

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CÁLCULOS CLÁSSICOS E QUÂNTICOS DE
MODELAGEM COMPUTACIONAL DE
ANESTÉSICOS LOCAIS**

Rafael de Cássio Bernardi

**– CBPF –
CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS
2007**

CÁLCULOS CLÁSSICOS E QUÂNTICOS DE MODELAGEM COMPUTACIONAL DE ANESTÉSICOS LOCAIS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Física, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Carlton Anthony Taft.

RAFAEL DE CÁSSIO BERNARDI

Rio de Janeiro, RJ - Brasil.
2007

A Juliana Amaral Passipieri

*“Eu andaria metade do mundo só para sentar ao seu lado
Eu faria de tudo, para ser a maçã de seus olhos.
Problemas podem ir e vir, mas os momentos bons são o que importam.
Então se o caminho ficar difícil, nos equilibramos enquanto avançamos.*

*Qualquer lugar que você queira ir, você sabe que estarei ao seu lado.
Se é um tesouro, que você procura.
Eu buscarei pelo mundo inteiro.
Problemas podem ir e vir, mas os momentos bons são o que importam.
Então se o caminho ficar difícil, nos equilibramos enquanto avançamos.*

*Quando a tempestade vem você me protege.
Quando eu não digo uma palavra e você sabe exatamente o que quero dizer.
Nos momentos mais obscuros, você me ilumina.
Você me liberta, me mantém equilibrado enquanto avançamos.
Então se seu coração se esvaziar, eu o preencherei.
E se seu fardo ficar pesado, eu te erguerei.
Então se o caminho ficar difícil, nos equilibramos enquanto avançamos.”*

Adaptado da letra de Steady as We Go, Dave Matthews

AGRADECIMENTOS

A Juliana, minha paixão, pela força carinho e compreensão em todos os momentos;
Ao Prof. Dr. Carlton Anthony Taft, que aceitou me orientar neste trabalho;
Ao Prof. Dr. André Tsutomu Ota, orientador e amigo em todas as árduas etapas;
Ao Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti, que também me guiou para conclusão deste trabalho e aceitou prosseguir-lo como orientador no doutorado;
Aos meus pais, pela força e confiança, mesmo nos momentos mais difíceis;
A minha irmã, que sempre me deu muita força, e ao contrario de muitos sempre confiou muito em minha capacidade;
Aos meus amigos e colegas, pela união em todos os momentos, desde as primeiros passos até aqui;
Ao Diego do IBCCF/UFRJ, que colaborou muito pela conclusão dos cálculos realizados neste trabalho;
A todos os meus professores, desde a pré-escola até hoje, que sempre me ensinaram a buscar, cada vez mais, tentar entender os fenômenos a nossa volta;
Ao Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, da FFCLRP/USP que colaborou conosco desde o primeiro trabalho com a tetracaína;
A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho;
Especialmente gostaria de agradecer aos membros da banca que estão corrigindo e sugerindo avanços neste trabalho;

BERNARDI, Rafael C., *Cálculos clássicos e quânticos de modelagem computacional de anestésicos locais*, 2007. Dissertação (Mestrado em Física), Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas / MCT.

RESUMO

Os anestésicos locais (LA) conhecidos hoje em dia são fármacos derivados da cocaína, amplamente empregado em cirurgias. Neste trabalho, escolhemos três LA para estudarmos, são eles a tetracaína (TTC), devido a ser um potente anestésico, porém muito tóxico e também por ser bastante conhecida devido a até pouco tempo atrás ser utilizada como a conhecida anestesia raquidiana, a procaína (PRC), um pouco menos potente mas de mesma forma muito tóxico e a lidocaína (LDC) que é também conhecida como xylocaína bastante empregada na odontologia e em soluções de uso tópico. Acredita-se que o local de ação destes fármacos seja na membrana celular, sendo que a sua forma protonada é quem interagiria com canais iônicos, de modo a provocar o bloqueio da transmissão do impulso nervoso. Porém, outros estudos indicam que a forma neutra da molécula seria a com maior facilidade de penetração na membrana. Como existem muitas divergências sobre a forma e local exatos de atuação dos anestésicos locais, começamos um estudo da estrutura molecular destas moléculas, com a finalidade de obtermos dados para uma análise computacional da dinâmica na sua interação com a membrana neural. Para tal, foram realizados cálculos computacionais da estrutura da molécula utilizando diversos métodos de forma consecutiva, de modo a obter valores razoáveis para as cargas e coordenadas atômicas. Uma primeira análise nos permite observar que a idéia mais aceita em livros de química farmacêutica, sobre os deslocamentos das cargas atômicas da molécula, é comprovada nos cálculos quânticos destes LA. Já na análise da dinâmica da molécula, vemos que sua forma protonada não ultrapassa a interface água-membrana, enquanto sua forma neutra transpassa facilmente a superfície da mesma, chegando à parte interior da bicamada, concordando com os resultados experimentais mais aceitos atualmente.

Palavras-chave: Anestésicos locais, DPPC, modelagem molecular, dinâmica molecular.

BERNARDI, Rafael C., *Computational modeling of local anesthetics: a Classical and quantum calculations*, 2007. Dissertação (Mestrado em Física), Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas / MCT.

ABSTRACT

The local anesthetics (LA) known nowadays are drugs derived from cocaine, and they are largely applied in surgery. In this study, we chose three LA: tetracaine (TTC), which is a very powerful and very toxic anesthetic, and because it has been used as a spinal cord anesthetic; procaine (PRC), which is not so powerful and toxic as the TTC; and the Lidocaine (LDC), also known as xylocaine, which is used in odontology. The LA probably affect the cellular membrane, and it is possible that it is their charged form that interact with the ion channels, causing the interruption of the nervous impulse. However, other studies suggest that the neutral molecule penetrates more easily into the membrane. There are many controversies about how exactly the LA act upon the nervous system, so this study aims to determine the molecular structure of these molecules, in order to find data for computational analysis of the interaction between the LA and the interface water/membrane. Computational calculations of the structure of the molecules were consecutive made through various methods, until reasonable values for their charges and atomic coordinates were acquired. The results from the first analysis were very similar to those found in the literature, concluding that quantum calculations also show the displacement of atomic charges in the molecule of the LA. The analysis of the dynamic of the molecule shows that its charged form does not cross the interface water/membrane, meanwhile its neutral form can easily go through the interface, entering the membrane, which agrees with the most recent experimental results.

Key-words: Local Anesthetics, DPPC, molecular modeling, molecular dynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Fórmula química dos anestésicos locais: Tetracaína (TTC), Procaína (PRC) e Lidocaína (LDC).
- Figura 2 Fórmula geral dos anestésicos locais.
- Figura 3 Deslocalização da nuvem eletrônica nos anestésicos locais.
- Figura 4 Ligação da molécula da tetracaína protonada ao receptor por meio de: E, forças eletrostáticas; D, interação dipolo-dipolo; V, forças de van der Waals e hidrofóbicas; H, pontes de hidrogênio; CT, transferência de carga.
- Figura 5 Propagação do impulso nervoso.
- Figura 6 Mecanismo de ação dos anestésicos locais ao nível molecular.
- Figura 7 Sistema de orientação usado na modelagem molecular: 1,2 representa o primeiro vizinho, 1,3 o segundo vizinho e 1,4 representa o terceiro vizinho.
- Figura 8 Representação da ligação direta entre um átomo e outro.
- Figura 9 Representação do ângulo de ligação entre um átomo e seu segundo vizinho.
- Figura 10 Representação do ângulo formado entre um plano e outro na estrutura molecular.
- Figura 11 Representação do ângulo de movimento em torno das ligações químicas e da forma do seu potencial.
- Figura 12 Representação do termo de potencial de van der Waals.
- Figura 13 Representação do termo de potencial de Coulomb.
- Figura 14 Representação em duas dimensões do modelo de condição periódica de contorno utilizado nos métodos de MM.
- Figura 15 Modelo da interface utilizada.
- Figura 16 Representação da membrana celular. Estão representados nesta figura os fosfolipídios, que são os principais integrantes da membrana, junto com diversas outras biomoléculas.
- Figura 17 Molécula de Dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) utilizada nas bicamadas lipídias.
- Figura 18 Quatro moléculas de DPPC alinhadas como em uma mono-camada.

- Figura 19 Bicamada lipídica de DPPC que utilizamos em nossos cálculos.
- Figura 20 Captura da tela do software Ghemical, utilizado para construir o input dos anestésicos locais e também para realizar os cálculos utilizando a teoria de modelagem molecular clássica. Na imagem vemos a tetracaína em sua forma neutra.
- Figura 21 Tetracaína neutra calculada com o método semi-empírico PM3.
- Figura 22 Gráfico da minimização da energia no cálculo da tetracaína, com o método semi-empírico PM3.
- Figura 23 Gráfico da minimização da energia no cálculo da tetracaína em sua forma neutra, com o método funcional densidade B3LYP.
- Figura 24 Observação da planaridade da região do anel benzênico da tetracaína.
- Figura 25 Em azul a forma neutra da tetracaína, e em cinza a forma protonada, note que quando a molécula é protonada, o ângulo diedral sobre o Nitrogênio 15, passa a ter uma estrutura piramidal, e não mais planar como na forma neutra.
- Figura 26 Representação ilustrativa da caixa d'água com a PRC protonada em seu interior, feita através do software VMD.
- Figura 27 Gráfico da RDF do hidrogênio que protona os LA em relação aos oxigênios da água.
- Figura 28 Gráfico da RDF do oxigênio da carbonia em relação aos hidrogênios das moléculas d'água.
- Figura 29 Gráfico da RDF do anel aromático em relação as moléculas d'água.
- Figura 30 Gráfico da RDF do terminal CH₃ em relação as moléculas d'água.
- Figura 31 Gráfico da RDF do terminal amina em relação as moléculas d'água. Em preto temos a TTC, em vermelho temos a PRC e em verde a LDC.
- Figura 32 Representação de pontes de Hidrogênio (linhas tracejadas) sendo feitas nos principais sítios ativos da tetracaína protonada.
- Figura 33 Representação de pontes de Hidrogênio (linhas tracejadas) próximas à tetracaína neutra.
- Figura 34 Gráfico RDF para o hidrogênio que protona o LA em relação à água.

- Figura 35 Plots das distâncias entre o cloro mais próximo e o hidrogênio que protona o LA.
- Figura 36 Captura feita com o VMD a partir de cálculos realizados com o método B3LYP/6-31G**.
- Figura 37 Gráfico da interação molécula interface, para a tetracaína em sua forma neutra (cor vermelha) e forma protonada (cor preta).
- Figura 38 Captura de imagem da saída do GROMACS através do software VMD, feita da TTC em sua forma protonada na membrana de DPPC.
- Figura 39 Captura de imagem da saída do GROMACS através do software VMD, feita da TTC em sua forma neutra na membrana de DPPC.
- Figura 40 Captura de imagem da saída do GROMACS através do software VMD, feita da TTC em sua forma neutra na membrana de DPPC, porém sem representar os lipídios para facilitar visualização do local onde o fármaco se estabeleceu.
- Figura 41 Gráfico da posição do centro de massa da tetracaína em relação ao tempo, somente no eixo z.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM1.....	<i>Austin Model 1;</i>
B3LYP.....	Funcional Becke-style3, com correlação de Lee-Yang-Parr;
CI	Interação da configuração;
CNDO	<i>Compleat Neglect of Differential Overlap;</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i> – Teoria do Funcional da Densidade;
DPPC.....	Dipalmitoil-Fosfatidilcolina;
ERIs	Integrais de repulsão eletrônica;
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations;</i>
HMO.....	<i>Hückel Molecular Orbital;</i>
INDO	<i>Intermediate Neglect of Differential Overlap;</i>
LA	<i>Local Anesthetics</i> – Anestésicos Locais;
LDA.....	<i>Local Density Aproximation;</i>
LDC.....	Lidocaína;
LSDA.....	<i>Local Spin Density Aproximation;</i>
MD	<i>Molecular Dynamics</i> – Dinâmica Molecular;
MM	<i>Molecular Mechanics</i> – Método clássico de mecânica molecular;
MO	<i>Molecular Orbitals</i> – Orbitais moleculares;
NDDO	<i>Neglect of Dlatomic Differential Overlap;</i>
pH	Potencial Hidrogenionico;
PM3.....	<i>Parameterized Model 3;</i>
POPC.....	Palmitoil-Fosfatidilcolina;
PPP	Método de <i>Pariser-Parr-Pople;</i>
PRC	Procaína;
PW	<i>Perdew-Wang;</i>
QM	<i>Quantum Mechanics;</i>
RDF.....	<i>Radial Distribution Function</i> – Função de Distribuição Radial;
SCF.....	<i>Self Consistense Field</i> – Método de Hartree-Fock;

SCP..... Modelo de água;
TTC..... Tetracaína;
VMD..... Software de visualização;
UHF..... *Unrestricted Hartree-Fock*;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3. MÉTODOS COMPUTACIONAIS	21
4. METODOLOGIA	58
5. RESULTADOS, DISCUSSÕES E ANÁLISES	65
6. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	92
ANEXOS – ARTIGO PUBLICADOS	97

1. INTRODUÇÃO:

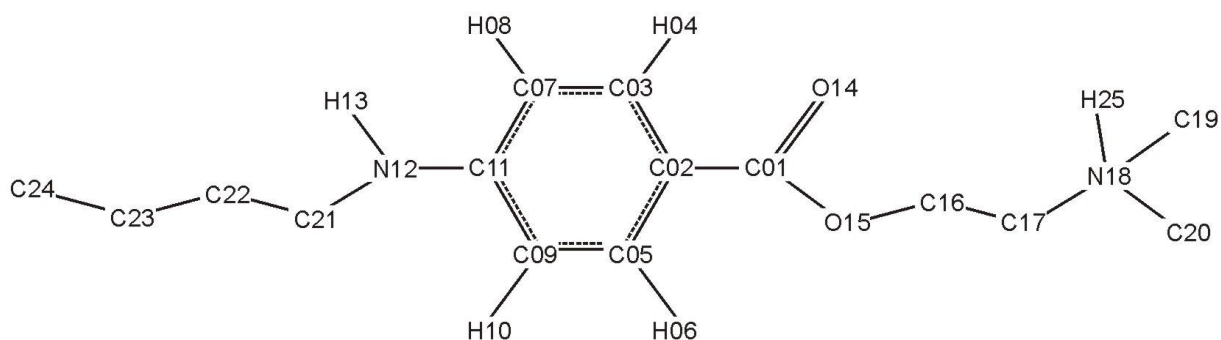
Cada vez mais freqüentes na literatura, estudos de fármacos em interação com sistema aquoso ou interfaces biológicas têm sido aplicados nas mais vastas áreas, desde o estudo de possíveis tratamentos para as mais diversas patologias, até mesmo na criação de armas químicas. A interação entre anestésicos locais (LA – *local anesthetics*) e sistemas-modelo de membrana é uma destas áreas de interesse. Aplicações destes modelos podem ser feitas em estudos de toxicologia, na criação de novos fármacos e até mesmo em testes de comportamento do fármaco a nível molecular. Neste trabalho, propomos um estudo da interação de LA com diferentes meios, tendo como objetivo compreender o comportamento destas pequenas moléculas próximas da membrana celular. Para tal faremos análises de três anestésicos: Procaína (PRC), Tetracaína (TTC) e Lidocaína (LDC), escolhidos devido a algumas peculiaridades de cada um que será mais bem demonstrada adiante.

Os LA bloqueiam reversivelmente a condução do impulso nervoso, entre eles, aqueles envolvidos com estímulos nociceptivos. Esta atuação paralisa as terminações nervosas sensitivas periféricas, ou ainda a transmissão da sensibilidade à dor entre terminações (nociceptores) e o encéfalo. Para tal, estes pequenos fármacos (Figura 1) apresentam-se geralmente em duas formas: uma neutra e outra catiônica. A forma catiônica da molécula é formada devido à inserção de um Hidrogênio no terminal amina. Isto ocorre devido ao fato do pKa dos LA geralmente variar entre valores entorno de 7,5 e 9,0. Logo, em meio fisiológico, onde o pH é aproximadamente neutro, teremos tanto moléculas neutras como carregadas.

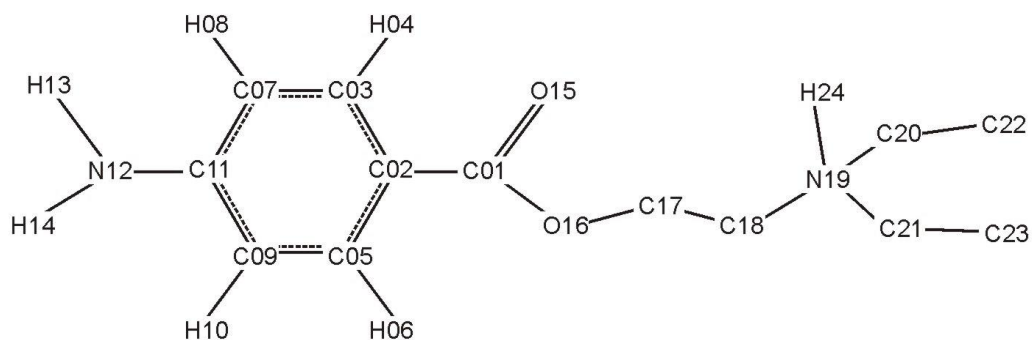
Alguns experimentos nos permitem compreender um pouco melhor o mecanismo de ação destes fármacos, como por exemplo, os realizados com axônios de lulas gigantes (Albert *et al*, 2004), onde são aplicados pulsos de corrente em uma extremidade do axônio sendo analisado então o comportamento destes pulsos em diversas situações, como na presença de LA ou na retirada das bainhas de mielina (células de Schwann). Estes experimentos podem nos dar propriedades macroscópicas dos LA, porém o conhecimento de como se dá a interação das moléculas anestésicas com membranas fosfolipídicas é algo ainda não

compreendido. Este é um problema que não pode ser totalmente resolvido experimentalmente, pelo menos não com as técnicas conhecidas hoje (Fraceto *et al*, 2002; Teixeira *et al*, 2001; Schreier *et al*, 2000).

Tetracaína



Procaína



Lidocaína

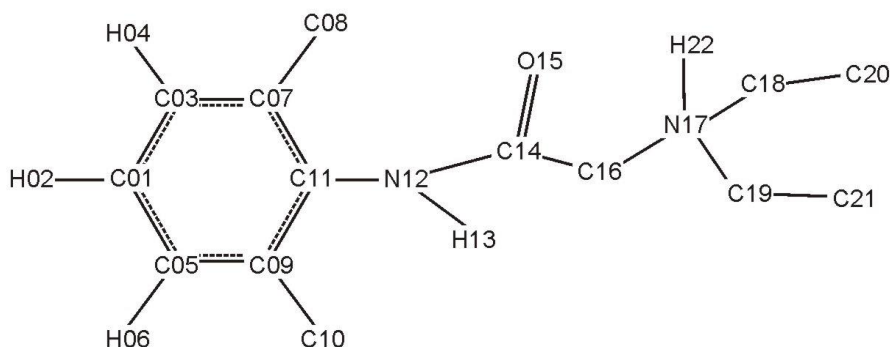


Figura 1 – Fórmula química dos anestésicos locais: Tetracaína (TTC), Procaína (PRC) e Lidocaína (LDC).

A impossibilidade de precisão na análise experimental levou-nos a uma tentativa de simulação computacional para analisar as propriedades do fármaco interagindo com a membrana. Para tal, o estudo começou com a obtenção de dados estruturais das moléculas de LA, como carga líquida de cada átomo e geometria das moléculas de TTC, PRC e LDC, de modo a podermos parametrizar os campos de forças clássicos para estes fármacos, existentes em softwares de Dinâmica Molecular (MD – *molecular dynamics*). Os dados de geometria e carga da molécula foram calculados utilizando três métodos de forma consecutiva, para aliviar o tempo de cálculo dos computadores. O primeiro método utilizado, e o mais grosseiro foi o método clássico de mecânica molecular (MM – *molecular mechanics*), que nos dá valores de geometria que são usados como dados de entrada num cálculo mais complexo que foi realizado em seguida: o semi-empírico PM3 (*parameterized model 3*). O cálculo da geometria através deste método já nos apresenta valores próximos aos experimentais para pequenas moléculas orgânicas como a nossa. Porém, como precisamos de valores mais confiáveis, utilizamos a geometria fornecida pelo método PM3 como entrada para o cálculo B3LYP (*Becke 3 – parameter: Lee – Yang – Parr*), com a base 6-31G**, que nada mais é do que uma soma de gaussianas.

O método quântico B3LYP é baseado na teoria do funcional da densidade DFT (*Density Functional Theory*), uma das mais poderosas ferramentas de cálculo de propriedades atômicas e moleculares. Os resultados obtidos com estes cálculos nos fornecem valores razoáveis para a geometria da molécula e para a carga de cada átomo, além é claro de muitas outras propriedades físico-químicas que se queiram calcular. Então, com os valores de carga atômica e geometria, podemos parametrizar o campo de forças GROMOS, possibilitando as análises da dinâmica clássica destas moléculas.

2. REVISÃO DA LITERATURA:

Os métodos de modelagem molecular estão ganhando muito espaço em todo o meio científico, principalmente devido ao desenvolvimento de novos computadores. Os conceitos base destes métodos são formulações conhecidas no mundo da física há muito tempo. Os métodos, principalmente os quânticos,

consistem de poderosas ferramentas no estudo de propriedade atômicas e moleculares, portanto seu crescimento deverá seguir naturalmente com o desenvolvimento de novos computadores (Mundim, 2002).

Quanto ao alvo de nosso estudo, os LA são fármacos de efeito reversivo, que inibem a propagação de sinais através de células do sistema nervoso. Esta inibição pode provocar redução ou perda da sensibilidade de uma determinada região do corpo. Estes fármacos estão divididos em duas classes: amino-amidas e amino-ésteres, sendo ambos sintéticos e suas estruturas estão relacionadas à cocaína (Ruetsch *et al*, 2001).

A fim de induzir a anestesia local, diversos fármacos podem ser empregados, sendo que alguns dos mais comuns são (Korolkovas, 1982 – Alfred, 2003):

1. Anestesia superficial – benzocaína, butacaína, cocaína, entre outros;
2. Anestesia espinal – lidocaína, piperocaína, procaína, entre outros;
3. Anestesia de bloqueio nervoso – procaína, tetracaína, entre outros;
4. Anestesia epidural – bupivacaína, etidocaína, lidocaína, entre outros;
5. Anestesia por infiltração – butanilicaína, prilocaína, entre outros;

Fatores históricos:

Existem registros do uso de inibidores de dor, como os LA, desde a Grécia antiga, através da aplicação de uma raiz com capacidade de aliviar a dor. Esta raiz é citada na obra *Ilíada* de Homero, mas também Dioscórides menciona o uso de óleos e bálsamos para a anestesia de partes do corpo. Já os LA que utilizamos hoje têm sua origem nas Américas, onde povos andinos do Peru e da Bolívia, como os Incas, mascavam folhas de coca. O costume ainda persiste e lhes dá a sensação de bem-estar, tornando-os capazes de trabalhos mais árduos, evitando a sensação de dor por fadiga muscular.

Apesar de conscientes do uso da folha da coca, conquistadores espanhóis não estudaram as propriedades da planta, o que veio a ser feito somente em 1855-60 por um estudante de doutorado da Universidade de Gottingen (Alemanha). Albert Niemann isolou a cocaína do arbusto *Erythroxylon coca*, publicando como seu trabalho de doutorado em 1860.

A partir daí diversos trabalhos começam a surgir estudando a cocaína. O primeiro que sugere o uso desta molécula como anestésico local foi de von Anrep, que por volta de 1880 estudou sua farmacologia. Em 1884, Sigmund Freud relatou seu efeito fisiológico e Köller demonstrou sua utilidade em oftalmologia. Em 1904-05, Fourneau sintetiza a amilocaína, a partir da disjunção da molécula de cocaína, surge então o primeiro LA derivado da cocaína. Ainda em 1905 é feita a procaína e então começam a surgirem diversos anestésicos. Em 1943 Löfgren e Lundqvist sintetizam a lidocaína, muito usada até hoje e mais conhecida sobre o nome comercial Xylocaína (Korolkovas *et al*, 1982 – Ruetsch *et al*, 2001 – Alfred *et al*, 2003).

Estrutura molecular:

LA são pequenas moléculas anfifílicas que em sua maioria possuem um grupamento amina ionizável em um pH entre 7,0 e 9,0 (Fraceto *et al*, 2002). Em geral, os anestésicos locais têm estrutura semelhante à da cocaína e podem ser representados por uma fórmula geral conhecida como grupo anestesiofórico, dada pela Figura 2.

Um detalhe importante, é que para terem atividade anestésica, estas moléculas devem ter equilíbrio entre as partes hidrofílica e lipofílica. Além disso, em todos os anestésicos locais dos tipos éster e amida, o grupo carbonila 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 π do anel aromático até o oxigênio da carbonila, como na Figura 3.

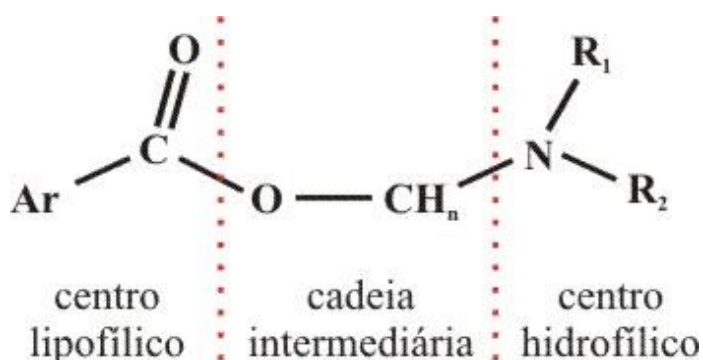


Figura 2 – Fórmula geral dos anestésicos locais. Fonte: A. Korolkovas, J. H. Burckhalter; *Química Farmacêutica* – cap. 21 – Guanabara – 1982.

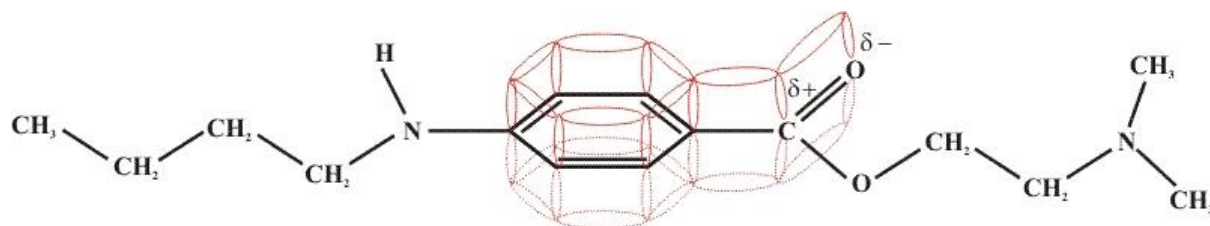


Figura 3 – Deslocalização da nuvem eletrônica nos anestésicos locais. O modelo acima segue representando a tetracaína.

Este átomo (oxigênio da carbonila) adquire uma carga parcial negativa, o que dá origem à carga parcial positiva no carbono da carbonila (Korolkovas *et al*, 1982). Na tetracaína, devido à presença de um grupo doador de elétrons na posição *para* do anel fenílico, existe ainda um aumento da polarização entre o oxigênio e o carbono da carbonila. Então neste caso acredita-se que haverá uma união mais firme entre o composto (tetracaína) e o aceitador de ligações de hidrogênio, o que prolongará a ação do anestésico (Bernardi *et al*, 2006). Com isso acredita-se que a ação anestésica dependeria da ligação dos LA com um receptor na membrana, como está indicado na Figura 4, sendo que o receptor poderia ser uma proteína trans-membranar (Fraceto *et al*, 2006) ou mesmo os fosfolipídios da membrana (Fraceto *et al*, 2002).

Mecanismo de ação:

Existem muitas divergências de informações quanto ao real modo de ação dos LA, principalmente quanto ao local onde agem e qual é a forma ativa, a neutra ou a protonada. Bastante aceito atualmente é o modelo que 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 (Figuras 5 e 6). O que os LA fazem, é em suma, despolarizar a membrana neural, bloqueando a transmissão do impulso nervoso (Boulanger *et al*, 1981 – Auger *et al*, 1988 – Bernardi *et al*, 2007.). Acredita-se que esta despolarização se dê por interferência no fluxo de íons Na^+ e K^+ através de canais iônicos da membrana. Ou seja, não há desenvolvimento de um potencial elétrico negativo para a transmissão de um impulso (Fraceto, 2006).

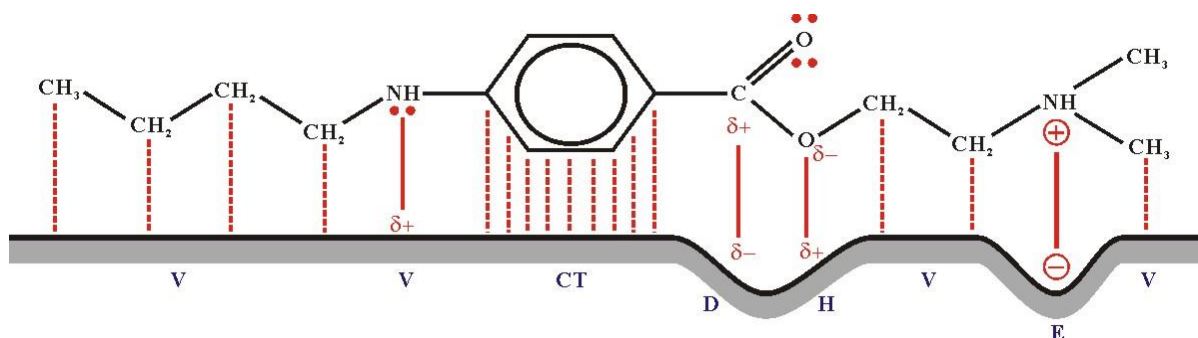


Figura 4 – Ligação da molécula da tetracaína protonada ao receptor por meio de: E, forças eletrostáticas; D, interação dipolo-dipolo; V, forças de van der Waals e hidrofóbicas; H, pontes de hidrogênio; CT, transferência de carga.

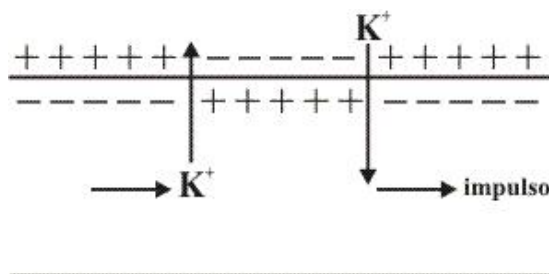


Figura 5 – Propagação do impulso nervoso. Fonte: A. Korolkovas, J. H. Burckhalter; *Química Farmacêutica* – cap. 21 – Guanabara – 1982.

Um fator que indicaria que tal teoria é plausível é o de que os efeitos de alguns LA sobre os nervos podem ser antagonizados pelo cálcio. Isto indicaria que tanto os LA quanto o Ca^{++} competem pelos mesmos sítios ligantes, logo devemos esperar que a forma catiônica dos LA é quem deve interagir com o aceitor na membrana, que por sua vez poderia ser uma proteína da membrana, como o canal de Ca^{++} . Outro fator é que os anestésicos locais costumam ser ineficazes em áreas inflamadas, devido ao pH mais ácido nestas áreas, o que facilita a ionização das moléculas do anestésico e, conseqüentemente, dificulta sua penetração nas fibras nervosas (Korolkovas *et al*, 1982).

Outra hipótese mais recente é a de que o sítio de ligação seria em canais de sódio na membrana celular neural. Quando o fluxo de sódio é interrompido, o potencial de ação não surge e o sinal não é conduzido através do neurônio. O mecanismo mais aceito atualmente seria de que os anestésicos locais entram na membrana e dentro dela se ligam a uma porção do canal de sódio, inibindo o mesmo, mantendo-o fechado para o fluxo de íons (Fozzard *et al*, 2005).

Outros trabalhos também indicam que os LA desorganizam a estrutura da bicamada lipídica o que aumenta a permeabilidade de água nas membranas. Isto poderia afetar o efeito anestésico e também aumentar sua toxicidade (Shibata *et al*, 1995 – Smith *et al*, 1991 – Auger *et al*, 1989).

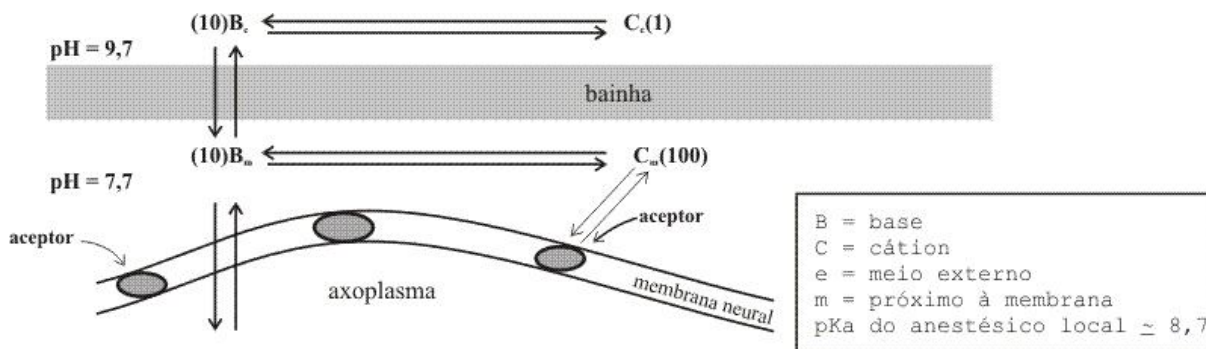


Figura 6 – Mecanismo de ação dos anestésicos locais ao nível molecular. *Fonte: A. Korolkovas, J. H. Burckhalter; Química Farmacêutica – cap. 21 – Guanabara – 1982.*

3. MÉTODOS COMPUTACIONAIS:

Simulações computacionais de diversos tipos de sistema, principalmente os biológicos, são cada vez mais comuns na literatura. Porém apesar de a cada ano milhares de artigos sobre o assunto nos mostrar como se comportam os mais diferentes sistemas, não se sabe ao certo exatamente o quanto disso é realmente uma boa aproximação da realidade. Na simulação de moléculas, diversas propriedades físico-químicas já são obtidas com boa precisão a partir de métodos computacionais. Mas ao tentarmos falar nestas simulações como verdades absolutas, devemos lembrar que uma importante questão precisa ser feita por nós mesmos: *As simulações que fazemos representam realmente a natureza?*

Os avanços dos métodos de modelagem molecular tentando encontrar a ideal representação da natureza passam principalmente pelo avanço dos computadores nas duas últimas décadas. Diversos estudos possíveis hoje em dia, só o são devido ao grande crescimento tecnológico nesta área. Em contrapartida, apesar de termos métodos também muito avançados, vários modelos hoje são na verdade meras adaptações para o computador de equações como as das leis de

Newton (publicadas em 1687, em seu trabalho de três volumes intitulado: *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*) utilizadas principalmente nos métodos de Dinâmica Molecular (MD – *molecular dynamics*).

Este avanço está ajudando no desenvolvimento de diversas áreas, como a bioquímica e a engenharia de materiais. Devido à limitação computacional, métodos envolvendo aproximações clássicas para sistemas quânticos, estão se expandindo muito rapidamente. E apesar dos avanços nos computadores, muitos sistemas que desejamos estudar esbarram na falta de máquinas suficientemente potentes para resolver via mecânica quântica problemas envolvendo grande número de átomos e moléculas. A utilização de cálculos quânticos *ab-initio* (*também chamado de método de primeiros princípios: indica que o cálculo é feito partindo dos primeiros princípios da mecânica quântica, ou seja, desde a equação de Schroedinger até a obtenção da grandeza física que se deseja, tendo como base apenas da massa e da carga das partículas, além é claro da constante de Plank*) para calcular, por exemplo, os potenciais harmônicos entre átomos em moléculas orgânicas pequenas, com menos de 30 átomos, chegam a levar, dependendo do método de aproximação utilizado no cálculo, até mesmo alguns dias. Os tempos computacionais envolvidos em uma abordagem puramente quântica, para sistemas moleculares de grande porte, são absolutamente proibitivos (Mundim et al, 2002).

As metodologias para o procedimento de simulação computacional nos remetem aos princípios gerais das dinâmicas clássica e quântica e aos princípios de extremos envolvendo grandezas físicas. O que dá origem a diversos métodos, sendo que os por nós utilizados foram os de mecânica molecular (MM – *molecular mechanics*), o método semi-empírico PM3, e o método *ab-initio* DFT com o funcional B3LYP na base 6-31G**.

Diversos softwares são encontrados, para o cálculo de propriedades atômicas e moleculares. Dentre eles, existem programas livres, os quais podem ser baixados da Internet em diversas home-pages, e que, em grande parte, são aprimorados por seus próprios usuários, devido ao fato de seu código fonte estar aberto para qualquer pessoa. Geralmente estes programas são desenvolvidos por grupos de pesquisas de diversos institutos. O problema destes softwares, é que nem sempre existem manuais sobre como utilizar seus recursos, e quando existem, estes manuais geralmente são muito incompletos e confusos. Existem também softwares

pagos, que geralmente possuem generosos guias, porém a um preço fora da realidade da maioria dos grupos de pesquisa. Estes, também apresentam o problema de serem muito fechados e devemos então confiar em seus cálculos sem saber o que exatamente seus algoritmos fazem, já que seus usuários não podem ter acesso aos seus códigos fonte. Desenvolver um software próprio é uma coisa complicada principalmente devido aos seus tamanhos, o que torna praticamente proibitivo uma pessoa ou um pequeno grupo fazê-lo de maneira eficiente.

A seguir, apresentamos um maior detalhamento sobre como funcionam os métodos que utilizamos para os cálculos da tetracaína:

3.1. Modelagem Molecular Clássica:

O princípio básico deste método é muito antigo e muito conhecido pelos físicos, e podemos sintetizá-lo em três leis básicas formuladas por Newton e publicadas no ano de 1687 em seu livro “*Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*” (Princípios Matemáticos da Filosofia Natural) da seguinte maneira:

1. *Corpus omne perseverare in statu suo quiescendi vel movendi uniformiter in directum, nisi quatenus a viribus impressis cogitur statum illum mutare.*
2. *Mutationem motis proportionalem esse vi motrici impressae, et fieri secundum lineam rectam qua vis illa imprimitur.*
3. *Actioni contrariam semper et aequalem esse reactionem: sine corporum duorum actiones in se mutuo semper esse aequales et in partes contrarias dirigi.*

Ou seja: 1. Todo corpo continua em seu estado de repouso ou de movimento uniforme em uma linha reta, a menos que seja forçado a mudar aquele estado por forças imprimidas sobre ele; 2. A mudança de movimento é proporcional à força motora imprimida, e é produzida na direção da linha reta na qual aquela força é imprimida; 3. A toda ação há sempre oposta uma reação igual, ou, as ações mútuas de dois corpos um sobre o outro são sempre iguais e dirigidas a partes opostas.

Faz-se necessário lembrar também que na MM, o átomo é representado por um corpo esférico com uma massa particular que, em geral, é igual a sua respectiva massa atômica. E é importante estabelecermos um sistema de coordenadas que

relaciona um determinado átomo com os átomos aos quais ele está ligado, criando assim uma relação entre seus vizinhos primeiros, segundos, terceiros e assim por diante. Este sistema de orientação, comumente usado métodos de modelagem e dinâmica molecular, aparece explicitado na Figura 7.

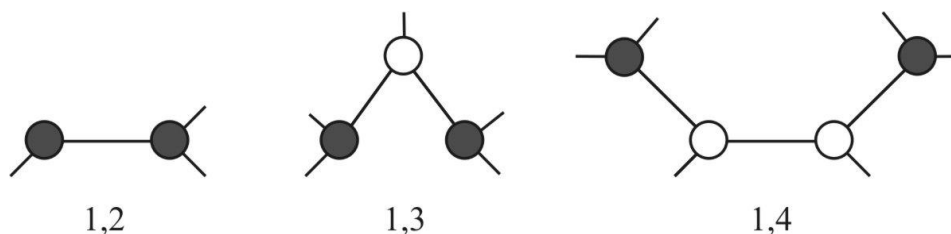


Figura 7 – Sistema de orientação usado na modelagem molecular: 1,2 representa o primeiro vizinho, 1,3 o segundo vizinho e 1,4 representa o terceiro vizinho.

A modelagem molecular busca, a partir das equações de Newton no formalismo de Hamilton, uma metodologia para descrever propriedades moleculares quânticas, em termos de um campo de força clássico. No método denominado MM, as ligações químicas são representadas por potenciais harmônicos. Em princípio, pode-se dizer que as moléculas são como uma coleção de massas ligadas por “molas” com suas propriedades representadas através de potenciais harmônicos e anarmonicos (Levine, 2003).

Precisamos então encontrar um conjunto refinado de parâmetros que melhor represente estes potenciais clássicos, a fim de descrever propriedades quânticas. Idealmente, espera-se que com este refinamento do campo de forças, venha eventualmente unificar modelos computacionais que possam sucessivamente fazer cálculos que descrevam as propriedades das moléculas observadas. A qualidade de um campo de força passa necessariamente pela sua sensibilidade em descrever e mapear os diferentes estados conformacionais de energia potencial mínima, local ou global, mesmo estando o sistema molecular em condições críticas e sob a ação de forças externas. E aqui já começamos a ter problemas, pois os métodos clássicos falham em algumas situações importantes, pois suas equações geralmente resolvem problemas para a maioria dos átomos em temperaturas e condições de pressão normal. Então alguns problemas insolúveis para mecânica clássica surgem:

- Prótons podem tunelar através de barreiras de potencial em uma ponte de hidrogênio.
- Hélio líquido a uma baixa temperatura possui uma alta frequência de vibração.
- A mecânica estatística do oscilador harmônico clássico difere-se muito da do oscilador harmônico quântico quando estamos próximos da frequência de ressonância.

Outro grande problema é que classicamente o número de onda é da ordem de 200 cm^{-1} , porém quanticamente este valor pode ser muito diferente, principalmente em moléculas com hidrogênio. Este problema específico pode ser solucionado de pelo menos duas maneiras:

1. Se estivermos utilizando potenciais harmônicos para simular as ligações químicas, podemos fazer correções na energia interna U e no calor específico C_v , de modo que estes termos sejam escritos na forma:

$$U^{QM} = U^{CL} + kT \left[\frac{x}{2} - 1 + \frac{x}{e^x - 1} \right]$$

$$C_v^{QM} = C_v^{CL} - k \left[1 - \frac{x^2 e^x}{(e^x - 1)^2} \right]$$

Deve-se lembrar que se forem calculadas, a energia livre G e a entropia S também devem ter suas equações corrigidas (McQuarrie, D. A., 1976).

2. Podemos tratar as ligações e os ângulos de ligação como vínculos na equação de movimento, sendo assim não precisaremos mais calcular estas vibrações do átomo de hidrogênio, congelando-o e ganhando no mínimo 4 vezes mais velocidade de cálculo em uma MD, pois agora ao invés de passos de 0.5 femtosegundos, daremos passos de 2 femtosegundos (van Gunsteren, 1977).

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

Descrição dos potenciais:

Na MM descrevemos a energia na forma Hamiltoniana como a soma da energia cinética com a potencial, sendo que esta parte potencial é descrita pela soma de um conjunto de termos representando cada tipo de potencial apresentado na molécula:

$$V = V_{\text{str}} + V_{\text{bend}} + V_{\text{oop}} + V_{\text{tors}} + V_{\text{vdW}} + V_{\text{es}}$$

Em resumo, os termos da equação acima podem ser divididos em 2 grupos de potenciais:

Potenciais covalentes:

Seguem 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 seguintes termos:

a. - V_{str} 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 8). 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:

$$V_{\text{str}} = \sum_{1,2} V_{\text{str},ij}$$

sendo que a energia potencial $V_{\text{str},ij}$ é representada pela equação:

$$V_{\text{str},ij} = \frac{1}{2} k_{IJ} (l_{ij} - l_{IJ}^0)^2$$

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. Por exemplo, no $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$, temos valores fixos de referência para ligações entre carbono e carbono, e carbono e hidrogênio. 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.

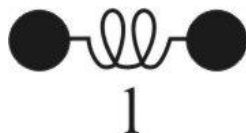


Figura 8 – Representação da ligação direta entre um átomo e outro.

b. – O termo V_{bend} é a contribuição na energia potencial que representa o ângulo entre as ligações, como na figura 4:

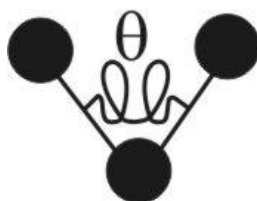


Figura 9 – Representação do ângulo de ligação entre um átomo e seu segundo vizinho.

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

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

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

c. – Para representar, e manter a estrutura tridimensional de alguns agrupamentos de átomos da molécula, temos a contribuição no potencial devido ao ângulo dihedral impróprio V_{oop} , 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 , como na figura 10.

Para representar 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:

$$V_{\text{oop}} = \frac{1}{2} k_{\text{oop}} \omega_{\text{oop}}^2$$

onde, k_{oop} é uma constante parametrizada a partir de valores empíricos.

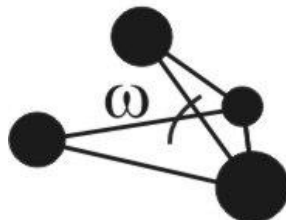


Figura 10 – Representação do ângulo formado entre um plano e outro na estrutura molecular.

d. – V_{tors} é o termo da contribuição torsional, que representa os movimentos harmônicos em torno das ligações químicas, como mostra a figura 11. Ele descreve a 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 $V_{\text{tors},ijkl}$, que por sua vez é dado por:

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

Onde φ é o ângulo dihedral próprio (como na figura 11), e V_1 , V_2 , V_3 são parâmetros definidos dependendo de quais tipos de átomos são i , j , k e l .

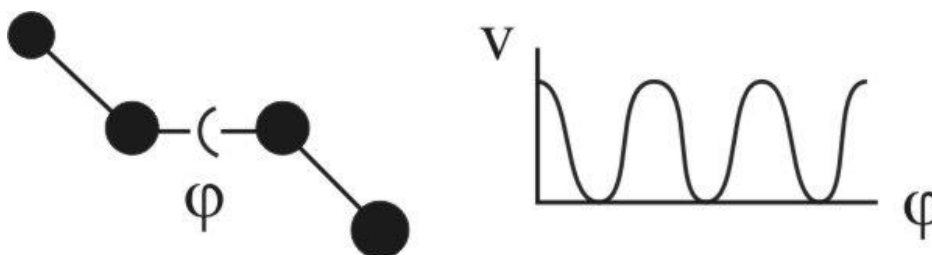


Figura 11 – Representação do ângulo de movimento em torno das ligações químicas e da forma do seu potencial.

Potenciais não-covalentes:

a. – Potencial de van der Waals: Quando temos átomos não ligados covalentemente, podemos tratar suas ligações por potenciais efetivos, compostos por termos de curto e longo alcance, o que inclui a repulsão das nuvens eletrônicas,

a atração de van der Waals e o termo eletrostático de Coulomb. Exceto os três primeiros vizinhos quimicamente ligados, cujas interações são tratados por potenciais harmônicos, a interação de cada átomo com os outros átomos da molécula é também descrita por termos de van der Waals e Coulomb. O termo de van der Waals V_{vdW} é usualmente dado como a soma das interações envolvendo todos os possíveis vizinhos a partir do terceiro (1,4, 1,5, 1,6, ...), ou seja:

$$V_{vdW} = \sum_{1, > 3} V_{vdW,ij}$$

sendo a equação para o termo $V_{vdW,ij}$ é dada como:

$$V_{vdW,ij} = \epsilon_{IJ} \left[\left(\frac{R_{IJ}}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{IJ}}{R_{ij}} \right)^6 \right]$$

onde: R_{ij} é a distância entre os átomos i e j , R_{IJ} é o valor parametrizado para a distância e ϵ_{IJ} é o parâmetro que fornece o valor de $V_{vdW,ij}$ que tem mínima interação de van der Waals na curva do poço de potencial. A curva do potencial de van der Waals e uma representação esquemática do tipo de interação é apresentada na figura 12.

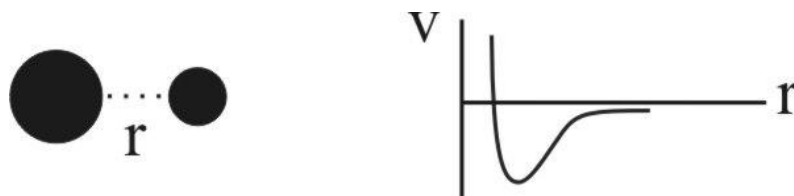


Figura 12 – Representação do termo de potencial de van der Waals.

Note que o potencial de van der Waals é representado por um termo atrativo com potência 6 e outro repulsivo com potência 12. O termo repulsivo é atribuído à combinação da repulsão interatômica com o princípio de exclusão de Pauli. Este termo é de curtíssimo alcance, da ordem de 5 Å, de maneira que a energia potencial aumenta rapidamente com a aproximação entre os núcleos atômicos devido a não interpenetração dos átomos não ligados covalentemente e ao fato do diâmetro atômico ser finito e quase invariável. O termo atrativo surge atribuído a pequenas flutuações na distribuição de cargas do átomo na presença de outro, o que induz um dipolo elétrico (em alguns casos até mesmo quadrupolo elétrico) em sentido oposto,

fazendo surgir assim uma interação atrativa dipolo-dipolo, sendo esta interação conhecida como termo de dispersão de London.

Na química, o potencial de van der Waals refere-se originalmente a todas as formas de forças intermoleculares, porém com o passar dos anos o termo acabou sendo mais relacionado com as forças devido à polarização das mesmas. Potenciais de Keesom, de Debye e o termo de dispersão de London eram nomeados juntos como potencial de van der Waals em homenagem ao físico holandês Johannes Diderik van der Waals, que foi o primeiro a documentar tais interações em 1873.

Um fato interessante decorrente destas expressões é que podemos ver que a tendência de todos os gases se condensarem a baixas temperaturas, próximas a temperatura de ebulição, é atribuída a forças atrativas que superam a energia cinética das moléculas nessas temperaturas. Esta relação pode ser obtida já que, macroscopicamente, o termo atrativo de van der Waals surge como uma correção da pressão, no tratamento de gases reais, e o termo repulsivo é uma correção na equação de estado dos gases ideais, para considerar o volume excluído no estudo de gases reais.

b. – O termo V_{es} (potencial de interação eletrostática) é comumente dado como a soma das interações eletrostáticas envolvendo todos os pares de átomos, exceto os três primeiros vizinhos de cada átomo da molécula, ou seja:

$$V_{es} = \sum_{1, > 3} V_{esij}$$

Este potencial de interação, demonstrado esquematicamente na figura 13, também é conhecido como potencial de repulsão coulombiana, pois $V_{es,ij}$ é expresso pela equação de energia potencial de Coulomb, isto é:

$$V_{esij} = Q_i Q_j / \epsilon_r R_{ij}$$

onde Q_i e Q_j são as cargas líquidas dos átomos i e j respectivamente, R_{ij} é a raio entre os átomos e ϵ_r é uma constante dielétrica.

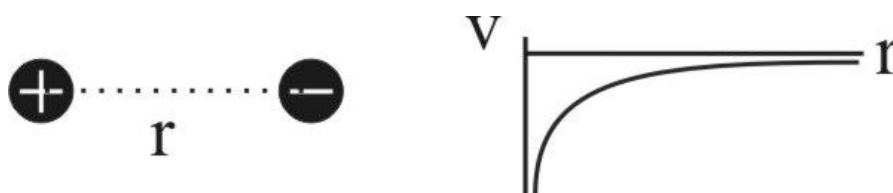


Figura 13 – Representação do termo de potencial de Coulomb.

Otimização de Geometria através da MM:

Computacionalmente temos diferentes modos de minimizar a energia de um sistema, porém basicamente o que é feito é ajustar as coordenadas atômicas de modo a reduzir a energia potencial descrita anteriormente. Os métodos de gradiente são as ferramentas mais comuns para esta função, sendo que os mais conhecidos são o do gradiente conjugado, o steepest descents, o de Newton-Raphson e o método de Newton truncado (Press *et al*, 1992).

O método steepest descent (declive acentuado) foi desenvolvido por Cauchy em 1847. Sua forma é muito conhecida e também bastante simples, porém apresenta um lento caminho de convergência, pois utiliza poucas informações, exigindo apenas as derivadas primeiras para o cálculo. Como o gradiente de uma função é um vetor que aponta na direção de maior crescimento da função, então o que método faz é seguir na direção oposta a do vetor, pois estamos procurando um ponto de mínimo.

O método do gradiente conjugado é um pouco mais sofisticado, pois além de utilizar a informação sobre a primeira derivada ele “memoriza” o caminho já percorrido o que lhe faz ser convergir mais rapidamente do que o steepest descent. A vantagem maior deste método está no fato que sua formulação garante que a direção do gradiente do novo passo será sempre ortogonal ao gradiente do passo anterior, e assim consequentemente de todos os anteriores. Desta maneira evitamos percorrer o mesmo caminho da minimização mais de uma vez, tentando ir diretamente para o fundo do poço de potencial.

Newton-Raphson já é um método mais complexo que converge em uma forma quadrática, ou seja, em pontos próximos da raiz o número de dígitos significativos dobra. A idéia do método é de se tomar um valor qualquer para uma variável x , como primeira estimativa para esta raiz. Com este valor calculamos então o valor da função que, provavelmente, não está na raiz. Deste ponto, traçamos uma tangente a curva buscando o ponto em que esta tangente corta o eixo x , ou seja, este novo valor de x deverá ser uma melhor aproximação da raiz, e assim sucessivamente.

Baseado em séries de Taylor, o método de Newton truncado consiste na geração de uma série de problemas linearizados, ou seja, quando tratamos de problemas muito grandes, a solução destes sistemas de equações lineares,

juntamente com as repetidas avaliações da matriz de rigidez, tornam o método muito dispendioso computacionalmente. O cálculo das soluções lineares no início das interações não-lineares não precisa de grande precisão, necessidade esta que aumenta na medida em que as interações não lineares vão, cada vez mais, aproximando-se da solução final no equilíbrio. Ou seja, a idéia principal é minimizarmos o trabalho necessário para busca do mínimo quando estivermos longe da posição de equilíbrio.

3.2. Método Semi-empírico PM3:

Devido à dificuldade em aplicar métodos quânticos em moléculas de médio e grande porte, foram desenvolvidos muitos métodos semi-empíricos para tratar tais problemas, sendo que os primeiros métodos só tratavam os elétrons π de moléculas conjugadas. O mais célebre método semi-empírico de tratamento do elétron π é o método do Orbital Molecular de Hückel (HMO), desenvolvido nos anos trinta. Aqui, a Hamiltoniana do elétron π é aproximada para a forma mais simples:

$$\hat{H}_{\pi} = \sum_{i=1}^{n_{\pi}} H^{\text{eff}}(i)$$

onde $H^{\text{eff}}(i)$ incorpora os efeitos das repulsões do elétron π de uma maneira muito simplificada. Este método é bastante vago, e na realidade o método de Hückel não especifica nenhuma forma explícita para $H^{\text{eff}}(i)$.

Embora a teoria de Hückel possa ser usada para prever as faixas de longo comprimento de onda de hidrocarbonetos aromáticos, seria absurdo tentar usar a teoria HMO para prever o espectro eletrônico completo de um hidrocarboneto aromático. Por exemplo, a teoria de Hückel que negligencia repulsões entre elétrons, não dá nenhuma separação entre termos de singlete e tripleto que surgem da mesma configuração eletrônica, sendo que experimentalmente, são observadas separações de 1 eV ou até 2 eV entre tais condições (ou seja, a diferença de energia entre os estados singlete e tripleto). Um método semi-empírico do elétron π que leva em conta a repulsão entre elétrons e que melhora o método de Hückel é o método Pariser-Parr-Pople (PPP), desenvolvido em 1953. Aqui, a Hamiltoniana inclui

repulsões eletrônicas, e a função de onda do elétron π é escrita como um produto anti-simétrico de orbitais de spin destes elétrons.

Pople e alguns colegas desenvolveram ainda os métodos CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*), INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) e NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), com o objetivo de reproduzir os resultados obtidos com métodos *ab-initio* de orbital molecular SCF, com uma teoria que requer muito menos tempo de cálculo no computador. Mas os seus métodos usam aproximações, e podemos esperar que os seus resultados por mais semelhantes que sejam, não serão tão precisos e confiáveis como os *ab-initio*. Assim estes métodos fazem bem os cálculos de geometria molecular, mas falham no cálculo de cargas e de minimização das energias de ligação. Surgem então vários métodos semi-empíricos semelhantes ao INDO e NDDO, iniciados por Dewar e seus colegas de trabalho, dentre eles o AM1 (*Austin Model 1*) e o PM3 (*Parameterized Model 3*), porém o objetivo de Dewar não era o de reproduzir os valores obtidos com cálculos *ab initio* SCF, e sim de obter uma teoria que daria as energias que ligam as moléculas com uma precisão química (dentro de 1kcal/mol) e que pudesse ser usado para moléculas grandes sem uma quantia proibitiva de cálculos. O desafio, que a princípio parecia loucura, era desenvolver uma teoria de orbitais moleculares (MO) que tivesse resultados próximos aos do método *ab initio* SCF de Hartree-Fock, e que ainda tivesse sucesso onde a teoria de Hartree-Fock falha, no desenvolvimento de funções matemáticas para descrever os orbitais. Porém, por escolha própria dos parâmetros no método semi-empírico, a pessoa pode melhorar o resultado obtido com o *ab-initio* SCF, porque a escolha de parâmetros satisfatórios compensaria a negligência de correlação do elétron na teoria SCF.

As teorias do tipo Dewar analisam apenas os elétrons de valência, sendo que em sua maioria, estas usam uma base de dados mínima do tipo Slater, de valência s e p nos orbitais atômicos (com valores para os orbitais determinados por parametrização) com a finalidade de expandir o elétron de valência dos orbitais moleculares. As equações de Fock-Roothaan são resolvidas para achar os orbitais moleculares SCF semi-empíricos. Já nos métodos *ab initio*, as integrais dos elementos da matriz de Fock F_{rs} são avaliadas, com bastante precisão, para obter os termos de MO, porém esta não é a aproximação usada nas teorias do tipo Dewar.

Teorias do tipo Dewar utilizam as integrais de repulsão eletrônica (ERIs) de centro único como parâmetros, cujos valores são escolhidos para ajustar o problema com os dados experimentais, e então são calculadas as integrais de centro duplo, partindo das primeiras, e assim as distâncias internucleares são calculadas usando aproximações envolvendo parâmetros experimentais e cálculos de minimização de energia. As integrais restantes são avaliadas usando parâmetros aproximados que são projetados para não dar valores que reproduzam os *ab-initio*s com precisão, mas sim que sejam consistentes com aproximações químicas usadas, que nas teorias de Dewar são parametrizadas para render bons valores na fase gasosa a 25°C, com entalpia de formação $\Delta H_{f,298}^0$.

Em 1985 Dewar e seus colegas publicaram uma versão melhorada do MNDO chamada AM1 (Austin Model 1, em homenagem a Universidade do Texas em Austin) (Dewar, 1985). O AM1 foi parametrizado para os elementos químicos: H, B, Al, C, Si, Ge, Sn, N, P, O, S, F, Cl, Br, I, Zn, e Hg, e a única diferença entre o MNDO e o AM1 está na expressão da energia pontencial para o caroço repulsivo central. Em seguida, 1989, Stewart reparametrizou o AM1 e criou então o método PM3 (Método Paramétrico 3, onde o 1 seria o MNDO e o 2 o AM1), (Stewart *et al*, 1991). O PM3 difere também muito pouco do método AM1, as integrais de repulsão eletrônica de centro único são levadas como parâmetros a serem aperfeiçoados (no AM1 estes valores foram obtidos experimentalmente por espectrometria atômica), a função para o caroço repulsivo contém apenas duas gaussianas por átomo, e os métodos de obtenção dos valores parametrizados são um tanto quanto peculiares (Stewart, 1990). O PM3 foi ajustado para os átomos de H, C, Si, Ge, Sn, Pb, N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te, F, Cl, Br, I, Al, Ga, In, Tl, Be, Mg, Zn, Cd, e Hg. Este ajuste a apenas estes átomos deve-se ao fato de a parametrização, utilizando resultados experimentais, ter sido feito apenas para estes átomos, o que não significa que este método não funcione para outros átomos, porém para átomos mais pesados (com o número atômico *Z* aproximadamente maior do que 30) os resultados começam a ficar fora de valores aceitáveis, salvo algumas exceções.

3.3. Método do funcional da densidade:

A Teoria do Funcional Densidade (DFT) é a mais próspera e popular aproximação da mecânica quântica para o estudo de átomos e moléculas, mas, apesar de ser um método quântico *ab-initio*, ele não resolve seus cálculos através da função de onda, e sim através da densidade de probabilidade eletrônica, porém tratando-a como se fosse a própria função de onda, aplicando a ela os operadores da mecânica quântica (QM – *quantum mechanics*). É aplicada habitualmente para o cálculo, por exemplo, da energia de ligação de moléculas de interesse na bioquímica ou até mesmo na física do estado sólido. Mas sua abrangência vai desde o campo da biologia e mineralogia (onde o uso está começando a se intensificar), até nos estudos de supercondutividade, efeitos relativísticos em elementos pesados e em núcleos atômicos, líquidos clássicos, e no estudo de propriedades magnéticas de ligas, entre outros. O DFT deve esta versatilidade à generalidade de seus conceitos fundamentais e a flexibilidade que a pessoa tem na aplicação destes conceitos. Porém, apesar desta flexibilidade e generalidade, o DFT está embasado em uma teoria conceitual pouco sólida, o que lhe dá uma grande credibilidade são seus bons resultados que concordam com os dados experimentais.

Diversos métodos poderosos, como o de Hohenberg e Kohn, foram desenvolvidos para resolver problemas de muitos corpos. Na resolução da equação de Schroedinger para tais problemas, houve anos de lutas para um melhor entendimento de como agir diante de tais problemas. Em física, por exemplo, temos os diagramas da teoria de perturbação (baseados em diagramas de Feynman e funções de Green), enquanto em química freqüentemente usam-se métodos de Interação da Configuração (CI) que são baseados em expansão sistemática em determinantes de Slater, que também criou diversas outras técnicas utilizadas em mecânica quântica. O problema com estes métodos é a grande exigência de recursos computacionais que seria necessária para trazermos estas equações ao estudo de moléculas e sólidos. É simplesmente impossível aplicá-los eficientemente em sistemas grandes e complexos. Ninguém conseguirá, pelo menos não com os computadores de hoje, calcular propriedades químicas de moléculas com mais de 100 átomos com o método CI em sua forma completa, ou a estrutura eletrônica de

um semiconductor real usando nada mais que as funções de Green e os diagramas de Feynman.

Este é o ponto onde o DFT tornou-se uma alternativa viável, menos preciso talvez, mas muito mais versátil. A teoria de funcional densidade utiliza sistemas coulombianos não relativísticos que diferem somente por seus potenciais $v(\mathbf{r})$, e ferramentas precisas para lidar com operadores universais $\hat{T}$ e $\hat{U}$. Além disso, o DFT consegue eliminar diversos termos, devido ao seu método de cálculos, trazendo um sistema complexo para o referencial de um único átomo. Isto tudo é feito promovendo a densidade partícula $n(\mathbf{r})$ ou a densidade eletrônica $\rho_0(\mathbf{r})$ de apenas um entre muitos observáveis como uma variável chave, na qual o cálculo de todos os observáveis pode ser baseado. Esta aproximação forma a base da grande maioria de cálculos de estrutura eletrônica em física e química. Muito do que nós sabemos sobre as propriedades elétricas, magnéticas e estruturais de materiais foi calculado usando DFT, e até que ponto a teoria do funcional densidade contribuiu à ciência de moléculas pode ser visto pelo Prêmio Nobel de Química de 1998 que foi dado a Walter Kohn, o pai do método DFT (Kohn, 1999), e John Pople, quem implementou o DFT em química computacional (Pople, 1999).

Para entender melhor o DFT é necessário recordar alguns conceitos elementares de mecânica quântica. Nesta aprendemos que todas as informações que podemos ter de um determinado sistema estão contidas numa função de onda Ψ do sistema. No cálculo de funcional densidade estamos interessados exclusivamente na estrutura eletrônica de átomos, moléculas e sólidos. Os graus de liberdade nuclear somente aparecem na forma de um potencial $v(\mathbf{r})$ agindo nos elétrons (aproximação de Born-Oppenheimer), de forma que a função de onda só depende das coordenadas eletrônicas e de sua relação com o núcleo, não explicitando os termos nucleares. Em sistemas não relativísticos, esta função de onda é calculada da equação de Schroedinger, que para um único elétron movendo-se em um potencial $v(\mathbf{r})$ é dada pela seguinte equação:

$$\left[-\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m} + v(\mathbf{r}) \right] \Psi(\mathbf{r}) = \epsilon \Psi(\mathbf{r})$$

Se há mais de um elétron, a equação de Schroedinger para muitos corpos torna-se:

$$\left[\sum_i^N \left(\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m} + v(\mathbf{r}) \right) + \sum_{i<j} U(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) \right] \Psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) = E \Psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$$

onde N é o número de elétrons e $U(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j)$ é o potencial de interação elétron-elétron.

Para um sistema coulombiano temos:

$$\hat{U} = \sum_{i<j} U(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) = \sum_{i<j} \frac{q^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|}$$

(note que este último operador demonstra somente a interação do potencial coulombiano). O operador do termo de energia cinética será:

$$\hat{T} = \frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2$$

Deve-se notar que estas expressões são dadas para um sistema não relativístico. Nosso sistema é um átomo, uma molécula, ou um sólido que depende somente de $v(\mathbf{r}_i)$. Por exemplo, para um átomo, o operador do potencial pode ser dado por:

$$\hat{V} = \sum_i v(\mathbf{r}_i) = - \sum_i \frac{Ze^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}|}$$

onde Z é o número atômico, e é carga do elétron e $\mathbf{R}$ é a posição do núcleo. Para uma molécula ou um sólido temos:

$$\hat{V} = \sum_i v(\mathbf{r}_i) = - \sum_{ik} \frac{Z_k e^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_k|}$$

onde, a soma em k nos dá a soma em todos os átomos do sistema, com carga $Z_k e$ e posição $\mathbf{R}_k$. Note que $\mathbf{R}_k$ é apenas um arranjo no espaço, com suas correspondentes condições de contorno, que distinguem, fundamentalmente, uma molécula de um sólido.

A manipulação quântica da equação de Schroedinger (SE) pode ser resumida pela seguinte sucessão:

$$v(\mathbf{r}) \xrightarrow{SE} \Psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \xrightarrow{\langle \Psi | \dots | \Psi \rangle} \text{observáveis}$$

Por exemplo, podemos especificar o sistema escolhendo $v(\mathbf{r})$, e tomando isto na equação de Schroedinger, resolvemos esta para uma função de onda Ψ , e então calculamos os valores esperados dos observáveis com esta função de onda. Um entre os observáveis calculados é a densidade de partícula:

$$n(r) = N \int d^3r_3 \dots \int d^3r_N \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)^* \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$$

Este observável é a grande base dos métodos DFT, porém, para resolvermos a equação de Schroedinger, e chegarmos até a expressão para a densidade de partícula, foi traçado um caminho tortuoso num emaranhado de problemas de cálculo que foram sendo resolvido aos poucos.

O primeiro passo no desenvolvimento dos cálculos de métodos DFT, para o estudo de sistemas de muitos átomos, surge devido ao fato de termos que a função de onda eletrônica de uma molécula de n elétrons depende de $3n$ coordenadas espaciais e n coordenadas de spin. De certo modo, a função de onda de uma molécula de muitos elétrons contém mais informações do que necessitamos. Isto foi o estopim para a procura de funções que envolvessem menos variáveis do que a função de onda, possibilitando o uso dos cálculos desenvolvidos para o estudo das energias e outras propriedades atômicas e moleculares.

Em 1964, Hohenberg e Kohn desenvolveram um teorema que segue um caminho um pouco diferente do dado até agora, passando a tratar a densidade eletrônica, e não a densidade de partículas. Este teorema prova que para moléculas com um estado fundamental não degenerado, a energia molecular do estado fundamental, a função de onda, e todas as outras propriedades eletrônicas são exclusivamente determinadas pelo estado fundamental de uma densidade eletrônica de probabilidade $\rho_0(x,y,z)$, uma função que possui apenas três variáveis (Wang, 1983). É fato que a energia eletrônica do estado fundamental E_0 é um funcional de ρ_0 e pode ser escrita como $E_0 = E_0[\rho_0]$, onde os colchetes denotam uma relação funcional. A DFT, partindo do teorema de Hohenberg-Kohn, tenta calcular a energia e outras propriedades moleculares no estado fundamental, a partir da densidade eletrônica do estado fundamental ρ_0 .

A aproximação feita pela teoria do funcional densidade pode ser resumida pela sucessão:

$$n(r) \Rightarrow \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) \Rightarrow v(r)$$

Por exemplo, o conhecimento de $n(\mathbf{r})$ insinua o conhecimento da função de onda e logo do potencial $v(\mathbf{r})$, e conseqüentemente de todos os outros observáveis.

Todos estes conceitos dão uma idéia geral da DFT, mas não especificam como a DFT realmente funciona (para um maior detalhamento do método vide

referências: Parr *et al*, 1990; Koch *et al*, 2001; Nalewajski *et al*, 1996; Anisimov *et al*, 1999; March *et al*, 1992, Laird *et al*, 1996; Joulbert *et al*, 1998; Dobson *et al*, 1998; Eschrig, 1996; Gross *et al*, 1995). Nos últimos anos, os cálculos baseados em DFT estão ganhando uma popularidade muito grande, e com isto foram surgindo incontáveis métodos de funcional densidade. Na verdade, diversos funcionais para aplicarem na DFT, sendo que o por nós utilizado para a análise dos LA foi o funcional B3LYP (*Becke-style3 – com correlação funcional de Lee-Yang-Parr*), utilizando uma base de cálculos chamada 6-31G**. Em geral, todos os funcionais constroem o funcional da densidade, a partir da função de onda, via funções de Green, o que não é exatamente o caso do B3LYP. E a aproximação para muitos corpos (no caso de aminoácidos, por exemplo) é feita com o teorema de Hohenberg-Kohn, que é conhecido como o coração dos funcionais da DFT moderna.

Mas o que é um funcional? Sabemos que a função $f(x)$ é uma regra que associa um número, com cada valor da variável x para a qual função f está definida. Entretanto, um funcional $F[f]$ é uma regra que associa um número com a função f . Por exemplo, o funcional $F[f] = \int_{-\infty}^{\infty} f^*(x)f(x)dx$, associa um número, achado pela integração de $|f|^2$ em todo o espaço, com cada função $f(x)$ quadraticamente integrável.

O novo problema a ser tratado é que o funcional B3LYP é um método funcional híbrido. Os métodos híbridos definem a troca funcional como uma combinação linear de aplicações de métodos Hartree-Fock, local, e gradientes de correção para os termos de troca. Este funcional de troca é então combinado com uma correlação funcional. Os melhores métodos híbridos conhecidos fazem a formulação de três parâmetros funcionais de Becke, o que é o caso do B3LYP. O funcional híbrido funcional Beck-style provou ser muito superior aos funcionais tradicionais, e isto foi visto devido à comparação com diversos experimentos simples, onde o método B3LYP simulou com precisão os resultados obtidos. Para um estudo mais aprofundado do B3LYP, introduzimos aqui um pouco sobre os métodos híbridos, começando um pouco antes do surgimento destes funcionais, com o estudo da aproximação de densidade local (LDA) e da aproximação da densidade local de spin (LSDA).

Na LDA, Hohenberg e Kohn mostraram que se ρ varia muito lentamente com a posição, então a energia é exatamente determinada por:

$$E_{xc}^{LDA}[\rho] = \int \rho(r) \epsilon_{xc}(\rho) dr$$

onde a integral é feita em todo o espaço, com dr representando dx , dy e dz , e $\epsilon_{xc}(\rho)$ é a energia de correlação por elétron em um gás de elétrons homogêneo de densidade ρ .

No LSDA, temos melhores resultados do que os obtidos com o LDA, quando queremos um estudo de moléculas de camada aberta ou de geometrias moleculares próximas à dissociação. Considerando que no LDA, elétrons com spins opostos emparelhados entre si têm o mesmo orbital espacial KS (orbital de Kohn e Sham), o LSDA pode ser considerado um análogo ao método UHF (unrestricted Hartree-Fock) (Levine, 2003), que permite diferentes orbitais espaciais de Hartree-Fock para elétrons com spins diferentes. Os teoremas de Hohenberg, Kohn e Sham não requerem o uso de diferentes orbitais para elétrons com spins diferentes (a menos que um campo magnético externo esteja presente). Caso o funcional $E_{xc}[\rho]$ for exatamente conhecido, não haverá porque resolver o problema desta maneira. Com um funcional E_{xc} aproximado, que é usado nos cálculos KS DFT, é vantajoso permitir que elétrons de diferentes orbitais possam ter spins diferentes, para que haja uma melhoria nas propriedades calculadas em moléculas de camada aberta ou com geometrias próximas da dissociação.

O LDA e o LSDA estão baseados no modelo de gás de elétrons uniforme, que é apropriado para um sistema onde ρ varia lentamente com a posição. O integrando na expressão do LDA para E_{xc} é uma função que depende apenas de ρ , e o integrando na expressão de LSDA para E_{xc} é uma função só de ρ^α e ρ^β . Funcionais que vão além da precisão do LSDA para corrigir este funcional quanto à variação da densidade de elétrons com a posição foram criados. Estes funcionais fazem isto incluindo os gradientes de ρ^α e ρ^β no integrando, da seguinte maneira:

$$E_{xc}^{GGA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int f(\rho^\alpha(r), \rho^\beta(r), \nabla \rho^\alpha(r), \nabla \rho^\beta(r)) dr$$

onde f é alguma função das densidades de spin e seus gradientes. O índice GGA representa a aproximação de gradiente generalizado. O termo funcional de gradiente de correção é então empregado para denominar este método. E_{xc} é normalmente separado em dois termos:

$$E_{xc}^{GGA} = E_x^{GGA} + E_c^{GGA}$$

São desenvolvidas aproximações de trocas de gradientes de correção e correlações funcionais de energias, usando considerações teóricas, como o conhecido comportamento dos verdadeiros funcionais E_x e E_c em várias situações, usando-os como um guia, com talvez um pouco de empirismo lançado dentro de toda a teoria.

Alguns funcionais E_x de troca de gradiente de correção comumente usados são, o funcional de Perdew e Wang de 1986 (que não contém nenhum parâmetro empírico), denominados de PW86, o funcional de Becke de 1988, chamado de B88, Becke 88, ou simplesmente B, e o funcional de troca PWx91 de Perdew e Wang, desenvolvido em 1991. A forma explícita do funcional de troca B88 é dada pela equação a seguir, onde b é um parâmetro empírico que possui um valor igual a 0.0042 unidades atômicas, parâmetro este determinado pelo conhecido ajuste gráfico das energias de troca de Hartree-Fock para diversos átomos.

$$E_x^{B88} = E_x^{LSDA} - b \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \int \frac{(\rho^\sigma)^{4/3} \chi_\sigma^2}{1 + 6b\chi_\sigma \sinh^{-1} \chi_\sigma} dr$$

onde:

$$\chi_\sigma \equiv \frac{|\nabla \rho^\sigma|}{(\rho^\sigma)^{4/3}}$$

$$\sinh^{-1} x = \ln \left[x + (x^2 + 1)^{1/2} \right]$$

$$E_x^{LSDA} = -\frac{3}{4} \left(\frac{6}{\pi} \right)^{1/3} \int \left[(\rho^\alpha)^{4/3} + (\rho^\beta)^{4/3} \right] dr$$

Algo importante que deve ser dito é que os funcionais PWx86 (que não tem parâmetros empíricos) e os B88 trabalham igualmente bem predizendo propriedades moleculares. Qualquer funcional de troca pode ser combinado com qualquer correlação funcional. Por exemplo, a notação BLYP/6-31G* denota o calculo feito com o funcional Becke 1988 e com as correlações funcionais de Lee-Yang-Parr, com os orbitais de KS se expandindo em uma base 6-31G*.

Os funcionais híbridos são, hoje em dia, extensamente usados. Um funcional do tipo híbrido mistura a equação geral para E_x :

$$E_x \equiv -\frac{1}{4} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \left\langle \theta_i^{KS}(1) \theta_j^{KS}(2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \theta_j^{KS}(1) \theta_i^{KS}(2) \right\rangle$$

com as equações para os gradientes de correção E_x e E_c . Por exemplo, o popular funcional híbrido B3LYP (onde o número 3 indica 3 parâmetros funcionais de Becke), por nós utilizado no cálculo da tetracaína, é definido por:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a_0 - a_x)E_X^{LSDA} + a_0E_X^{exact} + a_xE_X^{B88} + (1 - a_c)E_X^{VWN} + a_cE_C^{LYP}$$

onde E_X^{exact} é dado pela equação geral para E_x escrita acima, e onde os parâmetros a_0 , a_x e a_c foram escolhidos por ajuste de gráficos criados com dados experimentais de energias moleculares. Um maior detalhamento sobre estes métodos é apresentado no artigo de Becke de 1997 e também no livro de Levine, 2003.

3.4. Base 6-31G**:

Muitos métodos de mecânica quântica molecular começam o cálculo com a escolha das funções de base χ_r que serão utilizadas na descrição dos orbitais moleculares (Levine, 2003; Foresman, 1998). Uso de bases adequadas é um requerimento essencial para o sucesso dos cálculos. Os cálculos mais rápidos de integrais moleculares utilizam funções do tipo gaussianas (GTFs) para os orbitais atômicos na função de onda. O 6-31G** (ou 6-31G(d,p)), que apresenta resultados razoáveis desde o elemento químico Hidrogênio (H) até o Zinco (Zn), compreende uma base de funções polarizadas com seis integrais gaussianas em coordenadas cartesianas do orbital d (exceto para o Li e o Ca que são do orbital f, e para o H e He que são do orbital p). Os expoentes dos orbitais nestas polarizações são funções otimizadas a partir de valores calculados para pequenas moléculas com propriedades muito conhecidas, como a água, por exemplo.

3.5. Dinâmica Molecular:

A dinâmica molecular (MD), nada mais é do que o estudo da evolução temporal de um dado sistema molecular. Este método trata os átomos em um meio contínuo, com as ligações químicas vibrando, ângulos de ligação variando, a molécula rodando, e ainda, a molécula como um todo pode, ou não, estar se deslocando no meio, tudo isto dependendo do problema a ser tratado (Leach, 1996).

A primeira aplicação usando dinâmica molecular consistia de um modelo de esferas rígidas com choques perfeitamente elásticos para representar as interações atômicas e foi desenvolvida por Alder e Wainwright e publicado no *Journal of Chemical Physics* em 1957. Entre os principais precursores deste método também estão Westheimer, Hendrickson, Wiberb, Allinger e Warshel.

Desde os primeiros trabalhos no estudo de MD, as equações de movimento de Newton são utilizadas para descrever um sistema de N átomos interagindo, utilizando na verdade as mesmas equações e modelos apresentados na seção 3.1., quando falamos de modelagem molecular clássica. Durante estes anos o que cresceu bastante foi o tamanho deste número N de átomos e logo também a complexidade dos sistemas estudados. Para isto diversos artifícios tiveram de ser criados ou mesmo adaptados para estes estudos. A seguir apresentamos alguns destes mecanismos utilizados em nosso trabalho:

Algoritmo de Verlet:

Desenvolvido pelo físico francês Loup Verlet em 1967, este algoritmo, 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 temos que efetuar a derivada da função potencial descrita anteriormente na seção de Mecânica Molecular. Assim, 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.

Um problema deste método é que somente funciona para funções suaves, ou seja, funções contínuas das posições atômicas. Quando há truncamento nas interações de longo alcance, o potencial sofre variação brusca no instante em que a distância entre um par de átomos em interação ultrapassa o raio de corte, então a menos que um método de suavização possa ser usado, o tratamento do problema deve ser acoplado a uma análise colisional da dinâmica do sistema (Mundin, 2002; Allen, 1987).

A integral utilizada pelo algoritmo de Verlet pode ser derivada da expansão de Taylor da trajetória $x(t)$ de uma partícula num tempo t . A expansão de Taylor em torno de um tempo t_0 nos dá:

$$x(t_0 + \Delta t) = x(t_0) + \Delta t x'(t_0) + \frac{1}{2} \Delta t^2 x''(t_0) + \frac{1}{6} \Delta t^3 x'''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

E também:

$$x(t_0 - \Delta t) = x(t_0) - \Delta t x'(t_0) + \frac{1}{2} \Delta t^2 x''(t_0) - \frac{1}{6} \Delta t^3 x'''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

Juntando então as duas equações:

$$x(t_0 + \Delta t) + x(t_0 - \Delta t) = 2x(t_0) + \Delta t^2 x''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

Então, facilmente podemos obter a velocidade:

$$v(t_0) = \frac{x(t_0 + \Delta t) - x(t_0 - \Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2)$$

O cálculo da velocidade é duas vezes menos preciso do que o cálculo das trajetórias. Entretanto, este erro não é acumulado durante o cálculo porque a evolução dos passos não necessita dos valores das velocidades, sendo que esta é calculada diretamente das trajetórias sempre que requisitada.

Algoritmo “summed Verlet” ou “leapfrog”:

Este método foi feito como uma forma de se evitar que o incremento dado a cada passo fosse muito impreciso, devido ao fato deste ser muito pequeno comparado à distância entre duas posições. Este algoritmo de meio-passo foi criado a partir de uma modificação do algoritmo básico de Verlet (Berendsen, 1984). 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 $t + \frac{\partial t}{2}$ e $t - \frac{\partial t}{2}$ podem ser definidas, desprezando-se os termos de ordem superior, como:

$$v(t_0 + \partial t / 2) = \frac{x(t_0 + \partial t) - x(t_0)}{\partial t}$$

E também como:

$$v(t_0 - \partial t / 2) = \frac{x(t_0) - x(t_0 - \partial t)}{\partial t}$$

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

$$x(t_0 + \partial t) = x(t_0) + v(t_0 + \frac{\partial t}{2})\partial t$$

Esta equação é mais precisa por não lidar com diferenças entre grandes valores, comparados às pequenas variações nas posições atômicas entre t_0 e $t_0 + \partial t$.

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 facilmente a equação:

$$\frac{3}{2} N_{at} kT = \left\langle \sum_{i=1}^{N_{at}} \frac{1}{2} m_i v_i^2(t) \right\rangle_{N_{steps}}$$

De onde podemos 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_0 . No caso de haver um desvio ΔT muito grande, na maioria das vezes da ordem de 10% de T_0 , então as novas velocidades serão corrigidas por um fator:

$$v_i(t + \frac{\partial t}{2}) = v_i(t - \frac{\partial t}{2}) \sqrt{\frac{T_0}{T}}$$

Correções nas velocidades também podem ser muito úteis no início de dinâmicas de modo aliviar tensões localizadas do sistema. Geralmente as velocidades iniciais são 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.

Dinâmica na água:

Geralmente quando falamos de dinâmica molecular clássica, estamos interessados em uma simulação de alguma molécula ou de um conjunto de

moléculas em um determinado meio. Provavelmente o meio mais estudado nestas interações seja a água, principalmente quando realizamos simulações de interesse biológico. Isto se deve não só ao fato de água ser o maior constituinte de boa parte dos seres vivos, mas também ao de água líquida apresentar características peculiares e até mesmo intrigantes relacionadas, por exemplo, à sua habilidade singular de fazer simultaneamente quatro ligações de hidrogênio, em conjunto com sua baixa massa molecular e aos pequenos momentos de inércia. A água também é encontrada em abundância ao redor de biomoléculas como proteínas e membranas, controlando sua estrutura, função e reatividade em sistemas biológicos.

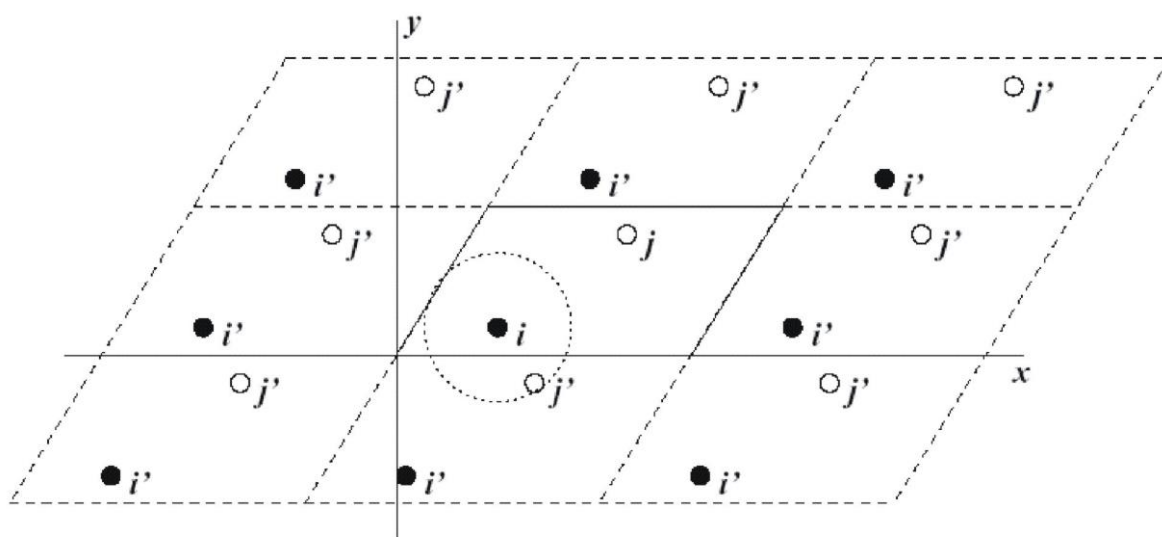


Figura 14 – Representação em duas dimensões do modelo de condição periódica de contorno utilizado nos métodos de MM.

Simulações em caixas d'água são muito comuns, porém como resolver problemas básicos, como as bordas de uma caixa? Sabemos que quando estamos tratando problemas em nível molecular, com uma pequena quantidade de moléculas (da ordem de 10^3 no nosso caso), se existisse uma parede nas bordas, haveria interação da água com esta parede, o que não nos interessa. Para resolver este problema, foi proposto então um modelo clássico que minimiza estes efeitos e consiste na aplicação de condições periódicas de contorno, ou seja, os átomos do sistema são simulados em uma caixa rodeada por cópias da própria caixa. Sendo assim é como se não houvesse limite na caixa e a mesma fosse infinita (Figura 14). A caixa é construída de modo que as moléculas de água podem entrar e sair

livremente de um lado para o outro, mas sempre mantendo uma mesma densidade no meio, ou seja, aproximadamente para cada molécula de água que sai da caixa através de uma parede, outra molécula entra pelo lado oposto, sem que as moléculas sejam quebradas, passando-as sempre inteiras. Existem muitas possibilidades para o formato destas células unitárias, como cúbicas, romboédricas ou octaedros truncados, e geralmente escolhe-se a que minimiza o número de átomos no sistema, principalmente quando temos uma macromolécula solvatada nesta caixa.

Diversas propriedades moleculares podem ser obtidas através de uma simulação em meio aquoso, como: propriedades estruturais de solvatação, ligações de hidrogênio entre soluto-solvente, a área do soluto acessível ao solvente, além do estudo da organização das moléculas de água na vizinhança do soluto.

Dinâmica em solução aquosa de Na^+Cl^- :

Se estivermos interessados em sistemas biológicos, outro fator que pode ser facilmente simulado é uma solução salina. Sabemos que em nosso corpo possuímos muita água e muito Na^+Cl^- , mais precisamente uma solução com concentração da ordem de 0,9% de sal. Então, principalmente em moléculas carregadas, o acréscimo de sal a dinâmica pode alterar seu resultado. Um meio de fazermos uma análise sobre a localização de átomos e moléculas ao redor de um determinado átomo, grupo de átomos ou mesmo moléculas é utilizando a função de distribuição radial (RDF – *Radial Distribution Function*). A RDF, também conhecida como função $g(r)$, nos dá, por exemplo, a distribuição das possíveis capas de hidratação sobre cada um dos átomos do LA quando em uma caixa d'água. Isso nos permite fazer uma análise da hidrofobicidade de cada ponto da molécula, bem como da molécula como um todo.

Dinâmica em simulação de membrana através de interfaces dielétricas:

No estudo da dinâmica da molécula em interação com membranas, primeiramente simulamos a mesma como sendo uma interface entre dois meios. De um lado, colocamos as constantes de permeabilidade e permissividade do meio exterior a membrana no nosso caso a água e do outro lado, às constantes dadas para o interior da membrana. Utilizamos então o método das cargas imagens, para

uma análise do deslocamento da molécula dentro da membrana. Isto, a primeira vista, é uma aproximação muito grosseira da membrana (Figura 15), porém os resultados obtidos são bons, e o método é fisicamente muito simples de ser explicado.

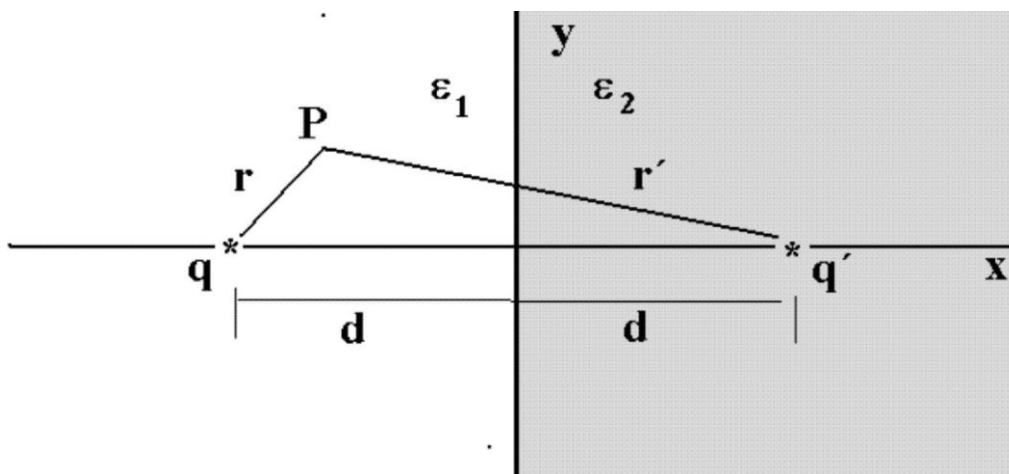


Figura 15 – Modelo da interface utilizada. Alguns fatores devem ser observados: O potencial em P (meio 1) depende de q e q' . O potencial em 2 depende só de q corrigida a descontinuidade dielétrica q' . Entre os dois meios os potenciais devem ser iguais. Deve haver continuidade da componente do deslocamento elétrico perpendicular à superfície.

Para este cálculo utilizamos o software brasileiro Thor, desenvolvido inicialmente no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), e hoje também na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e na Universidade de Brasília (UNB). Esta simulação pode ser aplicada a problemas envolvendo cargas na presença de superfícies de meios condutores ou dielétricos. Basicamente, consiste na substituição do problema real composto pelas cargas e a superfície da membrana, por um problema mais simples composto pelas cargas e suas imagens projetadas no interior do meio em questão. O campo elétrico, devido à densidade de cargas induzida na superfície de um meio condutor, ou devido à polarização da superfície de um meio dielétrico, na presença de uma carga q , é aproximado ao produzido por uma carga hipotética q' situada simetricamente em relação a posição onde estaria a superfície. Usa-se então uma abordagem semelhante à utilizada em livros de eletrodinâmica (Jackson, 1998).

Os potenciais dos dois lados da interface devem obedecer às condições de contorno do problema, como a continuidade do potencial eletrostático na interface e a continuidade do deslocamento elétrico perpendicular à mesma. Estas condições evitam a descontinuidade no potencial suavizando o potencial-degrau na interface entre os dois meios. E um fator importante que deve ser observado é que não há interação das cargas com suas próprias imagens e, portanto, não há divergência na energia potencial eletrostática entre os dois meios. (ver Figura 15)

A diferença em relação a esta figura é que em nosso caso utilizamos duas interfaces, então é como se estivéssemos “sanduichando” uma região com constantes dielétricas semelhantes às de uma bicamada lipídica. Com este aparato podemos deslocar o LA lentamente desde antes da primeira interface, passando para o meio da membrana e indo até depois da segunda interface. Em cada ponto calculamos a energia potencial da molécula e assim podemos obter a curva de potencial que o LA terá que enfrentar para permear a membrana.

Dinâmica de membrana explícita:

A simulação de membrana explícita é uma das técnicas mais apuradas para o estudo de fármacos já que a interação entre membranas e outras moléculas é de difícil simulação, devido principalmente à instabilidade de uma abordagem clássica em simulações como esta. A membrana que simulamos é uma Dipalmitoil-Fosfatidilcolina (DPPC), um dos modelos mais utilizados tanto por grupos experimentais quanto por teóricos.

Quando falamos em membranas explícitas queremos dizer que cada átomo do sistema é simulado independentemente. Desta maneira, simulações de bicamadas lipídicas já esbarram na falta de computadores que tenham capacidade de processar o número gigantesco de átomos necessários e também nas técnicas para resolver problemas quânticos de forma clássica a fim de tornarmos a simulação possível e confiável.

O modelo de membrana que estamos usando está em desenvolvimento pelo grupo do prof. Dr. Peter Tielleman da Universidade de Calgary, Canadá. Este modelo segue os procedimentos desenvolvidos na tese de doutorado de Tielleman sob orientação do prof. Dr. H. J. C. Berendsen, um dos “pais” do GROMACS. O grupo de Calgary alterou diversos parâmetros a fim de reproduzir propriedades

experimentais de membranas biológicas e assim poder organizar modelos confiáveis de simulação. Alterações nos potenciais, principalmente eletrostáticos e de van der Waals fazem-se necessário para estabilizar um sistema como este e manter condições periódicas de contorno (Tielleman, 1998), porém por mais modernos que sejam seus métodos ainda estamos um pouco longe de simular membranas explícitas com diversas proteínas e carboidratos cruzando através da mesma, como mostra a ilustração da Figura 16.

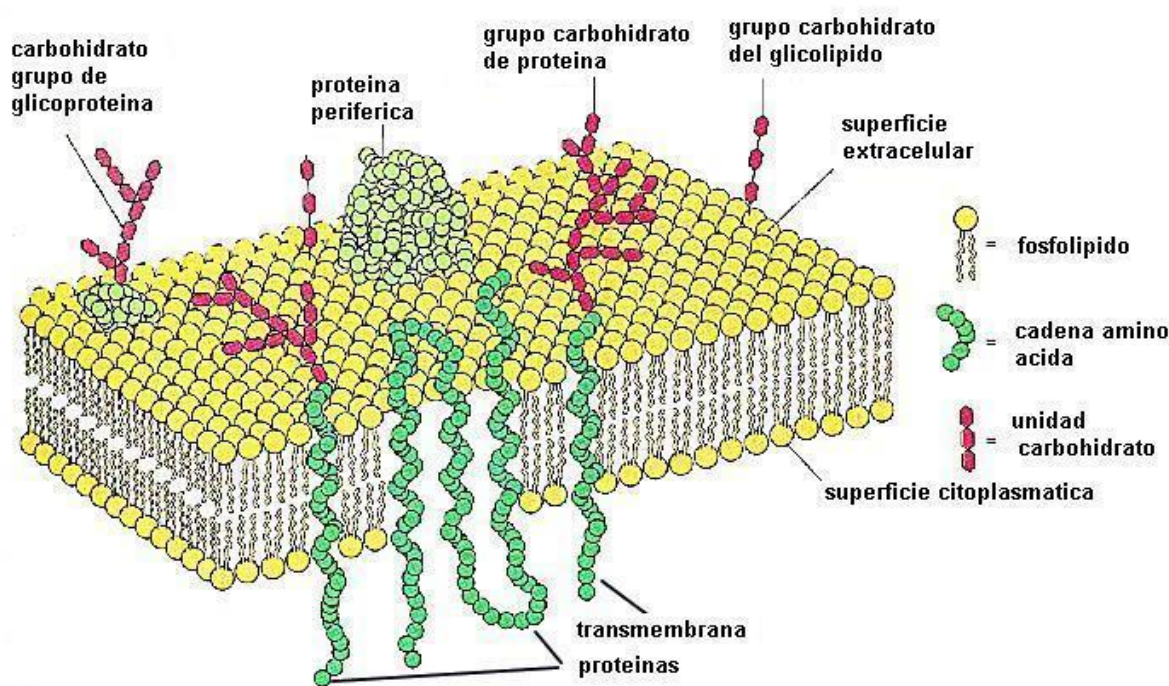


Figura 16 – Representação da membrana celular. Estão representados nesta figura os fosfolípidios, que são os principais integrantes da membrana, junto com diversas outras biomoléculas.

Membrana DPPC (baseado no trabalho de Tieleman, D. P. e Berendsen, H. J. C., 1996):

O estudo de sistemas modelo de membrana pode ser feito com detalhes atômicos através de técnicas como Monte Carlo, dinâmica molecular, dinâmicas estocásticas ou ainda por combinações destas técnicas. A dinâmica da DPPC bem como de qualquer outro sistema que se deseja simular, passa primeiramente por uma grande coleta de dados experimentais. Os estudos experimentais nos dão principalmente uma visão estrutural das cadeias fosfolípídicas e de suas propriedades de transporte de pequenas moléculas, ou seja, de sua permeabilidade

a outras moléculas, como fármacos, permitindo a entrada ou saída destas moléculas dentro da célula. Estes estudos nos levam a progressos principalmente nas parametrizações dos campos de forças.

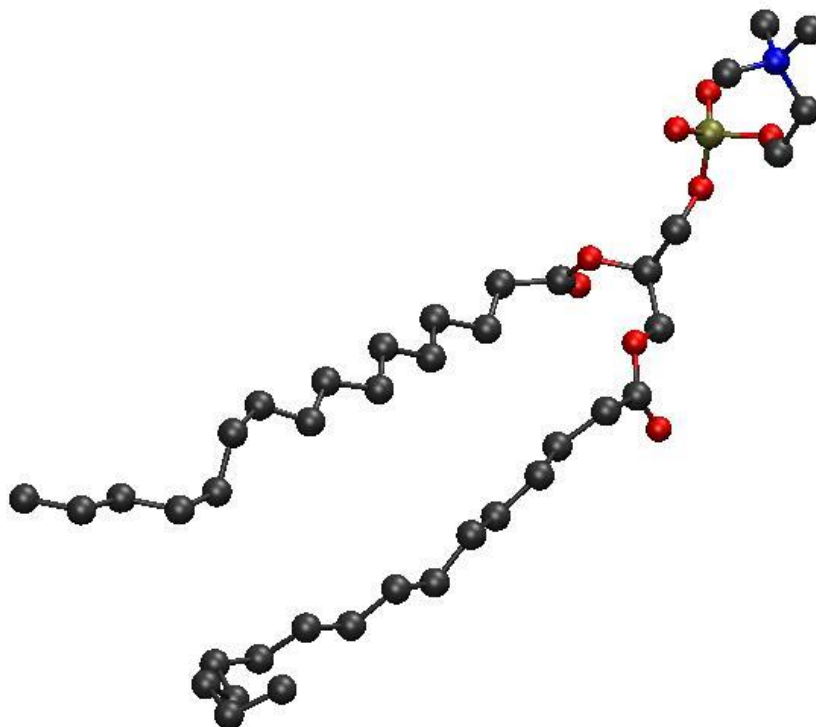


Figura 17 – Molécula de Dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) utilizada nas bicamadas lipídias.

Um trabalho importante, que ajudou bastante nos atuais métodos de simulação de membranas foi feito por Jakobsson e Scott em 1996, que revisaram algumas estratégias de simulação de lipídios. Este trabalho discutiu diferentes condições macroscópicas de bordas e propõe a simulação de bicamadas com a aplicação de uma superfície de tensão, como num ensemble $N\gamma T$. Poderia então surgir uma alternativa aos ensembles Npt e NVT que são mais comuns em simulações. Outros ensembles também foram estudados por Feller *et al*(1995) e também por Zhang *et al* (1995).

Um problema do uso de diferentes ensembles está no fato de que tipicamente são comparados dados obtidos por diferentes experimentos, realizados em diferentes condições. Afim de ajustar estes parâmetros, diferentes aproximações e parâmetros podem ser comparados fazendo-se uma série de simulações com diferentes parâmetros e condições de contorno alterando-os sistematicamente, mas

este tipo de cálculo demasiado exaustivo pode ser proibitivo em termos computacionais. No estudo da DPPC diversas simulações foram realizadas pelo grupo do professor Berendsen sendo que elas diferem uma da outra com respeito as condições macroscópicas de fronteira, modelo de água utilizado, cargas e também dos parâmetros das interações de Lennard-Jones entre carbonos e água.

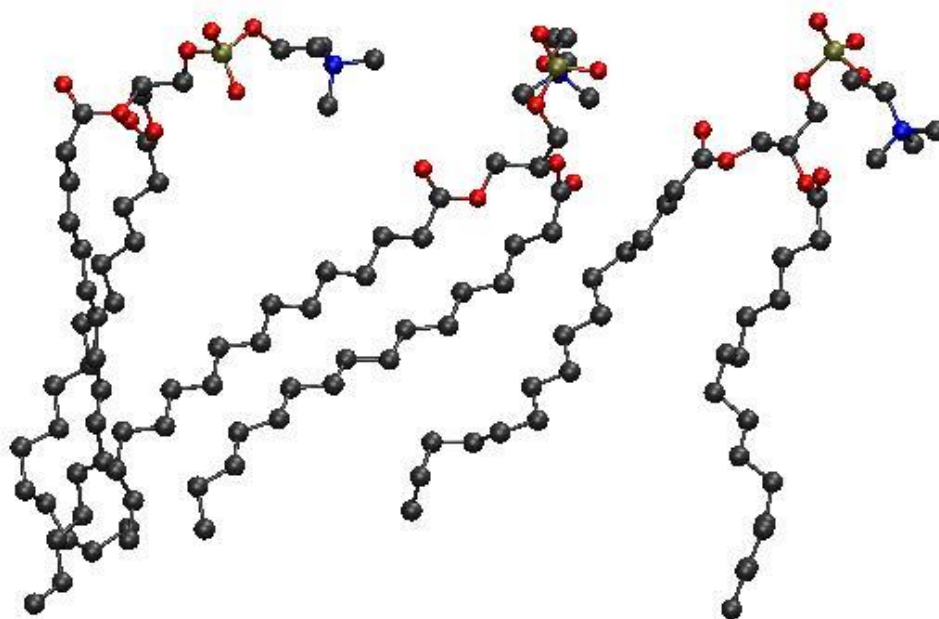


Figura 18 – Quatro moléculas de DPPC alinhadas como em uma mono-camada.

Num dos primeiros estudos da DPPC com detalhamento atômico, um sistema contendo 64 lipídios e 736 moléculas d'água foi utilizado na fase gel a uma temperatura de 335K. Para forçar o sistema a ficar nesta fase gel três ajustes fundamentais foram feitos: os parâmetros de Lennard-Jones das interações $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ e $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ foram alterados, os diedros do campo de forças GROMOS foram trocados por funções de potenciais diedrais de Ryckaert-Bellemans e as cargas das cabeças foram divididas por dois para diminuir as interações entre estes grupos. Isto poderia compensar então a perda no potencial dielétrico causado pela não polarizabilidade do modelo de água utilizado. Entretanto, como a redução das cargas não é a mais elegante, outras modificações foram propostas pelo grupo.

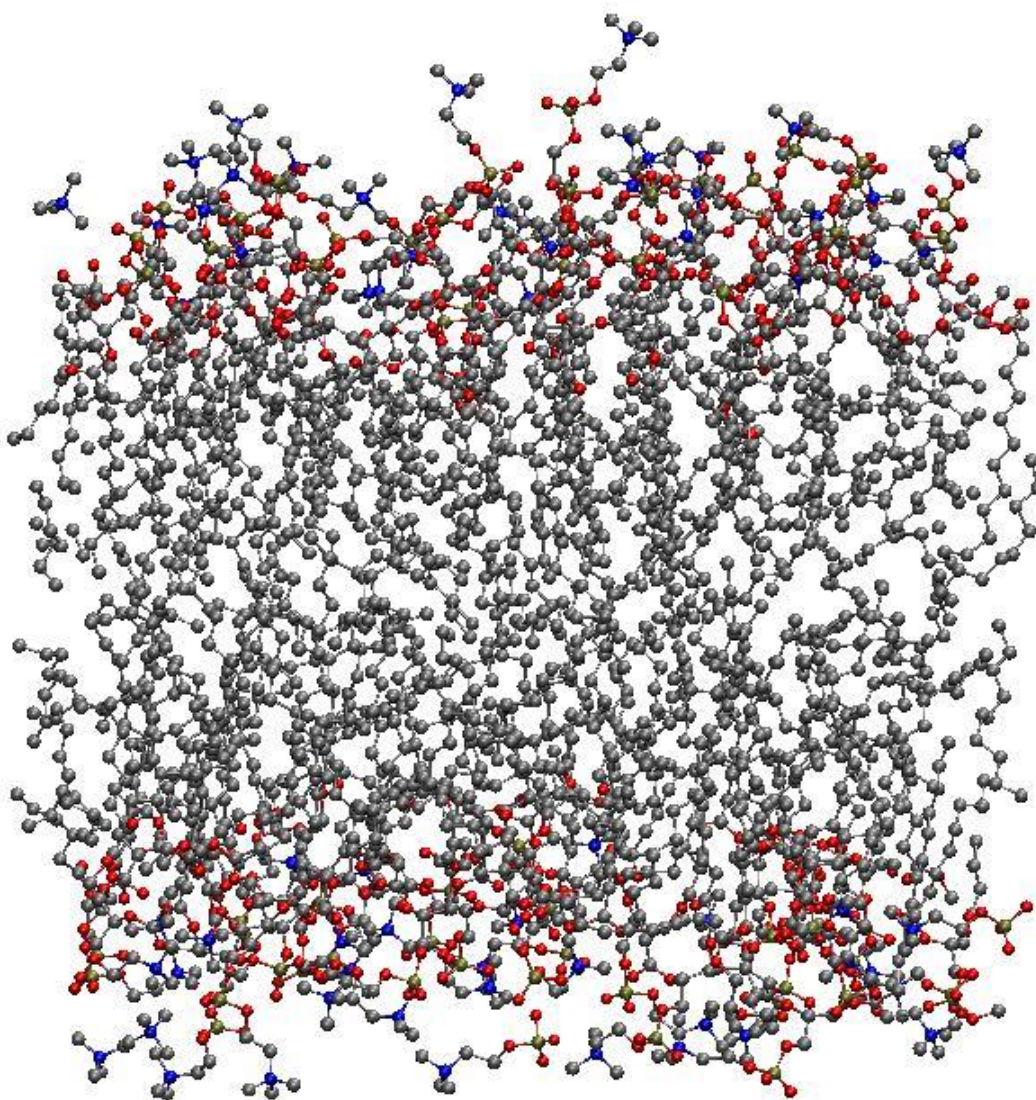


Figura 19 – Bicamada lipídica de DPPC que utilizamos em nossos cálculos. Esta bicamada contém 64 lipídios e na representação acima encontra-se sem as águas de hidratação.

Alterações no campo de forças:

1. Cargas:

Nas simulações atuais as cargas utilizadas são dos parâmetros do trabalho de Chiu (1995) com algumas correções através de cálculos *ab-initio*. Modelos com estas cargas e com o padrão de cargas do campo de forças GROMOS, já citado anteriormente, foram testados de modo a obter uma comparação dos termos para um mesmo sistema molecular.

2. Parâmetros de Lennard-Jones para interações entre água e metil ou metileno:

Nas primeiras simulações dois diferentes conjuntos de parâmetros de Lennard-Jones foram utilizados para estas interações: os parâmetros publicados por Chiu em 1995 e mais recentemente o conjunto derivado do estudo da interface decano/água feito por Van Buuren em 1993. Van Buuren e seus colaboradores examinaram cinco diferentes valores para o parâmetro ϵ nas interações Ow-CH₂ e Ow-CH₃, isto foi feito devido ao fato do valor original implementado no campo de forças GROMOS resultar na solubilidade do decano em água de maneira muito distante dos experimentos. As interações Ow-CH₂ e Ow-CH₃ são consideradas um ponto de fundamental importância na interface água membrana.

3. Modelo de água:

Diversos modelos de água foram utilizados nos testes de simulação da interface água/lipídio, sendo que os modelos que se saíram melhor foram o SPC, o SPC/E e o TIP. Apesar de cada modelo de água destes apresentar diferenças ínfimas entre si quando analisamos uma única molécula, esta diferença torna-se bastante significativa e influente quando tratamos de uma quantidade considerável de moléculas como em nosso sistema.

Focando nos modelos SPC e SPC/E, existem muitas razões para preferirmos um ao invés do outro. O modelo SPC/E foi originalmente desenvolvido devido ao fato de seu predecessor não dar corretamente as auto-energias devido à polarização (Berendsen *et al*, 1981). Este modelo nos dá uma melhor densidade, função de distribuição radial, constante de autodifusão e constante dielétrica do que a SPC (Guissani *et al*, 1993). Porém, infelizmente, um modelo com poucos parâmetros como o SPC ou o SPC/E não pode reproduzir todos os experimentos observados com valores exatos, e para se chegar as melhorias citadas o potencial termodinâmico para o SPC/E somente será correto se sua auto-energia de polarização for aplicada, ou seja, se for posta a dedo nas simulações. Também devemos lembrar que a energia livre efetiva do SPC/E é muito baixa (-27,6 kJ/mol) comparada a do modelo SPC (-24,3 kJ/mol), sendo que este último está mais próximo de valores experimentais (van Buuren, 1993 e Hermans, 1988). Isto tudo, indica que o estado líquido é termodinamicamente muito mais favorável para o SPC/E, porém como em nosso caso a água está em equilíbrio com diferentes

ambientes, a solubilidade torna-se muito importante para o bom comportamento das interfaces, então utilizamos o modelo SPC que tornou-se muito mais confiável em todos os nossos estudos.

4. O tratamento eletrostático:

As interações eletrostáticas requerem um cuidado especial. Inicialmente foram utilizadas funções de corte cilíndricas, método que foi usado devido ao fato de pegar todas as interações eletrostáticas entre pares no volume estudado. As interações eletrostáticas com o cilindro são somadas diretamente e a parte restante do sistema é tratada usando uma solução analítica da equação de Poisson. A contribuição desta parte restante torna-se insignificante e é então desconsiderada. Este método requer uma simetria cilíndrica, o que o torna indesejável para o estudo de bicamadas com outras moléculas e também muito custoso computacionalmente.

Métodos alternativos incluem métodos como a soma de Ewald ou condições estocásticas de contorno com métodos rápidos de expansões de multipólos. Este último método foi utilizado por Heller em 1993 para uma simulação contendo 200 moléculas de POPC (Palmitoil-Fosfatidilcolina). Os métodos de lattice-sum como o da soma de Ewald apresentam uma desvantagem por realçar artefatos utilizados nas condições periódicas de contorno, sendo que isto pode, ou não, ter uma grande importância nos resultados finais.

Para sistemas de lipídios com carga total neutra um critério simples de potencial de corte (*cut-off*) para as interações eletrostáticas é o métodos mais usado. Os métodos cut-offs introduzem valores indesejáveis nas soluções com íons (Smith, 1993), mas se o raio do corte é bastante grande (valores maiores que 1.8 nm), este método parece trabalhar bem com as fosfatidilcolinas.

Condições de contorno macroscópicas:

A maioria dos estudos de dinâmica molecular de lipídios e sistemas de interesse biológico usam condições de contorno a pressão constante em um ensemble NpT ou a volume constante num ensemble NVT.

O primeiro método permite que o sistema ajuste o tamanho da caixa de simulação de modo que o virial interno se ajuste a pressão externa aplicada (Berendsen, 1984). Este método tem grande vantagem pois uma única aproximação de tamanho inicial da caixa é necessária, isso pois o sistema encontrará o tamanho

correto por si só, baseando-se no campo de forças. Mais recentemente Chiu *et al.* (1995) introduziu uma tensão de superfície na simulação, com a suposição de que a tensão de superfície da membrana é duas vezes a da que corresponde à monocamada lipídica. Esta suposição é questionável já que a tensão da monocamada consiste principalmente da tensão de superfície da interface alcão/ar, mas isto faz uma pequena diferença na simulação: ao invés de acoplamento isotrópico de pressão, um acoplamento anisotrópico, com diferentes componentes de pressão no plano da bicamada e normal ao plano. Quando a interface é perpendicular ao eixo z, a tensão de superfície γ pode ser calculada de (Hill, 1986):

$$\gamma = -\int [p'(z) - p] dz$$

Onde $p'(z)$ é a pressão lateral, p é a pressão do bulk e a integral é definida nos limites da camada. A integral pode ser entendida para o infinito, $p'(z) = p$ pois no bulk. Com duas interfaces perpendiculares ao eixo z, como em nosso caso, a tensão de superfície pode ser reduzida á:

$$\gamma = -\frac{1}{2} \left(\frac{p_x + p_y}{2} - p_z \right) L_z$$

Onde $p_\alpha = P_{\alpha\alpha}$ ($\alpha = x, y, z$) e L_z é o comprimento da caixa na direção z. Estes resultados para uma pressão de -100 bar nas direções x e y em uma caixa de comprimento 5,6 nm (como a utilizada por Chiu em 1995) nos dão $\gamma = 28$ mN/m. Estes valores são a metade dos obtidos por Chiu devido ao fato de no nosso caso termos duas interfaces água/lipídio. Para uma caixa de aproximadamente 6,7nm, a mesma tensão de superfície usada por Chiu nos dá uma pressão de aproximadamente -80bar nas direções x e y, a qual é a pressão utilizada em todas as simulações no ensemble $N\gamma T$ feitas aqui.

Não houveram diferenças significativas entre os resultados das simulações nos ensembles NpT e $N\gamma T$. O tamanho do sistema é aproximadamente o mesmo com ou sem tensão de superfície, quando utilizamos os mesmos outros parâmetros. O ensemble NVT nos mostra em suas simulações muitos elementos preocupantes, apesar de todo o cuidado na escolha das dimensões da caixa. O sistema NVT apresenta um mínimo de densidade muito abaixo do centro da bicamada e uma diferente distribuição atrás da interface comparado com os ensembles NpT e $N\gamma T$.

As caldas são consideravelmente menos ordenadas do que as encontradas experimentalmente.

Com isto podemos crer que NVT não é o ensemble apropriado para o estudo de bicamadas em sistemas biológicos, pois sua fluidez torna impossível ou pelo menos mais difícil obter precisão nos resultados dos cálculos em sistemas com dimensões tão grandes. É possível porém obter bons resultados de uma simulação com pressão constante sem ter que assumir a presença de uma superfície de tensão.

Acoplamentos de pressão anisotrópica podem nos guiar a um rápido equilíbrio do sistema, mas não há razão para usar algum valor específico para esta finalidade, e pressões muito altas puderam conduzir ao resultado esperado mais rapidamente do que para valores justificáveis fisicamente.

Simulações:

Tanto as simulações do grupo do professor Berendsen quanto nossas simulações foram feitas utilizando o pacote holandês GROMACS (Berendsen, 1995). O grupo europeu realizou diversas simulações com os mais diversos parâmetros de modo a ajustar a membrana da melhor forma possível aos resultados experimentais, sendo que ao final, a maioria das propriedades dos sistemas analisados nos estudos concorda com simulações prévias e com os experimentos.

Desta maneira, embora a escolha entre diferentes parâmetros e condições de contorno analisadas pelo grupo europeu em seu estudo sempre signifique uma troca de prioridades, algumas conclusões básicas podem ser tiradas: Campo de forças: é possível usar todas as cargas em um sistema de lipídios hidratados ao invés das cargas reduzidas usadas em estudos precedentes. Modelo de água: embora nem o modelo SPC nem o SPC/E sejam perfeitos, geralmente é melhor utilizar o modelo SPC em estudos de interfaces. Condições de contorno macroscópicas: faz pouca diferença se uma tensão de superfície ou uma pressão isotrópica são usadas. As simulações a volume constante de bicamadas lipídicas geralmente nos conduzem a elementos problemáticos.

4. METODOLOGIA:

O estudo da dinâmica de fármacos é um problema que deve ser tratado de forma diferente da maioria dos demais estudos de MD. Os problemas de trabalharmos com estas moléculas partem principalmente do fato destas geralmente apresentarem algumas peculiaridades, como por exemplo grande flexibilidade estrutural ou mesmo superfícies eletrostáticas com pontos de bastante polaridade. Outro problema é que softwares de MD, como o GROMACS, são parametrizados para o estudo de moléculas naturalmente biológicas, como os aminoácidos. Ou seja, são padronizados para o estudo de moléculas existentes em organismos vivos, que não foram colocadas por interferência humana. Com este problema inicial, ao invés de nos dedicarmos à análise direta da MD, tivemos de começar a construir um meio de obter nossos parâmetros para ajustar o campo de forças as nossas necessidades. O que devíamos obter, para uma análise razoável, seriam pelo menos os valores das cargas de cada um dos átomos, além da geometria da molécula com o máximo de precisão. Isto já bastaria para a parametrização de um campo de forças do tipo GROMOS que utilizamos em nossos cálculos. O ideal seria ainda calcularmos os potenciais harmônicos de vibração da molécula, ou seja, as constantes de Hooke para a interação entre cada um dos átomos, em todos os possíveis movimentos vibracionais da molécula. Mas um cálculo preciso destes dados exigiria um tempo de cálculo proibitivo para a nossa realidade. Então, entre baixar a precisão do cálculo dos potenciais harmônicos de vibração, o que ainda levaria muito tempo, e utilizar os valores já parametrizados do GROMACS para aminoácidos, optamos pela segunda opção, já que a estrutura de alguns aminoácidos, como a fenilalanina (PHE), por exemplo, é razoavelmente semelhante a de um LA.

4.1. Cálculos Estruturais:

Obter estes parâmetros envolve uma seqüência de cálculos um tanto exaustiva. Métodos complexos como o DFT, se aplicados a moléculas com uma geometria muito distante da ideal, tendem a ser bastante problemáticos, já que o tempo computacional nestes casos pode ser infinitamente longo. O que se faz então

é tentar obter parâmetros mais adequados para usar como início nos cálculos DFT. Para os LA, partimos da suas fórmulas químicas e utilizando um software que nos permitia a construção de uma estrutura tridimensional, obtivemos uma primeira aproximação de como seria a geometria de cada um destes fármacos (Figura 20). O mesmo software já faz minimização do potencial das moléculas através de diversos métodos. Então, utilizando o método clássico MM fizemos uma primeira minimização para a geometria dos LA.

O Ghemical, utilizado para esta primeira parte dos cálculos, nos fornece um arquivo de saída com aproximações para a geometria dos fármacos em coordenadas cartesianas e a partir destas podemos construir inputs para softwares que realizam operações mais complexas. A partir destes dados, calculamos novamente a geometria dos LA utilizando para isto o pacote Gaussian 2003, que consiste em uma das mais poderosas ferramentas de cálculo conhecida. Este software, além de apresentar bastante credibilidade em seus resultados, é de fácil operação e apresenta saídas de dados bastante detalhadas e por isso foi por nós escolhido como a melhor opção para o problema que estávamos tratando.

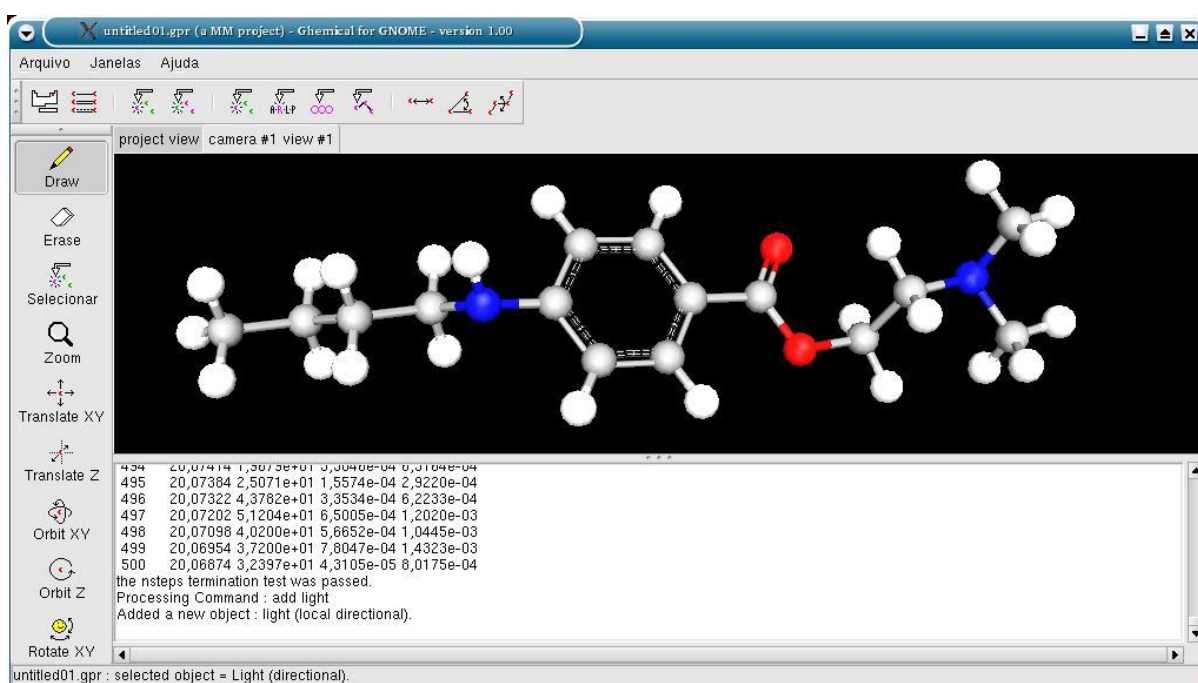


Figura 20 – Captura da tela do software Ghemical, utilizado para construir o input dos anestésicos locais e também para realizar os cálculos utilizando a teoria de modelagem molecular clássica. Na imagem vemos a tetracaína em sua forma neutra.

Com o Gaussian 2003, primeiramente fizemos um cálculo semi-empírico PM3, no qual somente as coordenadas nos interessavam, pois novamente esta era um cálculo que tinha por objetivo agilizar o cálculo mais complexo que é o utilizando a teoria do funcional da densidade. O método PM3 é bastante rápido, e num computador comum pode minimizar a energia de um LA em pouco menos de um minuto de processamento.

Estes dois primeiros cálculos eram apenas uma maneira mais brusca de tentarmos minimizar o sistema, mas para calcularmos as cargas precisamos de um método que possa compreender a estrutura eletrônica da molécula de forma confiável. Então construindo novamente um input para o Gaussian 2003, desta vez não mais em coordenadas cartesianas, mas sim na forma de uma matriz-Z (também conhecido como coordenadas internas) e agora com a geometria de saída do cálculo PM3, utilizamos o software para minimizar o sistema com o método B3LYP e com a base gaussiana 6-31G**.

Este método é considerado um dos mais potentes cálculos aplicáveis a moléculas deste tamanho e desta natureza, podendo nos fornecer boa parte das propriedades físico-químicas que se queira saber. O método de cálculo para as cargas que utilizamos foi o chelpG, isto devido apenas a sua grande aceitação pela comunidade científica. Este método utiliza as propriedades de estrutura eletrônica calculados com a teoria do funcional da densidade para obter uma aproximação para a carga parcial de cada átomo da molécula.

4.2. Cálculos de Dinâmica Molecular:

Após uma pequena análise dos dados estruturais para observar se não havia grandes discrepâncias em relação aos valores que esperávamos, passamos a construir a parte mais elaborada do nosso trabalho que era adequar os campos de forças aos nossos interesses. Da ordem de 10 alterações foram necessárias para cada um dos LA de modo a adequar o GROMACS ao nosso problema. Estas alterações foram feitas em distâncias de ligações e também em valores dos ângulos entre ligações e diedros. O campo de forças que utilizamos foi o GROMOS com seu pacote de parâmetros mais atual, o 43a1. Também foi necessário alterar as cargas

para cada átomo ao invés de utilizar os valores padrões, já inclusos no pacote computacional, para estes mesmos átomos.

Além do arquivo do campo de forças, devemos construir um arquivo de topologia da molécula, onde descrevemos onde está cada átomo, a quem está ligado e com quais parâmetros do campo de força estes estão correlacionados. Nestes arquivos para cálculos de MD, as estruturas dos LA foram passadas para uma forma reduzida, onde os grupos CH_n foram agrupados ao centro de massa do carbono, com massa e carga igual a soma das massas e cargas dos n hidrogênios mais a do carbono. Desta maneira, reduzimos bastante o número de graus de liberdade do nosso sistema, sem que com isso percamos precisão em nosso cálculo. Este método de agrupar os hidrôgenios já foi discutido na parte de métodos computacionais e é uma das grandes vantagens do pacote GROMACS.

Após os ajustes iniciais no campo forças, as estruturas foram minimizadas novamente, porém agora no próprio GROMACS, a fim de que pudéssemos relaxar possíveis tensões que se originaram devido as grandes diferenças no modo como tratamos a molécula com o cálculo quântico DFT e o clássico de MD. Minimizada a estrutura comparamos as mesmas com as saídas dos cálculos DFT e vimos se não existiam pontos com diferenças muito gritantes, de modo que mais alterações precisassem ser feitas nos campos de forças para ajustá-lo aos resultados quânticos. Posteriormente as correções necessárias e aos repetidos testes de minimização, fizemos dinâmicas no vácuo destes LA para também testar como se comportavam e ver se a estrutura média durante a dinâmica não saia muito do valor anterior. Estas dinâmicas eram feitas por longos períodos (da ordem de 10^{-8} s), pois como o número de átomos era bastante pequeno para uma MD, estas podiam ser realizadas em poucos minutos.

Em seguida a todos os ajustes necessários no campos de forças devido a pequenas tensões superficiais em alguns dos LA, construímos uma caixa de simulação, na qual colocamos moléculas de água, utilizando o modelo SCP-216. As moléculas foram tratadas num ensemble NPT em um banho térmico a 300K com pressão igual a 1 bar. Os termos de interações de van der Waals e eletrostáticas foram limitados por um algoritmo de cut-off a uma distância de 1nm. Estas moléculas foram acomodadas em uma caixa cúbica com 1.5 nm a mais, para cada lado, no eixo da maior dimensão de cada um dos anestésicos LA. Desta maneira podemos

ter certeza, que devido as condições periódicas de contorno, uma molécula não sofrerá influência eletrostática dela mesma, já que o raio de corte para o potencial coulumbiano foi de 1.0 nm. Assim esta caixa parece ser para o LA como um meio infinito e desta maneira podemos obter resultados mais confiáveis.

Inicialmente fizemos uma dinâmica de 500 picosegundos apenas para deixar o sistema se acomodar, desprezando os valores obtidos nesta parte do cálculo para as análises posteriores. Quando deixamos o sistema livre para interagir por um tempo de cinco nanosegundos, ou seja, quando fizemos o GROMACS calcular a dinâmica das moléculas neste intervalo de tempo, vimos que os LA, nesta caixa d'água, interagem com as moléculas de água da maneira que já era por nós esperada. A sua geometria média na dinâmica se manteve aproximadamente estável, não diferindo significativamente do modelo montado na entrada com a topologia. Como os mesmos se comportaram sem perder suas características básicas, estes cinco nanosegundos de dinâmica foram utilizados nas análises do comportamento destes anestésicos em água.

A relação entre o solvente e os LA foram analisadas por diversos métodos, mas o que mais foi usado e tomado como principal foi a Função de Distribuição Radial (RDF). A RDF, também conhecida como função $g(r)$, pode nos mostrar a afinidade do soluto, no caso o anestésico local, com o solvente. A RDF é normalizada para densidade da água como sendo igual a um, então, podemos analisar a organização das moléculas de água ao redor de um átomo, grupo de átomos ou até mesmo em relação a toda molécula.

Quando a RDF apresenta picos com máximos menores do que $g(r)=1,0$ devemos estar observando uma porção hidrofóbica da molécula, pois as águas tendem a estar longe deste ponto. Quando estes picos máximos são maiores do que $g(r)=1,0$ e estão a um raio da ordem do comprimento de uma ligação de hidrogênio devemos ter aí uma capa de hidratação, ou seja, moléculas de água organizadas de uma maneira na qual sua densidade local seja maior do que sua densidade média. O potencial efetivo na relação entre soluto e solvente com a $g(r)$ é dada pela equação:

$$V_{\text{ef}} = - kT \ln g(r)$$

Então, nota-se que quando $g(r) < 1.0$ o potencial será repulsivo, ao passo que quando $g(r) > 1$ o mesmo será atrativo, logo com a RDF podemos visualizar as propriedades de solvatação do LA.

Após todas as análises, construímos uma nova caixa d'água, mas agora com uma solução NaCl, a fim de estudarmos o comportamento dos anestésicos em um meio mais parecido com o meio fisiológico. Para isto estudamos diferentes concentrações de NaCl, que haviam sido dispostos aleatoriamente dentro da caixa, mas demos ênfase em comparar uma solução de 0,9% de NaCl com uma com apenas água. Esta solução salina apresenta a mesma porcentagem média de sal em nosso corpo. Estas simulações foram feitas por um tempo de 5 ns nas mesmas condições que a simulação com água pura.

Dois tipos de análise principal foram feitas inicialmente, a primeira era uma análise da função $g(r)$ dos pontos de maior interesse dos LA em relação a água, para vermos se houve grandes alterações devido a presença dos íons, a segunda análise constava de estudarmos a posição em cada passo da dinâmica dos íons Cl^- em relação ao terminal amina das moléculas protonadas. Assim poderíamos ver se estes se mantinham próximos ao terminal, e desta maneira achar uma distância para que pudéssemos fazer um cálculo mais complexo para estudar a possível formação de anestésicos hidroclorados.

Estudar a formação de moléculas hidrocloradas envolve voltarmos ao software Gaussian 2003 e agora simular os LA carregados próximos a um átomo de Cl^- posicionado próximo ao hidrogênio responsável pela protonação do fármaco, usando a distância estimada nos cálculos de MD. Para realizarmos estes cálculos apenas adicionamos o novo íon a saída do Gaussian no cálculo B3LYP. Agora, mais uma vez utilizando este método DFT, fizemos uma simulação para a obtenção da posição em que este Cl^- iria se acomodar, da nova geometria do anestésico e de sua nova estrutura eletrônica.

Devido a falta de recursos computacionais e com um objetivo um pouco diferente do apresentado até agora que era mais de uma comparação entre diferentes anestésicos para compreendê-los melhor, realizamos nossos cálculos com membranas apenas com a TTC (o motivo da escolha deste fármaco ficará mais evidente no próximo capítulo, onde os dados dos cálculos anteriores serão

apresentados e analisados). Simular membranas é algo bastante complexo e nos fez voltar ao problema de parametrizar os campos de forças.

Inicialmente realizamos cálculos com descontinuidades dielétricas que simulavam membranas. Estes cálculos foram realizados com o software THOR, desenvolvido no Brasil, numa parceria entre diversas instituições. Este modelo, nos permitiu calcular uma curva de energia potencial do anestésico desde antes da membrana, passando por ela, até depois. Ou seja, era como se o anestésico estivesse penetrando a membrana e saindo pelo outro lado da mesma. Com este modelo, fizemos cálculos da TTC em sua forma neutra e protonada, a fim de verificarmos diferenças no seu comportamento.

Em seguida, realizamos cálculos com membranas explícitas, sendo que a membrana que utilizamos foi uma DPPC, desenvolvida pelo do grupo do professor Tielleman, como já discutimos no capítulo anterior. Como a DPPC que usamos era parametrizada para uma versão mais antiga do GROMOS, tivemos que organizar novamente os parâmetros dos LA para este campo de forças. Então, após todos os mesmos testes realizamos também com o outro campo de forças, como havíamos mostrado anteriormente

Trabalhar com membranas explícitas é algo ainda mais complicado, pois primeiramente precisamos manter equilibrado o sistema água membrana. Como desenvolver uma membrana não é nada trivial e existem modelos disponíveis para uso, optamos por um bastante conhecido, desenvolvido inicialmente como trabalho de doutorado do hoje professor em Calgary no Canadá, o Dr. Peter Tielleman. Este modelo passou por diversas evoluções e é um dos mais confiáveis atualmente. Optamos por utilizar a dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), por ser um dos mais usuais modelos de membrana, pelos mais diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Então, com a membrana já pronta, equilibramos a mesma na água, nas condições que desejávamos estudar, e readequamos os campos de forças da TTC para o novo sistema. Esta readequação foi necessária pois o modelo da DPPC foi desenvolvida com um GROMOS em uma versão mais antiga da que estávamos utilizando, logo todo o trabalho de estabilização do sistema no vácuo e na água teve que ser refeito.

Passada esta parte inicial de testes, inserimos a TTC no sistema de água mais membrana. O fármaco foi colocado na água, onde uma cavidade foi aberta para o mesmo. Para relaxarmos as estruturas, iniciamos os cálculos com uma

dinâmica de 2 ns, que foi desprezada para as demais análises. Em seguida, iniciamos uma dinâmica de 20 ns, a uma temperatura de 300K. Nesta dinâmica podemos analisar a diferença do comportamento do LA em sua forma protonada ou neutra.

5. RESULTADOS, DISCUSSÕES E ANÁLISES:

As mais diversas análises podem ser realizadas a partir dos métodos que utilizamos, mas como tínhamos por objetivo estudar principalmente qual deveria ser o comportamento de um LA próximo a uma interface água-membrana, seguimos nossas análises tendendo para este lado, ou seja, analisando as propriedades que nos pareciam mais importantes na passagem do LA pela interface.

5.1. Cálculos de Modelagem Molecular:

Como já explicado, de modo a agilizar o cálculo, o primeiro método utilizado foi o de mecânica molecular clássica (MM). Este método bastante rústico compreende somente uma fase intermediária de nossas soluções e não apresenta nenhum resultado que analisaremos. Já com o software Gaussian 2003, utilizamos um segundo método o semi-empírico PM3, este método reduz rapidamente o sistema pra um mínimo de energia potencial muito próximo ao valor encontrado pelos métodos DFT, porém não nos fornece bons valores para cargas atômicas. Apenas como caráter ilustratório segue a figura 21 que nos mostra a estrutura geométrica tridimensional da tetracaína em sua forma neutra.

Os resultados da geometria da molécula (figura 21), calculada com o método PM3, surpreendem pela velocidade e precisão apresentadas, porém estes métodos geralmente podem nos induzir a erros, pois apresentam bons resultados para certas moléculas e muitas vezes resultados bastante insatisfatório para outras. Logo, devemos sempre ter muito cuidado com o que consideramos uma boa aproximação da realidade, o que só vai ser melhor visto ao estudarmos propriedades físico-químicas destes fármacos. Como a maior virtude deste método está na rápida minimização da estrutura geométrica, tomamos por bem utilizar algumas

ferramentas que ajudam-nos a ver como a minimização da energia potencial está ocorrendo. Utilizando então o software Molden, construímos um gráfico que mostra a minimização da energia com cada passo dado no cálculo PM3 (figura 22) e é fácil notar como a geometria converge muito rapidamente com este método. Porém na análise das cargas, vemos que este método deixa muito a desejar, mantendo a nuvem eletrônica praticamente sem os deslocamentos previstos por análises experimentais.

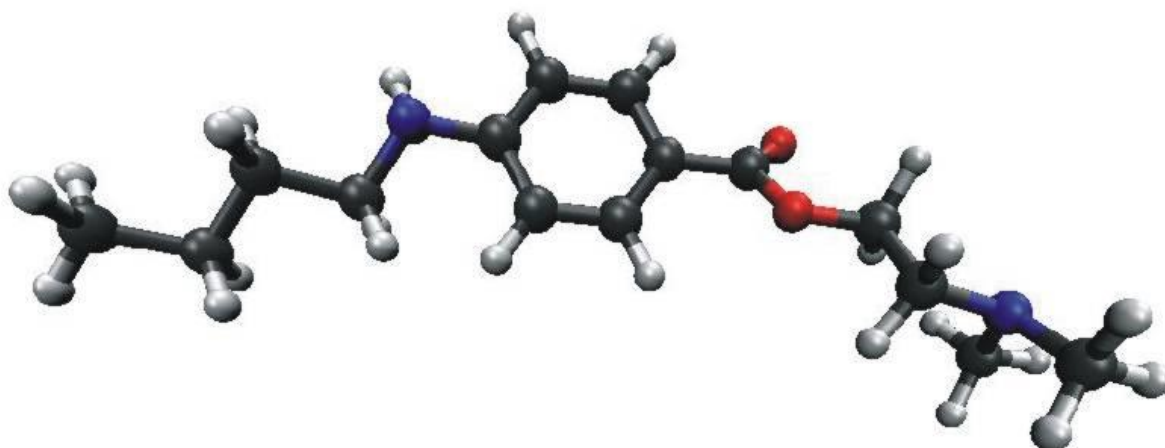


Figura 21 – Tetracaína neutra calculada com o método semi-empírico PM3. As cores seguem o padrão CPK. A cor cinza escura representa átomos de Carbono, a branca indica os Hidrogênios, azul os Nitrogênios e vermelha os átomos de Oxigênio.

Então, ainda utilizando o Gaussian, fizemos um cálculo quântico ab-initio, de muito poder para o cálculo das cargas e geometria, além de praticamente qualquer outra propriedade físico-química que se queira calcular para pequenas moléculas orgânicas como as nossas. O funcional B3LYP e a base 6-31G** foram então utilizadas a partir da geometria de saída do cálculo PM3. Na figura 23, pode ser observada a convergência da energia em relação aos passos dados no cálculo B3LYP para a tetracaína neutra. Podemos notar que o B3LYP convergiu de forma direta para o mínimo, isto ocorre principalmente devido as outras duas minimizações que havíamos feito, que levaram o sistema a um mínimo de energia, porém sem conseguir chegar mais ao fundo do poço de potencial por serem rústicos demais e não tratar com mais detalhamento as superfícies eletrostáticas.



Figura 22 – Gráfico da minimização da energia no cálculo da tetracaína, com o método semi-empírico PM3.

Analisando os valores das cargas calculados no cálculo DFT com o método chelpG, vemos que ocorreram apenas pequenas mudanças quando há protonação das LA. A única alteração relevante ocorre na variação da carga do nitrogênio do terminal amina (átomo: 17 na LDC, 19 na PRC e 18 na TTC) que é alterado de aproximadamente $-0.5e$ na forma neutra para um valor levemente positivo na molécula protonada. Uma pequena variação na carga também pode ser notada nos carbonos que são primeiros vizinhos do nitrogênio da amina. Uma análise importante a ser feita é quanto aos deslocamentos das cargas atômicas. Como vimos no segundo capítulo, o Oxigênio da carbonila deve adquirir carga parcial negativa e dar origem a uma carga parcial positiva no carbono da carbonila. Para melhor visualizarmos isto, construímos uma geometria reduzida da molécula, ou seja, agrupamos os átomos de Hidrogênio dos hidrocarbonetos aos seus respectivos Carbonos, colocando carga e massa igual à soma das cargas e massas de ambos os átomos, localizados na posição do átomo de Carbono. Fazendo isso obtivemos a configuração mostrada na figura 1 do primeiro capítulo. Na tabela 1 podemos notar que a configuração de carga esperada realmente ocorre, já que nos três LA estudados houve polarização na carbonila. Outro grande deslocamento de cargas que vemos está no nitrogênio do centro lipofílico, que tem uma grande carga negativa em todos os LA, tanto carregados como neutros. O deslocamento de cargas através do anel aromático da PRC e da TTC é observado neste caso, a forte polarização na carbonila provavelmente expulsa elétrons para o nitrogênio do outro

lado do anel aromático. Na lidocaína a carga parcial obtida pelo nitrogênio já não é tão expressiva.

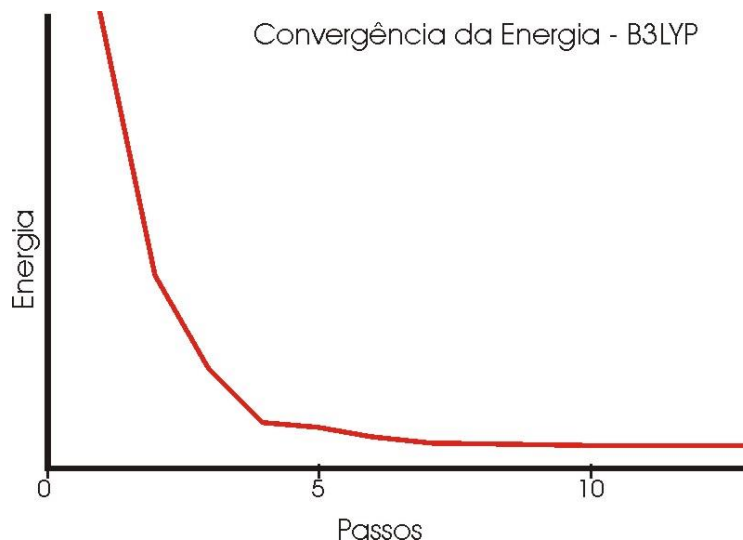


Figura 23 – Gráfico da minimização da energia no cálculo da tetracaína em sua forma neutra, com o método funcional densidade B3LYP.

A análise da geometria nos leva primeiramente a um estudo de um princípio básico, o anel aromático junto com seus Hidrogênios e primeiros vizinhos deve ser plano, e isto pode ser verificado em todos os LA calculados, como mostra a figura 24 para a TTC. Outra análise importante é quanto ao diedro do tipo piramidal formado no nitrogênio do centro hidrofílico, este diedro deve ter um ângulo de aproximadamente 35° , seguindo o padrão adotado para este tipo de estrutura, sendo que o valor obtido no cálculo da estrutura da TTC protonada, por exemplo, foi de 33.193° (figura 25). Esta propriedade, de ângulos diedrais, é uma das poucas diferenças notáveis na geometria entre o método semi-empírico e o DFT. No semi-empírico, a planaridade dos anéis força a estrutura tridimensional do nitrogênio de maneira bastante irregular, e também na amina onde há grande diferença em relação ao DFT.

Uma comparação entre as geometrias das formas protonada e neutra dos LA nos leva a perceber que existem pequenas diferenças em sua estrutura, mesmo em átomos mais distantes do hidrogênio adicionado à molécula. Estas diferenças vão desde a distância das ligações, até o caso mais evidente em que há planaridade forma protonada no entorno do nitrogênio do centro lipofílico (N12), porém na forma

neutra a estrutura é piramidal um pequeno ângulo diedral, como pode ser notado na figura 25 onde há a sobreposição das duas formas da molécula.

Tabela 1 – Cargas parciais de cada átomo de LA na forma reduzida.

Lidocaína			Procaína			Tetracaína		
Átomo	Neutro	Carregado	Átomo	Neutro	Carregado	Átomo	Neutro	Carregado
C01	-0.05369	-0.01633	C01	0.61308	0.62726	C01	0.70798	0.65843
H02	0.09310	0.10836	C02	-0.12325	-0.18465	C02	-0.20597	-0.20534
C03	-0.19779	-0.20442	C03	-0.03140	0.01172	C03	0.02076	0.01830
H04	0.11432	0.13431	H04	0.08729	0.10250	H04	0.08706	0.09935
C05	-0.24713	-0.22260	C05	-0.02817	-0.00240	C05	0.01118	-0.02105
H06	0.12660	0.13561	H06	0.08954	0.10098	H06	0.07277	0.08243
C07	0.09496	0.10246	C07	-0.26354	-0.32003	C07	-0.32759	-0.31150
C08	0.01305	0.03003	H08	0.13121	0.14862	H08	0.13001	0.14134
C09	0.11980	0.14153	C09	-0.27351	-0.31234	C09	-0.27783	-0.25057
C10	-0.00671	-0.00295	H10	0.13052	0.14785	H10	0.11608	0.11994
C11	0.08880	0.03614	C11	0.41852	0.60134	C11	0.46540	0.45804
N12	-0.52452	-0.44375	N12	-0.80944	-0.96888	N12	-0.68330	-0.62812
C13	0.27920	0.32197	H13	0.34805	0.43570	H13	0.32500	0.32542
C14	0.63810	0.61246	H14	0.34948	0.43487	O14	-0.53851	-0.52671
O15	-0.49268	-0.49500	O15	-0.48758	-0.54590	O15	-0.47951	-0.42920
C16	0.07473	-0.04148	O16	-0.43826	-0.38714	C16	0.30522	0.31663
N17	-0.55193	0.11573	C17	0.27982	0.31092	C17	0.20775	0.13781
C18	0.31021	0.21290	C18	0.19912	0.07557	N18	-0.46019	0.03401
C19	0.24307	0.33390	N19	-0.58265	0.01993	C19	0.12843	0.19885
C20	-0.07431	-0.00114	C20	0.26993	0.14408	C20	0.12843	0.20681
C21	-0.04718	0.02100	C21	0.25549	0.18299	C21	0.25615	0.25163
H22		0.12127	C22	-0.05620	0.04460	C22	-0.01882	0.00228
			C23	-0.07805	0.03387	C23	0.06705	0.05802
			H24		0.29854	C24	-0.03748	-0.01955
						H25		0.28275

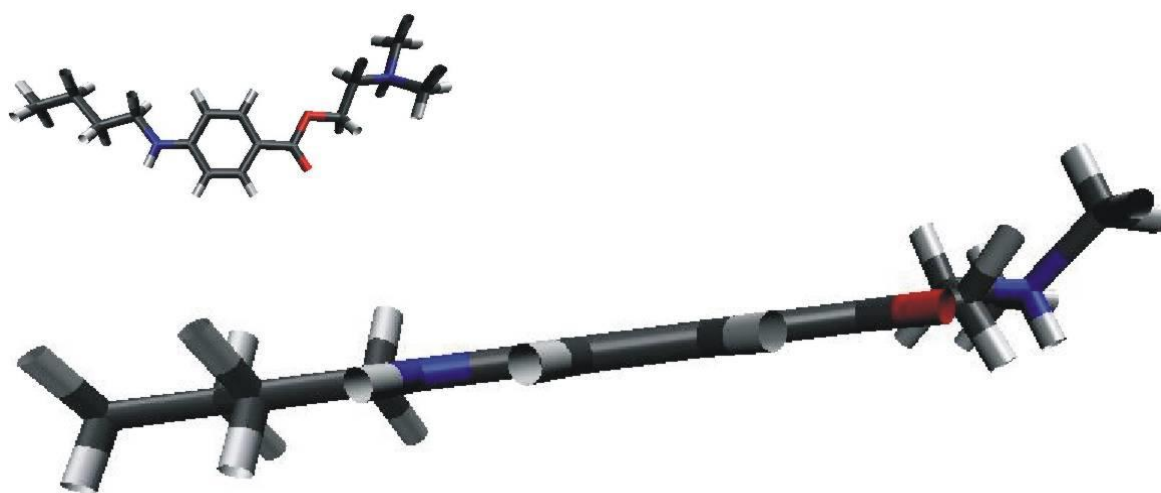


Figura 24 – Observação da planaridade da região do anel benzênico da tetracaína. Note que todos os átomos da região central da figura formam um plano.

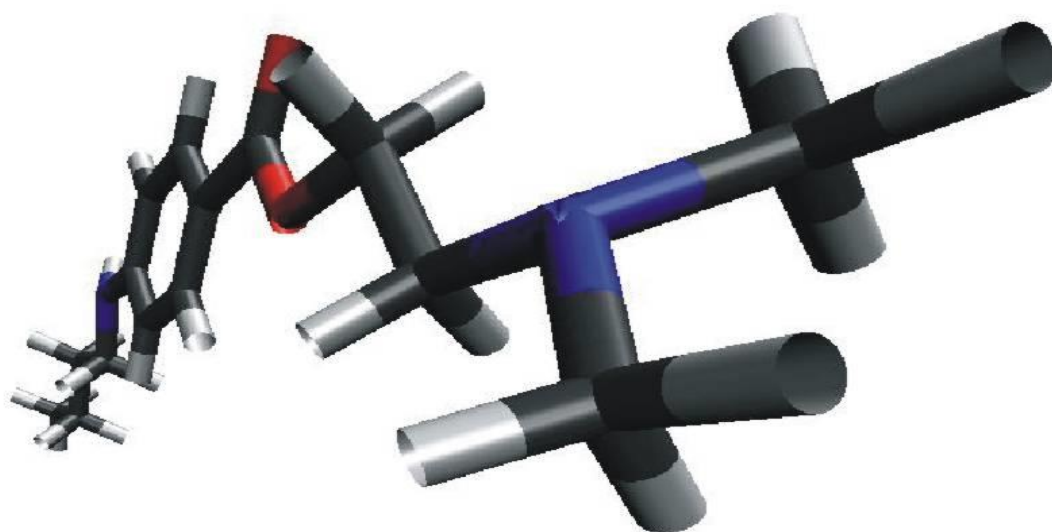


Figura 25 – Observação da forma piramidal no centro hidrofílico da tetracaína neutra.

Algumas distâncias de ligações químicas também diferem de uma molécula para a outra, principalmente na região do hidrogênio que ioniza os LA. As ligações entre os Carbonos e o Nitrogênio da amina são “esticadas” na molécula protonada em relação à molécula neutra. Todas estas transformações da geometria são devido às transferências de cargas, que ocorrem quando protonamos a molécula. O deslocamento das cargas provoca algumas ressonâncias nas ligações atômicas, provocando um distúrbio em sua configuração geométrica natural.

4.2. Cálculos de Dinâmica Molecular:

Iniciando os cálculos de MD construímos a topologia dos LA, que consiste na construção de um arquivo onde escrevemos a equação da energia potencial para a molécula. Ou seja, escrevemos todas as ligações diretas entre átomos vizinhos, todos os ângulos entre três átomos, a carga de cada átomo, os possíveis diedros próprios e impróprios, colocando para cada um sua devida constante. Num campo de forças do tipo GROMOS (implementado no GROMACS por nós utilizado), não é necessário escrever os potenciais de Coulomb e van der Waals, pois estes são automaticamente criados pelo software, no primeiro estágio do cálculo.

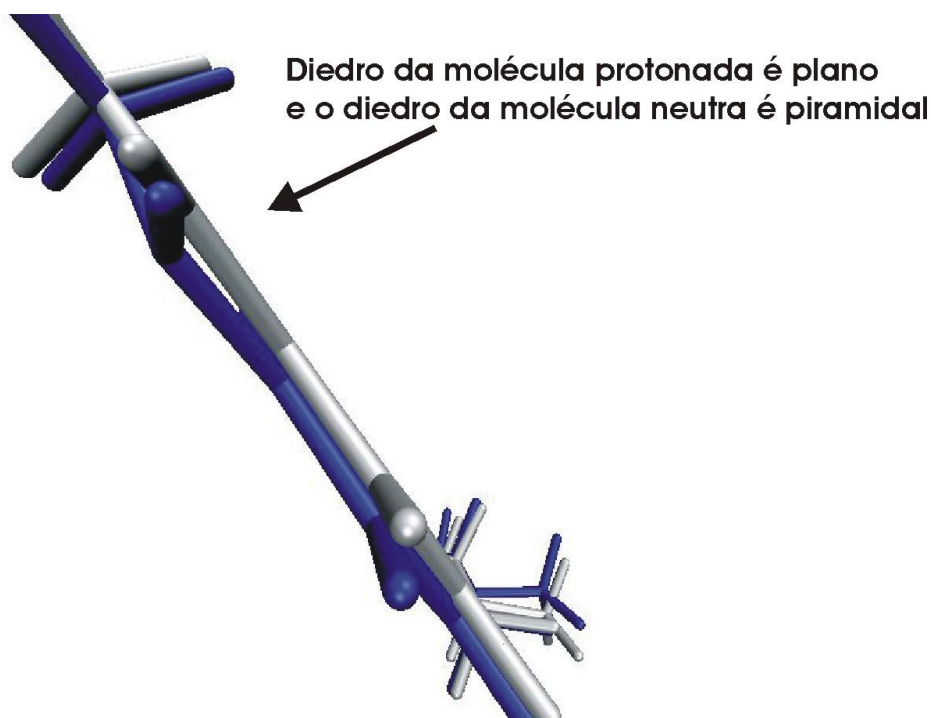


Figura 26 – Em azul a forma neutra da tetracaína, e em cinza a forma protonada, note que quando a molécula é protonada, o ângulo diedral sobre o Nitrogênio 15, passa a ter uma estrutura piramidal, e não mais planar como na forma neutra.

Dinâmica em água pura:

Com a topologia escrita e devidamente testada, criamos uma caixa d'água cúbica, em condições periódicas de contorno, com um modelo padrão já existente nas bibliotecas do GROMACS. No centro da caixa foi fixada uma molécula de LA, cercada de moléculas de água que seguiam o modelo SCP-216. Deste modo fazemos com que a caixa de simulação se pareça com um sistema real onde os LA também estariam soltas para circular livremente (figura 26). Realizando então uma dinâmica curta de teste reparamos que a sua geometria média na dinâmica se manteve aproximadamente estável, não diferindo significativamente do modelo montado na entrada com a topologia.

Realizando então a dinâmica na água por um tempo de 5 ns, obtivemos dados para uma análise da função de distribuição radial (RDF) dos LA em relação a água. Inicialmente construímos as RDF para cada um dos átomos da molécula de LA em relação a água, porém vimos que apenas algumas das regiões dos anestésicos eram para nós de real interesse. Para definirmos o que era ou não de

nosso interesse, tomamos por base principalmente se haviam diferenças entre a forma protonada e neutra das moléculas em uma determinada região.

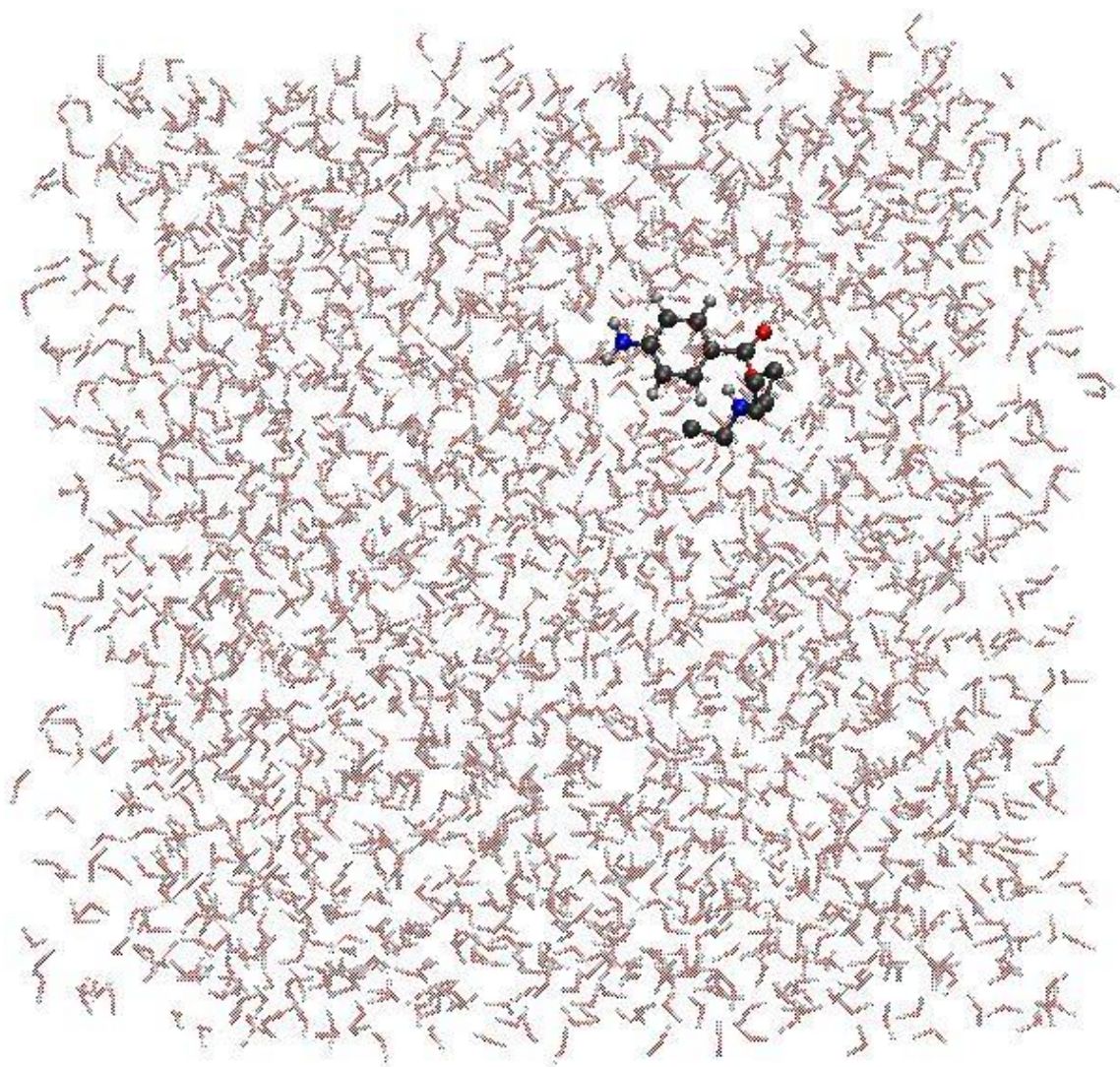


Figura 26 – Representação ilustrativa da caixa d'água com a PRC protonada em seu interior, feita através do software VMD.

Ao analisarmos a $g(r)$ para o hidrogênio que protona a amina, vemos que é nítida a presença de capas de hidratação ao seu redor (figura 27). Nota-se que os anestésicos do grupo amino-éster (PRC e TTC) apresentam uma função de distribuição similar com um primeiro pico a uma distância de aproximadamente 0.19 nm, sugerindo então a formação de pontes de hidrogênio entre este hidrogênio e oxigênios das moléculas de água, demonstrando um forte caráter hidrofílico a este hidrogênio. Na TTC também notamos que a segunda e a terceira camada de

hidratação estão localizadas um pouco mais próximas do que nos demais LA o que pode representar uma região mais atrativa, provavelmente porque a TTC é uma dimetilamina enquanto os demais LA estudados são dietilaminas.

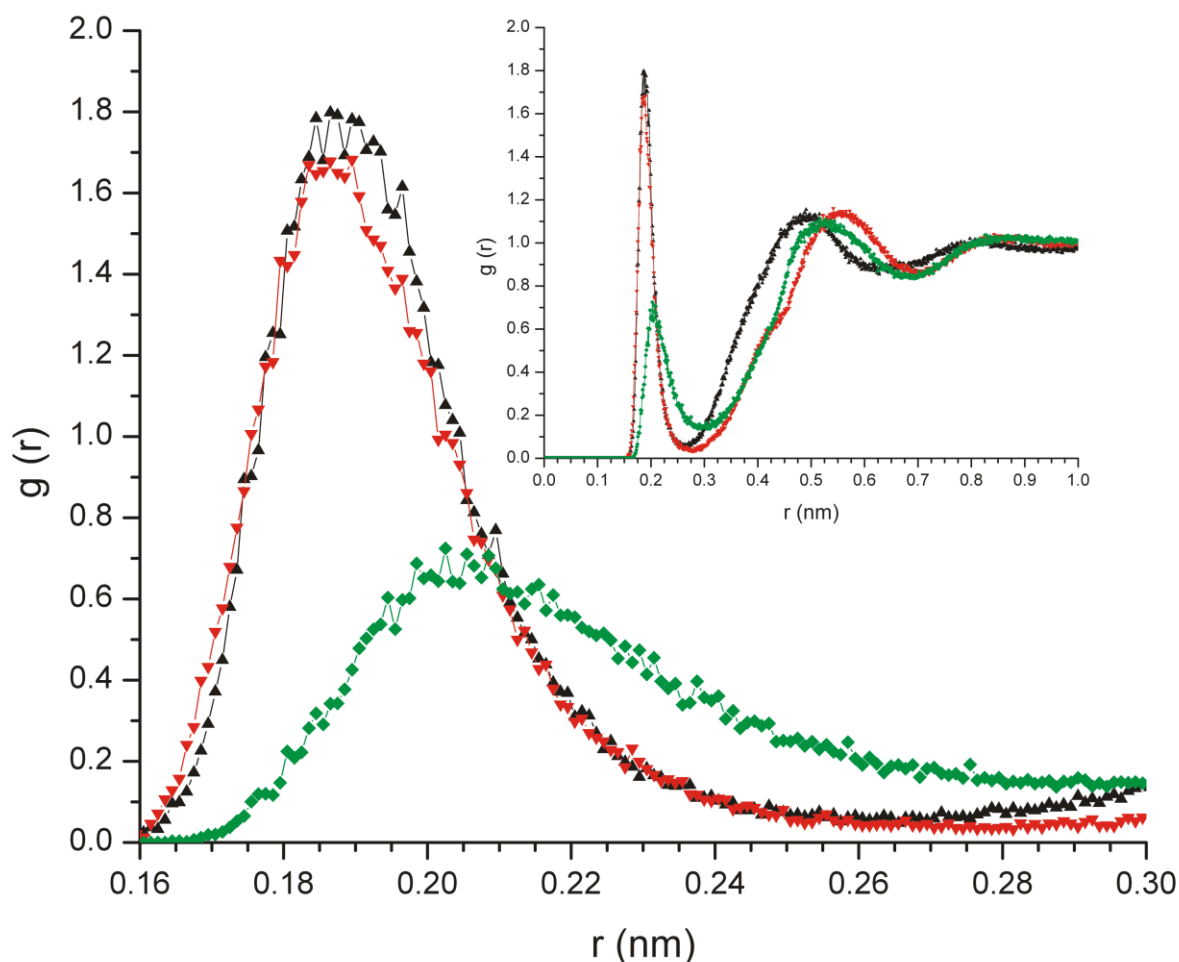


Figura 27 – Gráfico da RDF do hidrogênio que protona os LA em relação aos oxigênios da água. Em primeiro plano uma visão ampliada da região da primeira capa de hidratação e no detalhe uma visão geral da função $g(r)$.

Para a LDC, uma amino-amida, o primeiro pico representa uma capa muito menos intensa e localizada a uma distância maior do que nos demais LA, demonstrando então um leve caráter hidrofóbico a esta região. Nesta molécula, a curta distância entre o grupamento amina e o oxigênio da carboxila, provavelmente acaba deixando o hidrogênio pouco carregado, reduzindo então a sua atração ao oxigênio da água.

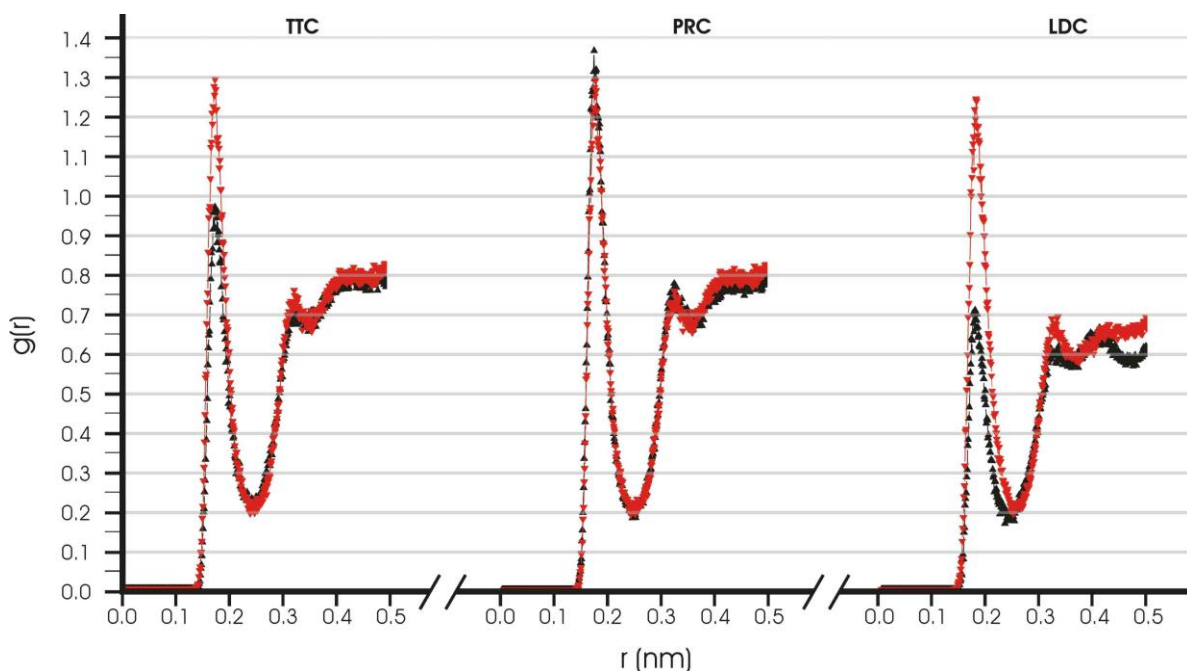


Figura 28 – Gráfico da RDF do oxigênio da carbonila em relação aos hidrogênios das moléculas d'água. Em vermelho temos as moléculas protonadas e em preto as neutras.

A RDF para o oxigênio da carboxila (átomo 14 para TTC, 15 para PRC e LDC) é dependente do estado de carga destes LA. Na forma neutra os amino-ésteres apresentam um caráter hidrofílico o que é visto por um pico muito forte entorno de 0.175 nm (figura 28). O primeiro pico para a LDC (amino-amida) está localizado a aproximadamente a mesma distância porém com uma intensidade significativamente menor que o valor observado nos demais anestésicos, isto também deve estar relacionado a proximidade entre esta porção da molécula e o terminal amina, além de que na LDC existe um nitrogênio entre a carbonila e o anel aromático, o que pode provocar um pequeno deslocamento de cargas na região, reduzindo a atração do oxigênio as moléculas de água.

Ao protonarmos os LA, vemos que a TTC e a LDC tornam-se mais hidrofílicas, porém na PRC o efeito é contrário, e a molécula torna-se um pouco menos hidrofílica. Isto deve ocorrer, pois aparentemente uma ponte de hidrogênio intramolecular pode surgir aqui, fazendo com que o oxigênio fique parte do tempo “ligado” ao hidrogênio que ioniza o terminal amina. Entretanto, isto não passa de uma especulação pois é o tipo de reação que somente podemos simular em um cálculo que considere os elétrons independente, como um cálculo quântico ou mesmo, de maneira não tão precisa, um semi-empírico.

Os grupos aromáticos por sua vez representam uma forma, como já era esperado, muito hidrofóbica. Os grupos aromáticos geralmente são bastante hidrofóbicos e não apresentam camadas de hidratação, como podemos notar na figura 29 com os gráficos para os LA. Uma pequena alteração entre a forma protonada e a neutra é possível de ser vista nos LA, provavelmente devido a deslocamentos de carga causados pela inserção de um hidrogênio no terminal amina, porém nada que possamos considerar significativo.

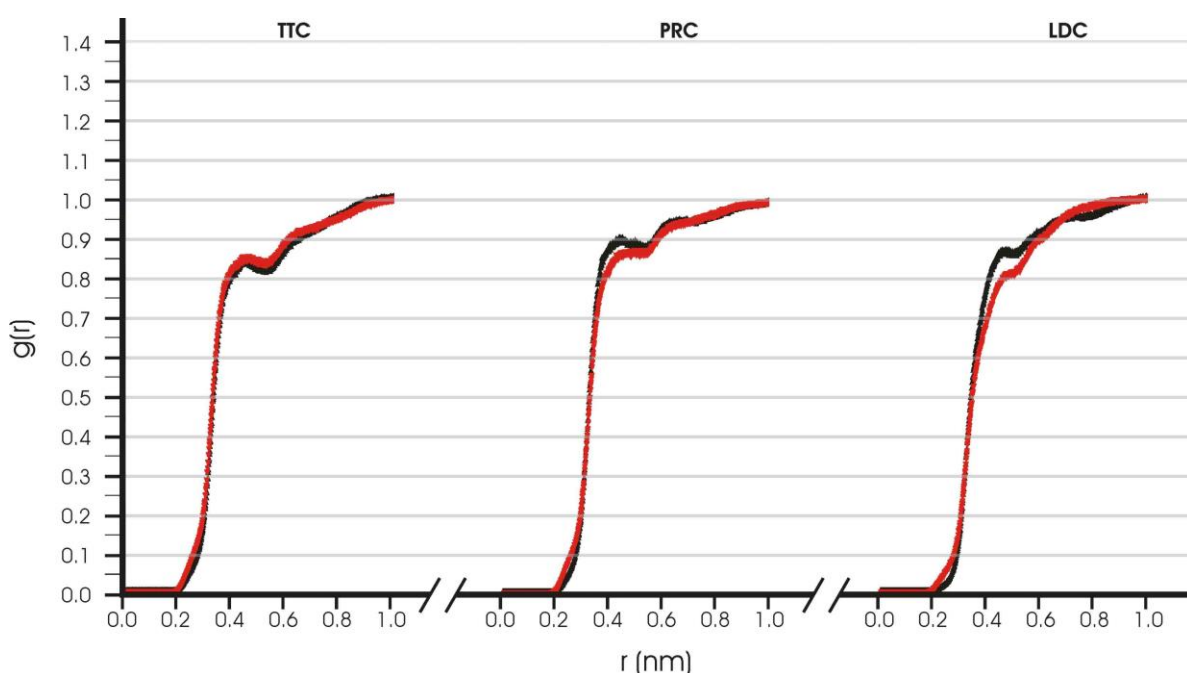


Figura 29 – Gráfico da RDF do anel aromático em relação as moléculas d'água. Em vermelho temos as moléculas protonadas e em preto as neutras.

Na região próxima aos terminais CH_3 na região amino-terminal, o estado de protonação dos anestésicos locais é importante para o arranjo das águas ao redor da região. Na forma não ionizada o primeiro pico está localizado a uma distância maior do que 0.35 nm e a intensidade está abaixo de 1.0, isto indica que esta é uma região hidrofóbica. Notamos que a tetracaína é a menos hidrofóbica, o que deve ocorrer devido ao fato desta ser uma dimetilamina ao passo que os demais LA são dietilaminas. Por outro lado a protonação da molécula faz com que esta região torne-se levemente hidrofílica, já que o pico passa a ter intensidade superior a $g(r)=1.0$, e existe uma maior proximidade entre as capas de hidratação e a origem do gráfico, o que esta mais visível nas moléculas de LDC e PRC (figura 30).

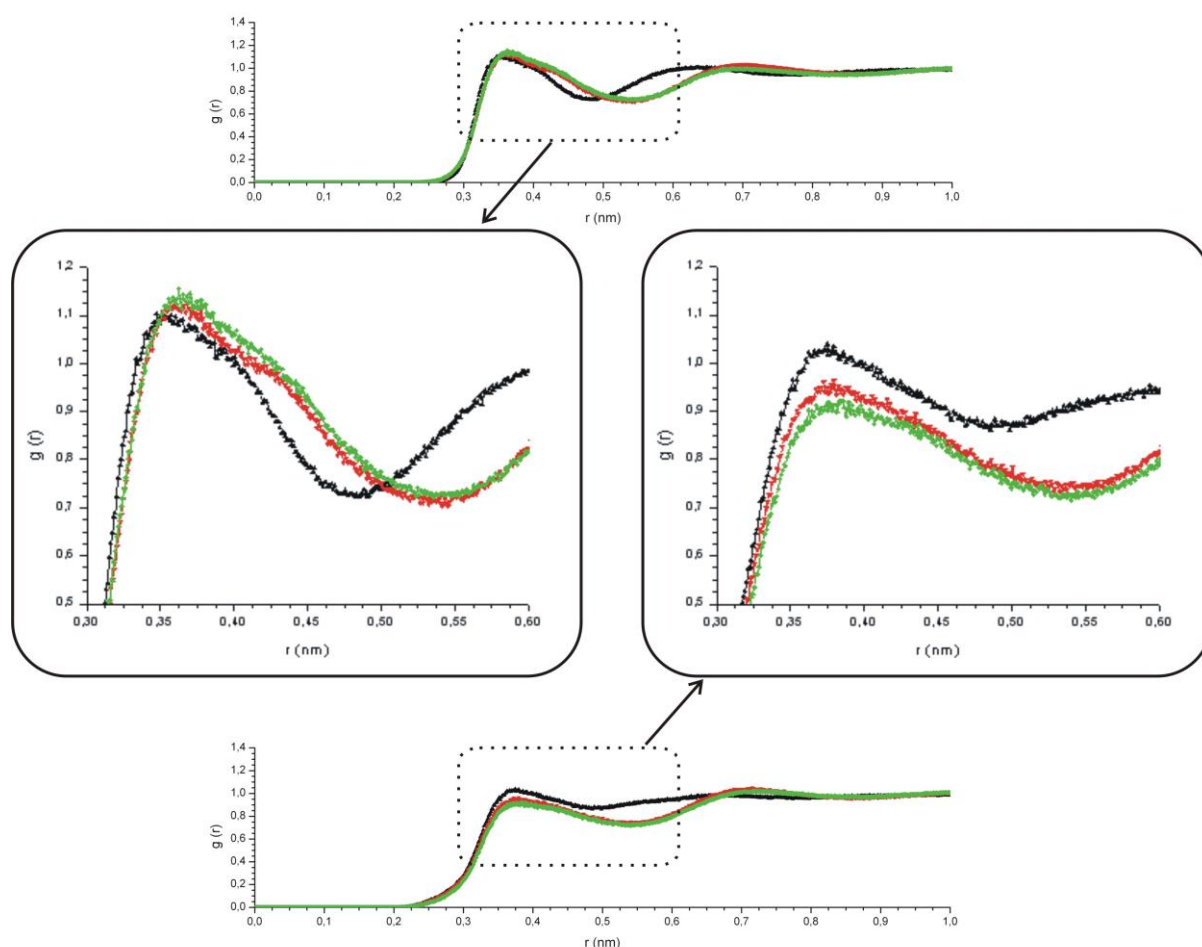


Figura 30 – Gráfico da RDF do terminal CH_3 em relação as moléculas d'água. Em preto temos a TTC, em vermelho temos a PRC e em verde a LDC. Acima estão os LA na forma protonada e abaixo na forma neutra.

Ao analisarmos o terminal amina como um todo em relação a água, vemos que quando neutras, as moléculas apresentam um caráter hidrofóbico, sendo a LDC o que mais representa isto, seguido pela PRC e TTC. Na forma carregada, a função mostra uma pequena contribuição hidrofílica a curtas distâncias, entorno de 0.20 nm, mas não é uma grandeza muito significativa (figura 31)

Estes resultados demonstram um caráter não homogêneo dos anestésicos locais com relação a afinidade a água. Cada um dos anestésicos tende a se comportar de uma maneira um pouco diferente. Estas análises são muito relevantes para o estudo de anestésicos locais em membranas lipídicas pois moléculas hidrofóbicas são geralmente lipofílicas e assim toda esta parte dos LA tende a penetrar a membrana. Outro fator que aqui importa muito são as possíveis pontes de

hidrogênio que podemos formar nestes casos. Apenas como caráter ilustrativo temos duas figuras da tetracaína (figuras 32 e 33), uma em sua forma protonada e outra em sua forma neutra obtidas com o programa VMD a partir dos dados gerados na MD, onde vemos prováveis pontes de hidrogênio da TTC.

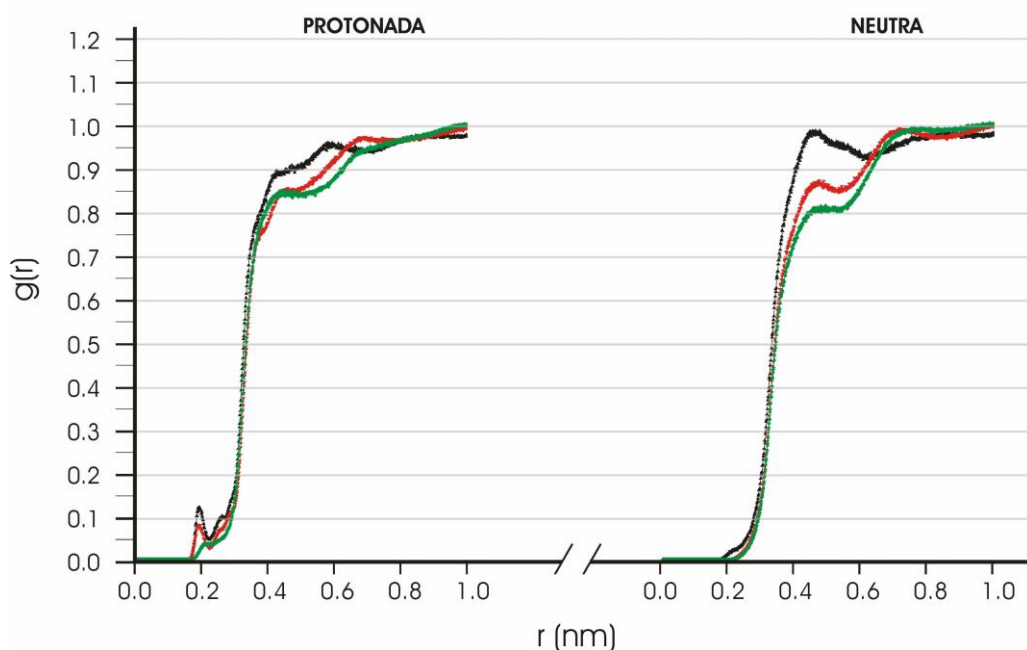


Figura 31 – Gráfico da RDF do terminal amina em relação às moléculas d'água. Em preto temos a TTC, em vermelho temos a PRC e em verde a LDC.

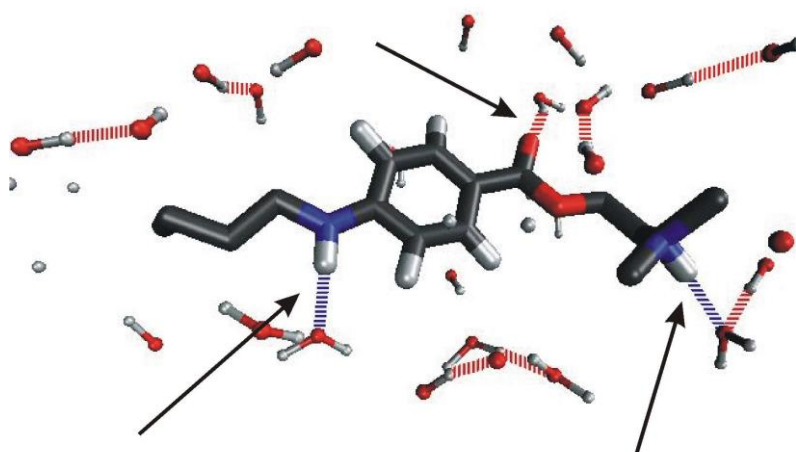


Figura 32 – Representação de pontes de Hidrogênio (linhas tracejadas) sendo feitas nos principais sítios ativos da tetracaína protonada. Note que as pontes entre a tetracaína e o solvente estão indicadas com flechas, as demais são pontes entre moléculas de água do solvente. Os átomos de Hidrogênio e Oxigênio sozinhos ao redor da tetracaína são na verdade moléculas de água que não aparecem por inteiro nesta figura.

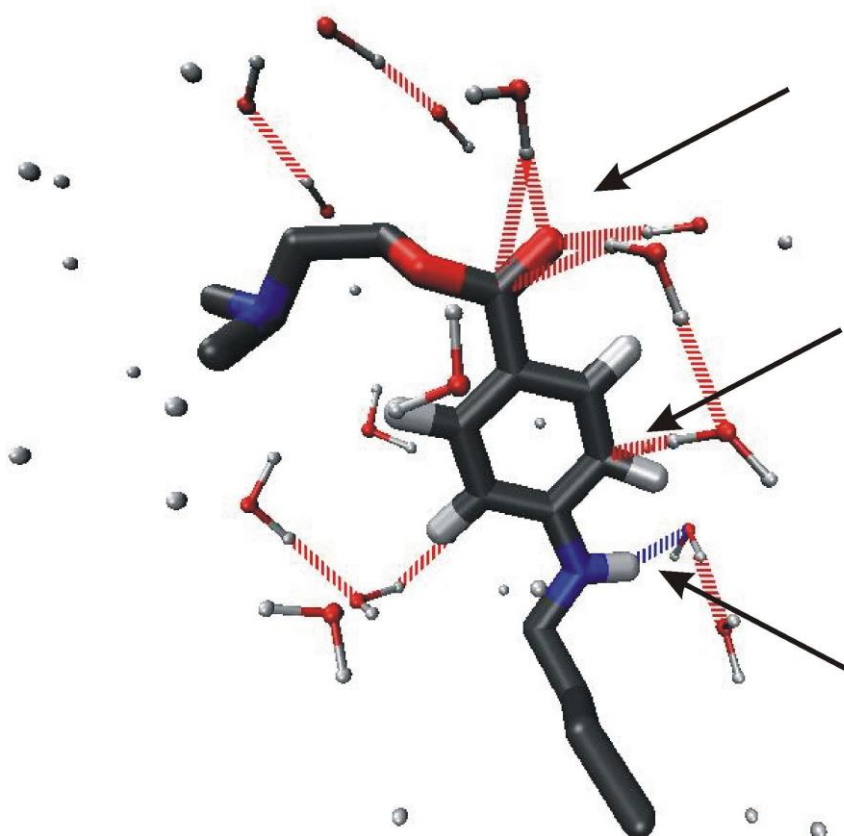


Figura 33 – Representação de pontes de Hidrogênio (linhas tracejadas) próximas à tetracaína neutra. Note que a tetracaína está fazendo 7 pontes de Hidrogênio com as moléculas de água, sendo 4 na mesma região. Isto é um fato raro, e em um único passo da dinâmica isto aconteceu.

Podemos supor a partir das simulações feitas até agora que devido a aparente hidrofiliçidade do hidrogênio que ioniza a amina e aos próprios terminais CH_3 , que a forma protonada da TTC deve ser a que mais irá sofrer para permear a membrana, seguida pela PRC e pela LDC. Sabemos também, a partir de resultados experimentais, que a LDC tem um efeito mais fraco e mais rápido, seguida pela PRC e pela TTC, que é a com maior poder anestésico entre os LA aqui estudados. Aparentemente a forma neutra destas moléculas é capaz de penetrar a membrana, e como é muito hidrofóbica a LDC deve ser também bastante lipossolúvel, logo terá um efeito mais curto do que as demais. Porém ainda é cedo para especular algo mais do que isso. Para seguir os cálculos propomos então uma simulação de uma caixa d'água com Na^+Cl^- , para o estudo do comportamento destes íons no fármaco, já que existem estudos que sugerem a formação de anestésicos hidroclorados e

também sabemos que estudos experimentais recentes indicam que apenas o fármaco protonado é quem possui regiões aceptoras em proteínas trans-membrana na região interna da membrana. Logo, de alguma forma os LA entrariam neutros e lá ficariam protonados.

Dinâmica em solução salina:

Substituindo moléculas de água por átomos de Na^+ e de Cl^- , com diferentes quantidades destes íons fizemos simulações dos anestésicos locais mergulhados nestas soluções. Para tal foram feitas dinâmicas somente com água e também substituindo moléculas do solvente NaCl, realizando diversos cálculos de 5 ns, fora os 500 ps utilizados para relaxar o sistema. Quando realizamos cálculos em soluções salinas, o comportamento do anestésico em relação à água não foi significativamente alterado, porém a região do terminal amina na molécula protonada tornou-se uma região de interesse ainda maior. Agora o hidrogênio que está ionizando a molécula tornou-se um forte atrator de átomos de Cl^- , e isto é de nosso interesse afinal queríamos ver a possibilidade da ligação deste cloro ao hidrogênio que protona os LA.

Focando então nossa atenção no hidrogênio, obtivemos um gráfico da RDF para a interação deste átomo com a água em duas situações: tendo somente água na caixa; tendo 0,9% de moléculas de NaCl (figura 34). Notamos então que praticamente não há diferença ao deixarmos à água com ou sem íons. Porém pequenas variações ocorrem, o que poderia indicar a presença de átomos de cloro rondando a região.

Para ver se isto realmente estava ocorrendo, calculamos a distância mínima entre o Cl^- e o hidrogênio da amina e plotamos em um gráfico na figura 35. Nota-se claramente que existem interações entre os LA e os átomos de cloro, porém como temos trata-se de uma dinâmica clássica, não podemos saber se neste caso haveria ou não uma ligação entre estes átomos, formando então um LA hidrocloreto, ou mesmo rompendo o fármaco e formando HCl e LA neutro. Então para tentar sanar esta dificuldade construímos um input para o Gaussian 03, com a finalidade de realizarmos cálculos quânticos B3LYP, colocando os LA e os Cl^- próximos do hidrogênio, a distância indicada como mínima na MD (figura 35).

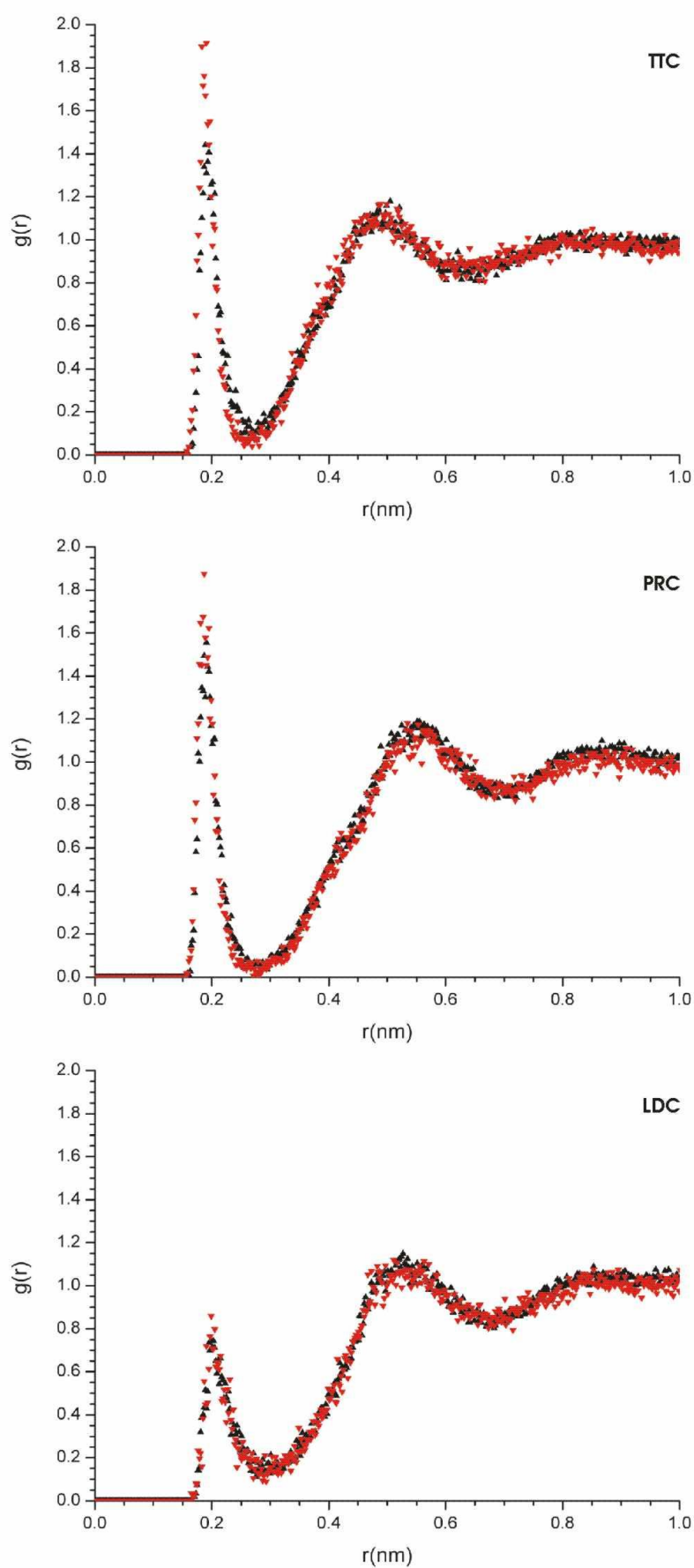


Figura 34 – Gráfico RDF para o hidrogênio que protona o LA em relação à água.

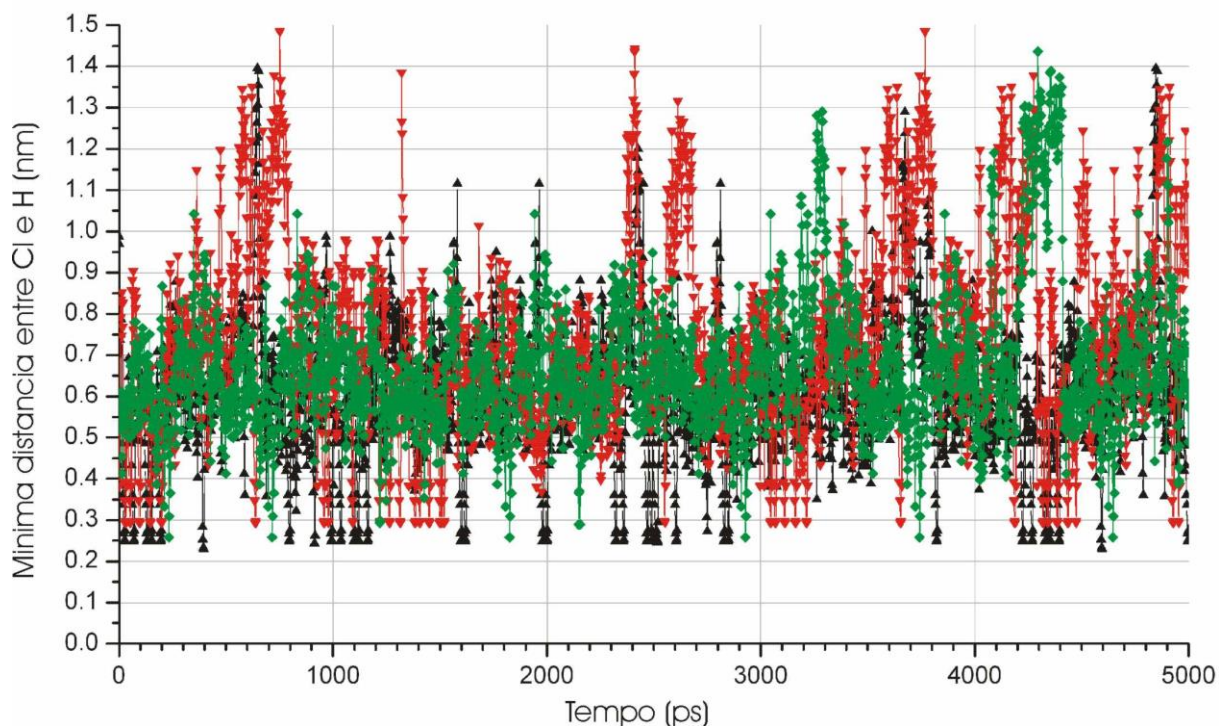


Figura 35 – Plots das distâncias entre o cloro mais próximo e o hidrogênio que protona o LA: TTC (▲), PRC (▼) e LDC (◆).

Otimizando a geometria com o cálculo DFT e utilizando o método chelpG para obtenção das cargas atômicas parciais obtivemos:

- Para a TTC: a distância de equilíbrio entre o H25 e o Cl⁻ ficou em 0.168 nm e a carga do hidrogênio passou de 0.28e para 0.12e;
- Para a PRC: a distância de equilíbrio entre o H24 e o Cl⁻ ficou em 0.180 nm e a carga do hidrogênio passou de 0.30e para 0.12e;
- Para a LDC: a distância de equilíbrio entre o H22 e o Cl⁻ ficou em 0.185 nm, a distância entre o mesmo Cl⁻ e o H13 ficou em 0.223 nm, a carga do hidrogênio H22 passou de 0.12e para 0.6e;

Para chegar a estes valores de mínimo, cada LA moveu-se de maneira diferente para adequar-se ao cloro. Na TTC apenas o terminal amina teve uma leve contorção. Na PRC o terminal amina girou cerca de 180° de maneira a acomodar a ligação entre o H24 e o cloro, pois mantendo-se na conformação original o cloro disputaria o sítio do oxigênio numa espécie de ponte intramolecular. Já com a LDC o terminal amina também teve que girar cerca de 180°, mas neste caso, ao “fugir” do oxigênio da carbonila, o cloro acabou ficando próximo também do H13 que esta

ligado ao outro nitrogênio da molécula, obtendo uma conformação bastante diferente da original (figura 36).

Outra análise importante pode ser feita a partir do número de pontes de hidrogênio que o terminal amina de cada um dos anestésicos faz com a água. Uma análise clássica deste tipo não é a maneira mais precisa para obter esta informação, porém para aumentarmos um pouco nosso conhecimento sobre os LA, construímos as tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Número médio de pontes de hidrogênio por passos da dinâmica.

MOLÉCULA	N-TERMINAL		INTEIRA	
	CARREGADA	NEUTRA	CARREGADA	NEUTRA
TTC	0.951	0.258	2.931	2.929
PRC	0.825	0.046	4.276	3.722
LDC	0.641	0.015	2.280	1.771

Tabela 3 – Tempo médio de estabilidade de uma ponte de hidrogênio em picosegundos.

MOLÉCULA	N-TERMINAL		INTEIRA	
	CARREGADA	NEUTRA	CARREGADA	NEUTRA
TTC	7.96	1.10	1.93	1.36
PRC	8.67	0.62	2.39	1.28
LDC	2.87	0.50	2.03	1.60

Sendo assim, estes cálculos indicam uma grande possibilidade da formação de anestésicos hidroclorados da forma apresentada. Por outro lado, precisamos de mais cálculos para analisar possíveis soluções para o método de funcionamento dos LA a partir da introdução de HCl em suas moléculas. Os dados discutidos tornam possíveis especulações sobre a importância destas moléculas, porém não podem ser dados como conclusivos. E continuando nossos cálculos com os anestésicos resolvemos então aprofundar o trabalho na parte de simulação de interfaces.

Dinâmica de LA através de interfaces dielétricas.

Como as características físico-químicas que mais nos interessam são mais claras na TTC, escolhemos este LA para os cálculos de simulação em membrana, primeiramente fazendo a simulação através do método das cargas imagem. Com este método estamos, grosseiramente, simulando o potencial de uma membrana, e

com isso podemos traçar a curva de potencial de barreira da membrana ao anestésico.

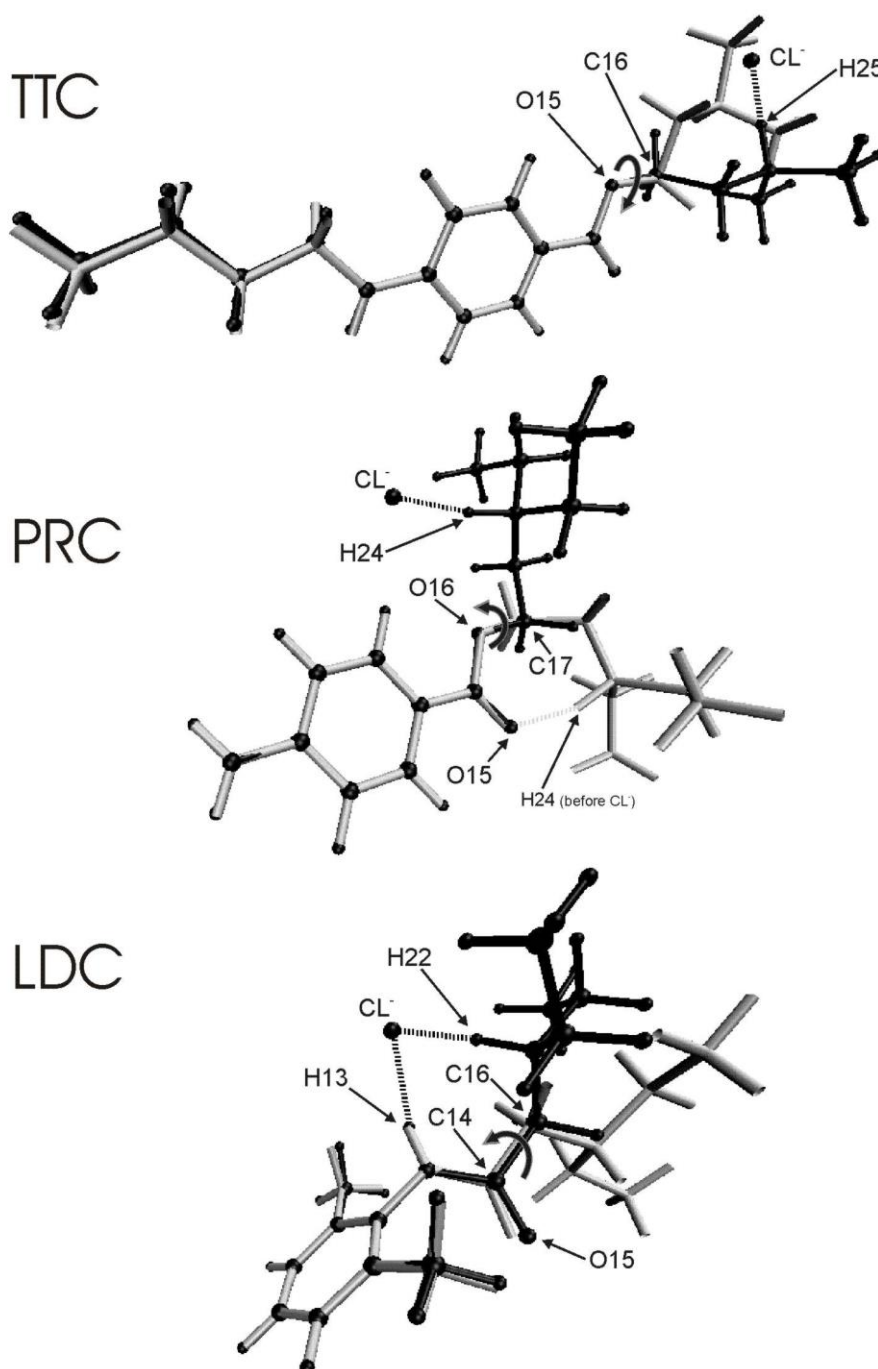


Figura 36 – Captura feita com o VMD a partir de cálculos realizados com o método B3LYP/6-31G**. Em cinza vemos a saída do cálculo sem cloro e em preto com o cloro.

Observamos que a tetracaína em sua forma protonada, teria uma barreira de potencial para cruzar na região da interface, ou seja, a forma iônica da tetracaína ficaria aprisionada na superfície da membrana neural, devido a um pequeno pico

indicativo de uma barreira para que esta entrasse completamente na membrana. Já a forma neutra da molécula, passa facilmente pela interface, devendo então permear a membrana. Isto pode ser observado quando analisamos os gráficos (figura 37) da energia pela posição do centro de massas. Nestes gráficos vemos que para a tetracaína em sua forma protonada, o centro de massa da molécula “sofre” muito para ultrapassar a região de interface. No gráfico da forma neutra é possível observar que a molécula continua seguindo através da interface atravessando-a para encontrar o seu mínimo de energia dentro da região membrana.

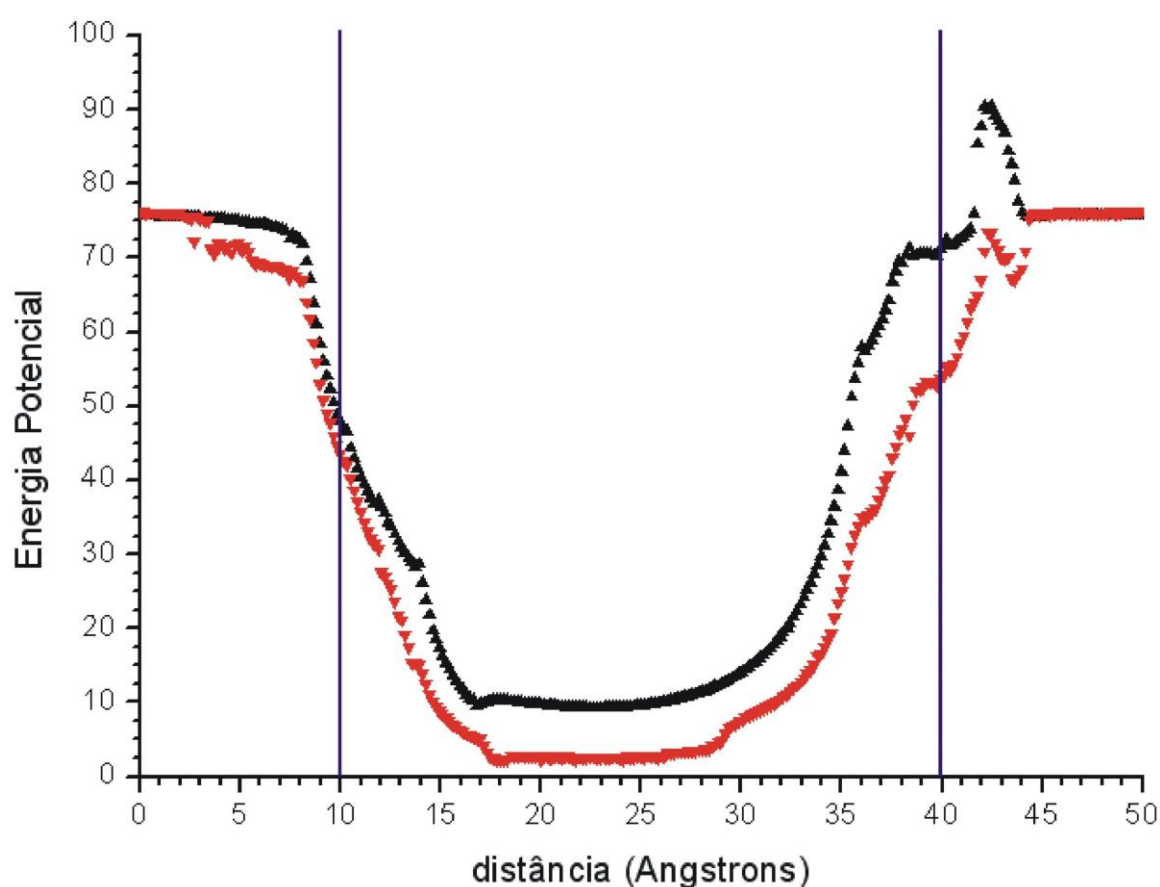


Figura 37 – Gráfico da interação molécula interface, para a tetracaína em sua forma neutra (cor vermelha) e forma protonada (cor preta). A energia é dada em Kcal/mol e a posição do centro de massas em Angstrons.

Dinâmica de LA em membrana explícita:

Tudo o que simulamos até agora ajuda muito na análise do problema em questão, porém não podemos esperar nenhum resultado muito concreto por estes métodos. Sendo assim, seguimos a um passo bem mais complicado, passando da

simulação de uma molécula em um solvente explícito, uma dinâmica com cerca de 2000 átomos em um sistema bastante estável, para uma dinâmica de um sistema com aproximadamente 17000 átomos, sendo que a membrana é muito difícil de ser estabilizada para reproduzir propriedades físico-químicas apresentadas em sistemas reais quando medidos experimentalmente.

Utilizamos, a partir da indicação de colaboradores de nosso trabalho, uma membrana já construída pelo grupo do prof. Dr. Peter Tielleman da Universidade de Calgary, Canadá. O modelo já estava razoavelmente estável e com a membrana bem solvatada em água, como vimos na seção sobre métodos de dinâmica molecular, deixando basicamente o problema da interação anestésico-membrana a ser resolvido.

Os cálculos feitos até então com o GROMACS haviam utilizado como base o campo de forças GROMOS96, com pequenas alterações para adequá-lo ao estudo de LA. Porém a membrana DPPC utilizada era parametrizada para o primeiro campo de forças GROMOS. Logo para não haver problemas, reparametrizamos a TTC de modo a obter uma topologia que não gerasse conflito com a topologia da bicamada lipídica.

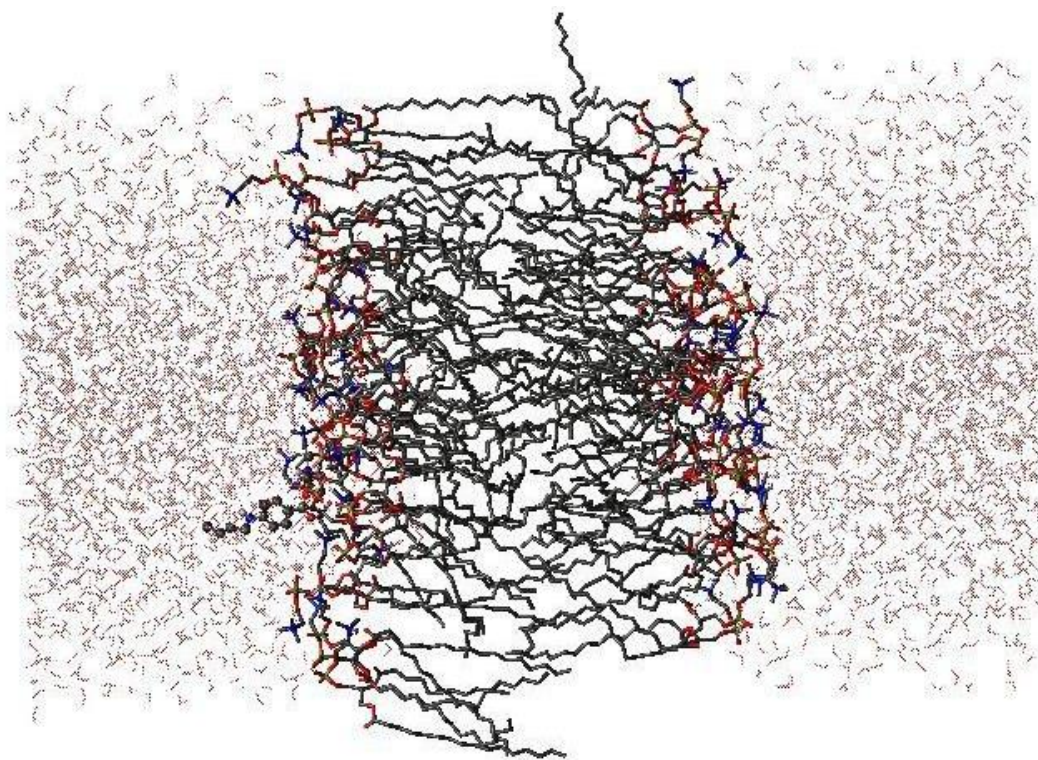


Figura 38 – Captura de imagem da saída do GROMACS através do software VMD, feita da TTC em sua forma protonada na membrana de DPPC.

Com a topologia construída e devidamente testada no vácuo, colocamos a TTC na forma protonada em uma cavidade na água em uma região próxima a DPPC. Assim fizemos um cálculo de 2ns apenas para relaxar o sistema e poder desprezar possíveis erros iniciais na dinâmica. Em seguida foram feitos 20 ns de dinâmica do sistema membrana-água-anestésico. Uma dinâmica como esta leva alguns dias, cerca de uma semana em nosso caso, para ser realizada em computadores de última geração e por este motivo somente a TTC na forma protonada e neutra foram calculadas neste trabalho.

Os cálculos preliminares de dinâmica em solvente já indicavam que a forma protonada do anestésico ficasse retida na superfície da membrana enquanto a forma neutra poderia permear a DPPC. Nossos resultados indicaram exatamente isto, podemos ver na figura 38 que a forma protonada ficou após 20ns sobre a superfície da membrana, tendo durante a dinâmica penetrado parcialmente a bicamada apenas algumas vezes, sendo que nenhuma vez com o terminal amina.

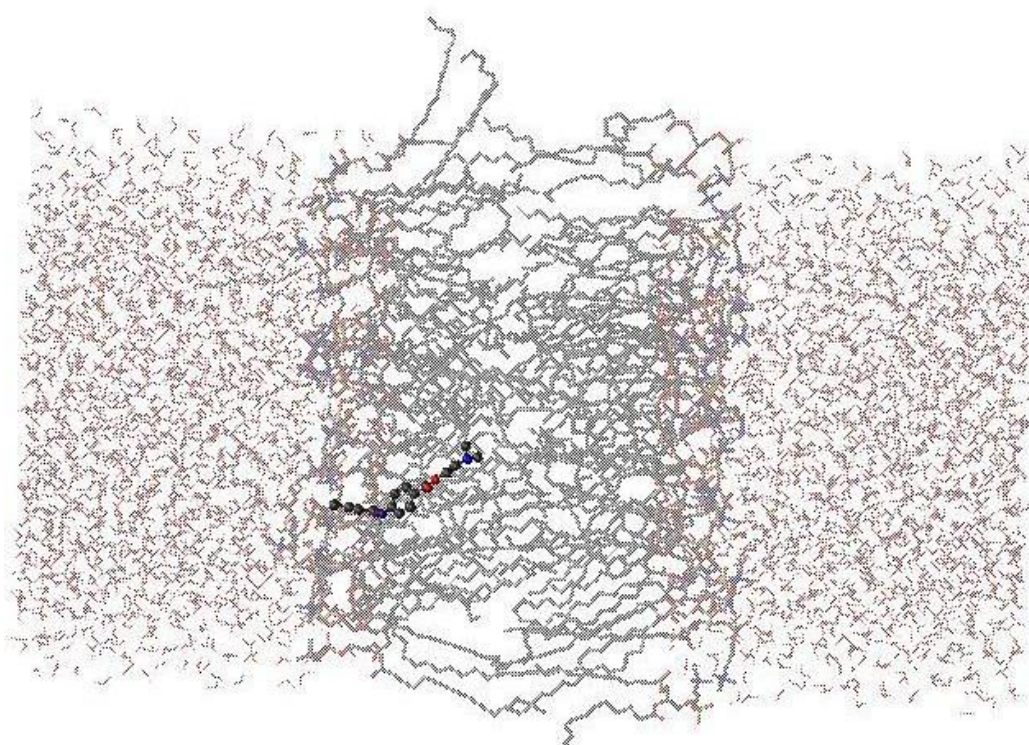


Figura 39 – Captura de imagem da saída do GROMACS através do software VMD, feita da TTC em sua forma neutra na membrana de DPPC.

Ao realizarmos os cálculos com a TTC na forma neutra, observamos que na primeira vez que a molécula se aproximou bastante da membrana, se orientou de

forma a ter seu lado lipofílico entrando primeiro e entrou completamente na membrana, ficando quase que na posição de um dos fosfolipídios da bicamada (figura 39 e 40).

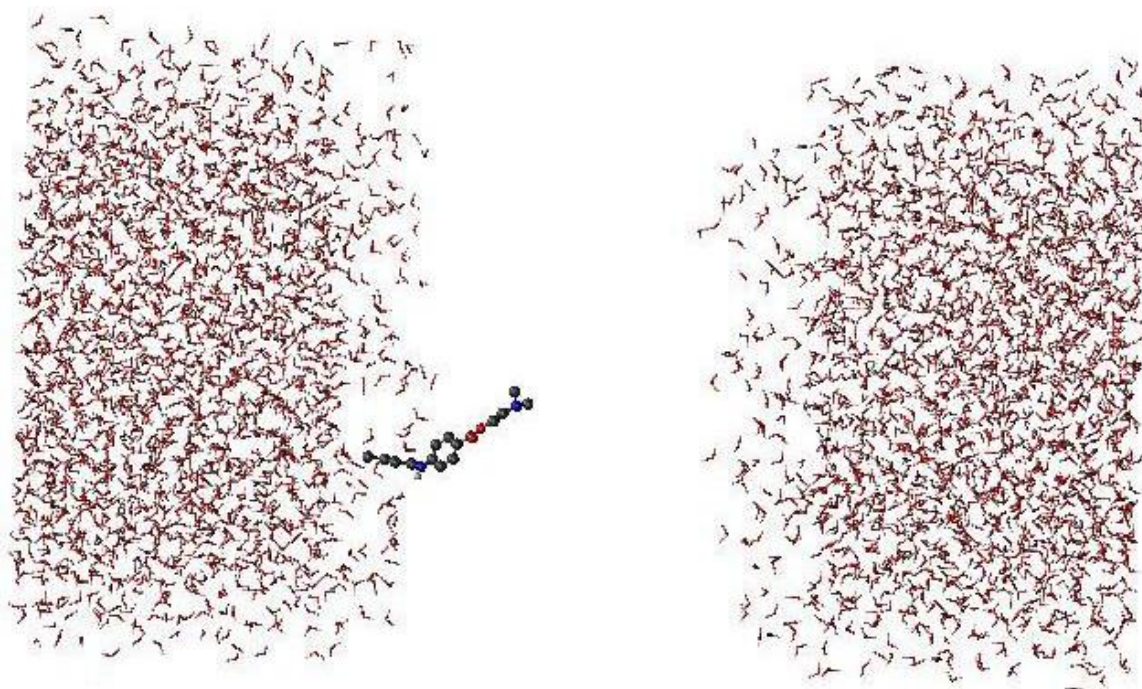


Figura 40 – Captura de imagem da saída do GROMACS através do software VMD, feita da TTC em sua forma neutra na membrana de DPPC, porém sem representar os lipídios para facilitar visualização do local onde o fármaco se estabeleceu.

Para compreendermos melhor o que aconteceu, fizemos um gráfico (figura 41) do deslocamento do centro de massa das duas formas da tetracaína, somente no eixo z, que é o eixo que cruza a membrana, desta forma podemos notar que a forma protonada já vem desde o começo com seu centro de massa sobre a interface entre a água e a membrana. Já a forma neutra quando chega próxima da membrana em pouco tempo consegue passar mais adiante do que a forma protonada.

Neste gráfico podemos notar facilmente que a forma protonada já começa a dinâmica próxima da interface. Isto ocorre devido ao fato de na dinâmica para relaxarmos as tensões locais, a forma protonada ter se aproximado da membrana enquanto a forma neutra manteve-se afastada. Outra pequena análise feita, de pontes de hidrogênio, indica que a forma neutra tem 0,019 pontes para cada passo da dinâmica, enquanto que a forma protonada tem 1,219 pontes, sendo que todas

são no terminal amina. Esta análise foi feita somente em relação à DPPC, não levando em conta as moléculas de água. Isto também nos ajuda a dizer que o N-terminal está segurando a forma ionizada junto a superfície da membrana.

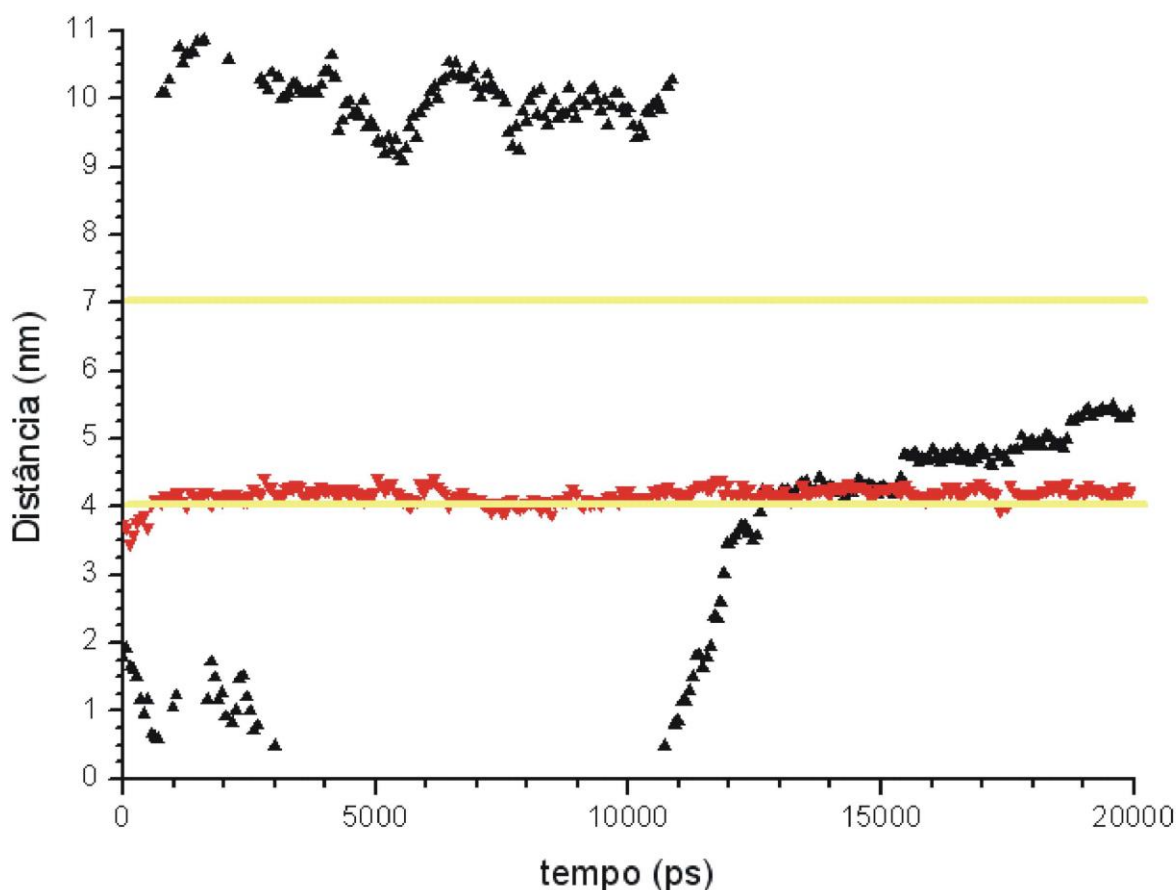


Figura 41 – Gráfico da posição do centro de massa da tetracaína em relação ao tempo, somente no eixo z. As linhas em amarelo denotam o início da membrana. Em vermelho temos a TTC carregada e em preto a forma neutra.

6. CONCLUSÃO:

Dois tipos de cálculos foram realizados neste trabalho, inicialmente realizamos cálculos de modelagem molecular que foram em seguida usados como base para cálculos de dinâmica molecular. Os cálculos de modelagem nos deram as geometrias das moléculas otimizadas e também a partir deles podemos ver os deslocamentos das nuvens eletrônicas que podem, como no caso da PRC, levar a um enfraquecimento do efeito anestésico. Este tipo de deslocamento já era

conhecido e seu modelo é comum em alguns livros de farmacologia (Korolkovas, 1988). Uma análise das cargas atômicas nos mostrou que a TTC foi o anestésico com maior diferença entre as formas neutra e protonada. Isto poderia indicar uma maior resistência a entrar na membrana por parte da molécula protonada, já que a região do terminal amina é bastante carregada nesta forma da molécula e esta teria uma maior chance de efetuar ligação com a água e então desta maneira sofrer dificuldade de penetrar o lipídio da membrana. A LDC por outro lado foi dos anestésicos estudados o que menos se diferenciou quando em sua forma carregada.

Em uma caixa d'água, a dinâmica nos mostrou que os LA se comportaram da maneira esperada, a TTC se mostrou o anestésico com o grupo amina mais hidrofílico quando protonado, seguido da PRC e da LDC. Isto indicaria que esta seria a ordem na qual o anestésico sofreria maior dificuldade em penetrar a membrana. Quanto maior a dificuldade, maior deverá ser o tempo de ação destes anestésicos, já que continuaram a penetrar a membrana por mais tempo e também estarão agindo na interface água – membrana.

Na dinâmica em uma solução salina observamos a possível formação de anestésicos hidrociorados. Como um dos mecanismos mais aceitos atualmente diz que os anestésicos em sua forma protonada ligam-se a proteína do canal iônico na parte interna da membrana, os anestésicos hidrociorados poderiam ser uma forma de facilitar o acesso dos anestésicos protonados a parte interna da membrana. A ligação de um átomo de cloro aos anestésicos aumenta a chance destes penetrarem a membrana, pois o terminal amina que estava muito carregado e desta maneira muito hidrofílico, agora neutralizado pelo Cloro deverá atravessar a interface com maior facilidade. Este mecanismo é um pouco mais complexo e é apresentado em poucos trabalhos na literatura.

As dinâmicas em membranas, tanto explícitas como por descontinuidade dielétrica nos apresentaram resultados semelhantes. A tetracaína protonada sofre maior dificuldade para atravessar a membrana, enquanto a forma neutra deverá permear a mesma com facilidade ao chegar próximo a mesma. Este mecanismo deverá ser o de funcionamento dos anestésicos, porém não sabemos afirmar se os anestésicos protonados, ficando na interface auxiliam no bloqueio da transmissão nervosa, ou somente os anestésicos neutros é que teriam este papel.

A dinâmica dos LA feita aqui, é uma aproximação muito grosseira da realidade. Esta simulação nos é muito útil na formação de conceitos, para cálculos futuros, onde possamos construir modelos computacionais de membranas com proteínas, simulando os átomos da membrana e das proteínas de forma explícita. Um modelo como este seria muito complicado de ser realizado, porém já existem estudos deste tipo sendo feitos por outros grupos. O que vimos na dinâmica realizada, é que os LA na forma neutra atravessam a interface água-membrana com facilidade, seguindo em frente sem maiores problemas, já a molécula protonada, prende-se a interface, não se afastando da mesma. Estes resultados estão de acordo com a idéia de alguns autores, por sinal, de grande parte deles e com alguns dados experimentais (Alfred *et al*, 2003; Korolkovas *et al*, 1982; Fraceto *et al*, 2002; Teixeira *et al*, 2001; Schreier *et al*, 2000; Frezzatti *et al*, 1986; Bianconi *et al*, 1985;; Boulanger *et al*, 1981).

Nos cálculos de MD utilizamos os dados dos cálculos B3LYP como base para os valores das geometrias e das cargas atômicas. Porém, apesar de o B3LYP ser uma das ferramentas mais avançadas de cálculo, os cálculos de dinâmica molecular utilizam campos de forças clássicos que negligenciam boa parte das propriedades que poderiam ser importantes para o entendimento de um anestésico local. Então, apesar de nossos dados concordarem com o que os resultados experimentais indicam que uma análise mais profunda do problema somente será possível através de métodos híbridos de mecânicas quântica e clássica, como o QM/MM (Quantum Mechanics / Molecular Mechanics). Outro problema é que os campos de forças que utilizamos não são polarizáveis, e isto pode influenciar na dinâmica próximo a interface, já que a polarização neste caso poderia alterar bastante as propriedades locais. Métodos como este já estão em desenvolvimento, porém nenhum nos pareceu aplicável ao nosso caso e também não nos sentimos seguros quanto a sua utilização.

Apesar de todos os problemas, acreditamos que nossos cálculos apresentam resultados que nos ajudam a compreender o sistema água – membrana – anestésico local. Temos em mente que nossos resultados não são conclusivos e que o conhecimento por completo do mecanismo de funcionamento dos LA estão longe de ser compreendidos. Nosso caminho deve ser partir para o desenvolvimento de métodos clássicos com campos de forças polarizáveis ou mesmo o uso de

métodos QM/MM. Com isso poderemos simular o anestésico e o seu arredor de forma quântica e o resto do sistema com mecânica clássica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Alberts, B.; Johnson, A.; Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*; Artmed: Porto Alegre, RS - Brasil, 2004.
2. Alfred; Goodman; Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*; McGraw-Hill: São Paulo, SP - Brasil, 2003.
3. Anisimov, V. I. *Strong Coulomb correlations in electronic structure calculations: Beyond the Local Density Approximation*; Gordon & Breach, 1999.
4. Auger, M.; Smith, I. C.; Jarrell, H. C. *Biochim Biophys Acta* 1989, 981, 351-357.
5. Auger, S.; Verma, D. P. *Biochemistry* 1981, 20, 1300-1306.
6. Becke, A. D. *Physical Review A* 1988, 38, 3098-3100.
7. Becke, A. D. *Journal of Chemical Physics* 1993, 98, 5648-5652.
8. Berendsen, H. J. C.; Postma, I. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, I. *Intermolecular Forces*; Reidel, Dordrecht, Holland, 1981.
9. Berman, B.; Flores, J.; Pariser, D.; Pariser, R.; de Araujo, T.; Ramirez, C. C. *Dermatol Surg* 2005, 31, 135-138.
10. Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito, A. S.; Ota, A. T. *International Journal of Quantum Chemistry* 2006, 106, 1277-1282.
11. Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito, A. S.; Taft, C. A.; Ota, A. T. *International Journal of Quantum Chemistry* 2007, 107, 1642-1649.
12. Bianconi, A.; Fritsch, E.; Calas, G.; Petiau, J. *Physical Review B. Condensed Matter* 1985, 32, 4292-4295.
13. Boulanger, Y.; Schreier, S.; Smith, I. C. *Biochemistry* 1981, 20, 6824-6830.
14. Breneman, C. M.; Wiberg, K. B. *Journal of Computational Chemistry* 1990, 11, 361-373.
15. Butterworth, J. F.; Strichartz, G. R. *Anesthesiology* 1990, 72, 711-734.
16. Chiu, S. W.; Clark, M.; Balaji, V.; Subramaniam, S.; Scott, H. L.; Jakobsson, E. *Biophys J* 1995, 69, 1230-1245.

17. Depaula, E.; Schreier, S. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1995, 1240, 25-33.
18. dePaula, E.; Schreier, S. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1996, 29, 877-894.
19. Dobson, J. F.; Vignale, G.; Das, M. P. *Density Functional Theory: Recent Progress and New Directions*; Plenum: New York, 1998.
20. Drewa, T.; Wolski, Z.; Galazka, P.; Olszewska-Slonina, D.; Musialkiewicz, D.; Czajkowski, R. *Urologia Internationalis* 2006, 76, 359-363.
21. Eschrig, H. *The fundamentals of Density Functional Theory*; Teubner: Leipzig, 1996.
22. Feller, S. E.; Pastor, R. W. *Biophys J* 1996, 71, 1350-1355.
23. Fozzard, H. A.; Lee, P. J.; Lipkind, G. M. *Curr Pharm Des* 2005, 11, 2671-2686.
24. Fraceto, L. F.; Oyama, S.; Nakaie, C. R.; Spisni, A.; de Paula, E.; Pertinhez, T. A. *Biophysical Chemistry* 2006, 123, 29-39.
25. Fraceto, L. F.; Pinto, L. D. A.; Franzoni, L.; Braga, A. A. C.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E. *Biophysical Chemistry* 2002, 99, 229-243.
26. Fraceto, L. F.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E. *Biophysical Chemistry* 2005, 115, 11-18.
27. Frezzatti, W. A., Jr.; Toselli, W. R.; Schreier, S. *Biochim Biophys Acta* 1986, 860, 531-538.
28. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; S., I. S.; J., T.; Barone, V.; Mennuccit, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasewaga, 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.; Ciolowski, 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: Pittsburg, PA, 2003.

29. Gross, E. K. U.; Dreizler, R. M. Density Functional Theory; Plenum: New York, 1995.

30. Hauet, N.; Artzner, F.; Boucher, F.; Grabielle-Madelmont, C.; Cloutier, I.; Keller, G.; Lesieur, P.; Durand, D.; Paternostre, M. Biophys J 2003, 84, 3123-3137.

31. Hille, B.; Courtney, K.; Dunn, R. Molecular Mechanisms of Anesthesia; Raven Press: New York, 1975.

32. Hohenberg, P.; Kohn, W. Physical Review B

Physical Review A 1964

1965, 864-871

1133-1138.

33. Jorkjend, L.; Skoglund, L. A. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1999, 21, 505-510.

34. Joulbert, D. Lecture Notes in Physics 1998, 500.

35. Kohn, W. Journal of Computational Chemistry 1999, 20, 1-1.

36. Korolkovas, A.; Burkhalter, J. H. Química Farmaceutica; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, RJ - Brasil, 1988.

37. Laird, B. B.; Ross, R. B.; Ziegler, T. Chemical Applications of Density-Functional Theory 1996, 629, 1-17.

38. Lee, A. G. Nature 1976, 262, 545-548.

39. Lee, C.; Parr, R. G. Physical Review A 1990, 42, 193-200.

40. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. Physical Review B 1988, 37, 785-789.

41. Levine, I. N. Quantum Chemistry; Pearson Education: New York, 2003.

42. Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. Journal of Molecular Modeling 2001, 7, 306-317.

43. Malheiros, S. V. P.; Pinto, L. M. A.; Gottardo, L.; Yokaichiya, D. K.; Fraceto, L. F.; Meirelles, N. C.; de Paula, E. *Biophysical Chemistry* 2004, 110, 213-221.
44. March, N. H. *Electron Density Theory of Atoms and Molecules*; Academic Press: London, 1992.
45. Matsuki, H.; Simada, K.; Kaneshina, S.; Kamaya, H.; Ueda, I. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1998, 287-295.
46. McDonald, N. A.; Carlson, H. A.; Jorgensen, W. L. *Journal of Physical Organic Chemistry* 1997, 10, 563-576.
47. Mundim, K. In *Anais da IV Escola do CBPF*; CBPF: Rio de Janeiro, RJ - Brasil, 2002.
48. Nalewajski, R. F.; Mrozek, J. *International Journal of Quantum Chemistry* 1996, 57, 377-389.
49. Parr, R. G. *Chemical & Engineering News* 1990, 68, 45-45.
50. Parr, R. G. *International Journal of Quantum Chemistry* 1990, 37, 327-347.
51. Pople, J. A. *Angewandte Chemie-International Edition* 1999, 38, 1894-1902.
52. Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. *Science* 1994, 265, 1724-1728.
53. Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93, 9270-9275.
54. Ruetsch, Y. A.; Boni, T.; Borgeat, A. *Curr Top Med Chem* 2001, 1, 175-182.
55. Schmidt, A. C. *Pharm Res* 2005, 22, 2121-2133.
56. Schreier, S.; Malheiros, S. V.; de Paula, E. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1508, 210-234.
57. Shibata, A.; Ikawa, K.; Terada, H. *Biophysical Journal* 1995, 69, 470-477.
58. Sigfridsson, E.; Ryde, U. *Journal of Computational Chemistry* 1998, 337-395.
59. Singer, M. A. *Biochem. Pharmacology* 1977, 51– 57.
60. Smith, I. C. P.; Auger, M.; Jarrell, H. C. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991, 625, 668-684.

61. Stewart, J. J. P. *Journal of Computational Chemistry* 1991, 12, 320-341.
62. Teixeira, C. V.; Itri, R.; Casallanovo, F.; Schreier, S. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1510, 93-105.
63. van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. *Gromacs User Manual*; (www.gromacs.org): Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2002.
64. van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. *J Comput Aided Mol Des* 1987, 1, 171-176.
65. Vandrunen, R.; Vanderspoel, D.; Berendsen, H. J. C. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 1995, 209, 49-Comp.
66. Yagiela, J. A. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*; Mosby: Philadelphia, 1986.
67. Yun, I.; Cho, E. S.; Jang, H. O.; Kim, U. K.; Choi, C. H.; Chung, I. K.; Kim, I. S.; Wood, W. G. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2002, 1564, 123-132.

ANEXOS

Anexo A: Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito, A. S.; Ota, A. T. International Journal of Quantum Chemistry 2006, 106, 1277-1282.

Anexo B: Bernardi, R. C.; Gomes, D. E. B.; Pascutti, P. G.; Ito, A. S.; Taft, C. A.; Ota, A. T. International Journal of Quantum Chemistry 2007, 107, 1642-1649.