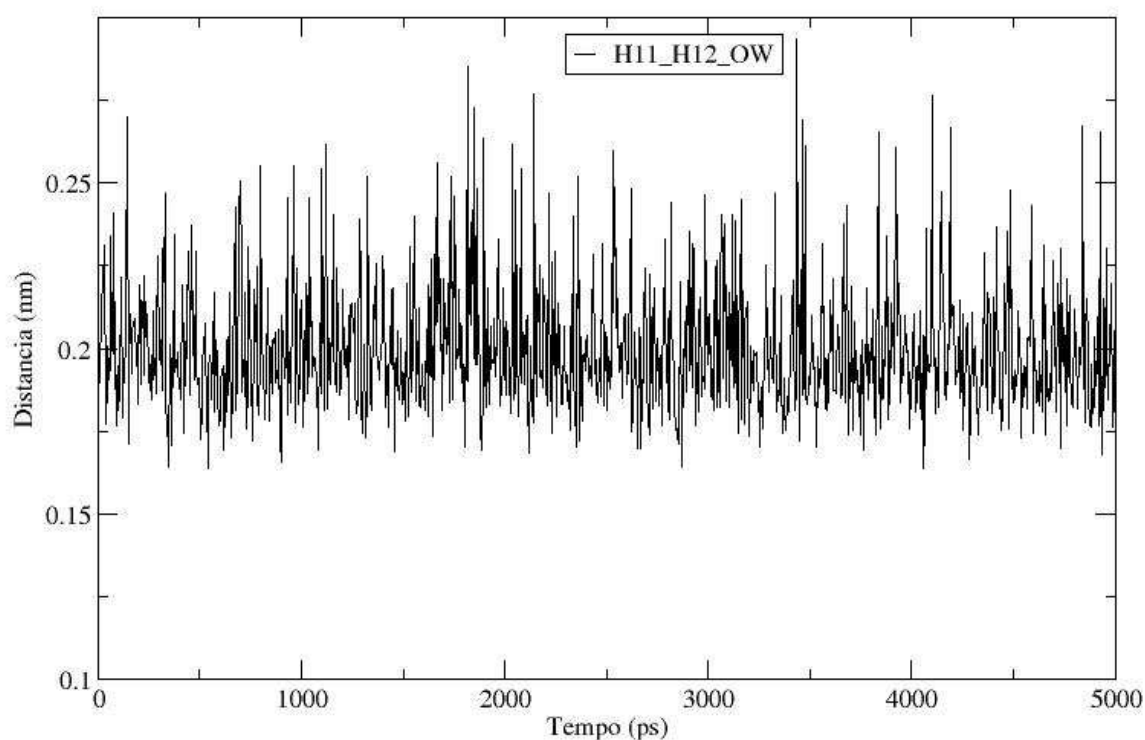


Figura RC14. Gráfico da distância média mínima dos átomos de hidrogênios, H11 e H12 com os oxigênios Ow da água, na MD de 1 (uma) molécula de BZC em meio fisiológico. A Figura RC12, aponta possível ligação de hidrogênio com os hidrogênios, do terminal amina, com o oxigênio da molécula de água, atraindo estes, repelindo os hidrogênios da água, ficando estes dispostos em sentido contrário ao grupo. A distância média mínima em torno de 0,20 nm, em conformidade com a Figura RC12, reforça essa possibilidade de ligação de hidrogênio. Esta possível ligação de hidrogênio, com os hidrogênios do terminal amina, independe do solvente da MD, tanto solvente aquoso puro, quanto em solvente aquoso a 0,9% de NaCl. O pico característico manteve-se na mesma faixa, de distância prevista para uma possível ligação de hidrogênio, variando sua amplitude, diminui com o acréscimo de moléculas de BZCs.

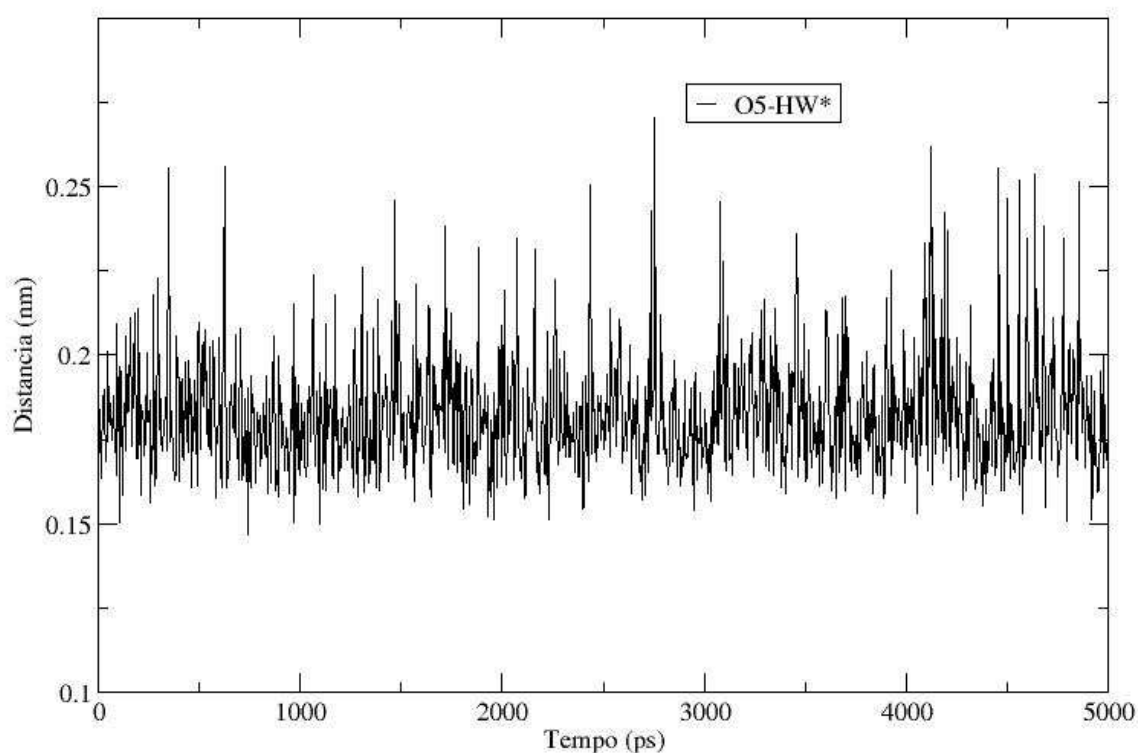


Figura RC15. Gráfico da distância mínima (nm) entre o oxigênio O5 carbonila, com os hidrogênios (Hw*) das moléculas de água, para a MD de 1 (uma) molécula de BZC em meio fisiológico. O pico característico de possível ligação de hidrogênio (Figura RC13), com valor médio de 0,18 nm, nesta Figura RC15, pode ser confirmado, indicado a provável “permanência” de ligação de hidrogênio entre o oxigênio O5 carbonila, com os hidrogênios da água, é independente da quantidade de moléculas de BZC acrescentadas na simulação dos agregados. Esta possível ligação de hidrogênio no O5 independe do solvente da MD, tanto em solvente aquoso puro, quanto em solvente aquoso a 0,9% de NaCl. O pico característico manteve-se na mesma faixa, diminuindo sua amplitude com o acréscimo de moléculas de BZCs.

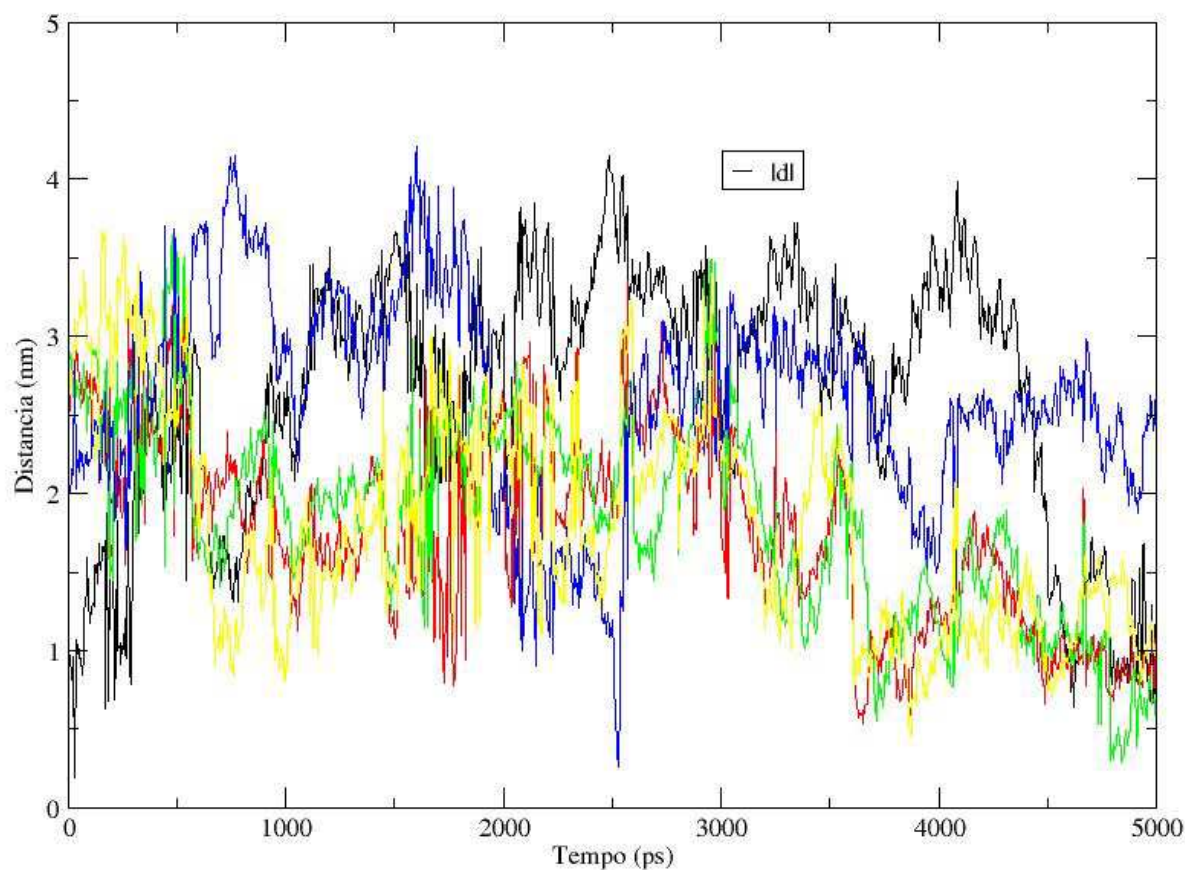


Figura RCI6. Gráfico da distância (nm) entre uma molécula de BZC, em meio aquoso a concentração 0,9% de NaCl, e as outras 4 (quatro) moléculas em função do tempo (ps). Cada cor representa uma das 5 (cinco) moléculas. Forma-se no final da dinâmica um agregado, tendo este 4 (quatro) moléculas com diâmetro médio do agregado em torno de 0,5 nm, e uma molécula fora do agregado. Nesta dinâmica, tem-se no entorno de 3000 ps um agregado com 3 (três) moléculas e 2 (duas) moléculas fora do agregado. No final da dinâmica estas se aproximam, e formam um único agregado, com uma molécula livre, fora deste, permanecendo assim até o final da dinâmica.

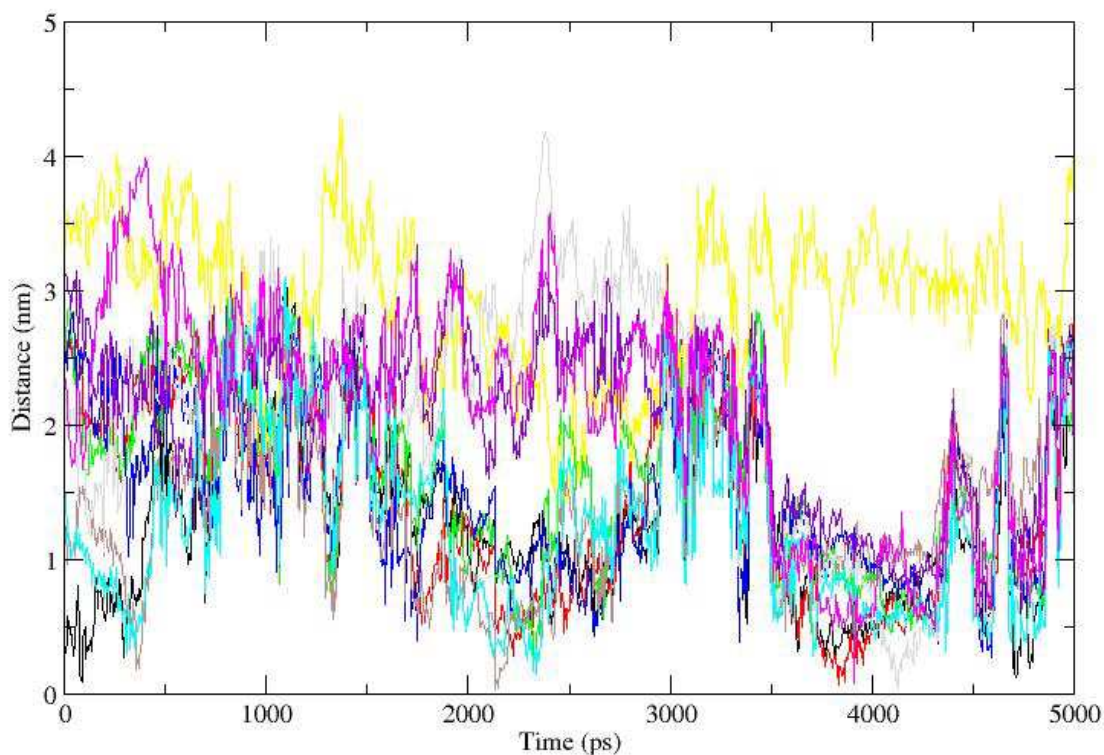


Figura RCI7. Gráfico da distância (nm) entre uma molécula de BZC, em meio aquoso a concentração 0,9% de NaCl, e as outras 9 moléculas em função do tempo (ps). Cada cor representa uma das 10 (dez) moléculas. Forma-se no final da dinâmica um agregado, tendo este 9 (nove) moléculas com diâmetro médio do agregado em torno de 0,5 nm, e uma molécula fora do agregado. Nesta dinâmica, o agregado formado permanece junto por um tempo de dinâmica maior que o agregado formado na dinâmica sem íons, indicando um valor de $g(r)$ menor, (Figura RCI8). Tem-se que no entorno de 1900 ps havia dois agregados um maior com 7 (sete) moléculas e outro com 3 (três) moléculas, estes se aproximam, e formam um único agregado, com uma molécula livre, permanecendo assim até o final da dinâmica.

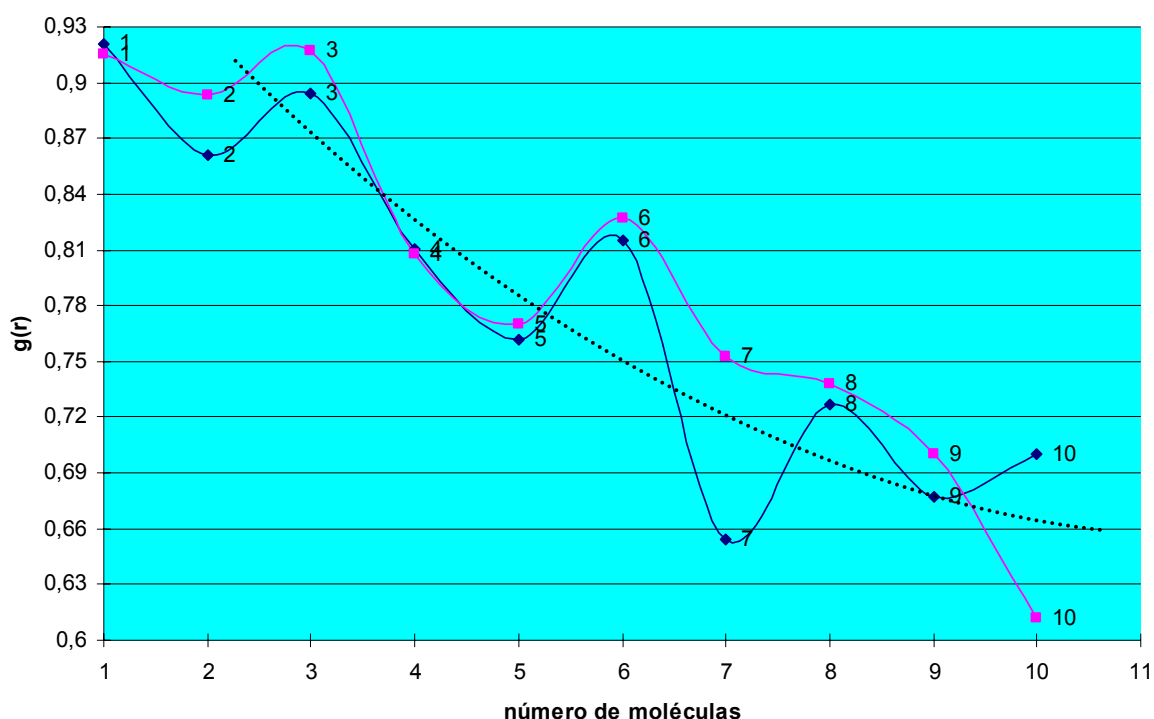


Figura RCI8. Gráfico do valor da função $g(r)$ a uma distância de 0,4 nm do CM das moléculas de BZC em simulação, em meio aquoso e salino. O eixo horizontal representa o número de moléculas na MD e o eixo na vertical o valor da função de distribuição radial $g(r)$ a distância de 0,4 nm. No gráfico a cor rosa representa a DM das moléculas de BZC em solução aquosa a 0,9% de NaCl, e na cor azul a DM das moléculas de BZC em solução aquosa pura. Verifica-se que o valor da função $g(r)$ para 1 (uma) molécula e 4 (quatro) moléculas de BZC, em solução aquosa com íons Na^+ e Cl^- , é discretamente menor que em solução aquosa pura. Com 10 (dez) moléculas de BZC em solução aquosa com íons Na^+ e Cl^- , o valor da função $g(r)$ com íon é muito menor que em solução aquosa pura ($g(r)_{\text{íons}} \ll g(r)_{\text{água pura}}$). Nas outras MD, com dois, três, cinco, seis, sete, oito e nove moléculas de BZC, o valor do $g(r)$, indica que o valor da função $g(r)$ com íons maior que em solução aquosa pura ($g(r)_{\text{íons}} > g(r)_{\text{água pura}}$), em destaque o valor ($g(r)_{\text{água pura}} \ll g(r)_{\text{íons}}$) para sete moléculas de BZC.

Ambas, MD em meio aquoso e salino, (Figura RCI8), a RDF, $g(r)$, cai em curva exponencial e converge a um valor limite, com o aumento da concentração de moléculas da BZC na solução. Os pontos fora da curva indicam que o sistema ainda não entrou em equilíbrio em 5 ns.

Segue abaixo a tabela de comparação de agregados em simulação da MD em meio aquoso sem íons e com íons de Na⁺ e Cl⁻.

MD de todas as BZCs de 1 a 10

Número de BZCs	Número de agregados formados no final da MD	Moléculas fora do agregado	Número de agregados formados no final da MD c/ íons	Moléculas fora do agregado c/ íons
2	1	0	0	2
3	0	3	0	3
4	0	4	0	4
5	1	2	1	1
6	1	2	1	4
7	1	0	1	2
8	2	1	1	3
9	1	2	2	0
10	2	2	1	1

Tabela RC11. Tabela comparativa com os dados do número de agregados e moléculas livres - fora dos agregados, para a simulação da MD em meio aquoso sem íons e com íons de Na⁺ e Cl⁻, com 1 (uma) a 10 (dez) moléculas de BZC.

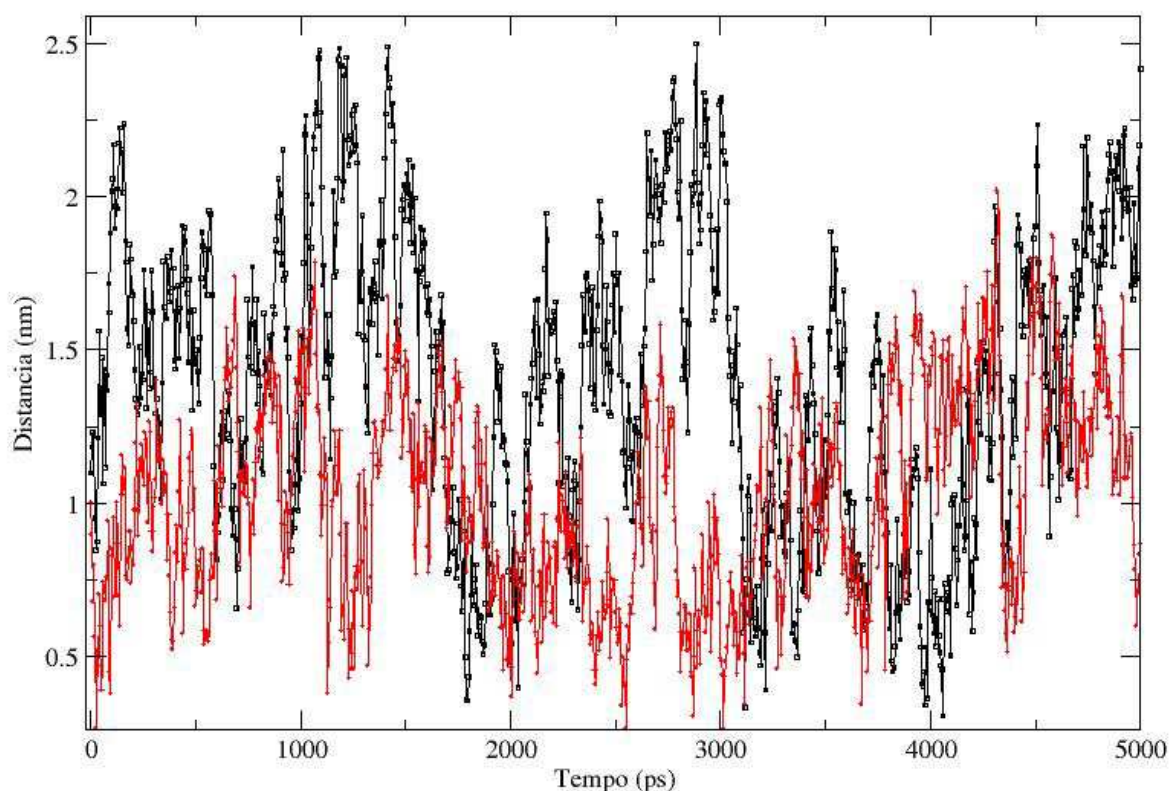


Figura RC19. Gráfico da distância mínima (nm) entre os hidrogênios, H11 e H12, do terminal amina, com os íons Cl^- da solução iônica. Na cor preta a distância mínima dos hidrogênios, H11 e H12, com os íons Cl^- da solução iônica, para uma MD de 1 (uma) molécula de BZC. Na cor vermelha a distância mínima dos hidrogênios, H11 e H12, com os íons Cl^- da solução iônica, para a MD de 10 (dez) moléculas de BZC na solução. A distância para a MD de 1 (uma) molécula de BZC, se encontra no entorno de 0,26 nm a 2,5 nm, representado na cor preta. A distância para a MD de 10 (dez) moléculas de BZC, se encontra no entorno de 0,25 nm a 2,0 nm, representado na cor preta, portanto, ocorreu uma diminuição da distância entre os hidrogênios do terminal amina da BZC, com os íons cloro (Cl^-) da solução iônica, quando do aumento da concentração de BZC, com a formação de agregados.

As moléculas de BZC em meio aquoso e em meio fisiológico na dinâmica aplicada, não entraram em equilíbrio devido ao tempo de 5 ns serem insuficiente para tal, mas apresenta em essência o mesmo comportamento.

3.12. Penetração da BZC na interface água/membrana DPPC/água

Para estudar o comportamento do fármaco na interface água/membrana DPPC/água, construímos um gráfico com a posição relativa de determinado átomo da molécula BZC, com dois átomos de interface da membrana DPPC. Como o modelo de membrana que utilizamos tem seu plano no eixo XY, e para determinamos como a BZC interage com a interface, gráficos do deslocamento do terminal CH₃, do anel aromático e do nitrogênio N10, da molécula da BZC, com dois átomos de fósforo, estes um em cada lado da interface da membrana DPPC foram construídos. Um gráfico do deslocamento com relação ao eixo Z, dentro da caixa, através da interface da água/membrana/água, em função do tempo, nos deu a profundidade com que a molécula do nosso fármaco BZC penetra a membrana DPPC. O tempo de simulação computacional da MD da BZC na interface na DPPC foi de 20 ns.

Utilizando os gráficos como parâmetros de nossa análise, verifica-se que a BZC penetra a membrana após 13ns de dinâmica.

A representação da estrutura da membrana DPPC se faz necessária a seguir e a análise prossegue utilizando como base os gráficos das Figuras [RM1-RM5].

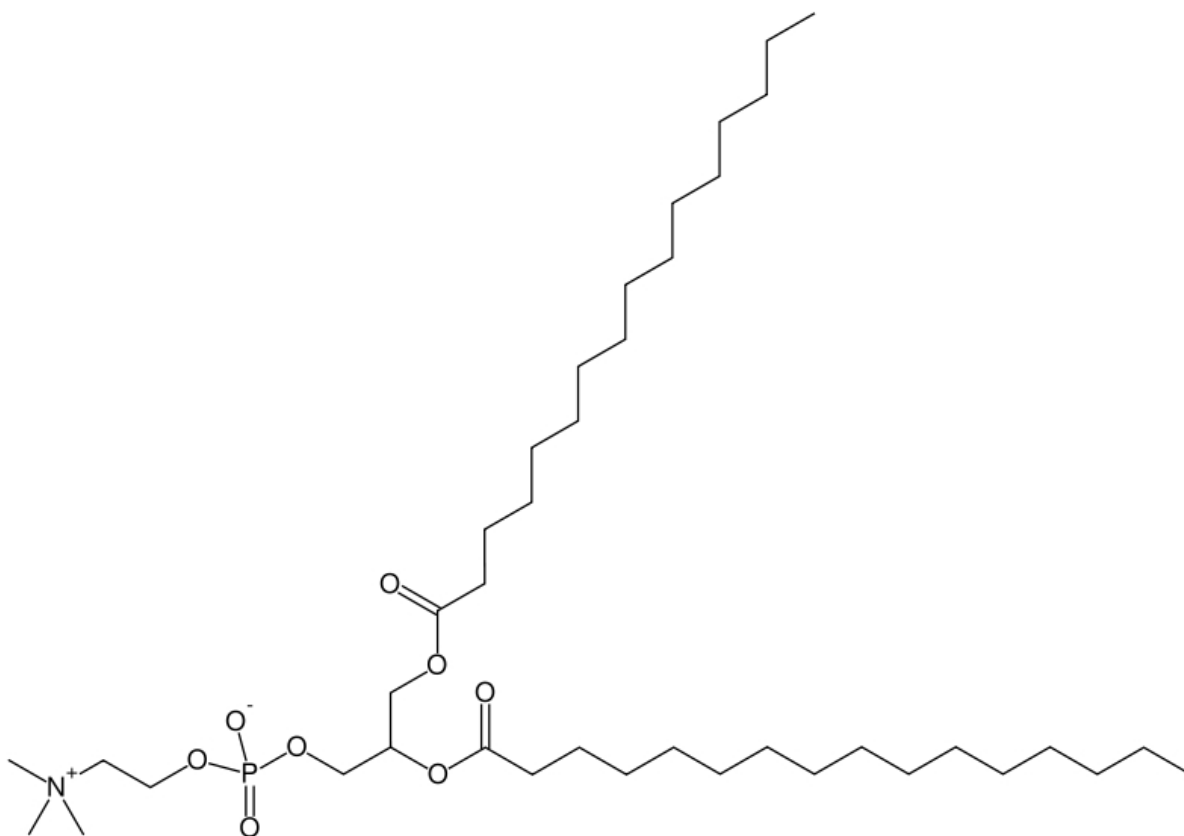


Figura RM0. Representação da estrutura atômica da membrana DPPC, de massa atômica 734,038861 g/mol e fórmula molecular $C_{40}H_{80}NO_8P$. Observa-se o elemento fósforo P, próximo à cabeça lipídica da membrana, sendo o fósforo utilizado como elemento de referência nos gráficos para a observação do deslocamento da molécula da BZC, frente à interface água/membrana/água.

Segue, portanto uma análise dos gráficos das coordenadas relativas do terminal $-CH_3$, do anel aromático e do nitrogênio N10, da molécula da BZC, frente à interface água/membrana/água, utilizando como referência o fósforo P, da DPPC, (Figuras [RM1-RM5]).

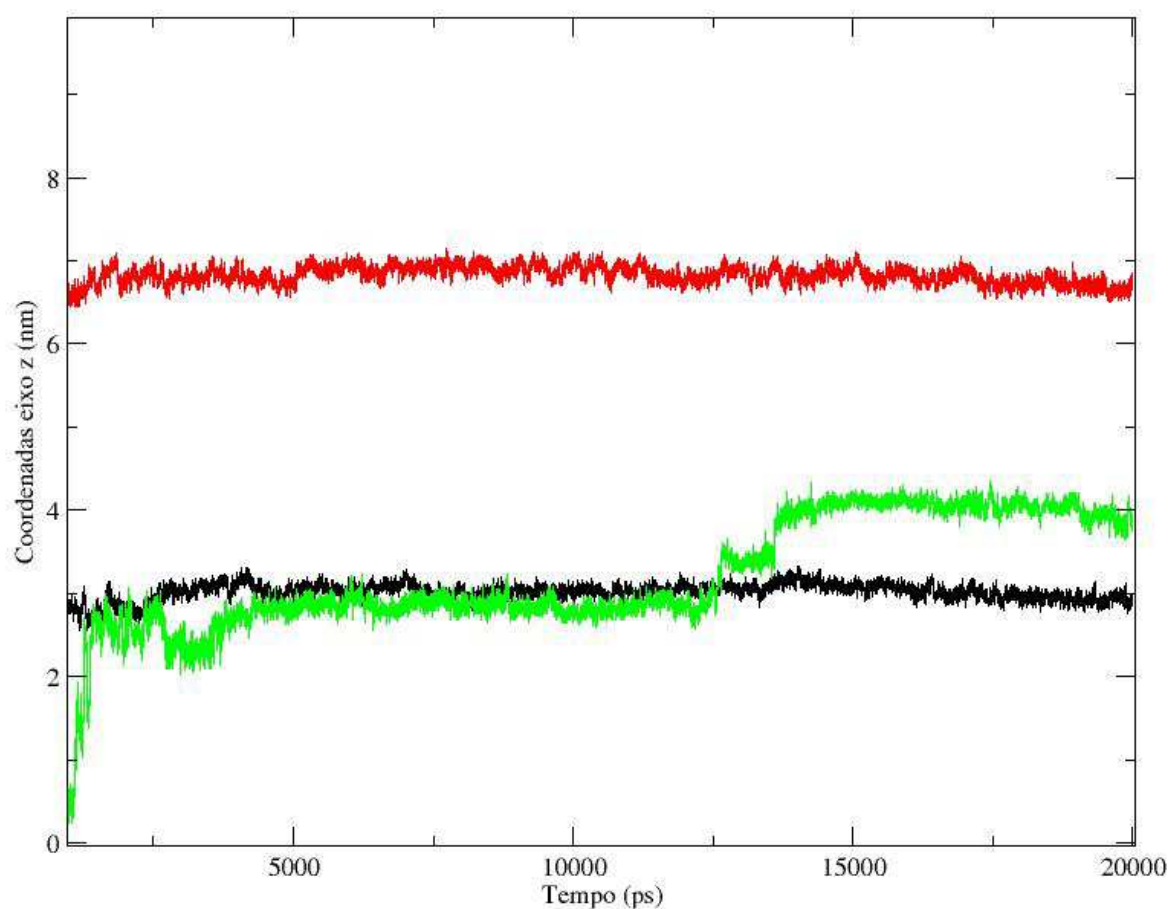


Figura RM1. Gráfico da distância (nm) entre o terminal $-CH_3$, da BZC, com dois átomos de fósforo da membrana DPPC. Na “cor” preta a posição relativa de um dos átomos de fósforo de um lado da interface membrana DPPC, em uma posição inicial no entorno de 2,75 nm na membrana. Na cor vermelha a posição relativa de um dos átomos de fósforo do outro lado da interface da membrana DPPC, em uma posição inicial no entorno de 6,5 nm na membrana. Na cor verde a posição relativa do terminal da $-CH_3$ da BZC, ao início da MD na interface água/DPPC/água, no entorno de 0,5 nm. O terminal $-CH_3$ aproxima-se rapidamente da interface lipídica aos 1000 ps, permanecendo no entorno de 2,5 nm, próximo à cabeça lipídica da membrana até 3 ns, da qual se afasta por um pequeno intervalo de tempo, e retorna a posição no entorno de 2,5 nm, mantendo-se nesta posição aproximadamente até 13 ns, onde o terminal se insere na membrana no entorno de 3,4 nm e logo a seguir mantém-se na posição no entorno de 4 nm até o final da dinâmica.

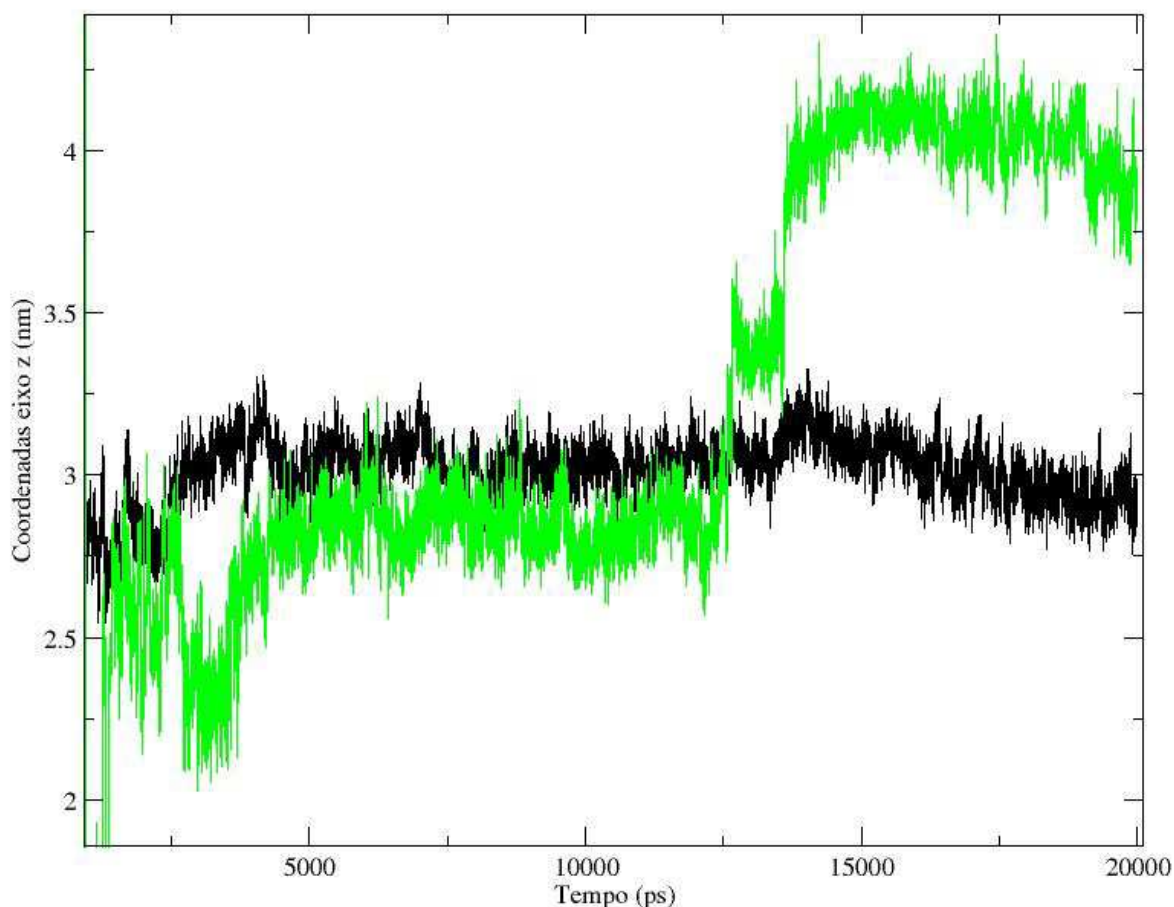


Figura RM2. Gráfico ¹⁵ da distância (nm) entre o terminal $-CH_3$, da BZC, com um dos átomos de fósforo da membrana DPPC. Na cor preta a posição relativa de um dos átomos de fósforo de um lado da interface membrana DPPC, em uma posição inicial no entorno de 2,75 nm. Na cor verde a posição relativa do terminal da $-CH_3$ da BZC, ao início da MD na interface água/DPPC/água, no entorno de 0,5 nm. A BZC aproxima-se rapidamente da interface lipídica ao 1 ns, permanecendo no entorno de 2,5 nm próximo à cabeça lipídica da membrana até 3 ns, da qual se afasta por um pequeno intervalo de tempo, e retorna a posição no entorno de 2,5 nm, mantendo-se nesta posição aproximadamente até 13 ns, onde a BZC se insere mais profundamente na membrana no entorno de 3,5 nm e logo a seguir mantém-se na posição no entorno de 3,75 nm até o final da dinâmica.

¹⁵ Gráfico da Figura RM1, com uma melhor aproximação “zoom”, para facilitar a visualização.

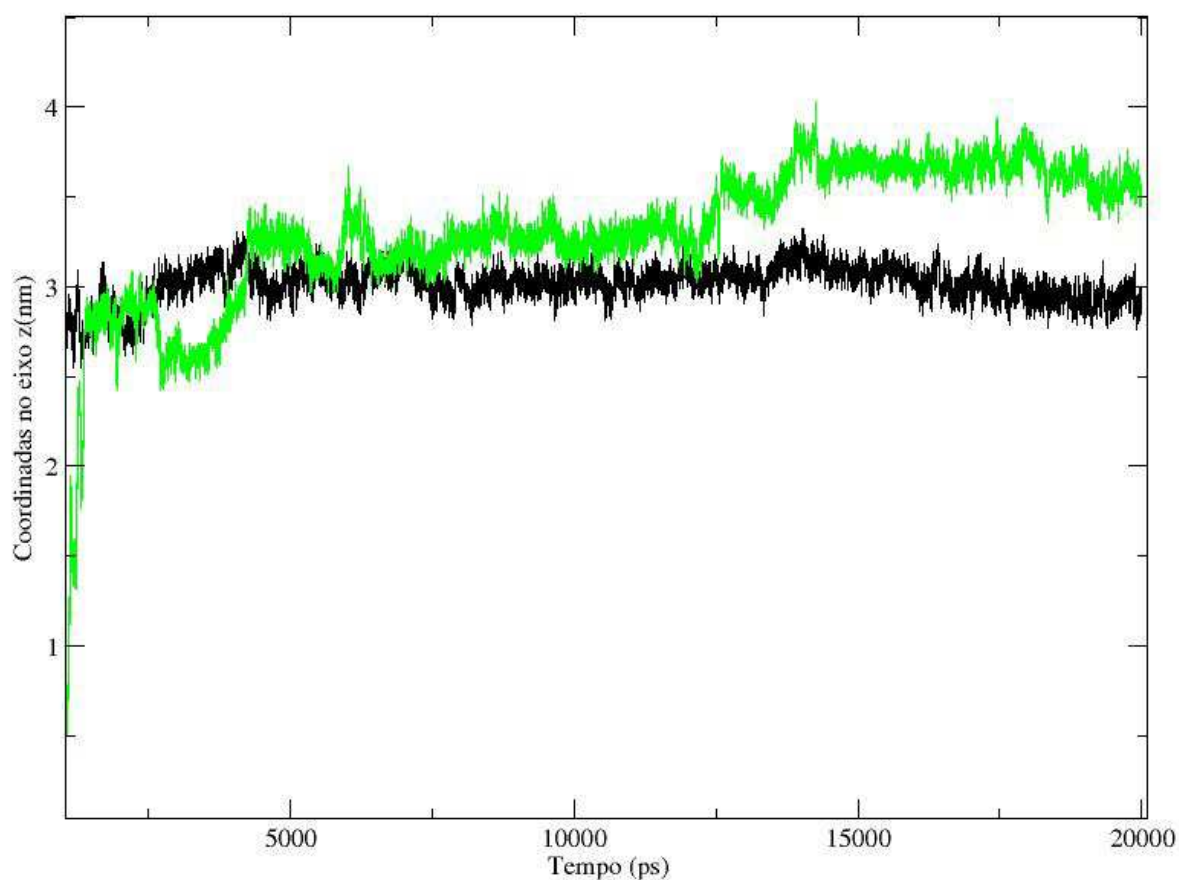


Figura RM3. Gráfico da distância (nm) entre o anel aromático da BZC, com um dos átomos de fósforo da membrana DPPC. Na cor preta a posição relativa de um dos átomos de fósforo de um lado da interface da membrana DPPC, em uma posição inicial no entorno de 2,75 nm. Na cor verde a posição do anel aromático da BZC, ao início da MD na interface água/DPPC/água. O anel aromático aproxima-se rapidamente da interface lipídica aos 1000 ps, permanecendo no entorno de 2,8 nm próximo à cabeça lipídica da membrana até 3 ns, da qual se afasta por um pequeno intervalo de tempo, e retorna penetrando mais até no entorno de 3,3 nm, mantendo-se nesta posição aproximadamente até 12,5 ns, onde a BZC se insere ainda mais na membrana no entorno de 3,5 nm e logo a seguir mantém-se na posição no entorno de 3,7 nm até o final da dinâmica.

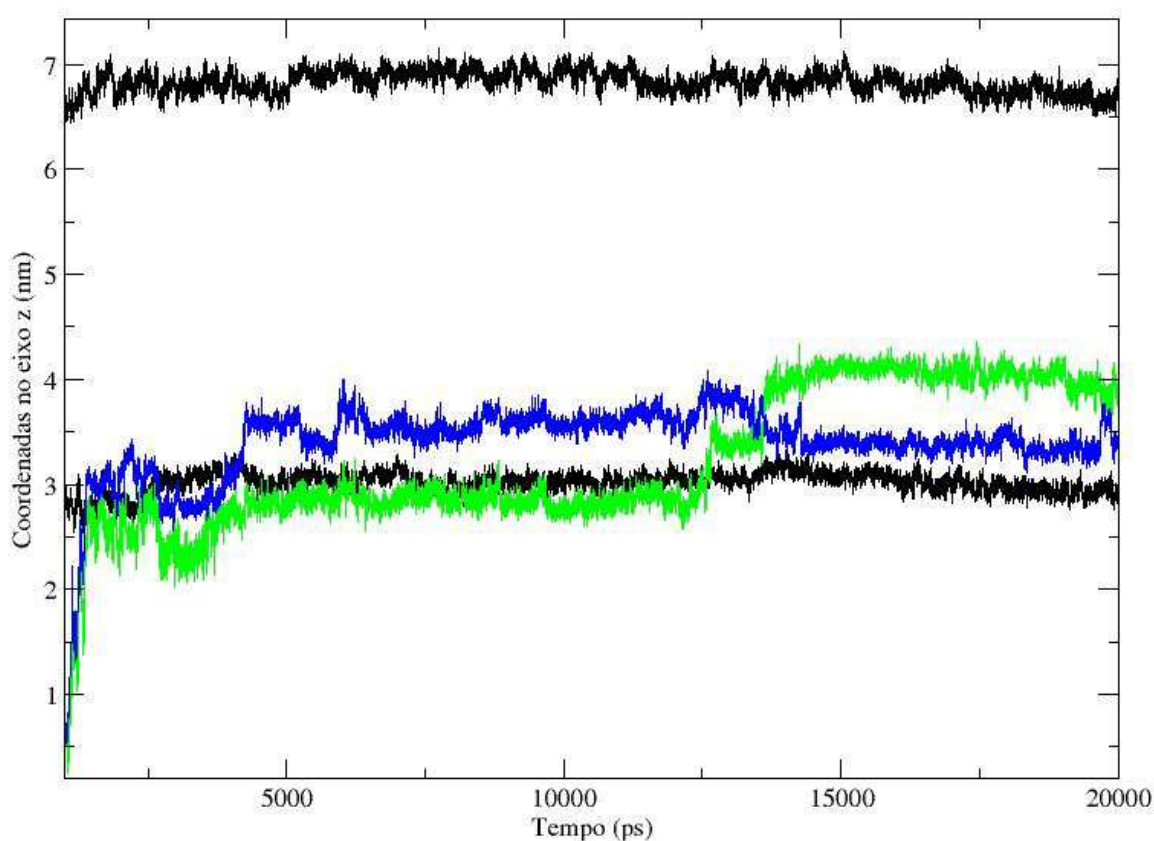


Figura RM4. Gráfico da distância (nm) entre o terminal $-CH_3$, o átomo de nitrogênio N10 da BZC, com um dos átomos de fósforo da membrana DPPC. Na “cor” preta a posição relativa dos átomos de fósforo de ambos os lados da interface da membrana DPPC, em uma posição inicial no entorno de 2,75 nm e 6,5 nm respectivamente. Na cor verde a trajetória do terminal $-CH_3$ da BZC, ao início da MD na interface água/DPPC/água. Na cor azul a trajetória do átomo de nitrogênio N10. A BZC aproxima-se rapidamente da interface lipídica aos 1000 ps, permanecendo no entorno de 2,8 nm para o $-CH_3$ e 3,2 nm para o N10 próximo à cabeça lipídica da membrana até 3 ns, da qual se afasta por um pequeno intervalo de tempo, e retorna penetrando mais até no entorno de 2,8 nm para $-CH_3$ e 3,8 nm para o N10, mantendo-se nesta posição aproximadamente até 12,5 ns, onde a BZC se insere ainda mais na membrana, e logo a seguir mantém-se na posição no entorno de 3,3 nm, para o N10, e ~4,3 nm, para o $-CH_3$ até o final da dinâmica.

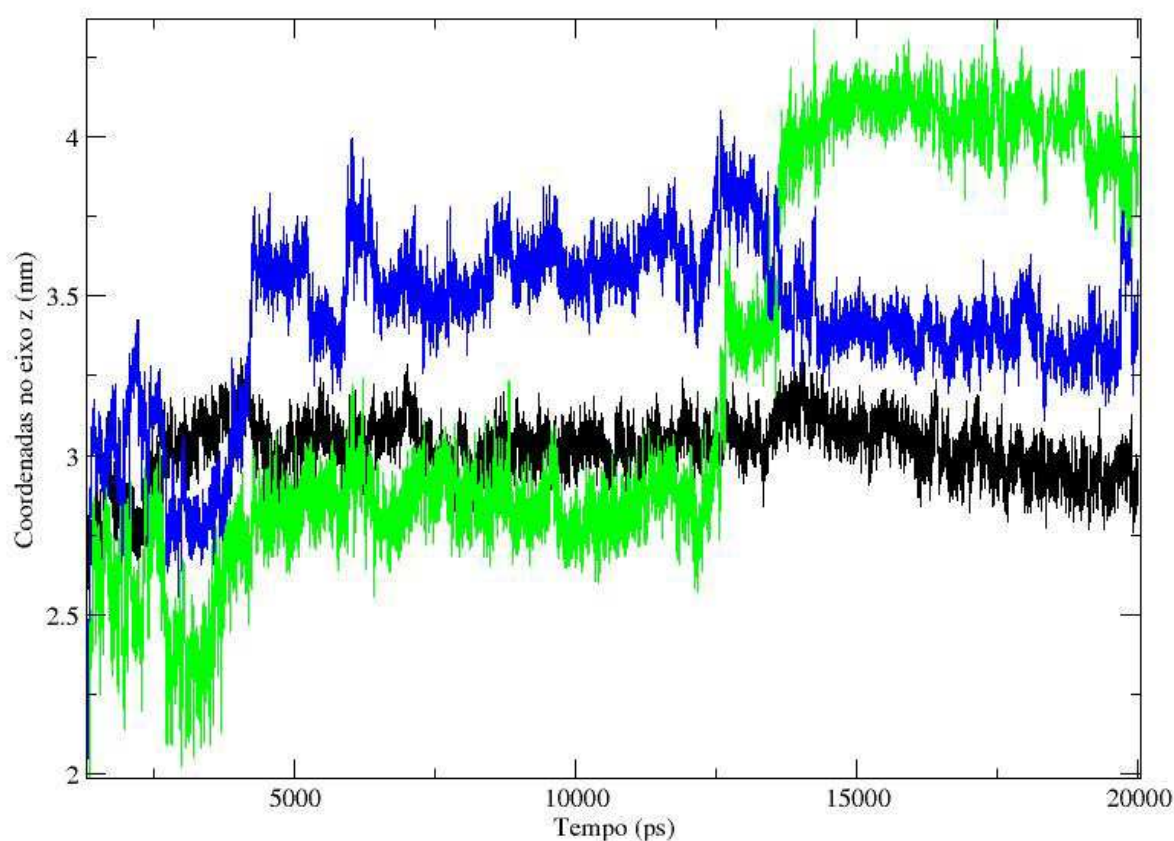


Figura RM5. Gráfico ¹⁶ da distância (nm) entre o terminal $-CH_3$, o átomo de nitrogênio N10 da BZC, com um dos átomos de fósforo da membrana DPPC. Na “cor” preta a posição relativa de um dos átomos de fósforo de um lado da interface membrana DPPC, em uma posição inicial no entorno de 2,75 nm. Na cor verde a trajetória do terminal $-CH_3$ da BZC, na interface água/DPPC/água. Na cor azul a trajetória do átomo de nitrogênio N10. A BZC inicialmente encontra-se um pouco inclinada em relação ao eixo z, com o terminal amina apontando para o centro da membrana e no sentido oposto o terminal etil. Aos 12,5 ns de MD a BZC penetra mais profundamente a membrana, quando então a BZC gira 180° e agora o terminal etil aponta para o centro da membrana e o nitrogênio N10 do terminal amina aponta para fora da membrana, permanecendo assim até o final da dinâmica.

¹⁶ Gráfico da Figura RM4, com uma melhor aproximação “zoom”, para facilitar a visualização.

Analisando as Figuras [RM4, RM5], verifica-se que no início da dinâmica o terminal etil está apontado para fora da membrana, enquanto o terminal amina aponta na direção da cabeça hidrofílica da membrana, permanecendo próximo, isto até 3,0 ns. Neste instante a BZC se afasta um pouco da membrana. Após este breve intervalo, com o terminal amina apontando na direção do centro da membrana lipídica, a BZC penetra à membrana, mantendo o terminal amina, apontado na direção do centro da membrana, até 12,5 ns, quando a BZC penetra ainda mais, à membrana, e agora, o terminal amina inverte sua direção em 180°, aponta agora para fora da membrana, na direção da cabeça lipídica. O terminal -CH₃ aponta para o centro da membrana, e a BZC se mantém nesta posição até o final da dinâmica. Provavelmente deve ocorrer que os hidrogênios H11 e H12 do terminal amina da BZC, formem ligação de hidrogênio com os oxigênios próximos à cabeça lipídica da membrana.

4. CONCLUSÃO

A análise computacional da MD da molécula de BZC, demonstrou ser este um LA diferente devido ao baixo pKa. Em meio fisiológico não apresenta a forma protonada. Assim a ação desta não é facilmente compreendida.

A BZC pode ser dividida em duas partes uma hidrofóbica e outra hidrofílica. Os grupos, amina, anel, éster, são levemente hidrofóbicos, enquanto o grupo etil, hidrofílico. A propriedade hidrofóbica/hidrofílica, estudada dos átomos em separado, indicam que estão em alternância por toda molécula, isto é, um átomo ou pequeno grupo é hidrofóbico e outro é hidrofílico, e assim sucessivamente.

Em meio fisiológico MD indica a possibilidade de formação da BZC na forma hidroclorada.

Tanto em meio aquoso puro, quanto em meio fisiológico, indica a possibilidade de ligações de hidrogênio, estas no terminal amina, com os hidrogênios deste, e no grupo éster, com o oxigênio (O5). Estas possíveis ligações de hidrogênio parecem ocorrer independentemente da quantidade de moléculas de BZC na MD.

O estudo computacional com alta concentração do anestésico estudado a BZC, em meio aquoso puro e meio fisiológico, indicou a formação de agregados. As moléculas de BZC indicam para a formação de agregados, e quando nos agregados às moléculas de BZC são mais hidrofóbicas. O aumento da concentração, e conseqüentemente sua hidrofobicidade provavelmente permite a ação da BZC com maior intensidade, não necessitando a forma protonada para penetração em meio lipídico da membrana. É provável que a BZC se ligue em mais de um local na

membrana. Provavelmente os hidrogênios do terminal amina, poderão formar ligação de hidrogênio como os oxigênios próximos à cabeça lipídica da membrana.

Outra questão é quanto à formação dos agregados, poderão ser estes modificados ou não, ou seja, os agregados podem ser instáveis quando inseridos em meio lipofílico? Estas e outras questões somente serão resolvidas quando a simulação dos agregados for feita perto de membrana.

5. REFERÊNCIAS

- [1]. Gilman, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. São Paulo: McGraw-Hill, 2003.
- [2]. Korolkovas, A.; Burkhalter, J. H. **Química Farmacêutica**; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- [3]. Ruetsch, Y. A.; Boni, T.; Borgeat, A. **Current Topic Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 175-182. 2001.
- [4]. The role of molecular structure in the crystal polymorphism of local anesthetic drugs: crystal polymorphism of local anesthetic drugs, part X. - Pharm Res. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. Dec 22(12), p. 2121-33, Schmidt ARC, 2005.
- [5]. Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito A. S.; Ota, A. T.; Theoretical Studies on Water-Tetracaine Interaction. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 106, p. 1277-1282. 2006.
- [6]. Auger, M.; Jarrell, H. C.; Smith, I. C. P. Interactions of the local anesthetic tetracaine with membranes containing phosphatidylcholine and cholesterol: a ²H NMR study. **Journal of Biochemistry**. v. 27, p. 4660–4667, 1988.
- [7]. Auger, M.; Jarrell, H. C.; Smith, I. C. P. Interactions of the local anesthetic tetracaine with glyceroglycolipid bilayers: a ²H-NMR study. **Biochemistry Biophysics**. v. A 981, p. 351–357, 1989.
- [8]. Boulanger, Y.; Schreier, S.; Smith, I. Molecular details of the anesthetic-lipid interaction as seen by deuterium and phosphorous-31 NMR. **Biochemistry. Biophysical Journal**. v. 20, p. 6824–6830, 1981.

- [9]. Boulanger, Y.; Schreier, S.; Leitch, L.; Smith, I. Multiple binding sites for local anesthetics in membranes: characterization of the sites and their equilibria by deuterium NMR of specifically deuterated procaine and tetracaine. **Biophysical Journal**. v. 58, p. 986–995, 1980.
- [10]. Kelusky, E. C.; Smith, I. C.. Anesthetic-membrane interaction: a ²H NMR study of the binding of specifically deuterated tetracaine and procaine to phosphatidylcholine. Cellular Biology. **Journal Biochemistry**. v. 62, p. 178–184. 1984.
- [11]. Kelusky, E. C.; Smith, I. C.. The influence of local anesthetics on molecular organization in phosphatidylethanolamine membranes. **Journal Molecular Pharmacology**. v. 26, p. 314–321. 1984.
- [12]. Kelusky, E. C.; Boulanger, Y.; Schreier, S.; Smith, I. C.. A ²H-NMR study of the interactions of the local anesthetic tetracaine with membranes containing phosphatidyl serine. Biochemistry Biophysical. **Journal Pharmacology**. v. A 856, p. 85–90. 1986.
- [13]. Kuroda, Y.; Fujiwara, Y. Locations and dynamical perturbations for lipids of cationic forms of procaine, tetracaine, and dibucaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry Biophysical. **Biophysical Journal**. v. A 903, p. 395–410. 1987.
- [14]. Peng, X.; Jonas, A.; Jonas, J. One and two dimensional ¹H-NMR studies of pressure and tetracaine effects on sonicated phospholipid vesicles. Chemistry Physical. Lipids. **Wiley Inter Science**. v. 75, p. 59–69. 1995.

- [15]. Peng, X., Jonas, J. High-pressure ^{31}P NMR study of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry*. **Biophysical Journal**. v. 31, p. 6383–6390. 1992.
- [16]. Siminovitch, D. J.; Brown, M. F.; Jeffrey, K. R. ^{14}N NMR of lipid bilayers: effects of ions and anesthetics. *Biochemistry*. **Pubmed**. v. 23, p. 2412–2420. 1984.
- [17]. Smith, I. C.; Auger, M.; Jarrel, H. C. **Molecular details of anesthetic-lipid interaction**. *Ann. New York: Academic of Science*, v. 62, p. 668–684. 1991.
- [18]. Wichita, M.; Kuroda, Y.; Fujiwara, Y.; Nakagawa, T. Conformations of dibucaine and tetracaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemistry Physical Lipids*. **Biophysical Journal**. v. 62, p. 45–54. 1992.
- [19]. Westman, J., Boulanger, Y.; Ehrenberg, A.; Smith, I. Charge and pH dependent drug binding to model membranes. A ^2H -NMR and light adsorption study. **Biochemistry Biophysics Acta**. v. 685, p. 315–328. 1982.
- [20]. Bartucci, R., P. Mollica, P.; Sapia, P.; Sportelli, L. Procaine interaction with DPPC multilayers: an ESR spin label investigation. *Application Magnetic Resonance*. **Biophysical Journal**. v. 15, p. 181–195. 1998.
- [21]. Bianconi, M. L.; Amaral, A. T.; Schreier, S. Use of membrane spin label spectra to monitor rates of reaction of partitioning compounds: hydrolysis of a local anesthetic analog. *Biochemistry Biophysics. Res. Commun.* **Journal of Lipid Research**. v. 152, p. 344–350, 1988.

- [22]. Frezzatti, W. A. Jr.; Toselli, W. R.; Schreier, S. Spin label study of local anesthetic-lipid membrane interactions. Phase separation of the uncharged form and bilayers micellization by the charged form of tetracaine. **Journal of Biophysical Chemistry**. v. A 860, p. 531–538. 1986.
- [23]. Ondrias, K.; Stasko, A. Perturbation effect of the diheptanoyl phosphatidylcholine on rat brain total lipid liposomes. An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Chemistry Biological. Biophysical Journal*. v. 84, p. 143–151. 1992.
- [24]. Ondrias, K.; Horvath, L. I.; Balgavy, P.; Stolc, S.. Effects of tertiary amine local anaesthetics on the phase behaviour of the dipalmitoylphosphatidylcholine model membrane. Electron spin resonance tetramethylpiperidinyloxyl partition study. *Physiol. Bohemoslov. Biophysical Journal*. v. 33, p. 489–494. 1984.
- [25]. Pinto, L. M.; Yokaichiya, D. K.; Fraceto, L. F.; de Paula, E.. Interaction of benzocaine with model membranes. *Biophys. Chem. Biophysical Journal*. v. 87, p. 213–223. 2000.
- [26]. Shibata, A.; Ikawa, K.; Terada, H. Site of action of the local anesthetic tetracaine in a phosphatidylcholine bilayer with incorporated cardiolipin. **Biophysics Journal**. v. 69, p. 470–477. 1995.
- [27]. Fozzard, H. A.; Lee, P. J.; Lipkind, G. M. **Current Pharmaceutical Design**. v. 11, p. 2671-2686. 2005.
- [28]. Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito, A. S.; Taft, C. A.; Ota, A. T.; Water Solvent and Local Anesthetics: A Computational Study.

- International Journal of Quantum Chemistry.**, v. 107, p. 1642-1649, 2007.
- [29]. Fraceto, L. F.; Oyama, S.; Nakaie, C. R.; Spisni, A.; de Paula, E.; Pertinhez, T. A. **Journal of Biophysical Chemistry.** v. 123, p. 29-39. 2006.
- [30]. Wishart DS et al. **DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets.** Nucleic Acids Res. Dec 11 2007. <<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/>>
- [31]. Becke, A. D. Density functional thermochemistry III. The role of exact exchange, **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, Issue 7, p. 5648-5652, April 1, 1993.
- [32]. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review.** v. B 37, p. 785–789, 1988.
- [33]. Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review.** v. 136, p. B864-B871, 1964.
- [34]. Kohn, W.; Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, **Physical Review.** v. 140, p. A1133-A1138, 1965.
- [35]. Petersson, G. A.; Al-Laham, M. A. A complete basis set model chemistry II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms, **Journal of Biophysical Chemistry.** v. 94, p. 6081, 1991.
- [36]. Petersson, G. A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Al-Laham, M. A.; Shirley, W. A.; Mantzaris, J. A complete basis set model chemistry. I. The

total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row atoms, **Journal of Biophysical Chemistry**. v. 89, p. 2193, 1988.

- [37]. Breneman, C. M.; Wiberg, K. B.; Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. **The Journal Comp. Chemical**. v. 11, p. 361-373, 1990.
- [38]. Wong, M. W.; Wiberg, K. B.; Frisch, M. J. **Journal American Chemistry Society**. v. 114, p. 523, 1992.
- [39]. Wong, M. W.; Wiberg, K. B.; Frisch, M. J. **Journal Chemistry Physical**. v. 95, p. 8991, 1991.
- [40]. Wong, M. W.; Wiberg, K. B.; Frisch, M. J. **Journal Chemistry Physical**. v. 113, p.4776, 1991.
- [41]. Kirkwood, J. G. **Journal Chemistry Physical**. v. 2, p. 351, 1934.
- [42]. Onsager, L. J. **American Chemistry Society**. v. 58, p. 1486-93, 1936.
- [43]. Richardson, J. M. Variational Theory of the Radial Distribution Function. **The Journal of Chemical Physics**. v. 23, Issue 12, p. 2304-2308, December 1955.
- [44]. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. **Interaction models for water in relation to protein hydration**. In: Intermolecular Forces. Pullman, B. ed., D. Reidel Publishign Company Dordrecht, 1981, p. 331-342.
- [45]. 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, p. 327-341. 1977.

- [46]. Carley, D. D. Computations of Radial Distribution Functions for a Classical Electron Gas, v. 131, p. 1406-1409, 1963.
- [47]. Bamdada, M.; Alavib, S.; Najafic, B.; Keshavarzic, E. A new expression for radial distribution function and infinite shear modulus of Lennard-Jones fluids, **Chemical Physics**, v. 325, p. 554-562. 2006.
- [48]. Tieleman, D. P.; Berendsen, H. J. C. Molecular dynamics simulations of fully hydrated DPPC with different macroscopic boundary conditions and parameters. **Journal of Chemical Physics**. v. 105, p. 4871-4880. 1996.
- [49]. Parr, R. G.; Yang, W. **Density Functional Theory**, Oxford University Press, 1989.
- [50]. Bartolotti, L. J.; Flurchick, K. Review Computational Chemistry. **Reviews in Computational Chemistry**. v. 7, p. 187, 1996.
- [51]. St-Amant, A. Review Computational Chemistry. **Journal Molecular Structure**. v. 7, p. 217, 1996.
- [52]. Ziegler, T. Chemistry Review. **Journal Organometallic Chemistry**. v. 91, p. 651, 1991.
- [53]. Baerends, E. J.; Gritsenko, O. V. **Journal Physical Chemistry**, v. 101, p. 5383, 1997.
- [54]. Block, F.; Physik, Z. **Physical Review**. v. 57, p. 545. 1929.
- [55]. Dirac, P. A. M. **Proc. Cambridge Philosophy Society**. v. 26, p. 376. 1930.
- [56]. Gritsenko, O. V.; Schippen, P. R. T.; Baerends, E. J. **Journal Chemistry Physical**. v. 107, p. 5007, 1997.
- [57]. Politzer, P.; Abu-Awwad, F. **Theor. Chem. Acta**, v. 99, p. 83, 1998.

- [58]. Levy, M.; Perdew, J. P. **In Density Functional Methods in Physics.** ed. R. M. Dreizler and J. da Providencia, New York, U.S.A.: Plenum,1985.
- [59]. Zhao, Q.; Morrison, R. C.; Parr, R. G. **Physical Review.** v. A 50, p. 2138, 1994.
- [60]. Gritsenko, O. V.; Schippen, P. R. T.; Baerends, E. J. **Journal Chemistry Physical.** v. 104, p. 8535, 1996.
- Tozer, D. J.; Ingamells, V. E.; Handy, N. C. **Journal Chemistry Physical.** v. 105, p. 9200. 1996.
- [61]. Becke, A. D. **The Journal of Chemical Physics,** v. 107, p. 8554, 1997.
- [62]. Becke, A. D. **The Journal of Computational Chemical,** v.20, p. 63, 1999.
- [63]. Becke, A. D. **Physics Review,** v. A 38, p. 3098, 1988.
- [64]. Becke, A. D. **Journal Chemistry Physical.** v. 98, p. 5648, 1993.
- [65]. Perdew, J. P.; Wang, B. **Physical Review.** v. B 33, p. 88001 1986.
- [66]. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. **Physical Review Letter.** v. 77, p. 3865, 1996.
- [67]. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. **Physical Review Letter.** v. 78, p. 1396, 1997.
- [68]. Perdew, J. P.; Kurth, S.; Zupan, A.; Blaha, P. **Physical Review Letter.** v. 82, p. 254, 1999.
- [69]. Capelle, K. **A Bird's View of Density-Functional-Theory.** Escola Brasileira de Estrutura Eletrônica, Juiz de Fora: Ed. Livraria da Física, 2002.

- [70]. Harris, J. **Physical Review**. v. A 29, p. 1648. 1984.
- [71]. Jensen, F. **Introduction to Computational Chemistry**. Odense University, England: John Wiley & Sons, 1999.
- [72]. Mulliken, R. S. **Journal Physical Chemistry**. v. 36, p. 3428, 1962.
- [73]. Löwdin, P. -O. **Advanced Quantum Chemistry**. v. 5 , p. 185. 1970.
- [74]. Williams, D. E. **Rev. Computation Chemistry**. v. 2, p. 219, 1991.
- [75]. Chirlian, L. E.; Francl, M. M. **Journal Computational Chemistry**. v. 8, p. 894. 1987.
- [76]. Besler, B. H.; Merz, K. M.; Kollman, P. A. **Journal Computational Chemistry**. v. 11, p. 431. 1990.
- [77]. Connolly, M. L. J. **Application Crystallography**. v. 16, p. 548. 1983.
- [78]. Ewald, P. P. Calculation of optical lattice and electrostatic potential. **Ann. Physical**. v. 64, p. 253-287, 1921.
- [79]. Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis, **J. Mol. Mod.** v. 7 p. 306-317, 2001.
- [80]. Nosé, S. A molecular dynamics method for simulation in the canonical ensemble. Molecular Physics. **Journal Computational Physics**. v. 52, p. 255-268. 1984.
- [81]. Hoover, W. Canonical dynamics: equilibrium phase space distributions. **Physical Review**. v. A 31, p. 1695-1697. 1985.
- [82]. Langevin P., **Accounts Made Academy Science**. v. 146, p. 530, Paris: 1908.
- [83]. Uhlenbeck, G.; Ornstein, L. S., **Physical Review**. v. 36, p. 823, 1930.

- [84]. van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Feenstra, K. A.; van Drunen R.; Berendsen, H. J. C. **Gromacs User Manual version 3.3**, <<http://www.gromacs.org>>. 2005.
- [85]. Materials Digital Library Pathway, Softmatter: Radial Distribution Function. Disponível em: http://matdl.org/matdlwiki/index.php/softmatter:Radial_Distribution_Function. acesso em: 30 dez. 2007.
- [86]. Allan, M. P.; Tildesley, D. J. **Computer Simulation of Liquids**. Oxford Clarendon Press, 1987.
- [87]. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L.; **Journal Chemistry Physical**. v. 79, p. 926. 1983.
- [88]. Pathria, R. K, **Statistical Mechanics**. 2 Ed. Oxford: Butterworth Heinemann. 1996.
- [89]. Hille, B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug receptor reaction, **The Journal of General Physiology**, v. 69, p. 497-515, 1977.
- [90]. Butterworth J. F.; Strichartz, G. R. Molecular mechanisms of local anesthetics: a review Anesthesiology. **The Journal of the American Society the Anesthesiologists**. v. 72, p. 711–734, 1990.
- [91]. Wang, G. K.; Quan, C.; Wang, S. A common local anesthetic receptor for benzocaine and etidocaine in voltage-gated mu 1 Na⁺ channels, **American Heart Association, Inc.** v. A 435, p. 293-302, 1998.
- [92]. Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito A. S.; Ota, A. T.; Density Functional and Molecular Dynamics Simulations of Local

Anesthetics in 0,9% NaCl solution. **Molecular Simulaation**. [in press]
GMOS-261914.

- [93]. Wang, G. K.; Quan, C.; Wang, S. Y. Molecular Pharmacology, Local Anesthetic Block of Batrachotoxin-Resistant Muscle Na⁺ Channels. **Journal Molecular Pharmacology**. v. 54, Issue 2, p. 389-396, 1998.
- [94]. Lundbaek, J.A.; Birn, P.; Girshman, J.; Hansen, A.J.; Andersen, O.S. Membrane stiffness and channel function. **Journal Biochemistry** v. 35, p. 3825–3830. 1996.
- [95]. Schuettelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta Crystallographica**. v. D60, p. 1355-1363. 2004.
- [96]. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **Journal Chemistry Physical**. v. 8, p. 3684–3690, 1984.
- [97]. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.;

- Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C. ; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision B.04, **Gaussian, Inc.**, Pittsburgh, U.S.A, 2003.
- [98]. Barcelo, F.; Prades, J.; Funari, S. S.; Frau, J.; Alemany, R.; Escriba, P. V. The hypotensive drug 2-hydroxyoleic acid modifies the structural properties of model membranes. *Molecular Membrane Biological*. **Biophysical Journal**. v. 21, p. 261–268, 2004.
- [99]. Herbette, L. G.; Mason, P. E.; Sweeney, K. R.; Trumbore, M. W.; Mason, R. P. Favorable amphiphilicity of nimodipine facilitates its interactions with brain membranes. *Neuropharmacology*. **Biophysical Journal**. v. 33, p. 241–249. 1994.
- [100]. Kelusky, E. C.; Smith, I. C.. Characterization of the binding of the local anesthetics procaine and tetracaine to model membranes of phosphatidylethanolamine: a deuterium nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*. **Journal Biophysical**. v. 22, p. 6011–6017. 1983.
- [101]. Strugala, G. J; Elsehans, B.; Forth, W. Active transport inhibition in rat small intestine by amphiphilic amines: an In Vitro study with various local anesthetics, *Biochemical Pharmacology*, **Pubmed**. v. 9, n. 8, p. 907-913(7), 15 April 2000.
- [102]. Filippi, C.; Umrigas, C. J.; Taut, M. **Journal Chemistry Physical**. v. 100, p. 1290, 1994.

ANEXOS

Tabela utilizada na DM para a BZC, usando como base o PRODRG [95] - cargas corrigidas para 3 grupos de cargas.

Átomo ou grupo de átomos	Tipo de átomos ou grupo de átomos utilizados pelo Gromacs [28]	Carga e (u.e.c.)	massa atômica (u.m.a.)
C1	CH3	-0.033	15.0350
C2	CS2	0.329	14.0270
O3	OS	-0.416	15.9994
C4	C	0.644	12.0110
O5	O	-0.524	15.9994
C6	CB	-0.244	12.0110
C7	CR61	0.023	13.0190
C8	CR61	-0.189	13.0190
C9	CB	0.410	12.0110
N10	NT	-0.800	14.0067
H11	H	0.400	1.0080
H12	H	0.400	1.0080
C13	CR61	-0.131	13.0190
C14	CR61	0.131	13.0190

Tabela AN1. Tabela com as cargas da benzocaína - usado como base o PRODRUG - onde as cargas foram corrigidas para 3 grupos de cargas. A coluna um representa a numeração utilizada para os átomos ou grupo de átomos, como entrada no programa Gromacs [28]. A coluna dois representa o tipo de átomo ou grupo de átomos utilizado como entrada na topologia do programa Gromacs. As colunas três e quatro as cargas e massas respectivamente.

Coordenadas dos átomos da BZC de acordo com a Figura C1.

Cargas e coordenadas cartesianas dos átomos da BZC, (Figura C1)				
Átomo	Átomo	Coordenadas (Å)		
	Carga e(u.e.c.)	X	Y	Z
C1	0.409661	2.959416	-0.331868	-0.006199
C2	-0.269957	2.549412	1.016198	-0.005891
C3	-0.020567	1.201942	1.339876	-0.004616
C4	-0.143842	0.219028	0.338390	-0.003421
C5	-0.037112	0.625831	-1.004726	-0.004735
C6	-0.261077	1.972747	-1.337227	-0.005610
C7	0.644199	-1.203067	0.750185	0.001755
O8	-0.523816	-1.591663	1.904767	0.007039
N9	-0.801297	4.304782	-0.661679	-0.058395
O10	-0.415491	-2.052260	-0.309190	0.000118
C11	0.331889	-3.457479	0.017205	0.004272
C12	-0.235122	-4.229326	-1.288495	0.000680
H13	0.348409	4.953371	0.047973	0.250040
H14	0.345254	4.552738	-1.589057	0.254350
H15	0.087154	-0.123683	-1.787810	-0.002303
H16	0.129817	2.274922	-2.381449	-0.009726
H17	0.130774	3.299403	1.803015	-0.010010
H18	0.093244	0.881888	2.376422	-0.001793
H19	0.070265	-3.990356	-1.886871	0.884656
H20	0.072454	-3.993882	-1.879801	-0.888963
H21	0.047727	-5.304768	-1.085343	0.003634
H22	-0.003882	-3.679605	0.622986	0.888669
H23	0.001318	-3.683142	0.629841	-0.874450

Tabela AN2. Cargas e coordenadas dos átomos da BZC, Figura C1.

Tabela com as coordenadas relativas entre todos os átomos da molécula da BZC.

Distância Å (Angstroms):								
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 C	0.000000							
2 C	1.409038	0.000000						
3 C	2.425582	1.385800	0.000000					
4 C	2.821167	2.426956	1.403244	0.000000				
5 C	2.428654	2.790035	2.414345	1.403371	0.000000			
6 C	1.408638	2.423046	2.785861	2.425536	1.387351	0.000000		
7 C	4.300834	3.761903	2.476256	1.480526	2.534684	3.800413	0.000000	
8 O	5.071000	4.235354	2.850170	2.394212	3.658219	4.818268	1.218234	0.000000
9 N	1.386184	2.428858	3.692794	4.206726	3.695300	2.428484	5.686245	6.431095
10 O	5.011732	4.788744	3.648187	2.361805	2.766941	4.154224	1.357721	2.261372
11 C	6.426391	6.089402	4.843526	3.690518	4.209256	5.596601	2.370578	2.654084
12 C	7.252117	7.159815	6.033825	4.736521	4.863446	6.202268	3.648899	4.141767
13 H	2.045921	2.604223	3.975812	4.750009	4.461018	3.296703	6.201328	6.807657
14 H	2.046237	3.296726	4.457976	4.750004	3.978589	2.605254	6.218131	7.072598
15 H	3.409587	3.874005	3.397015	2.153644	1.083974	2.144308	2.757990	3.973686
16 H	2.160863	3.408720	3.872928	3.409437	2.148230	1.087073	4.680136	5.772556
17 H	2.161789	1.087007	2.147992	3.410847	3.877038	3.408981	4.623941	4.892155
18 H	3.413353	2.151943	1.084836	2.143119	3.390830	3.870552	2.644181	2.518132
19 H	7.177116	7.210371	6.177593	4.843489	4.783135	6.054196	3.937329	4.571701
20 H	7.178003	7.209807	6.176162	4.842847	4.784283	6.056019	3.936858	4.571261
21 H	8.298468	8.130480	6.943993	5.704331	5.931153	7.281879	4.493675	4.767380
22 H	6.766768	6.305197	5.014120	4.009509	4.688752	6.049071	2.633636	2.603793
23 H	6.767742	6.304633	5.012465	4.008811	4.689932	6.050895	2.633057	2.603217

Distância Å (Angstroms):								
	9	10	11	12	13	14	15	
9 N	0.000000							
10 O	6.367075	0.000000						
11 C	7.792143	1.442633	0.000000					
12 C	8.557300	2.387186	1.516778	0.000000				
13 H	1.009657	7.019180	8.414496	9.282793	0.000000			
14 H	1.009615	6.732659	8.173506	8.790867	1.685347	0.000000		
15 H	4.569750	2.430171	3.791084	4.135895	5.404651	4.687675	0.000000	
16 H	2.660885	4.797797	6.214028	6.595445	3.625419	2.426123	2.470985	
17 H	2.662300	5.753417	6.988904	8.138754	2.425573	3.625864	4.961009	
18 H	4.577058	3.977655	4.939235	6.289367	4.697027	5.409785	4.283924	
19 H	8.437994	2.650981	2.164380	1.093880	9.172601	8.571490	3.968333	
20 H	8.428611	2.650882	2.164307	1.093865	9.223175	8.627654	3.971532	
21 H	9.619084	3.343835	2.151300	1.094465	10.323494	9.873552	5.228493	
22 H	8.142342	2.075266	1.094747	2.178183	8.675642	8.547923	4.387523	
23 H	8.132705	2.075193	1.094714	2.178115	8.728826	8.603919	4.390379	
	16	17	18	19	20	21	22	23
16 H	0.000000							
17 H	4.308051	0.000000						
18 H	4.957615	2.484601	0.000000					
19 H	6.348089	8.219263	6.534540	0.000000				
20 H	6.350008	8.217524	6.532658	1.773636	0.000000			
21 H	7.689718	9.076043	7.089327	1.773789	1.773785	0.000000		
22 H	6.729795	7.134890	4.967362	2.529024	3.085885	2.518497	0.000000	
23 H	6.731578	7.132989	4.965035	3.085883	2.528848	2.518444	1.763136	0.000000

Tabela AN3. Distâncias entre cada um dos vinte e três átomos da BZC, obtidas através do cálculo quântico.