

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Estudo teórico de propriedades eletroquímicas e interação com possíveis alvos biológicos de complexos baseados em ru com potencial atividade antitumoral.

Eufrásia de Sousa Pereira

Belo Horizonte
2020

UFMG/ICEx/DQ. 1379^a

D. 632^a

Eufrásia de Sousa Pereira

Estudo Teórico de Propriedades Eletroquímicas e Interação com Possíveis Alvos Biológicos de Complexos Baseados em Ru com potencial atividade antitumoral.

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências - Química.

Orientador: Prof Willian Ricardo Rocha

Fevereiro - 2020

Ficha Catalográfica

P436e
2020

Pereira, Eufrásia de Sousa
Estudo teórico de propriedades eletroquímicas e interação com possíveis alvos biológicos de complexos baseados em Ru com potencial atividade antitumoral [manuscrito]/Eufrásia Pereira de Sousa. 2020.
[xii], 152 f.: il.

Orientador: Willian Ricardo Rocha.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

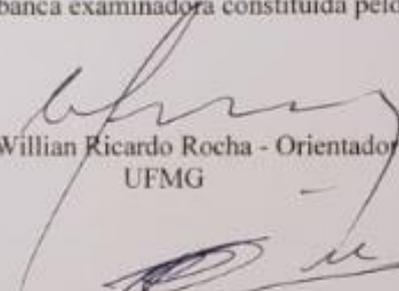
Inclui bibliografia.

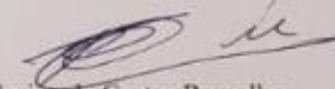
1. Físico-química - Teses 2. Óxido nítrico - Teses
3. Funcionais de densidade - Teses 4. Compostos de rutênio - Teses 5. Medicamentos - Tese I. Rocha, Willian Ricardo - Orientador II. Título

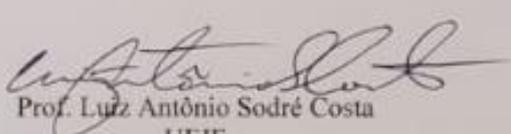
"Estudo Teórico de Propriedades Eletroquímicas e Interação com Possíveis Alvos Biológicos de Complexos Baseados em Ru com Potencial Atividade Antitumoral"

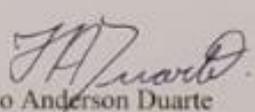
Eufrásia de Sousa Pereira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Willian Ricardo Rocha - Orientador
UFMG


Prof. Teodorico de Castro Ramalho
UFLA


Prof. Luiz Antônio Sodré Costa
UFJF


Prof. Hélio Anderson Duarte
UFMG


Prof. Guilherme Ferreira de Lima
UFMG

Belo Horizonte, 13 de fevereiro de 2020.

Esta tese é dedicada à minha mãe, guerreira e inspiração da mulher que me tornei hoje Izabel Maria de Sousa pelo apoio incondicional, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Agradecimentos:

A minha mãe Izabel, pelo apoio, dedicação e por ter lutado por mim e pela minha educação desde de minha infância até os dias hoje. Aos meus irmãos Eney e Elisiane que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida;

Aos meus sobrinhos Sara, Samuel e Heloisa pelos momentos de mais profunda alegria e queima de calorias durante nossos passeios, e por renovar minhas energias a cada encontro;

Ao professor e orientador Willian Ricardo Rocha pela paciência, orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta Tese. Agradeço também por ter me apresentado um mundo novo na área de Química Teórica e por me permitir acessar diferentes ferramentas computacionais que foram importantes para minha formação científica, além de ampliar meus horizontes acerca da fronteira do conhecimento científico;

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais pela valiosa contribuição na minha formação durante as disciplinas cursadas;

Aos amigos do eCsMo, Marcelo, Mateus, Gabriel, Taís, com os quais tive o prazer de conviver durante este período, pela agradável convivência, discussões e colaboração durante a construção deste trabalho, em especial gostaria de agradecer ao Gabriel pela sua valiosa contribuição e discussões científicas, que culminou em um trabalho colaborativo;

Aos amigos, que conheci neste departamento – não ousarei citar os nomes por motivos de esquecer injustamente algum – pela amizade, apoio e união que foram cruciais em momentos difíceis dessa construção.

Aos amigos conhecidos através da UFMG e que se tornaram mais que irmãos, obrigada Leonardo Aparecido de Souza pelo apoio nos momentos difíceis, mas também pelas risadas infundas em momentos de descontração. Giovanna Neves Damasceno pelo prazer de conviver com você durante quase todo o doutoramento e assim ter a oportunidade de saber que ainda há seres realmente humanos. Ao Rodolfo Vieira Maximiano, meu irmão de Uberlândia, por estar sempre aberto a me ouvir, pela parceria e companheirismo;

Ao meu amado e companheiro João Marcos Martins da Costa Cota pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo quando eu acreditava estar tudo perdido. Por ter me acolhido e me acalentado no momento mais desafiador desta construção. A sua importância na minha vida jamais poderá ser expressa, mesmo se eu utilizar toda a Tese para isso;

Aos meus protetores mentais Geisiane Lopes e Adilson, por seus conselhos e orientações para a vida que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Obrigada por terem ascendido a luz do caminho de encontro comigo mesma permitindo que eu me reerguesse e assim transcender para um estado de maior equilíbrio;

A secretaria de pós-graduação do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais por ter me acompanhado ao longo do processo de doutoramento em especial as secretárias Alessandra e Lilian pelo respeito e compreensão quando o assunto se tornou mais delicado. Agradeço imensamente o coordenador do programa de pós-graduação em Química Prof^o Hélio Anderson Duarte por ter lutado para que fosse reincluída ao programa e assim concluir esta importante etapa da minha formação.

Por fim, ao CNPq pela bolsa e junto com a CAPES, FAPEMIG e Rede Mineira de Química pelo apoio financeiro dado ao desenvolvimento deste trabalho.

*" E depois que a dor passar
Poder abrir o olho e ver tudo igual
E tudo aquilo que você pensou ter acabado
está a salvo
As coisas não estão tão mal assim*

*E até que enfim
Você pode chegar em casa tarde e reparar
Que o coração agora não dói mais
E que essa paz de ver que tudo passa
É bom pra gente aguentar firme
Se acontece uma próxima vez*

*Porque quando a dor voltar
Não vai ser muito fácil de se convencer
De que não é o lado bom que passa
Porque pra quem foi ferido
É fácil de uma cicatriz se abrir*

*Mas há por vir
Muita beleza ainda
Você tem toda uma vida
Pra viver o que ainda nem chegou
E se não deu, vai dar
Ou paciência
Nem sempre o que a gente pensa
É realmente o que vai ser melhor."*

Tim Bernardes – O Terno

Resumo

Os complexos de rutênio (II) e (III) têm atraído o interesse da comunidade científica como potenciais medicamentos antitumorais, graças à sua baixa toxicidade e capacidade de superar a resistência aos medicamentos. Embora os metalofármacos de Ru exibam atividade antitumoral em ambos os estados de oxidação, é provável que o íon metálico de Ru (III) seja reduzido a Ru (II) *in vivo*. Dessa forma, os complexos de Ru (III) atuariam como um pró-fármaco, que é ativado por redução *in vivo* para se ligar de forma mais eficiente ao alvo biológico. Neste sentido os compostos de rutênio (III) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})(\text{pyz})]^{3+}$ e os icônicos: rutenato de trans-tetracloro (dimetilsulfóxido) imidazol (III) $[\text{Im}]\text{trans}-[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]$ (NAMI-A) e rutenato de trans-[tetraclorobis (1H-indazol) (III)] $[\text{IndH}]\text{trans}-[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]$ (KP1019), foram investigados no presente trabalho graças à suas atividades antineoplásica. Acredita-se que no mecanismo associado a esses complexos de Ru (III), a ativação por redução e troca de ligantes de cloreto por moléculas de água do solvente (hidrólise ou aquação) sejam duas etapas importantes para a função antitumoral de tais metalofármacos. Com base em observações experimentais, três eventos estão conectados à atividade biológica de tais complexos: i) Redução do centro Ru (III), (ii) reação de troca de cloretos com moléculas de água do meio solvente e (iii) interação com os alvos biológicos. A sequência dos eventos dependerá da cinética dessas reações e também do potencial de redução das espécies, da concentração de cloretos e da estabilidade termodinâmica dos complexos formados. Neste trabalho, empregamos a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), no nível TPSSh/Def2-TZVP, em combinação com o modelo de solvatação por SMD, para investigar a eletroquímica do NAMI-A, KP1019 e seus produtos de hidrólise, bem como a termodinâmica de suas interações com moléculas biológicas do doador S (cistina (Cys), glutathiona (GSH)) e do doador N (guanina nos locais de coordenação N3 e N7). Nossos resultados mostram que os compostos exibem comportamento eletroquímico diferente após a hidrólise. Enquanto o potencial de redução do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{3+}$ e NAMI-A são sensíveis a troca de ligantes, aumentando até 0,8 V para o último complexo após a hidrólise, o potencial de redução do KP1019 permanece quase constante após a primeira hidrólise. Todos os complexos estudados têm preferência termodinâmica a ser reduzida antes da hidrólise e o NAMI-A e KP1019 apresentam forte preferência por hidrólise sucessiva em vez de interagir com os ligantes S-doador e N-doador. A interação com ligantes S-doador na forma desprotonada é altamente desfavorável, com a energia livre em solução ($\Delta G_{\text{sol}} \geq 18 \text{ kcal mol}^{-1}$). Para ambos os complexos,

a interação com a guanina e a glutatona é da mesma magnitude ($\Delta G_{\text{sol}} = 0,6 \text{ kcal mol}^{-1}$), o que significa que esses ligantes podem competir pela ligação ao metalofármacos. Em contraste com os complexos apresentados acima, a variação da energia de Gibbs em fase gás é energeticamente favorável praticamente a todos os adutos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$, exceto para o aduto de Ru-GN3. A reação de troca de ligantes $\text{H}_2\text{O}/\text{NO}$ do complexo NAMI- H_2O com o NO foi investigada no nível de teoria B3LYP/DEF2-TZVP e também por meio do uso de cálculos multiconfiguracionais como o CASSCF. Nossos resultados mostraram que mecanismo se passa por um reagente e estado de transição tripleto e a formação de um produto singleto. As energias eletrônicas de ativação e do processo reacional corrigidas apresentam valores de 7,53 e 30 kcal mol^{-1} respectivamente. As transições entre os estados de *spin* foram estudadas por meio de MECP's (ponto mínimo onde duas superfícies de energia potencial se cruzam) obtidos no nível B3LYP/def2-TZVP de teoria. Foi possível observar que o cruzamento entre sistemas com consequente acoplamento dos spins eletrônicos deve acontecer no ponto do MECP-III, em que concomitantemente haverá a transferência de carga $\text{NO} \rightarrow \text{Ru}$ e a formação do produto de configuração $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+]$.

Palavras Chaves: Complexos de Rutênio; Complexos antitumorais; NAMI-A; KP1019 e DFT

Abstract

Ruthenium (II and III) Complexes have attracted the interest of the scientific community as potential antitumor drugs, due to their low toxicity and ability to overcome drug resistance. Although Ru metallodrugs exhibit antitumor activity in both oxidation states, metal Ru(III) ion will likely reduce to Ru (II) *in vivo*. Thus, Ru (III) complexes would act as a prodrug, which is activated by reduction *in vivo* to bind more efficiently the biological target. Thus ruthenium (III) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})(\text{pyz})]^{3+}$ compounds and the iconic: trans-tetrachloro (dimethylsulfoxide) imidazole ruthenate(III) $[\text{Im}]\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]$ (NAMI-A) and trans-[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate(III) $[\text{IndH}]\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]$ (KP1019), were investigated in the present study due to their antineoplastic activities. This mechanism associated with the Ru (III) complexes, are activated by reduction and chloride ligands exchange by water molecules in the solvent (hydrolysis or aquation), have two important steps for anti-tumor function of such metallodrugs. Based on experimental observations, three events are connected to the biological activity of such compounds: i) reduction of the Ru (III) center, (ii) reaction of exchange chloride with water molecules of the solvent medium and (iii) interaction of the targets biological. The sequence of the events will depend, on the reactions kinetics and also on species potential reduction, chloride concentration and thermodynamic stability of the complexes formed. Density Functional Theory (DFT) calculations, at the TPSSh/Def2-TZVP level, in combination with the SMD continuum solvation model, were performed to investigate the electrochemistry and their hydrolysis products as well as the thermodynamics of biological molecules interactions with S-donor (cystine (Cys), glutathione (GSH)) and N-donor (guanine at the coordination sites N3 and N7). Our results show that the compounds exhibit different electrochemical behavior upon hydrolysis. While the reduction potential of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{3+}$ and NAMI-A are sensitive to ligand exchange. NAMI-A complex increases to 0.8V after hydrolysis and the reduction potential of KP1019 remains almost constant after the first hydrolysis. The NAMI-A and KP1019 complexes have thermodynamic preference to reduce before undergoing hydrolysis and strong preference to undergo successive hydrolysis rather than interacting with donor S and donor N ligands. Interaction with S-donor ligands in the unprotonated form is highly unfavorable, with the free energy in solution ($\Delta G_{\text{sol}} \geq 18 \text{ kcal mol}^{-1}$). For both complexes, the interaction with the guanine and glutathione are of the same magnitude (ΔG_{sol} ca. $-0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) meaning that these ligands can compete for binding to the metallodrug. In contrast to the complexes presented above, the Gibbs variation energy in gas phase is energetically favorable to virtually all adducts. The H₂O/NO ligand exchange reaction of the NAMI-H₂O complex with NO was investigated at the B3LYP/DEF2-TZVP theory level and will through the use of multiconfigurational calculations such as CASSCF. Our

results showed that mechanism goes through a triple reactant and transition state and the singlet product formation. The corrected electronic energies present values respectively by 7.53 and 30 kcal mol⁻¹. The transitions between spin states have studied by MECP's obtained at the B3LYP / def2-TZVP level of theory. It was observed that the intersection between systems with consequent coupling of electronic spins must happen at the point of MECP-III, where concomitantly there will be NO → Ru charge transfer and configuration product formation [Ru^{II}NO⁺].

Keywords: Ruthenium Complex, Antitumoral Complexes, NAMI-A, KP1019 and DFT.

Lista de Figuras

Figura 1.1 Dados do Ministério da Saúde sobre as doenças que mais causaram óbitos no Brasil em 2018 [1].	21
Figura 1.2. Dados do INCA sobre os novos casos de câncer no Brasil entre os homens e mulheres [5].	22
Figura 1.3. Estrutura química dos compostos NAMI-A (A) e KP1019 (B).	28
Figura 2.1 Representação esquemática dos orbitais na metodologia CASSCF.	61
Figura 2.2 Cavidades ocupadas pelos átomos e superfícies SAS e SES, onde esta última é construída por uma molécula de prova. Adaptado da Ref. 2.	64
Figura 3.1. Representação esquemática dos possíveis caminhos de reação biológica competitiva para o complexo NAMI-A (1). Na via (A) NAMI-A inicialmente sofre reação de deslocamento do ligante gerando a espécie monoaquo-Ru(III) 1A, que é posteriormente reduzida à espécie monoaquo-Ru(II) 2. Na via (B) o composto é inicialmente reduzido gerando o complexo Ru(II) 1B e sofre reação de troca de ligante com água, gerando o complexo monoaquo 2. Após a geração do complexo 2, ele pode ser hidrolisado consecutivamente pela via (C) ou interagir com os alvos biológicos L na via (D), gerando o aduto 3. Há ainda a possibilidade da interação com alvo biológico ocorrer após a segunda aquação, como é mostrado pela via D'.	71
Figura 3.2 Espécies metálicas otimizadas no nível TPSSh/def2-TZVP. Na figura (a) é mostrada a estrutura do KP1019 antes da aquação, (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>trans</i> .	75
Figura 3.3 Espécies metálicas otimizadas nível TPSSh/def2-TZVP (a) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>cis</i> e (b) após a terceira aquação.	76
Figura 3.4 Quebra da interação Cl3-Ru-H2(a) através da rotação de 45° do grupo indazol acima do plano equatorial (b).	77
Figura 3.5 Espécies metálicas otimizadas nível TPSSh/def2-TZVP. Na figura (a) é mostrada a estrutura do NAMI-A antes da aquação, (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>cis</i> , (d) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>trans</i> e (e) após a terceira aquação.	78
Figura 3.6 Complexo metálico (a) <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (Pz)(Cl)] ²⁺ e (b) <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (Pz)(H ₂ O)] ³⁺ , obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP.	79
Figura 3.7 Orbitais LUMO para o complexo KP1019 (a) e seus respectivos produtos de aquações obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP. (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>cis</i> , (d) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>trans</i> e (e) após a terceira aquação.	82
Figura 3.8 Orientação dos orbitais LUMO para o complexo NAMI-A (a) e suas respectivas aquações obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP. (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituído na posição <i>cis</i> , (d) dois ligantes cloretos são substituído na posição <i>trans</i> e (e) após a terceira aquação.	83
Figura 3.9 Orbitais LUMO para o complexo NAMI-A (a) e seus respectivos produtos de aquações obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP. (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>cis</i> , (d) dois ligantes cloretos são substituídos na posição <i>trans</i> e (e) após a terceira aquação.	83
Figura 4.1 Estrutura dos alvos biológicos (a) guanina (nos sítios de coordenação N3 e N7), (b) cisteína (Cys) e (c) glutatona (GSH), estudados via reação com o complexo de rutênio.	94

Figura 4.2 Estruturas das formas reduzida GSH (A) e oxidada, GSSG (B), da Glutathiona existindo no pH fisiológico.....	95
Figura 4.3 Estruturas estendida (a) e circular (b) da GSH, utilizadas para no estudo de formação dos adutos de Ru-GSH.....	96
Figura 4.4 Representação esquemática dos possíveis caminhos de reação biológica competitiva para o complexo NAMI-A. Na via (E) NAMI-A inicialmente sofre reação de deslocamento do ligante gerando a espécie (1E) de monoaquo-Ru(III), que posteriormente interage com alvo biológico L, gerando o composto Ru ^{III} -L(2E). Na via (D') o composto já reduzido e hidrolisado pela segunda vez interage com os alvos biológicos L, gerando os adutos 3D' e 4D'.	98
Figura 4.5. Esquema do ciclo termodinâmico proposto para a descrição do processo de solvatação dos adultos. Onde L = cisteína (Cys), glutathiona (GSH), sítios GN7 e GN3 da guanina.	99
Figura 4.6 Representação esquemática das reações entre os complexos Ru(II)-monoaquo de NAMI-A com os sítios GN3 e GN7, CysH e GSH.....	100
Figura 4.7 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos [RuCl ₃ (DMSO)(Im)L] ⁻¹ com L = GN3 (a), GN7(b) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP.....	101
Figura 4.8 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos [RuCl ₃ (DMSO)(Im)L] ⁻¹ com L = Cys(a), GSH(b) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP.....	101
Figura 4.9 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos [RuCl ₃ (In) ₂ L]-1 com L = GN3 (a), GN7 (b) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP	104
Figura 4.10 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos [RuCl ₃ (In) ₂ L]-1 com L = GSH (a), CYS (b) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP	104
Figura 4.11 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos [RuCl ₃ (In) ₂ L]-1 com L = GSH-linear (a), GSH-circular (b) e CYS (c) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP	105
Figura 4.12 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos [Ru(NH ₃) ₄ (pz)L] ²⁺ com L = GN7 (a), (b) L= CYS utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP	109
Figura 4.13 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos [Ru(NH ₃) ₄ (pz)L] ²⁺ com L = GSH (estendida (a) e circular (b))	110
Figura 5.1 Micrografia óptica, espalhamento de raios-X (SA) e mapas de distribuição elementar de XRF de P, S, K, Cl, Fe, Cu, Zn e Ru de uma célula SH-SY5Y tratada com 200 μM KP1019 (A) e NAMI-A (B) durante 4 h. As densidades máximas da área são dadas em μgcm ⁻² para cada elemento. Retirada da referência [9].....	123
Figura 5.2 Diagrama de orbitais moleculares para a molécula NO. Adaptada Ref [42].	125
Figura 5.3 Principais modos principais de coordenação do NO ao centro metálico. (a) linear e (b) angular.....	126
Figura 5.4 Estruturas otimizadas: (a) NAMI-A; (b) NAMI-H ₂ O; (c) NAMI-NO singlete e (d) tripleto realizadas no nível B3LYP / DEF2-TZVP de teoria.	130
Figura 5.5 Possíveis rotas para a substituição da H ₂ O por NO no complexo NAMI-H ₂ O. Na via A, a reação segue uma curva de energia potencial exclusivamente singlete e na via B a troca de ligantes H ₂ O-NO é realizada na superfície de energia potencial tripleto.	132
Figura 5.6 Perfil de energia potencial para a reação de troca de ligantes H ₂ O-NO no estado de spin singlete. R1 refere-se ao reagente, TS ao estado de transição e P1 ao produto.	134
Figura 5.7 Perfil de energia potencial para a reação de troca de ligantes H ₂ O-NO no estado de spin tripleto. R2 refere-se ao reagente, TS2 ao estado de transição e P2 ao produto, todos no estado de spin tripleto.	136

Figura 5.8 Superfície de energia potencial singleto e tripleto para a reação de troca de ligante H ₂ O-NO calculado no nível B3LYP/def2-TZVP de teoria.	138
Figura 5.9 Perfil de energia potencial para a reação de troca de ligantes H ₂ O-NO corrigida via método SA-CASSCF/NEVPT2 (50% singleto + 50% tripleto). R2 refere-se ao reagente no estado tripleto, TS2 ao estado de transição no estado tripleto e P1 ao produto no estado no estado singleto	141
Figura 5.10 Orbitais CASSCF de fronteira otimizados (espaço ativo) para os reagentes e estado de transição mostrados no novo perfil de reação da Figura 5.9.....	142
Figura 5.11 Orbitais CASSCF de fronteira otimizados (espaço ativo) para os reagentes e estado de transição mostrados no novo perfil de reação da Figura 5.10.....	142
Figura 5.12 Orbitais CASSCF de fronteira otimizados (espaço ativo) para os produtos mostrados no novo perfil de reação da Figura 5.9.	143
Figura 5.13 Orbitais CASSCF de fronteira (espaço ativo) para o MECF-III. (a) orbital HOMO (b) orbital LUMO.....	144

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Valores das distâncias de ligação nos complexos $[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]^{1-}$, $[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]_1$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ e seus respectivos produtos de hidrólise obtidas no nível DFT ^a	74
Tabela 3.2 Variação do potencial de redução dos complexos em estudo com o número de aquações, obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP//SMD.....	80
Tabela 3.3 Energia livre de solvatação calculada para as reações de troca de ligantes envolvendo os ligantes de água e cloreto dos complexos NAMI-A e KP1019 em formas normais e reduzidas.*.....	85
Tabela 4.1 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-1}$ com L = Cys, GSH, GN7 e GN3 utilizando o funcional TPSSh e funções de def2-TZVP (Figuras 4.7 e 4.8).....	102
Tabela 4.2 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{L}]^{-1}$ com L = Cys, GSH, GN7 e GN3 utilizando o funcional TPSSh e funções de def2-TZVP (Figuras 4.9 e 4.10).....	106
Tabela 4.3 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos monoaquo-Ru(III)-L com L = Cys, GN7 e GN3 utilizando o funcional TPSSh e funções de def2-TZVP.....	107
Tabela 4.4 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$ com L = Cys, GSH, GN7 e GN3.	111
Tabela 4.5 Energia livre de Gibbs calculada (em kcal mol ⁻¹) para a reação dos complexos Ru(II)-monoquo (NAMII-H ₂ O, KP1019II-H ₂ O e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$) com a nucleobase de guanina nos locais N3 (GN3) e N7 (GN7), cisteína (CYSH) e glutatona (GSH).....	115
Tabela 4.6 Variação da energia livre de Gibbs em solução ($\Delta G(\text{solução})$)* para as reações de formação dos adutos com as espécies metálicas oxidadas.....	116
Tabela 4.7 Variação da energia livre de Gibbs de solução ($\Delta G(\text{solução})$)* para as reações de formação dos adutos entre os alvos biológicos GN3,GN7,CYS e as espécies metálicas di-hidrolisados obtidas no nível TPSSh/DEF2-TZVP//SMD de teoria.....	117
Tabela 5.1 Parâmetros estruturais dos complexos otimizados NAMI-A, NAMI-H ₂ O, NAMI-NO em estados singlete e tripleto no nível B3LYP/DEF2-TZVP em fase gasosa.....	131
Tabela 5.2 Energias CASSCF e SA-CASSCF (50% singlete e 50% tripleto) com correção NEVPT2 dos pontos estacionários dos caminhos de reação calculados pela DFT.*.....	140
Tabela 5.3 Desdobramento energético tripleto-singlete (ΔE_{t-s}) e constante de acoplamento spin-órbita (SOC) para estruturas localizadas na superfície de energia potencial tripleto como mostrada na Figura 5.9.	145

Abreviações:

CASSCF – *Complete Active Space Self-Consistent Field*

Cdk1 – *Cyclin-dependent kinase 1*

CGTO – *Contracted Gaussian Type Orbital*

COS – *Chain of Sphere*

COSMO – *Conductor-like Screening Model*

Cys – Cisteína

DFT – Teoria do funcional da densidade

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *deoxyribonucleic acid*

ECP – *Effective Core Potentials*

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

FCI – *FULL CI*

GGA – *Generalized Gradient Approximation*

GN3 – sítio N3 da guanina

GN7 – sítio N7 da guanina

GRP78 – Proteína imunoglobulina de ligação

GSH – Glutathiona

GSSG – Glutathiona dissulfeto

GTO – *Gaussian Type Atomic Orbital*

HF – *Método Hartree-Fock*

HOMO – *highest occupied molecular orbital*

HSTf – transferrina

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KP1019 – tetracloridobis(1H-indazol)rutenato(III)

KP1019II-H₂O - triclorobis(1H-indazol)aquarutênio(II)

LDA – *Local Density Approximation*

LUMO – *Lowest unoccupied molecular*

MC-SCF – *multiconfiguration self-consistent field*

MECP – *minimum energy crossing point*

MS – Ministério da Saúde

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAMI-A – *New Anti-tumour Metastasis Inhibitor-A*
NAMI-A^{II} – tricloroaqua(dimethylsulfoxido)imidazolrutênio(II)
NAMI-A-NO – [Ru(Cl)₃(Im)(DMSO)(NO)]
NAMIII-H₂O – tricloroaqua(dimethylsulfoxido)imidazolrutênio(II)
NAMIII-H₂O – [Ru(Cl)₃(Im)(DMSO)(H₂O)]
NA-TST – Teoria do estado de transição não-adiabática
NKP1339 – trans-[tetracloridobis (1H-indazole) rutenato de sódio (III)]
NO – óxido nítrico
NOS – NO sintase
NSCLC – *Non-small-cell lung carcinoma*
OM – *Orbital Molecular*
PCM – *Polarizable Continuum Model*
RE – retículo endoplasmático
RI – *Resolution of Identity*
RKS – *Restricted Kohn-Sham*
RuII-KP1019-2H₂O – cis-diclorobis(1H-indazol)aquarutênio(II)
RuII-KP1019-2H₂O – trans-diclorobis(1H-indazol)aquarutênio(II)
RuII-NAMI-2H₂O – cis-diclorodiaqua(dimethylsulfoxido)imidazolrutênio(II)
RuII-NAMI-2H₂O – trans-diclorodiaqua(dimethylsulfoxido)imidazolrutênio(II)
SAS – *Solvent Accessible Surface*
SCF – *Self-Consistent Field*
SES – *Solvent Excluded Surface*
SOC – *spin-orbit coupling*
SOMO – *singly occupied molecular orbital*
STO – *Slater Type Atomic Orbital*
TST – *Transition State Theory*
UKS – *unrestricted Kohn-Sham*
XANES – *X-ray Absorption Near Edge Structure*

Sumário

Capítulo 1 – Introdução.....	21
1.1 Propriedades Químicas e Bioquímicas dos Complexos de Rutênio Apropriadas Para Aplicações Biológicas	24
1.1.1 Substituição de Ligantes	24
1.1.2 Estado de Oxidação	25
1.1.3 Mimetização do Íon Ferro (III).....	26
1.2 Fármacos em Teste Clínico.....	28
1.3 Estudo computacional de sistemas com interesse biológico.....	30
1.4 Objetivos.....	31
1.5 Referências Bibliográficas.....	33
Capítulo 2 – Fundamentação Teórica.....	36
2.1 Fundamentos De Mecânica Quântica	36
2.2 Método de Hartree-Fock.....	38
2.4 Aproximação do Conjunto de Funções de Base	45
2.3 Teoria Do Funcional Densidade	50
2.7 Energia de correlação eletrônica.....	58
2.8 Métodos Multiconfiguracionais: CASSCF.....	60
2.6 O Modelo do Contínuo Polarizável [54-56]	62
2.7 Referências Bibliográficas	65
Capítulo 3 – Influência das reações de hidrólise no potencial de redução dos complexos de rutênio... 68	
3.1 Introdução	68
.....	71
3.2 Metodologia Teórica.....	71
3.3 Resultados e discussão.....	73
3.3.1 Resultados Estruturais.....	73
3.3.2 Cálculo dos potenciais de redução.....	80
3.4 Conclusão	87
3.5 Referências Bibliográficas.....	89
Capítulo 4 – Interações dos complexos NAMI-A KP1019 e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})(\text{Pz})]^{2+}$ com biomoléculas e nucleobase do DNA	
4.1 Introdução	92

4.2 Metodologia Teórica.....	98
4.3 Resultados Estruturais.....	100
4.3.1 Detalhes Geométricos	100
4.3.2 Interações com alvos biológicos	112
4.4 Conclusão	118
4.4 Referências Bibliográficas	120
Capítulo 5 – Entendendo a Estrutura Eletrônica e a Natureza dos Mecanismos de Interação do Óxido Nítrico com NAMI-A.....	122
5.1 Introdução	122
5.1.1. Uma breve apresentação do óxido nítrico – NO – sua química de coordenação e reatividade de complexos nitrosilados de rutênio.....	124
5.2 Metodologia Teórica.....	128
5.3 Resultados e Discussão.....	129
5.3.1 Resultados geométricos	129
5.3.2 Estados de transição, reatividade	131
5.3.3 CASSCF	138
5.3.4 Cruzamento entre sistemas e MECP.....	144
5.3.5 Conclusão.....	146
5.4 Referências Bibliográficas	147
Capítulo 6 – Comentários finais e perspectivas.....	151

Capítulo 1 – Introdução

O perfil das doenças que mais matam no Brasil está se modificando ao longo das últimas décadas, segundo o Ministério da Saúde (MS). Enquanto na década de 30, as doenças infecciosas e parasitárias eram as responsáveis pela maior taxa de mortalidade no país (cerca de 46%), hoje as doenças que mais matam estão associadas ao estilo de vida contemporâneo. Dentre as principais patologias “modernas”, o câncer apresenta um percentual importante de causas de morte no Brasil, ((24%) segundo MS) ocupando o segundo lugar, como mostra a Figura 1.1, ficando atrás apenas de doenças cardíacas [1].

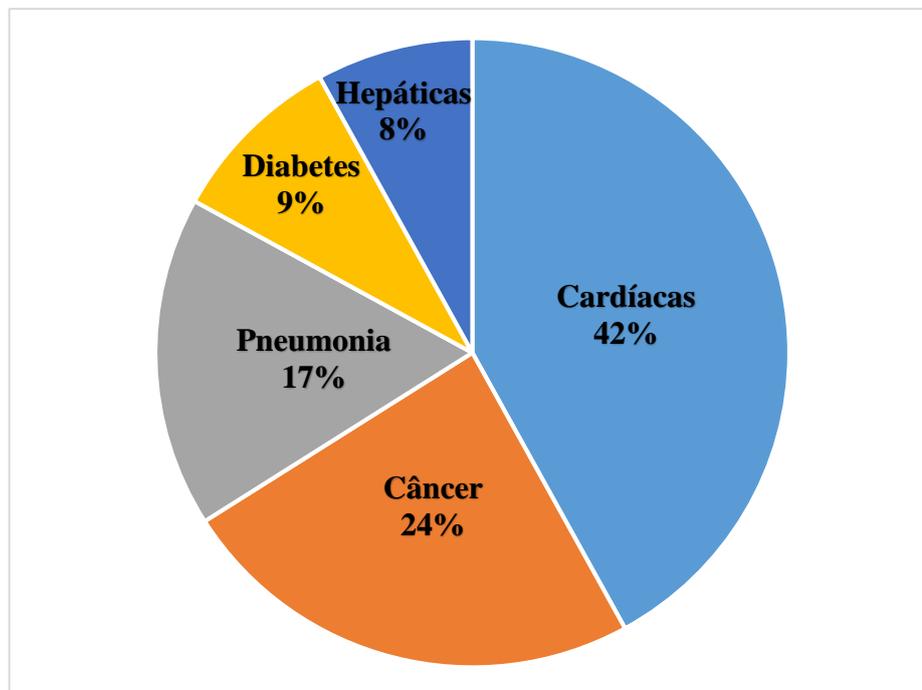


Figura 1.1 Dados do Ministério da Saúde sobre as doenças que mais causaram óbitos no Brasil em 2018 [1].

O câncer pode ser definido como sendo uma lesão constituída pela proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, em geral com perda ou redução da diferenciação celular, em consequência de alteração nos genes que regulam o crescimento e diferenciação. Além disso, possuem crescimento rápido do tipo infiltrativo, pois não apresentam uma cápsula de tecido conjuntivo delimitando a área de proliferação celular desordenado [2,3].

Segundo a Agência Internacional para pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) estima-se que os casos globais do câncer tenham aumentado para 18,1 milhões e

9,6 milhões de mortes em 2018. Um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres em todo o mundo desenvolvem câncer durante sua vida, e um em cada oito homens e uma em cada 11 mulheres morrem [4]. A Figura 1.2 mostra os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para o ano de 2018 por sexo [5]. Como pode ser observado, o perfil de incidência do câncer entre os sexos é muito variado necessitando de estratégias terapêuticas mais apropriadas e eficazes.

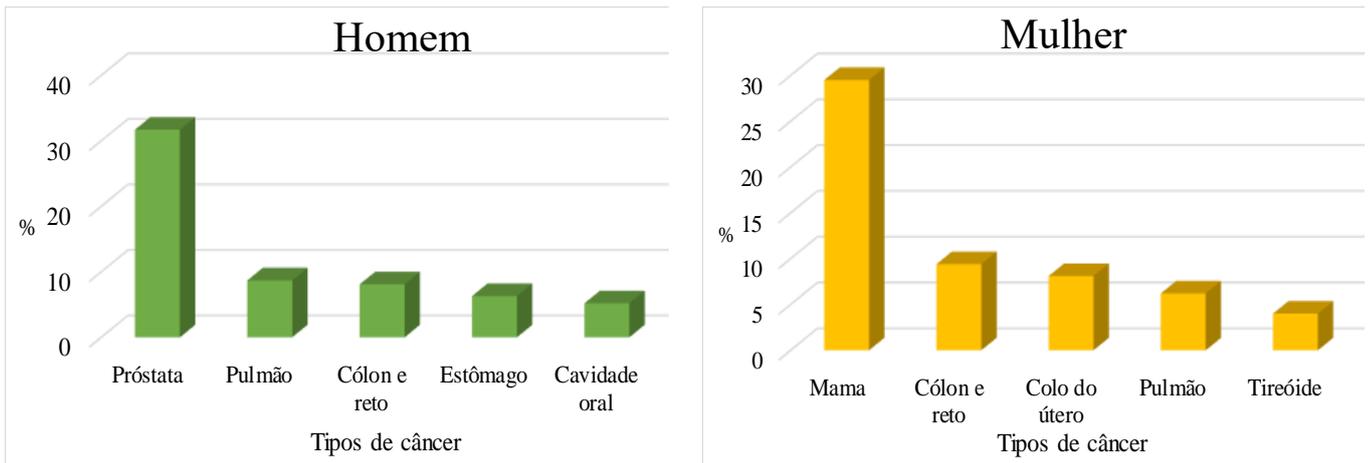


Figura 1.2. Dados do INCA sobre os novos casos de câncer no Brasil entre os homens e mulheres [5].

Diante do impacto que os fatores relacionados acima têm na população, muitos são os esforços para encontrar formas eficazes de combater a doença. Por exemplo, técnicas mais seguras e eficientes para diagnósticos rápidos; formas alternativas de tratamento e, por último, síntese de novos agentes antitumorais e testes biológicos. Um dos principais motivos de falha no tratamento contra o câncer está relacionado à metástase de tumores sólidos, dessa maneira a quimioterapia a base de fármacos sintéticos ainda é considerada a melhor escolha e, do ponto de vista terapêutico, o desenvolvimento de novos compostos dotados de uma atividade anti-metastática específica é um tema de grande importância. Nesse sentido, foram desenvolvidos vários complexos de platina com atividade antitumoral, os quais são ainda hoje os agentes mais eficientes para o tratamento de alguns tipos de câncer[6-10]. Contudo, semelhantemente a outros fármacos, medicamentos a base de platina apresentam vários efeitos colaterais, como a resistência intrínseca ou adquirida e toxicidade, limitando a sua aplicação [11,12].

Muitos tem sido os esforços no sentido de desenvolver novos compostos antitumorais à base de metais para melhorar a eficácia clínica, reduzir a toxicidade geral e para ampliar o espectro de atividade. Isto porque os íons metálicos exibem vários números de coordenação e várias geometrias associadas, permitindo assim distribuir os ligantes espacialmente de modo a atingir melhor o alvo pretendido [13-15]. Além disso, esta abordagem oferece vantagem de possíveis sinergismos de

fragmentos metálicos/orgânicos. A atividade biológica de um fármaco orgânico pode ser aprimorada, mascarando-a após a coordenação de um íon metálico e, portanto, estendendo seu tempo de residência no organismo, permitindo alcançar alvos biológicos de forma mais eficiente [13,14]. Outro fator importante é que a complexação ao metal pode diminuir sua toxicidade através do transporte direcionado para o local de ação específico.

Dentre as novas possibilidades de metalofármacos, complexos de rutênio tem se destacado graças à sua baixa toxicidade e capacidade de superação da resistência do fármaco. Outras vantagens são: métodos confiáveis para sintetizar complexos estáveis com estruturas previsíveis; capacidade de ter múltiplas ações *in vivo* e *in vitro* que podem ser modificados e/ou moduladas pela troca de ligantes; vários estados de oxidação acessíveis e um conhecimento crescente dos efeitos biológicos dos complexos de rutênio [16]. Para exemplificar a ação biológica de tais compostos, podemos citar a redução de metástases de tumores pulmonares [17-20], a diminuição da ocorrência de infartos, a inibição da proliferação de linhagens de células cancerígenas no câncer de colo retal, sua habilidade em se coordenar a biomoléculas importantes, o DNA [21] e algumas proteínas do plasma sanguíneo que exercem função transportadora no organismo, como a albumina [21,22] e transferrina [21].

O rutênio (Ru) é um metal de número atômico 44 e está situado no bloco d, oitavo grupo e no quinto período da Tabela Periódica. Sua descoberta data de 1844, quando o químico russo Karl Karlovitch Klaus analisava resíduos de platina. Em homenagem a sua terra natal, Klaus deu o nome de ruthenia (do latim Rússia) ao novo metal. Na natureza, é encontrado nos minerais laurita, RuS_2 , e em pequenas quantidades na pentlandita, $(\text{Fe, Ni})_9\text{S}_8$, geralmente junto com outros elementos do grupo da platina. Os estados de oxidação mais comuns do rutênio são +2, +3 e +4, apesar de ser possível encontrar compostos desse metal cujo número de oxidação varia de -2 a +8, como, por exemplo, o tetróxido de rutênio, RuO_4 [23,24].

Compostos de rutênio com ligantes nitrogenados apresentam uma vasta gama de aplicações em processos de grande interesse para a bioquímica e farmacologia. Como exemplo podemos citar a aplicação de complexos de rutênio como agentes antitumorais [25], compostos que atuam como imunossupressores [26], radiofármacos [27], compostos envolvidos em terapia fotodinâmica, compostos que atuam na liberação controlada de óxido nítrico no organismo, que por sua vez está envolvido em uma série de processos fisiológicos importantes [28]. Devido à grande energia de estabilização do campo ligante, complexos de rutênio, em seus estados de oxidação mais comuns (Ru(II), Ru(III) e Ru(IV)), apresentam estruturas octaédricas em solução aquosa.

Uma vasta gama de compostos de rutênio foi sintetizada e testada quanto às suas propriedades antitumorais. A maioria destes compostos, independente dos ligantes, demonstraram citotoxicidade relativamente baixa e são menos tóxicos do que a cisplatina, necessitando de uma dose terapêutica

mais elevada. Esse baixo potencial citotóxico pode contribuir para aumentar a expectativa de vida do portador da doença.

A possibilidade de obtenção de novos compostos com potencial quimioterapêutico é suportada por observações de que os compostos de rutênio poderiam interagir com células tumorais melhor do que com os tecidos normais. Esta interação se deve às características químicas dos íons de rutênio que podem conferir uma maior seletividade quando comparada com outros compostos clínicos como a cisplatina. Assim, os compostos à base de rutênio representam um caminho para a introdução de uma nova classe de fármacos antitumorais dotadas com um grande potencial para o tratamento de tumores [16,28,29].

1.1 Propriedades Químicas e Bioquímicas dos Complexos de Rutênio Apropriadas Para Aplicações Biológicas

Os complexos de rutênio apresentam três aspectos importantes que os tornam adequados para uso médico, são elas: (1) Substituição de ligantes; (2) diferentes estados de oxidação acessíveis e (3) habilidades do rutênio em mimetizar o íon ferro na coordenação com certas moléculas biológicas [29-31].

1.1.1 Substituição de Ligantes

Reações de troca de ligante é um importante e determinante fator para a atividade antitumoral, pois fármacos metálicos sofrem modificações ao atingir o alvo biológico, seja por interações com macromoléculas e proteínas ou com pequenos doadores de enxofre e a água presente no organismo. Além disso, é necessário que o fármaco permaneça em sua forma ativa um tempo suficiente para completar sua ação e ser eliminada do corpo. Como a reação de troca de ligante é dependente da concentração destes ao redor do complexo, doenças que alteram diretamente essas concentrações nas células ou tecido vizinho podem ter efeitos na atividade do fármaco.

Uma provável explicação para a ação antitumoral de composto de platina é a cinética de troca de ligantes, que pode variar de minutos a dias, ao contrário de outros compostos de coordenação, cuja troca de ligantes ocorrem em microssegundos ou segundos. Desta maneira, os complexos de platina possuem alta estabilidade cinética e previne reações de equilíbrio rápido [30]. A cinética de troca de ligantes em complexos de rutênio é comparável ao de platina, isto é, ocorre em uma faixa de 10^{-2} a 10^3 s^{-1} . Dessa maneira é possível conferir aos complexos alta estabilidade cinética e prevenir reações de equilíbrio rápido [30,31,56]. A modulação dos ligantes pode interferir na cinética do complexo para permitir um melhor controle da sua estabilidade.

Compostos de coordenação Ru têm uma maior labilidade em comparação aos compostos de Pt com a mesma esfera de coordenação, e isso marca uma diferença relevante. De fato, os processos de aquação relativamente rápidos e as reações de troca de ligantes dos compostos de Ru produzem várias espécies que são capazes de reagir com uma variedade de componentes biológicos, tornando possível o desenho de fármacos em que o alvo biológico não seja apenas o DNA [32]. Porém, é extremamente difícil obter uma descrição satisfatória do modo de ação “verdadeiro” dos compostos de rutênio, pois o papel individual de cada espécie de rutênio deve ser identificado e caracterizado, bem como sua contribuição específica para o efeito biológico geral [32].

1.1.2 Estado de Oxidação

Rutênio é o único entre o grupo de metais de transição em que os estados de oxidação II, III, IV são todos acessíveis em condições fisiológicas [16,31,33-35]. Esta é uma característica particularmente importante porque permite o desenho de fármacos que são ativas apenas no alvo biológico e também pode prevenir reações paralelas. Nestes estados, o centro metálico é predominantemente hexacoordenado, com geometria octaédrica. Portanto, o modo de coordenação com o DNA é diferente do observado com a Pt (II). O ambiente de coordenação ao redor do rutênio desempenha um importante papel na estabilização desses diferentes estados de oxidação e, portanto, determinam a propriedade redox do íon metálico central [36-38]. Apesar de os compostos com íon metálico Ru tanto no seu estado de oxidação II quanto como no III apresentarem atividade antitumoral, é provável que o íon metálico Ru (III) seja reduzido para Ru (II) *in vivo*. Dessa maneira, os complexos de Ru (III) atuam como pró-fármacos ativadas por redução *in vivo*, em tumores sólidos, para se ligar com maior eficiência ao alvo biológico [16,29,33-35]. Pró-fármacos são substâncias químicas que sofrem transformações no meio biológico, com o objetivo de tornar-se um fármaco ativa.

No sistema biológico, a redução de Ru (III) e Ru (IV) é favorecida pela glutatona, ascorbato e proteínas transportadoras de elétrons, porém, esse processo pode ser revertido na presença de oxigênio molecular e pela citocromo oxidase. O processo de redução parece ser mais eficaz em tecidos tumorais hipóxicos, ou seja, com baixa concentração de O_2 [34,39]. Isso ocorre graças à alteração do metabolismo em células cancerígenas de tumores sólidos, devido ao aumento no consumo de nutrientes. Por esse motivo, essas células realizam glicólise anaeróbica para obter energia, gerando ácido láctico e conseqüentemente diminuindo o pH do meio intracelular. Como resultado há uma diminuição do potencial eletroquímico relativo dentro das células tumorais, em relação às células saudáveis, favorecendo a redução do Ru(III) para Ru (II) [39]. Outro fator que

favorece a redução do íon Ru(III) é a maior concentração de glutatona em células tumorais. A “ativação por redução” é uma das propostas de mecanismo de ação desses fármacos. Em teoria, se o complexo ativo de Ru (II) deixar a condição aneróbica, ele será novamente convertido no composto mais inerte Ru (III) por uma variedade de oxidantes biológicos[31].

1.1.3 Mimetização do Íon Ferro (III)

Fármacos a base de rutênio são menos tóxicos quando comparados aos complexos de platina, devido a capacidade do rutênio em imitar o ferro em sua coordenação com biomoléculas, tais como a transferrina e a albumina. Dessa maneira, os metalofármacos à base de rutênio podem ser transportados e liberados de forma seletiva em células tumorais. Transferrina é uma glicoproteína de massa molecular aproximadamente de 80 kDa. Ela é encontrada no plasma sanguíneo com uma concentração aproximadamente 2,5 g/L. Essa é responsável pelo transporte e solubilização do íon Fe(III) no plasma, assim como a albumina [40]. A liberação do íon é induzida pela diminuição do pH que deve promover a protonação do anel imidazólico e/ou induzir mudanças na disposição das interações de hidrogênio intramolecular entre lisinas no N-lobúlo[40].

Em condições fisiológicas, a transferrina circula no sangue com cerca de 30% de saturação de Fe(III) e há, portanto sítios disponíveis para transportar outros íons metálicos trivalentes. Compostos de Rutênio com ligantes nitrogenados do tipo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, *trans*- $[\text{Ru}(\text{Cl})_4(\text{Imidazol})_2]^-$ e *trans* $[\text{Ru}(\text{Cl})_4(\text{DMSO})(\text{Imidazol})]^-$, se ligam prontamente à nitrogênios imidazólicos de resíduos histidil acessíveis na superfície de algumas proteínas. No entanto, ambas as cinéticas de equilíbrio de associação e liberação de rutênio são altamente dependentes do complexo envolvido [42-45].

Células tumorais requerem maior quantidade de nutrientes, que pode ser suprida pela angiogênese, que promove um aumento do fluxo sanguíneo resultando em uma maior captação de nutrientes. Além disso, células cancerosas se dividem mais rapidamente que as células saudáveis, necessitando, portanto, de uma maior quantidade de íons ferro. Como resultado, há um aumento na regulação do número de receptores de transferrina na superfície celular e assim potencializando o sequestro de transferrinas circulantes. Estudos *in vivo* com o complexo $^{103}\text{RuCl}_3$ tem mostrado um aumento na concentração de ^{103}Ru no interior de células cancerígenas quando comparadas com células normais, indicando uma captação específica desse metal [46]. No interior das células tumorais ou dos endossomos, o baixo pH e o potencial de redução do complexo transferrina-Ru (III/II) acessível em condições fisiológicas favorecem a liberação de compostos de rutênio dos sítios de ligação da proteína.

Apesar das generalizações feitas neste tópico ter sido repetida em diversos trabalhos na literatura acerca dos metalofármacos a base de rutênio, é importante ter uma visão crítica do ponto de vista químico sobre tais generalizações. Segundo a mais recente organização da tabela periódica os elementos são organizados em grupos por possuírem propriedades semelhantes. Dessa forma, propagou-se a ideia de que, sendo o ferro e o rutênio elementos do mesmo grupo, então a aparente baixa toxicidade de compostos de rutênio derivaria do fato de que o “metabolismo” do rutênio em sistemas biológicos seria o mesmo do ferro[47].

No entanto, é sabido que a química do ferro é bastante diferente e envolve variações da relação carga/raio e estabilidade de spin que é modulada pelos ligantes na esfera de coordenação do íon Fe(II) e Fe(III). Já o rutênio, predomina na condição de distribuição eletrônica de spin baixo, portanto, apresenta um valor praticamente fixo de raio para cada estado de oxidação [14]. Outro fator importante é que o rutênio apresenta um raio maior comparado ao ferro. Por esse motivo ele torna-se um ácido mais mole do que o ferro, impactando significativamente sua reatividade. Portanto, não é adequado justificar um estudo de complexo de rutênio com base na ideia de que suas propriedades, no que diz respeito à atividade biológica e citotoxicidade, decorrem de sua semelhança com o ferro.

Em relação ao fato de o rutênio ser o único entre o grupo de metais de transição em que os estados de oxidação II, III, IV serem todos acessíveis em condições fisiológicas é uma descoberta importante [48]. Porém, assumir que as propriedades redox observadas *in vitro* possam ser estritamente reproduzidas para a química redox *in vivo* é imprudente, por mais que seja conveniente. Isto porque a única situação na qual os valores de potenciais redox observados poderiam se manter alinhados seria para casos onde os complexos são inertes, mesmo com a diversidade de moléculas biológicas, como proteínas e soluções aquosas presentes nos organismos vivos.

Outra ideia que também tem sido cultivada ao longo dos anos é a de que a transferrina poderia atuar como um transportador seletivo de fármacos de rutênio para tecidos cancerígenos. O problema é que além de tal ideia não ter sido comprovada, evidências experimentais sugerem que os adutos de transferrina com esses compostos de rutênio não são os principais adutos formados no sangue após sua injeção. No caso do KP1019, verificou-se que a porcentagem de complexo associado à transferrina é - na melhor das hipóteses - apenas uma fração muito pequena do total administrado[49-53]. Experimentos *in vitro* mostraram também que, quando se incubava células com transferrina (HSTf) previamente carregada com KP1019 - um complexo antitumoral que será abordado na próxima sessão - sua internalização diminuiu em comparação com a incubação com o complexo em solução. Esse fato sugere que, embora a ligação da HSTf com o complexo de rutênio ocorra, é possível que o aduto formado não tenha a conformação correta para interagir com os receptores celulares [47]. Novamente a mimetização do rutênio o com o ferro é questionada, pois HSTf é conhecida justamente por ser transportadora de ferro e outros metais para as células.

1.2 Fármacos em Teste Clínico

Existem atualmente dois compostos antitumorais de rutênio(III) que estão sendo avaliados em fase clínica, graças a sua ampla atividade anti-neoplásica. São eles: o (*trans*-tetraclorido(dimethylsulfoxido)imidazolrutenato(III)([Im]trans-[RuCl₄(Im)(DMSO)]⁻¹), conhecido como *New Anti-tumour Metastasis Inhibitor-A (NAMI-A)*, em que Im é o ligante imidazol e A é porque trata-se do primeiro da série [54]. O outro complexo é o *trans*-[tetracloridobis(1*H*-indazol)rutenato(III)] ([IndH]trans-[RuCl₄(Ind)₂]⁻¹), conhecido por KP1019. As estruturas de ambos os fármacos são mostradas na figura 1.3.

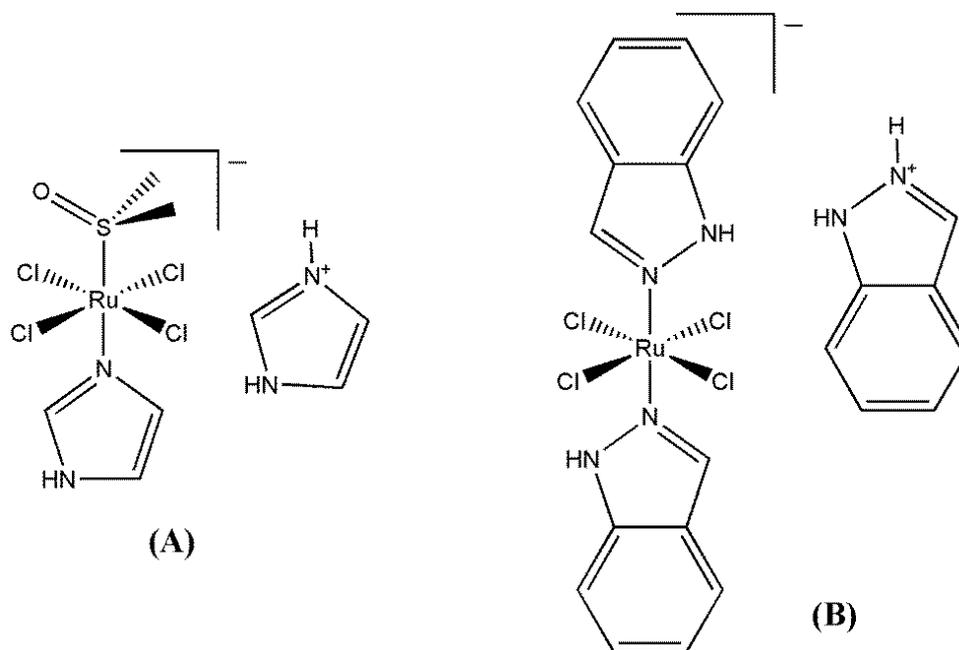


Figura 1.3. Estrutura química dos compostos NAMI-A (A) e KP1019 (B).

Apesar de sua aparente relação estrutural, emergem perfis biológicos e farmacológicos profundamente distintos. O NAMI-A é capaz de inibir, de forma eficaz, o desenvolvimento e crescimento de metástases pulmonares em modelos experimentais de tumores sólidos *in vivo* [54], enquanto que o KP1019 apresenta atividade citotóxica por indução de apoptose em uma grande linhagem de células cancerígenas, especialmente tumores colorretais [55]. Ambos complexos são considerados como promissores agentes antitumorais. No entanto, há ainda um conhecimento limitado em relação à maneira como o complexo metálico penetra na célula tumoral e o quanto é inativado.

Em relação ao NAMI-A, acredita-se que sua ação se passa por três etapas, são elas: (1) interação com o ciclo de regulação celular, resultando em acúmulo transiente de células em fase de divisão celular G2/M; (2) inibição de matriz de metaloproteinases; (3) aumento da matriz extracelular em torno da vasculatura do tumor, evitando assim que as células neoplásicas invadam tecidos e sangue nas proximidades dos vasos e (4) ligação através de uma coordenação a ácidos nucleicos, causando a morte celular [46,56,57]. Estudos toxicológicos em cães e ratos revelaram um perfil de toxicidade aceitável. A meia-vida calculada foi de aproximadamente 18 h. A toxicidade foi observada em concentrações superiores a 50mg/kg /dia e em ratos que sobreviveriam foi revertida com 3 semanas após o fim do tratamento[58].

Em humanos, foi observado que a dose máxima recomendada é de 300mg/m²/dia, em caso de doses maiores há o aparecimento de bolhas doloridas nos pés e mãos [59]. Outros efeitos colaterais da NAMI-A incluído anemia, linfopenia, fadiga, anorexia, estomatite, edema periférico, alopecia, náuseas, diarreia, zumbido, entre outros. Anormalidades bioquímicas incluíram pequenas elevações de creatinina (todas reversíveis em menos de 3 semanas) e hiperbilirrubinemia. A maioria do fármaco no plasma foi ligada a proteína. Rutênio foi encontrado também acumulado nas células brancas do sangue, mas a sua acumulação não era diretamente proporcional à dose diária total de exposição ou NAMI-A [59].

Já o KP1019, acredita-se que sua ação antitumoral se deve a promoção de apoptose de várias linhagens celulares de câncer, através da interação com biomoléculas transportadoras de elétrons, despolarização da membrana mitocondrial e ativação de caspases-3, bem como para baixa modulação do fator anti-apoptótico Bcl-2[59]. *In vivo*, KP1019 revelou forte atividade citotóxica em tumores murinos transplantados, como o carcinoma do cólon MAC15A, que é um tipo de cancro com resistência a quimioterapia [59], além de tumores colorretais autóctones do rato se assemelham câncer de cólon humano em aparência histológica, progressão metastática, interações tumor-hospedeiro. A dose máxima tolerada não poderia ser alcançada mesmo quando KP1019 foi dada a 600 mg duas vezes por semana durante 3 semanas. A dose ideal para estudos de fase II foi fixada em 400 mg (dose fixa) nos dias 1, 4, 8, 11, 15, e 18 de um ciclo de 3 semanas, porém a solubilidade do fármaco é um fator limitante de sua aplicação[61]. Após a administração intravenosa, observou uma alta coordenação do KP1019 com as proteínas plasmáticas (principalmente albumina e em menor medida de transferrina).

NAMI-A e KP1019 formam no geral, um caso único e exemplar no campo da química inorgânica medicinal como promissores candidatos a fármacos anticâncer. Isso pode ser atestado pela quantidade considerável de estudos sobre suas respectivas características químico-biológicas e o fato de serem os únicos metalofármacos a serem introduzidos em estudos clínicos. Porém, os testes clínicos foram descontinuados após a conclusão da fase II, pois, apesar da baixa citotoxicidade nos testes *in vitro* e

in vivo em fase pré-clínica, o composto NAMI-A mostrou-se tóxico nas condições de realização dos testes em humanos [62]. É justo, no entanto, dizer que o NAMI-A contribuiu muito para aumentar o interesse em compostos metálicos anticancerígenos contendo metais diferentes de platina e - acima de tudo - para ampliar a abordagem racional para este campo. Dessa maneira, a lição aprendida com NAMI-A deve ser utilizada para a concepção de melhores agentes anticancerígenos de rutênio e para a preparação de moléculas contendo fragmentos de rutênio[32].

1.3 Estudo computacional de sistemas com interesse biológico

Apesar de muito progresso ter sido conseguido na síntese e caracterização de complexos metálicos de Ru(II)/Ru(III) existem vários aspectos da atividade antitumoral de compostos de rutênio que ainda estão em aberto. Como um exemplo disso, podemos citar o entendimento detalhado (fundamental) do efeito dos ligantes em torno da esfera de coordenação do metal na indução da atividade esperada e nos potenciais de redução, o efeito do meio solvente sobre a estabilidade, reatividade e propriedades espectroscópicas destes complexos, a seletividade na interação com as biomoléculas alvo do organismo como o DNA.

A química computacional se mostra uma ferramenta importante para, em conjunto com estudos experimentais, validar algumas propostas mecanísticas através do estudo isolado destes processos. Além disso, é possível extrair conhecimento da vasta quantidade de dados cada vez mais detalhados e alinhar tais dados a uma descrição analítica abrangente da função biológica com o objetivo de prever uma propriedade de interesse. Os fenômenos biológicos necessitam de uma compreensão precisa da multiplicidade de componentes que lhes dão origem e de uma concepção clara das interações dinâmicas entre os componentes individuais em todos os níveis de integração funcional.

O estudo teórico pode fornecer informações sobre as barreiras energéticas envolvidas nos processos de interação, complexo-biomolécula, investigar a natureza das interações Metal-Ligante (M-L), fornecer subsídios para se entender a influência eletrônica do metal e dos ligantes sobre o processo global, investigar a influência do meio solvente sobre a distribuição de produtos, estabilidades relativas, investigações espectroscópicas, investigar o efeito do meio sobre processos de transferência de carga Metal-Ligante e propriedades magnéticas, entre outras possibilidades.

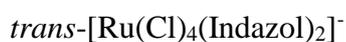
Sob um ponto de vista teórico, o estudo de processo reativo envolvendo compostos organometálicos e complexos metálicos em solução é hoje uma área de fronteira dentro da Química Teórica/Computacional. Estes processos apresentam inúmeros desafios e peculiaridades metodológicas, a saber:

- (a) A presença de metais de transição (que possuem elevado número atômico, orbitais *d, f* etc.) nestes compostos faz com que efeitos relativísticos (usualmente não levados em consideração no tratamento teórico de sistemas orgânicos), sejam devidamente tratados.
- (b) O sinergismo presente nas ligações M-L (doação e retrodoação de densidade eletrônica), requer o uso de métodos que levem em consideração efeitos de correlação eletrônica dinâmica, que demandam um elevado custo computacional.
- (c) O sinergismo presente nas ligações M-L também faz com que novas metodologias sejam desenvolvidas com o intuito de se quantificar efeitos comumente observados na química organometálica, como, por exemplo, efeito *cis* e efeito *trans* de ligantes.
- (d) Diferentes multiplicidades de spin que os sítios metálicos possam apresentar;
- (e) Como os processos de interesse neste projeto ocorrem em solução, metodologias devem ser aplicadas e/ou desenvolvidas com o intuito de avaliar o efeito do meio solvente sobre estes processos, o que no caso dos compostos de Rutênio e outros metais de transição, implicaria no desenvolvimento de potenciais de interação intermoleculares visando o estudo mecânico-estatístico (Monte Carlo ou Dinâmica Molecular) clássico ou através de dinâmica quântica (Carr-Parrinello).

1.4 Objetivos

A ideia central que norteou o presente trabalho foi o entendimento fundamental de como os efeitos eletrônicos e espaciais dos ligantes, bem como o efeito do solvente estão correlacionados com a atividade de compostos antitumorais de Ru(II)/Ru(III) utilizando mecânica quântica computacional. Acreditamos que este tipo de entendimento é de fundamental importância para o planejamento racional de novos fármacos a base de Rutênio. Muitos trabalhos teóricos importantes, nessa linha de pesquisa e citados neste trabalho, têm focado em estudos termodinâmicos envolvendo ativação e/ou redução de complexos metálicos. Este trabalho, por outro lado, está focado na avaliação termodinâmica dos modos de interação do íon metálico Ru(II)/Ru(III) com alvos biológicos que consideramos estratégicos para a atividade antitumoral dos complexos que foram analisados. Portanto, temos como metas:

- a) Avaliar o efeito da reação de substituição de cloretos por água (aquação) no potencial de redução dos complexos listados abaixo:



Tais complexos foram escolhidos por apresentarem interesse biológico, pois possuem atividades antitumorais e também pela simplicidade de suas estruturas, constituindo, portanto, como exemplos de modelos “simplificados” para a proposta de estudo.

b) descrever a termodinâmica de solvatação e interação de complexos de rutênio com os alvos biológicos cisteína (Cys), glutathiona (GSH) e guanina (nos sítios N3 e N7),

c) estudar o mecanismo de reação do NAMI-A com a molécula NO.

Esta Tese está organizada da seguinte maneira: No capítulo 2 as fundamentações teóricas utilizadas para a realização dos cálculos que se seguirão nos demais capítulos foram descritas. No capítulo 3, o comportamento eletroquímico dos complexos NAMI-A, KP1019 e *trans*-[Ru(NH₃)₃(Pz)(Cl)]²⁺, bem como dos seus produtos de hidrólise mais relevantes serão estimados. No capítulo 4 o processo de interação em solução dos complexos listados no item a com os alvos biológicos cisteína, glutathiona e guanina serão abordados. No capítulo 5, será explorado o mecanismo da nitrosilação do aduto monoaquo-NAMI-A.

1.5 Referências Bibliográficas

1. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/busca?searchword=Doen%C3%A7as%20que%20mais%20matam&searchphrase=all&limitstart=0>. Acessado em 22/05/19.
2. Bogliolo, L.; Brasileiro Filho, G. *Patologia*. 7ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **2006**.
3. Robbins, S. L.; Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. *Patologia: Bases Patológicas das doenças*. 7ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, **2005**.
4. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/PRGlococanFinal.pdf>. Acessado em 26/06/19.
5. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acessado em: 09/06/19
6. Pranczk, J.; Jacewicz, D.; Wyrzykowski, D.; Chmurzynski, L. *Curr. Pharm. Anal.* **10** (2014) 2.
7. Brabec, V.; Kasparkova, J. *Drug Resist. Update* **8** (2005) 131.
8. Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. *Dalton Trans.* **39** (2010) 8113.
9. Parel, M.; Ranchon, F.; Nosbaum, A.; You, B.; Vantard, N.; Schwiertz1, V.; Gourc, C.; Gauthier, N.; Guedat, M. –G.; He, S.; Kiouris, E.; Alloux, C.; Vial, T.; Trillet-Lenoir, V.; Freyer, G.; Berard, F.; Rioufol, C. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **15** (2014) 1.
10. Langer, C. J.; Novello, S.; Park, K.; Krzakowski, M.; Karp, D. D.; Mok, T.; Benner, R. J.; Scranton, J. R.; Olszanski, A. J.; Jassem, J. *J. Clin. Oncol.* **32** (2014) 2059.
11. Pluim, D.; van Waardenburg, R. C. A. M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54** (2004) 71.
12. Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **116** (2016) 3436.
13. Lazarević, T.; Rilak, A.; Bugarčić, Ž. D. (2017). *Eur. J. Med. Chem.* **142** (2017) 8.
14. Shriver, D. F.; Atkins, P. W. *Química Inorgânica*. 4ª ed. Bookman, Porto Alegre, **2008**.
15. Dupont, J. *Química Organometálica: Elementos do Bloco d*. 1ª ed. Bookman, Porto Alegre, **2005**.
16. Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **232** (2002) 69.
17. Leijen, S.; Burgers, S. A.; Baas, P.; Pluim, D.; Tibben, M.; van Werkhoven, E.; Alessio, E.; Sava, G.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. *Invest New Drugs.* **33** (2015) 201.
18. Sava, G., Clerici, K., Capozzi, I. et al. *Antic. Drug.* **10** (1999) 129.
19. Alessio, E.; Xu, Y.; Mestroni, G.; Quadrifoglio, F.; Viglino, P.; Marzilli, L. G. *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 7068.
20. Berger, M. R.; Garzon, F. T.; Keppler, B. K.; Schmahl, D. *Anticancer Res.* **9** (1989) 761.
21. Zhao, M; Clarke, M. J. *J. Biol. Inorg. Biochem.* **4** (1999) 318.
22. González-Vilchez, F.; Vilaplana, R.; Blasco, G.; Messori, L. *J. Biol. Biochem.* **71** (1998) 45.
23. Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the elements*. Pergamon, Oxford, **1993**.
24. Silva, P. P; Guerra, W. *Quím. Nova Escola* **2** (2012) 99.

25. Abid, M.; Shamsi, F.; Amir, A. *Mini-Rev. Med. Chem.* **16** (2016) 772.
26. Clarke, M.; Bailey, V. M.; Doan, P.; Hiller, C.; La Chance-Galand, K. J.; Daghljan, H.; Mandal, S.; Bastos, S.; Lang, D. *Inorg. Chem.* **35** (1996) 4896.
27. Hartmann, M.; Kepler, B. K. *Comm. Inorg. Chem.* **16** (1995) 339.
28. Clarke, M. J.; Gaul, J. B. *Struct. Bonding* **81** (1993) 147.
29. Antonarakis, E. S.; Emadi, A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66** (2010) 1.
30. Bloemink, M. J.; Reedijk, J. *Met. Ions Biol. Syst.* **32** (1996) 641.
31. Clarke, M. J.; Zhu F.; Frasca, D. R. *Chem. Rev.* **99** (1999) 2511.
32. Alessio, E.; Messori, L. *Molecules* **24** (2019) 1995.
33. Sava, G.; Gagliardi, R.; Bergamo, A.; Alessio, E.; Mestroni, G. *Anticancer Res.* **19** (1999) 969.
34. Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **236** (2003) 209.
35. Reisner, E.; Arion, V. B.; Fátima, M.; Da Silva, C. G.; Lichtenecker, R.; Eichinger, A.; Keppler, B. K.; Kukushkin, V. Y.; Pombeiro, A. J. L. *Inorg. Chem.* **43** (2004) 7083.
36. Yamada, H.; Koike, T.; Hurst, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2003) 12775.
37. Chakravarty, J.; Bhattacharya, S. *Polyhedron* **15** (1996) 1047.
38. Baitalik, S.; Adhikary, B. *Polyhedron* **16** (1997) 4073.
39. Bergamo, A.; Sava, G. *Dalton Trans.* **40** (2011) 7817.
40. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7^a ed. Artmed Editora, **2018**.
41. Antonarakis, E.; Emadi, A. *Cancer Chemoth. Pharma.* **66** (1997) 1.
42. Messori, L.; Vilchez, F. G.; Vilaplana, R.; Piccioli, F.; Alessio, E.; Keppler, B. *Met. Based Drugs* **7** (2000) 335.
43. Messori, L.; Orioli, P.; Vullo, D.; Alessio, E.; Iengo, E. *Eur. J. Biochem.* **267** (2000) 1206.
44. Bailey, V. M.; La Chance-Galang, K. J.; Doan, P. E.; Clarke, M. J. *Inorg. Chem.* **36** (1997) 1873.
45. Kuehn, C. G.; Taube, H. *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 689.
46. Bergamo, A.; Gagliardi, R.; Scarcia, V.; Furlani, A.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Sava, G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289** (1999) 559.
47. Nikolaou, Sofia; Da Silva, C. F. N. *Quím. Nova* **41** (2018) 833.
48. Blazevic, A.; Hummer, A. A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Filipits, M.; Cibin, G.; Keppler, B. K.; Rompel, A. *Sci. Rep.* **7** (2017) 40966.
49. Sulyok, M.; Hann, S.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Stingeder, G.; Koellensperger, G. *J. Anal. At. Spectrom.* **20** (2005) 856.
50. Groessl, M.; Hartinger, C. G.; Polec-Pawlak, K.; Jarosz, M.; Keppler, B. K. *Electrophoresis* **29** (2008) 2224.
51. Dömötör, O.; Hartinger, C. G.; Bytzeck, A. K.; Kiss, T.; Keppler, B. K.; Enyedy, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18** (2013) 9.

52. Śpiewak, K.; Brindell, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20** (2015) 695.
53. Pelillo, C.; Mollica, H.; Eble, J. A.; Grosche, J.; Herzog, L.; Codan, B.; Sava, G.; Bergamo, A. *J. Inorg. Biochem.* **160** (2016) 225.
54. Fricker, S. P.; Slade, E.; Powell, N. A.; Vaughan, O. J.; Henderson, G. R.; Murrer, B. A.; Megson, I. L.; Bisland, S. K.; Flitney, F. W. *British J. Pharm.* **122** (1997) 1441.
55. Hotze, A. C. G.; Velders, A. H.; Ugozzoli, F.; Biagini-Cingi, M.; Manotti-Lanfredi, A. M.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **39** (2000) 3838.
56. Zorzet, S.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Sorc, A.; Gava, B.; Alessio, E.; Lengo, E.; Sava, G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295** (2000) 927.
57. Vacca, A.; Bruno, M.; Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Ribatti, D.; Bergamo, A.; Garbisa, S.; Sartor, L.; Sava, G. *Br J Cancer* **86** (2002) 993.
58. Cocchietto, M.; Sava, G. *Pharmacol Toxicol*, **87** (2000) 193.
59. Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 3717.
60. Kapitza, S.; Jakupec, M. A.; Uhl, M.; Keppler, B. K.; Marian, B. *Cancer Lett.* **226** (2005) 115.
61. Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A. *Chem. Biodivers.* **5** (2008) 2140.
62. Alessio, E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017** (2017) 1549.

Capítulo 2 – Fundamentação Teórica

Neste capítulo serão mostradas algumas noções básicas de uma das mais poderosas e bem-sucedidas teorias científicas já desenvolvidas: a mecânica quântica. Além disso, serão discutidas brevemente as ferramentas teóricas utilizadas durante a construção dessa Tese. O objetivo desse capítulo não é ser completo em si, pois, os assuntos aqui abordados já foram discutidos com rigor em várias referências.

A química teórica pode ser pensada como uma base de modelos que descrevem os sistemas químicos de maneira quantitativa ou semiquantitativa. Nesse sentido, ela teve seu início com algumas ideias envolvendo valência e periodicidade, mas seu desenvolvimento ao seu nível atual se deu graças a mecânico-quântico de 1920 [1,2]. Desde então, seu objetivo é resolver, com a maior precisão possível as equações, exatas da mecânica clássica e da mecânica quântica.

A química computacional, por sua vez, abrange os métodos matemáticos, bem desenvolvidos implementados em um computador em que o foco principal é resolver problemas quimicamente relacionados por meio de cálculos[1]. Os avanços dessa área são, portanto, dependentes do aumento da performance dos computadores modernos, com cálculos usufruindo de paralelização dos processadores atuais além da acessibilidade financeira a componentes de hardware. A combinação entre química teórica e computacional pode tornar análises de sistemas químicos/bioquímicos complexos e com grande custo computacional possíveis, através do desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas para cálculos numéricos[1,2].

No contexto da química teórica, a descrição de fenômenos físicos e químicos pode ser feita qualitativamente e, em muitos casos, bons resultados quantitativos podem ser obtidos. Dessa maneira, a química teórica/computacional pode ser considerada um grande elo entre experimento e teoria. Mediante o grande desempenho e a capacidade de armazenamento de dados das máquinas atuais pode-se “reproduzir virtualmente” conjuntos de sistemas experimentais através de modelos bastante razoáveis. Seguindo a aplicação dos mais diversos métodos computacionais, fruto das aproximações na teoria quântica, ao fim de experimentos computacionais é possível obter em nível molecular propriedades de interesse, inclusive àquelas inacessíveis experimentalmente.

2.1 Fundamentos De Mecânica Quântica

A espectroscopia praticada em meados de 1900, a respeito da radiação de corpo negro e das raias de hidrogênio, levou a um entendimento maior do comportamento da natureza. A mecânica quântica

emerge neste contexto, trazendo à tona diversas novas perguntas sobre a realidade física, e causa grande debate entre os cientistas que tentavam entender cada um dos experimentos ou equações que surgiram a partir daí. O princípio fundamental dessa nova mecânica é o da existência de um espaço linear complexo de Hilbert (\mathcal{H}) cujos elementos são caracterizados como funções de onda ou vetores de estado, mas que (em rigor) carecem de significado físico [3,4]. Para os elétrons em átomos, ou moléculas individuais a mecânica quântica é sempre necessária.

Na mecânica quântica é possível descrever o comportamento de um sistema a partir da função de onda ψ do mesmo, pois, é nela que se concentra todas as informações do sistema. No formalismo matemático usado, ψ é uma função que existe em um espaço de Hilbert de dimensões apropriadas para a análise do problema, porém ela não apresenta em si significado físico. Para isso, calcula-se o quadrado do módulo da mesma em uma dada posição \vec{r} e instante t , obtendo-se assim informações sobre a densidade de carga em algum ponto do sistema. Além disso, com o uso de operadores matemáticos hermitianos aplicados a função de onda, é possível extrair outras grandezas físicas, como a energia do sistema, o estado de spin de alguma partícula, ou outras características de interesse. Para o caso da modelagem de um sistema que possa ser representado por um estado estacionário, a equação de Schrödinger não relativística e independente do tempo é escrita na forma da equação 2.1.

$$\hat{H}\psi(\vec{r}) = E\psi(\vec{r}) \quad (2.1)$$

Em que \hat{H} representa o operador hamiltoniano do sistema, o qual é composto pela soma dos operadores das energias cinética e potencial, ψ é a função de onda que descreve o sistema, \vec{r} é o vetor que descreve as coordenadas espaciais e de spin e E é a energia de um dos estados do sistema. Essa equação é, do ponto de vista matemático, uma equação de autovalor e autovetor, cuja solução tem por objetivo determinar a energia e a função de onda do estado em estudo.

Em tese, para a solução da equação de Schrödinger é preciso construir o operador hamiltoniano e determinar as condições de contorno que caracterizam o sistema. Porém, para sistemas de interesse dos químicos, como moléculas de maior complexidade, átomos multieletrônicos, e interações entre estes entes, a função de onda não pode ser obtida de forma exata e analítica, devido à complexidade da equação de Schrödinger. Este problema é contornado utilizando métodos de cálculos que possibilitam a obtenção de funções de onda que expressam com boa precisão as propriedades de sistemas de muitos corpos. Como exemplo de alguns desses métodos, tem-se os métodos *ab initio* ou métodos de primeiros princípios [5], os métodos semiempíricos [6] e os métodos baseados na teoria do funcional da densidade [7], no qual ao invés da função de onda o objeto de estudo é a densidade eletrônica.

Nesta Tese, a teoria do funcional da densidade foi utilizada em conjunto com métodos contínuos de solvente para avaliar os potenciais de redução e reatividade dos complexos aqui investigados. Nos tópicos seguintes desse capítulo apresentamos uma breve descrição dos fundamentos desses métodos.

2.2 Método de Hartree-Fock

Para uma molécula, o operador hamiltoniano não relativístico expresso na forma em unidades atômicas ($me=e=\hbar=1$) é dado a seguir.

$$\hat{H} = -\sum_{\mu=1}^N \frac{1}{2} \nabla_{\mu}^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{\mu=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{\vec{r}_{\mu A}} + \sum_{\mu=1}^N \sum_{\vartheta > \mu}^N \frac{1}{\vec{r}_{\mu\vartheta}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B > A}^M \frac{Z_A Z_B}{\vec{R}_{AB}} \quad (2.2)$$

O operador hamiltoniano pode ser escrito de forma mais compacta como

$$\hat{H} = \hat{T}_e(\vec{r}) + \hat{T}_e(\vec{R}) + \hat{V}_{eN}(\vec{r}, \vec{R}) + \hat{V}_{ee}(\vec{r}, \vec{r}) + \hat{V}_{NN}(\vec{R}, \vec{R}) \quad (2.3)$$

Na equação 2.2, os dois primeiros termos do lado direito estão relacionados com a energia cinética dos elétrons e núcleos respectivamente. Os demais termos representam a atração elétron-núcleo, repulsão elétron-elétron e repulsão núcleo-núcleo. Na expressão 2.2, Z_A é o número atômico do núcleo A, Z_B é o número atômico do núcleo B, $\vec{r}_{\mu A}$ é a distância entre o elétron μ e o núcleo A, \vec{R}_{AB} é a distância entre os núcleos A e B e $\vec{r}_{\mu\vartheta}$ é a distância entre os elétrons μ e ϑ ; N e M indicam, respectivamente, os números de elétrons e núcleos do sistema. Na equação 2.3, os mesmos termos são representados de forma mais compacta, porém as grandezas \vec{r} e \vec{R} representam as coordenadas espaciais dos elétrons e dos núcleos respectivamente.

O termo de repulsão elétron-elétron presente no hamiltoniano do sistema (4º termo eq 2.2 e 2.3), dificulta a resolução da equação de Schrödinger, porque os termos repulsivos intereletrônicos não são separáveis. Além disso, em sistemas moleculares o hamiltoniano é constituído de termos que são dependentes explicitamente das posições do núcleo. Para contornar tais dificuldades, faz-se uso da aproximação de Born-Oppenheimer [7], a qual permite desacoplar os movimentos eletrônico e nuclear. O termo $\hat{V}_{eN}(\vec{r}, \vec{R})$ é grande e não pode ser negligenciado; no entanto, podemos tornar a dependência \vec{R} paramétrica, de modo que a função de onda total seja dada como $\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \psi(\vec{r}, \vec{R})\chi(\vec{R})$. A aproximação de Born-Oppenheimer (ABO) baseia-se no fato de que os núcleos são muito mais massivos que os elétrons (1836 x), por esse motivo, é possível dizer que os núcleos estão praticamente fixos em relação ao movimento dos elétrons. Assim, os elétrons se adaptam quase que

instantaneamente a qualquer disposição nuclear. É possível fixar \vec{R}_a como uma configuração espacial nuclear e resolver a função de onda eletrônica $\Psi(\vec{r}, \vec{R}_a)$, que depende apenas parametricamente de \vec{R} . Se fizermos isso para uma faixa de \vec{R} , obteremos a curva de energia potencial ao longo do qual os núcleos se movem. Considerando que os núcleos estão fixos, sua energia cinética é zero e a energia de repulsão entre os núcleos é tratada como uma constante adicionada à solução da parte eletrônica. O Hamiltoniano eletrônico e a energia total do sistema serão apresentados dentro da aproximação Born-Oppenheimer como:

$$\hat{H}_{eletronico} = -\sum_{\mu=1}^N \frac{1}{2} \nabla_{\mu}^2 - \sum_{\mu=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{\mu A}} + \sum_{\mu=1}^N \sum_{\vartheta > \mu}^N \frac{1}{r_{\mu \vartheta}} \quad (2.4)$$

$$E_{total} = E_{eletronica} + \sum_{A=1}^M \sum_{B > A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.5)$$

Embora a resolução da equação de Schrödinger independente do tempo é a principal tarefa a ser executada para um estudo de estrutura eletrônica em átomos e moléculas, apenas para o átomo de hidrogênio a função de onda exata do sistema é conhecida. Desta forma, faz-se necessário o uso de modelos e aproximações para resolver a referida equação. Dentre os métodos de estrutura eletrônica utilizados, a aproximação certamente mais simples e popular para resolver a equação de Schrödinger é o método Hartree-Fock (HF) [8]. Ele serve também como ponto de partida na formulação de outros métodos. O método de Hartree-Fock em cálculos de estrutura eletrônica busca uma solução aproximada para o estado fundamental de um sistema de elétrons. Esse sistema pode ser definido com um átomo, ou uma molécula ou num sólido considerando apenas um determinante de Slater [9] (ver equação 2.6), o qual é construído a partir de um conjunto de spin-orbitais moleculares de uma partícula. Em física e química computacional, o método de Hartree-Fock (HF) é uma técnica de aproximação para a determinação da função de onda e a energia de um sistema quântico de muitos corpos em estado estacionário. Nesta aproximação os movimentos dos elétrons são tratados de forma independentes. Dessa maneira, a equação de Schrödinger independente do tempo pode ser separada em um conjunto de equações, uma para cada elétron, dependente apenas das coordenadas de um único elétron.

Para tornar possível a exigência de que os elétrons se movam independentemente uns dos outros e, ao mesmo tempo, considere-se as interações coulombianas entre eles, Hartree considera que a interação eletrônica sentida por um dado elétron depende dos campos elétricos produzidos pelo núcleo e por todos os outros elétrons do sistema [10-14]. Isto é, os elétrons se movem em um potencial resultante que é a soma do potencial de Coulomb atrativo, devido ao núcleo, com um potencial repulsivo, que representa o efeito médio das interações coulombianas repulsivas entre o elétron e seus

$n-1$ pares. O operador hamiltoniano para um sistema de i -elétrons não-interagentes pode ser escrito da forma:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N \hat{h}(i) \quad (2.6)$$

Em que:

$$\hat{h}(i) = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{k=1}^M \frac{Z}{r_{ik}} \quad (2.7)$$

O primeiro termo da equação 2.7, representa a energia cinética para o i -ésimo elétron e o segundo termo o potencial de Coulomb devido a presença do núcleo de carga Z . Como o hamiltoniano é separável, a função de onda multieletrônica poderá ser descrita como um produto de autofunções de um elétron (equação 2.8), aqui HP é o Produto de Hartree e ϕ_N é a autofunção do N -ésimo elétron do sistema .

$$\Psi^{HP}(1, 2, 3 \dots N) = \phi_1 \phi_2 \phi_3 \dots \phi_N \quad (2.8)$$

O problema do modelo de elétrons independentes ou não-interagentes proposto por Hartree que é a função produto fornecia resultados que diferiam substancialmente da energia real do sistema – cerca de 30% para o átomo de hélio –, pois, a interação instantânea entre os elétrons é omitida. Além disso, o método de Hartree não inclui o spin eletrônico e trata os elétrons como entidades distinguíveis. Para contornar esses problemas, V. Fock sugeriu utilizar determinantes de Slater no método de Hartree. Uma de suas conseqüências está no fato de que o determinante acima não permite que dois spinorbitais sejam idênticos. Caso isso aconteça, a função de onda desaparece e, portanto, não pode representar os elétrons [8,9,11,14].

A chave para o método básico Hartree-Fock são os pressupostos que se faz sobre a forma da função de onda do elétron. É assumido que há um total I de elétrons em órbita em torno de um número de núcleos. A função de onda que descreve o conjunto de elétrons tem a forma geral:

$$\Psi^{HP}(\vec{r}_1, S_{z1}, \vec{r}_2, S_{z2}, \dots, \vec{r}_i, S_{zi}, \dots, \vec{r}_I, S_{zI}) \quad (2.9)$$

Em que \vec{r}_i é a posição do i -elétron, S_{zi} é a coordenada de spin em uma direção z escolhida, com valores mensuráveis de $-\frac{1\hbar}{2}$ e $\frac{1\hbar}{2}$. Para garantir a indistinguibilidade dos elétrons e a antissimetria da

função, Fock sugeriu que a função de onda fosse definida por uma combinação linear de determinantes de Slater, que garantiriam estas duas propriedades. Dizer que a função de onda completa é antissimétrica em relação a troca, significa que o sinal deve mudar sempre que quaisquer dois elétrons são trocados. Slater mostrou que um determinante construído a partir de um conjunto de spin-orbitais moleculares ϕ_N de uma partícula satisfaz a antissimetria requerida para a função de onda de um sistema de muitos elétrons. Assim, a função de onda pode ser escrita como:

$$\Psi_{(X_1, X_2, X_N)} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(X_1) & \phi_2(X_1) & \dots & \phi_N(X_1) \\ \phi_1(X_2) & \phi_2(X_2) & \dots & \phi_N(X_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \phi_1(X_n) & \phi_2(X_n) & \dots & \phi_N(X_n) \end{vmatrix} \quad (2.10)$$

Em que $\frac{1}{\sqrt{N!}}$, representa a constante de normalização, as linhas representam os spin-orbitais e as colunas os elétrons. A troca de duas partículas é equivalente à troca de duas colunas, que induz, devido às propriedades conhecidas dos determinantes, uma mudança de sinal. É importante, notar que se duas linhas são iguais, o determinante é zero, ou seja, todos ϕ_N devem ser diferentes. Isso demonstra o princípio de exclusão de Pauli: dois (ou mais) férmions idênticos não podem ocupar o mesmo estado. Em geral, as dependências espaciais e do spin do spin-orbitais podem ser escritas como um produto da parte espacial e da parte de spin, como mostrado na Eq. 2.11 e Eq. 2.12.

$$\phi_i(q_\mu) = \gamma_i(x_\mu y_\mu z_\mu) \varepsilon(S_\mu) = \gamma_i(\vec{r}_\mu) \varepsilon_\mu \quad (2.11)$$

Em que:

$$\varepsilon(S_\mu) = \begin{cases} \alpha_\mu & \uparrow \\ \beta_\mu & \downarrow \end{cases} \quad (2.12)$$

representa a dependência com as coordenadas de spin e $\gamma_i(r_\mu)$ são funções dependentes apenas das coordenadas espaciais do elétron μ .

A escolha dos melhores spin-orbitais a serem utilizados no determinante de Slater é realizada com base no princípio variacional [10], o qual afirma que para um dado sistema no qual o operador \hat{H} é independente do tempo e dada uma função de onda aproximada normalizada e bem comportada das coordenadas das partículas do sistema, ψ_0 , o valor esperado do operador hamiltoniano representa um limite superior para a energia exata do estado fundamental, que matematicamente pode ser escrito como:

$$\int \phi^* \hat{H} \phi d\tau \geq E_{exata} \quad (2.13)$$

O teorema variacional nos permite obter uma energia aproximada do estado fundamental, porém não nos diz o quão próximo estamos da energia exata. Na verdade, ele afirma que o uso de funções aproximadas sempre levará ao limite superior da energia do estado fundamental. Assim sendo, os coeficientes spin-orbitais ϕ_N nos orbitais moleculares são determinados de modo a conduzirem ao valor mínimo de energia E associada com essa função de onda do estado fundamental. Na prática, o menor valor de energia é obtido a partir de uma função aceitável com vários parâmetros ajustáveis que, segundo o princípio variacional, conseguirá obter-se uma melhor aproximação para a energia do estado fundamental. Desta forma, podemos minimizar a integral variacional de tal forma a obter a função de onda aproximada com menor desvio. A igualdade só existe na equação (2.13) para o caso do uso de uma função de onda exata. De posse da aproximação de Born-Oppenheimer, o operador Hamiltoniano eletrônico pode ser escrito como:

$$\hat{H}_{elet} = \sum_{\mu} \hat{h}(\mu) + \frac{1}{2} \sum_{\mu \neq \theta} \frac{1}{r_{\mu\theta}} \quad (2.14)$$

em que, $\hat{h}(\mu)$ é o operador Hamiltoniano de uma partícula para o μ -ésimo elétron se movendo no campo gerado pelos núcleos e é representado por:

$$\hat{h}(\mu) = -\frac{1}{2} \nabla_{\mu}^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{\mu A}} \quad (2.15)$$

O último termo da equação (2.14) corresponde a um operador de dois elétrons relacionado com a interação elétron-elétron. Na equação (2.15), o primeiro termo do lado direito corresponde à energia cinética do elétron μ e o segundo termo representa a interação coulombiana do elétron μ com o núcleo A . Pode-se mostrar (ver referência 11) que a aplicação do Hamiltoniano eletrônico na função de onda descrita por um determinante de Slater (ver equações 2.10 e 2.11) leva ao seguinte resultado para a energia Hartree-Fock de um sistema de camada fechada (orbitais duplamente ocupados), considerando spin-orbitais moleculares ortonormais:

$$E^{HF} = 2 \sum_1^{N/2} h_i + \sum_{1=1, j=1}^{N/2, N/2} (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (2.16)$$

Em que:

$$\begin{aligned}
 h_i &= \int \phi_1^*(\vec{r}_\mu) \hat{h}(\mu) \phi_i(\vec{r}_\mu) d\tau \\
 J_{ij} &= \iint \phi_i^*(\vec{r}_\mu) \phi_j^*(\vec{r}_\vartheta) \frac{1}{r_{\mu\vartheta}} \phi_i(\vec{r}_\mu) \phi_j(\vec{r}_\vartheta) d\tau \\
 K_{ij} &= \iint \phi_i^*(r_\mu) \phi_j^*(\vec{r}_\vartheta) \frac{1}{r_{\mu\vartheta}} \phi_j(r_\mu) \phi_i(r_\vartheta) d\tau
 \end{aligned} \tag{2.17}$$

No conjunto de equações (2.17), h_i representa a integral de um elétron, pois envolve operadores que atuam apenas nas coordenadas de um elétron e tem como resultado a energia do i -ésimo orbital molecular; J_{ij} é conhecido como integral de Coulomb e corresponde à repulsão coulombiana média entre os elétrons i e j . Por último tem-se K_{ij} , denominada integral de troca, que representa uma interação entre os elétrons i e j diferente da interação coulombiana clássica. O aparecimento da integral de troca é resultado da necessidade de se utilizar uma função de onda anti-simétrica exigida pelo princípio de exclusão de Pauli [12]. Assim sendo, os melhores spin orbitais moleculares a serem eleitos para compor o determinante de Slater são aqueles que minimizam o funcional energia eletrônica mostrado na equação 2.16. Com uso da técnica dos multiplicadores de Lagrange e mais algumas manipulações algébricas (ver referência 11), chega-se a um conjunto de equações conhecidas como equações canônicas de Hartree-Fock:

$$\hat{F}(1)\phi_i = \varepsilon_i \phi_i \tag{2.18}$$

Com \hat{F} , denominado operador de Fock, dado por:

$$\hat{F}(1) = \hat{h} + \sum_{i=1}^{n/2} (2\hat{J}_i - \hat{K}_i) \tag{2.19}$$

com \hat{J}_i e \hat{K}_i representando os operadores de Coulomb e troca, respectivamente. A resolução da equação (2.15) gera um conjunto de soluções em que, o menor autovalor corresponde ao estado fundamental. É importante observar que as equações canônicas de Hartree-Fock não representam equações de autovalor, pois o operador de Fock depende dos ϕ_i 's e assim sendo, este só é conhecido quando os ϕ_i 's forem determinados. A solução da equação (2.18) é feita de forma iterativa, em que na convergência os ϕ_i 's determinam o operador de Fock que por sua vez determina os ϕ_i 's e então neste caso é dito ter uma solução autoconsistente.

Uma das técnicas mais utilizadas para o cálculo de propriedades eletrônicas de átomos, moléculas, etc, por métodos quânticos é a proposta de Roothaan, em que os orbitais atômicos e moleculares podem ser obtidos como uma combinação linear de funções de base [13,14]. Este modelo ficou conhecido como método da combinação linear de orbitais atômicos (do inglês: *Linear Combination of Atomic Orbitals*). A sugestão de Roothaan não foi à criação das combinações lineares dos orbitais atômicos, mas a sua utilização através das equações de Hartree-Fock. Genericamente, pode-se dizer que orbitais atômicos ou moleculares podem ser obtidos de forma auto-consistente como combinações lineares de determinadas funções matemáticas ou funções de base [14]. Esta proposta é matematicamente escrita através da expansão:

$$\phi_i = \sum_{p=1}^M C_{pi} X_p \quad (2.20)$$

em que X_p corresponde ao p -ésimo orbital atômico e ϕ_i representa o i -ésimo orbital molecular, com X_p escolhido ser ortonormal. A substituição da série de Roothaan nas equações de HF resulta na expressão da Eq 2.21. Esta substituição tem o objetivo de encontrar um conjunto de coeficientes C_{pi} para qual o funcional energia eletrônica total (equação (2.16)) seja um mínimo:

$$\sum_{p=1}^M C_{pi} (F_{pv} - \varepsilon_i S_{pv}) \quad (2.21)$$

As equações de Hartree-Fock são resolvidas numericamente por um processo iterativo, e neste sentido Roothaan contribui enormemente para o desenvolvimento e implementação computacional dos métodos de estrutura eletrônica. Esta contribuição se deve a proposta de Roothaan, em que os orbitais moleculares seriam expandidos em termos de funções de base conhecidas, ao invés de serem expandidos nas bases de orbitais atômicos [13,14]. Desta forma Roothaan mostrou que, com a introdução das funções de base conhecidas, as equações diferenciais existentes na formulação teórica desses métodos poderiam ser convertidas num conjunto de equações algébricas, as quais podem ser resolvidas por meio de técnicas padrões para a solução de problemas matriciais. A solução não-trivial da equação 2.21 é obtida pela resolução do determinante secular.

$$\det(F_{pv} - \varepsilon_i S_{pv}) = 0 \quad (2.22)$$

O procedimento utilizado para resolver a equação (2.22) de Hartree-Fock-Roothaan é através do método iterativo denominado campo autoconsistente (SCF do inglês *Self-Consistent Field*) [15], em

que os elementos de matriz Fock (F_{pv}) dependem dos orbitais ϕ_i , que dependem dos coeficientes C_{pi} .

As etapas do método autoconsistente SCF são basicamente:

- i) Especificam-se os dados necessários para definir a molécula (coordenadas dos átomos, número atômico, carga da molécula, multiplicidade de spin etc).
- ii) Escolhe-se o conjunto de funções de base para cada átomo.
- iii) Calcula-se a matriz F_{pv} inicial.
- iv) Resolvem-se as equações (2.17) e (2.18).
- v) Constrói-se um novo operador F_{pq} .
- vi) Repete-se o processo iterativo até obter-se uma autoconsistência entre o valor de entrada e o valor de saída para a matriz densidade.

2.4 Aproximação do Conjunto de Funções de Base

Para resolver os orbitais das equações de Kohn-Sham ou da maioria dos métodos quântico-mecânicos que usam a expansão dos orbitais em um conjunto de base, tem como um dos passos iniciais a escolha da função de base (χ_μ).

Uma função de base é a função resultante da combinação linear de funções linearmente independentes, que é utilizada para descrever orbitais atômicos ou moleculares semelhantes àqueles do átomo de hidrogênio, contendo parte radial e angular. Dessa maneira, a escolha correta de um conjunto de funções de base é essencial para o sucesso do cálculo quântico.

Os primeiros esforços no sentido de modificar as soluções numéricas das equações de Hartree-Fock por expressões analíticas utilizaram funções do tipo exponencial [11,16]. Mas, a princípio, pode-se utilizar qualquer função de onda. No entanto, é necessário que um conjunto de funções de base possa ter amplitude suficiente para representar regiões do espaço com maior densidade de probabilidade eletrônica, ou menor amplitude em regiões em que a densidade de probabilidade é menor.

Expandir uma função desconhecida, como um orbital molecular, em um conjunto de funções conhecidas não é uma aproximação se o conjunto de base estiver completo. No entanto, um conjunto de base completo significa que um número infinito de funções deve ser usado, o que é impossível em cálculos reais. Nesse contexto, é preciso que prevaleça o senso químico para escolher um conjunto de funções viável computacionalmente e eficiente para tratar os sistemas químicos de interesse.

Existem dois tipos de funções de base atômicas radiais comumente utilizadas em cálculos de orbitais moleculares, são elas: orbitais atômicos de Slater (STO's - *Slater Type Atomic Orbitals*) ou funções de base atômicas do tipo gaussianas (GTO's - *Gaussian Type Atomic Orbitals*). Funções do tipo Exponencial, chamadas de funções de Slater, foram introduzidas na década de 30 e propiciam

uma boa representação dos orbitais atômicos [17]. Os orbitais do tipo Slater podem ser descritos segundo a equação (2.23).

$$\chi_{\zeta,n,l,m} = NY_{l,m}(r, \theta, \varphi)r^{n-1}e^{-\zeta r} \quad (2.23)$$

Em que N é a constante de normalização, $Y_{l,m}$ são as funções dos harmônicos esféricos, θ e φ são coordenadas esféricas. O n , l e m são os números quânticos: principal, secundário e magnético, respectivamente e ζ é o expoente do orbital. O termo ζ tem a forma $\zeta = \frac{Z-W}{n}$, em que $Z - W$ representa a carga nuclear efetiva e W é uma constante de blindagem. Os expoentes ζ são números positivos e determinam as características das funções. Para $\zeta > 1$ temos uma representação aproximada dos orbitais mais contraídos, ou seja, aqueles nos quais a distribuição de densidade de probabilidade está mais concentrada perto do núcleo.

A dependência exponencial da distância entre o núcleo e o elétron se assemelha aos do átomo de hidrogênio e assegura uma convergência razoavelmente rápida com números crescentes de funções, no entanto o cálculo de integrais de dois elétrons de três e quatro centros não pode ser realizado analiticamente.

Apesar dessas desvantagens em sua utilização computacional, as STO's são usadas principalmente para sistemas atômicos e diatômicos nos quais é necessária alta precisão e em métodos semi-empíricos em que todas as integrais de três e quatro centros são negligenciadas. Ainda na década de 50 foram propostas o uso de funções gaussianas como proposta de solução para os problemas apresentados pelas funções de Slater na representação dos orbitais atômicos [11,16,18]. Orbitais do tipo gaussianiana podem ser escritos em termos de coordenadas cartesianas segundo a equação (2.24).

$$\chi_{\zeta,l_x,l_y,l_z}(x, y, z) = Nx^{l_x}y^{l_y}z^{l_z}e^{-\zeta r^2} \quad (2.24)$$

Em que a soma de l_x, l_y e l_z fornece o número quântico secundário do orbital ocupado, sendo também referido à simetria desse orbital (s, p, d, f..). Se a soma $l_x + l_y + l_z = 0$, por exemplo, o orbital s será definido, por outro lado se a soma $l_x + l_y + l_z = 1$, o orbital p será representado e assim por diante. Utilizando-se essas funções pode-se contornar o problema das integrais de vários centros, uma vez que o produto de duas gaussianas é outra gaussianiana.

A dependência exponencial r^2 torna os GTO's inferiores aos STO's em dois aspectos. No núcleo, um GTO tem um declive zero (derivada não se anula quando $r=0$), em contraste com um STO que tem uma "cúspide" (derivada descontínua), e consequentemente os GTOs têm problemas que representam o comportamento adequado perto do núcleo. O outro problema é que o GTO cai muito

rapidamente longe do núcleo comparado com um STO, o que dificulta a análise da região de valência e de propriedades relacionadas, uma vez que a função de onda é mal descrita nessa região.

Apesar das desvantagens descritas acima, as funções gaussianas são as mais utilizadas atualmente para aproximação de orbitais atômicos. Isto porque, as GTO's apresentam propriedades matemáticas que tornam o seu tratamento computacional viável. Por exemplo, é possível substituir duas funções gaussianas centradas em átomos diferentes, por uma única função gaussiana centrada num ponto intermediário. Como consequência, integrais de dois elétrons em três e quatro centros atômicos diferentes podem ser reduzidas a integrais ao longo de dois centros diferentes, que são significativamente mais fáceis de calcular. Funções gaussianas se tornaram populares por reduzir cálculos necessários na implementação de métodos da Química Quântica.

Uma função gaussiana é incapaz de descrever com precisão um orbital atômico, pois, estas funções são centradas de modo geral nos átomos. Como resultado, há uma restrição na capacidade da mesma de descrever a distribuição eletrônica entre núcleos, limitando o entendimento, por exemplo, das ligações químicas. Por esse motivo é feita uma combinação linear combinação linear de funções gaussianas originando novas funções chamadas funções de base gaussiana contraídas (*Contracted Gaussian Type Orbital* – CGTO) representadas pela equação (2.25).

$$\chi_{\mu} = \sum_{\nu} d_{\mu\nu} g_{\nu} \quad (2.25)$$

Em que $d_{\mu r}$ são os novos coeficientes de expansão e g_r são as funções gaussianas originais (GTO). Assim, o termo contraído refere-se ao fato de cada função χ_{μ} poder ser formada por um subconjunto de outras funções de base, denominadas funções primitivas.

As funções de base podem ser classificadas pelo número de funções gaussianas que as formam. Uma função de base é dita mínima quando uma única função CGTO é necessária para descrever o orbital. Um conjunto de função de base mínimo abrange as funções que permitem a ocupação de todos os elétrons do átomo. Ou seja, envolve uma única função (1s) para os átomos de hidrogênio e hélio e cinco funções (1s, 2s, 2px, 2py, 2pz) para o átomo de lítio ao neônio. Algumas funções de base gaussianas imitam os orbitais atômicos do tipo Slater. A função de base STO-3G, por exemplo, é uma função de base que utiliza três funções gaussianas para formar cada orbital do tipo Slater. Já a função STO- 4G utiliza quatro funções gaussianas para formar um orbital do tipo Slater.

Uma função de base é estendida quando cada orbital é definido por mais de um conjunto de funções contraídas para representar elétrons de valência. Por exemplo, as bases de Pople, cuja notação geral é k-nlm+G(x). Em que a letra k representa o número de funções GTO primitivas utilizadas na formação de uma função contraída para representar cada orbital interno. As letras n, l e m indicam,

separadamente, o número de funções GTO primitivas utilizadas na formação das funções contraídas para representar cada orbital de valência. Caso somente duas dessas letras possuam valores numéricos correspondentes, a base é dita Valence Double Zeta (VDZ), como exemplo, temos a função de base 3-21G [19].

$$\begin{array}{c}
 3-21G \left\{ \begin{array}{l}
 \chi_1 = \sum_{i=1}^3 d_i \chi_i^{GTO} \\
 \chi_2 = \sum_{i=4}^5 d_i \chi_i^{GTO} \\
 \chi_3 = \chi_6^{GTO}
 \end{array} \right. \\
 \underbrace{\hspace{10em}} \\
 (6s,3p/3s) \rightarrow [3s,2p/2s]
 \end{array}$$

A escolha do conjunto de funções de base é dependente do sistema molecular a ser estudado. Além disso, os Químicos teóricos dispõem-se de outras ferramentas para aumentar a flexibilidade da base ou mesmo a descrição de uma propriedade através do uso de funções extras, como as funções difusas ou ainda funções de polarização.

As funções difusas são empregadas para sistemas que possuem grande concentração de densidade eletrônica longe do núcleo, ou seja, elétrons ligados fracamente estão presentes no sistema, como exemplo, estudos de sistemas aniônicos ou no estado excitado ou quando a propriedade de interesse depende da parte mais externa da função de onda. Por exemplo, moléculas com elétrons desemparelhados, ânions, sistemas carregados e moléculas no estado excitado. O uso da função difusa é normalmente denotado pelo símbolo + (apenas átomos pesados) ou ++ (átomos pesados e hidrogênio).

Já as funções de polarização, são funções de momento angular maior do que os considerados nos orbitais atômicos ocupados e são empregadas devido a deformações que surgem nos orbitais que participam de uma ligação química. Por exemplo, o estudo de sistemas que envolvem metais pesados requer a adição de funções de polarização d para uma melhor descrição de seus elétrons de valência ou ainda, é possível incluir funções polarizadoras do tipo p para o hidrogênio. Esta operação permite a expansão da distribuição da função de base fora das posições nucleares.

2.4.1 Potencial efetivo de “caroço” [20-23]

Normalmente, os metais de transição possuem um grande número de elétrons que para serem descritos num cálculo quântico, um número consideravelmente grande de funções de base deveria ser

utilizado. O método do pseudopotencial é uma ferramenta indispensável no estudo de propriedades eletrônicas de sistemas moleculares com a presença de átomos pesados. Nesta aproximação somente os elétrons de valência são tratados explicitamente, substituindo-se os elétrons do caroço (core) por um pseudopotencial. Assim, os elétrons da camada interna atuam como um campo médio para os elétrons de valência, independentemente do ambiente químico no qual o átomo se encontra. Por exemplo, o átomo de rutênio, possui 44 elétrons de acordo com a configuração: Ru (Z=44): $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^6 5s^1 4d^7$; de acordo com método do pseudopotencial, os orbitais de valência são representados por $4s^2 4p^6, 4d^7, 5s^1$ que são tratados de forma explícita, já os demais orbitais de caroço seriam tratados por um pseudopotencial.

O método do pseudopotencial utiliza os chamados potenciais efetivos de caroço (*Effective Core Potentials* ou ECP) que substituem os operadores de *core* (operadores de Coulomb e de troca) que atuam nas camadas eletrônicas internas, por um potencial efetivo na equação do operador de Fock que pode ser escrita na forma:

$$\hat{F}(1) = -\frac{1}{2}\nabla_j^2 - \sum_A \frac{Z_A}{R_{iA}} + V^{HF} \quad (2.26)$$

em que o primeiro e segundo termos da equação representa a energia cinética e V^{HF} representa o potencial de Fock, descrito em termos dos operadores J e K que passa a ser dividido em duas partes: uma trata os elétrons de camada interna (V_{int}^{HF}) e a outra contempla os elétrons de valência (V_{val}^{HF}) como mostra as equações (2.27)

$$V^{HF} = \left[\sum_a^{N_{int}} (J_{int} - K_{int}) + \sum_b^{N_{val}} (J_{val} - K_{val}) \right] \quad (2.27)$$

$$V^{HF} = [V_{int}^{HF} + V_{val}^{HF}]$$

Nas equações anteriores, o operador V_{int}^{HF} é substituído por um potencial efetivo (V_{ef}) que atua apenas sobre os elétrons internos incluindo as interações entre os elétrons internos e os de valência de forma implícita. Este potencial também reproduz os orbitais atômicos de valência gerando um “pseudo-orbital” de valência que deve ser equivalente ao orbital original dentro da camada de valência.

2.3 Teoria Do Funcional Densidade

Teoria do funcional da densidade (DFT) é um método utilizado para descrever quanticamente a estrutura molecular e as propriedades químicas de sistemas de muitos corpos no estado fundamental. A relevância da DFT ficou evidenciada quando em 1998 Walter Kohn foi agraciado com o prêmio Nobel de Química por suas contribuições no desenvolvimento da DFT. A inovação da DFT em relação aos métodos HF e pós-HF está no uso de funcionais, que neste caso é a densidade de elétrons. Como resultados, é possível determinar as propriedades de um sistema de muitos elétrons de forma relativamente rápida. A DFT é uma das abordagens mecânicas quânticas mais populares e bem-sucedidas disponíveis em física da matéria condensada, física computacional e química computacional[3,4,6]. A versatilidade da DFT pode ser explicada pela generalidade de seus conceitos fundamentais e à flexibilidade que se tem para implementá-los. Assim, é possível estudar sistemas de tamanho moderado a grande com relativa precisão e menor custo computacional se comparado aos métodos correlacionados tradicionais, como teoria de perturbação e *coupled cluster* [2-4,6]. Com relação a cálculos de otimização de geometria, frequências vibracionais e energias relativas, a DFT fornece resultados comparáveis aos obtidos, pelos métodos *ab initio* convencionais que incluem correlação eletrônica [24-26]. O desenvolvimento da DFT tem sido impulsionado pela evolução de novos funcionais de troca-correlação mais precisos e de algoritmos eficientes de integração numérica.

Em contraste aos os métodos HF, na DFT as propriedades e a energia de um sistema de N elétrons são expressas em termos de densidade eletrônica. Ou seja, a variável fundamental não é a função de onda, mas a densidade eletrônica [4,6]. Esta densidade é a probabilidade por unidade de volume; isto é, a probabilidade de encontrar qualquer um dos N elétrons em um elemento de volume dv centrados em pontos de coordenadas x, y, z como mostra a equação (2.28).

$$\rho(\vec{r}) = N \int |\psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2 \dots, \vec{r}_n)|^2 d\vec{r}_2^3 d\vec{r}_3^3 \dots d\vec{r}_n^3 \quad (2.28)$$

A vantagem deste tipo de método é que, diferente da função de onda, a densidade eletrônica é um observável e medida experimentalmente utilizando difração de raio X, pois ela é um observável físico. Além disso, a função de onda para muitos corpos resulta em uma função no espaço de $3N$ dimensional (em que N é o número de elétrons no sistema), e é, portanto, um cálculo muito complexo, já a densidade é uma função simples que depende unicamente das coordenadas de espaciais e de spin[4,6,11].

2.3.1 Teoremas de Hohenberg-Kohn[27-29]

A teoria do funcional de densidade está alicerçada na demonstração matemática realizada por Hohenberg e Kohn de que a energia eletrônica do estado fundamental é determinada completamente pela densidade de elétrons. Em outras palavras, existe uma correspondência individual entre a densidade eletrônica de um sistema e a energia. Os dois teoremas propostos por Hohenberg e Kohn são mostrados a seguir.

Primeiro teorema: A densidade eletrônica do estado fundamental $\rho(r)$ de um sistema de elétrons interagentes em um campo de potencial externo $v(r)$, determina univocamente esse potencial.

$$v(r) = v[\rho_0(\vec{r})] \quad (2.29)$$

O hamiltoniano do sistema é definido como sendo o potencial \hat{U} , referente a energia potencial associada a $v(r)$, que é dependente do sistema e descreve a parte atrativa elétron-núcleo, acrescido da energia cinética \hat{T} e do operador de repulsão elétron-elétron \hat{V} , que inclui a repulsão eletrostática e todos os termos não clássicos (troca e correlação) como descritos na equação (2.30).

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{U} + \hat{V} \quad (2.30)$$

Estes operadores possuem a forma:

$$\hat{T} = - \sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 \quad (2.31)$$

$$\hat{V} = \sum_{i < j}^N \sum_j^N \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (2.32)$$

em que i e j representam os elétrons e r_i as coordenadas do elétron i . Como o Hamiltoniano do sistema fica definido conhecendo-se o potencial $v(\vec{r})$, torna-se possível determinar a função de onda do sistema, isso significa que há uma relação direta entre a densidade eletrônica do estado fundamental com a função de onda para esse estado. Logo, ρ_0 deve conter as informações do sistema assim como a função de onda, ou seja, a função de onda é um funcional de ρ_0 , $\psi[\rho_0]$, conseqüentemente todos os observáveis são funcionais de ρ_0 .

Este fato revela a importância desse teorema que promove a troca de um problema de 3N variáveis para um de três variáveis sem perda de informação do sistema. A prova desse teorema pode ser feita por absurdo.

Considera-se um Hamiltoniano H do estado fundamental do sistema contendo um potencial externo $v(r)$ com uma função de onda ψ . Logo da equação de Schrödinger:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (2.33)$$

$$(\hat{T} + \hat{U} + \hat{V})\psi = E\psi \quad (2.34)$$

Supondo outro potencial externo $v'(\vec{r})$, diferente de $v(\vec{r})$, que origina um Hamiltoniano \hat{H}' , o qual dará origem à outra função de onda do estado fundamental ψ' . Por hipótese, admita-se que ambos potenciais levem a mesma densidade $\rho_0(r)$, além disso, considere que:

$$\rho_0(r) = \langle \psi | \psi \rangle = \langle \psi' | \psi' \rangle \quad (2.35)$$

Pelo teorema variacional tem-se que:

$$E = \langle \psi | \hat{H} | \psi \rangle < \langle \psi' | \hat{H} | \psi' \rangle \quad (2.36)$$

$$E' = \langle \psi' | \hat{H}' | \psi' \rangle < \langle \psi | \hat{H}' | \psi \rangle \quad (2.37)$$

Essas equações podem ser reescritas da forma:

$$E = \langle \psi | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V} | \psi \rangle < \langle \psi' | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V} | \psi' \rangle \quad (2.38)$$

$$E' = \langle \psi' | \hat{T} + \hat{U}' + \hat{V} | \psi' \rangle < \langle \psi | \hat{T} + \hat{U}' + \hat{V} | \psi \rangle \quad (2.39)$$

Outra forma de escrever as equações (2.38) e (2.39) é:

$$\langle \psi' | \hat{H} | \psi' \rangle = \langle \psi' | \hat{H}' | \psi' \rangle + \langle \psi' | \hat{H} - \hat{H}' | \psi' \rangle \quad (2.40)$$

Como: $\hat{H} - \hat{H}' = \hat{U} - \hat{U}'$

$$\langle \psi' | \hat{H} | \psi' \rangle = \langle \psi' | \hat{H}' | \psi' \rangle + \langle \psi' | \hat{U} - \hat{U}' | \psi' \rangle \quad (2.41)$$

Portanto da equação (2.38):

$$(2.42)$$

$$\langle \psi | \hat{H} | \psi \rangle < \langle \psi' | \hat{H}' | \psi' \rangle + \langle \psi' | \hat{U} - \hat{U}' | \psi' \rangle$$

A densidade eletrônica é dada por [18]:

$$\rho_0(\vec{r}) = N \int d^3 \vec{r}_2 \int d^3 \vec{r}_3 \dots \int d^3 \vec{r}_N \psi^*(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \psi(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \quad (2.43)$$

E a energia potencial por:

$$\hat{U} = \sum_{i=1}^N \vartheta(\vec{r}_i) \quad (2.44)$$

Com isso, tem-se que:

$$\langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle = \sum_{i=1}^N \langle \psi | \vartheta(\vec{r}_i) | \psi \rangle = \sum_{i=1}^N N \int d^3 \vec{r}_1 \int d^3 \vec{r}_N \dots \int d^3 \vec{r}_N \psi^*(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \psi(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \quad (2.45)$$

Sendo $\vartheta(r_i) = \int d^3 r \delta(r - r_i) \vartheta(\vec{r})$, em que $\delta(r - r_i)$ é a função delta de Dirac:

$$\begin{aligned} \langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle &= \sum_{i=1}^N \int d^3 \vec{r}_2 \int d^3 \vec{r}_N \dots \int d^3 \vec{r} \delta(r - r_i) \vartheta(\vec{r}) \psi^*(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \psi(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \\ &= \sum_{i=1}^N \int d^3 \vec{r} \int d^3 \vec{r}_1 \dots \int d^3 \vec{r}_i \delta(r - r_i) \vartheta(\vec{r}) \dots \int d^3 \vec{r}_n \psi^* \psi \end{aligned} \quad (2.46)$$

Como a matriz densidade é dada por:

$$\rho(\vec{r}) = \langle \psi | \sum_{i=1}^N \delta(r - r_i) | \psi \rangle \quad (2.47)$$

Portanto:

$$\langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle = \int \rho(\vec{r}) \vartheta(\vec{r}) d^3 r \quad (2.48)$$

Com isso:

$$\langle \psi' | \hat{U} - \hat{U}' | \psi' \rangle = \int \rho(\vec{r}) [\vartheta(\vec{r}) - \vartheta'(\vec{r})] d^3 r \quad (2.49)$$

Analogamente para a equação (2.37):

$$\langle \psi | \hat{H}' | \psi \rangle = \langle \psi | \hat{H} | \psi \rangle + \langle \psi | \hat{H}' - \hat{H} | \psi \rangle = \langle \psi | \hat{H} | \psi \rangle + \langle \psi | \hat{U}' - \hat{U} | \psi \rangle \quad (2.50)$$

Sendo:

$$\langle \psi | \hat{U}' - \hat{U} | \psi \rangle = \int \rho(r) [\vartheta'(r) - \vartheta(r)] \rho(r) d^3r \quad (2.51)$$

Logo:

$$E < E' + \int [\vartheta(\vec{r}) - \vartheta'(\vec{r})] \rho(\vec{r}) d^3r \quad (2.52)$$

$$E' < E + \int [\vartheta'(\vec{r}) - \vartheta(\vec{r})] \rho(\vec{r}) d^3r \quad (2.53)$$

Somando a equação (2.52) com a equação (2.53):

$$E + E' < E' + E \quad (2.54)$$

A desigualdade (2.54) é claramente falsa e, portanto, a hipótese considerada na equação (2.35) é absurda. O erro da desigualdade (2.54) é resultado de considerarmos uma mesma $\rho(r)$ para diferentes potenciais externos com funções de onda diferentes ($\psi \neq \psi'$). Com isso, a unicidade da densidade eletrônica $\rho(r)$ exige que se duas funções de onda do estado fundamental dão origem a uma mesma densidade eletrônica, obrigatoriamente as duas funções de onda serão iguais. Desta forma, dada a densidade eletrônica, o Hamiltoniano fica unicamente determinado e com isso em princípio, todas as propriedades do sistema

Segundo Teorema: A energia do estado fundamental é mínima para a densidade eletrônica n_0 exata.

Esse teorema mostra que a teoria do funcional da densidade segue o princípio variacional.

Sendo a energia total de um sistema de N partículas dadas por:

$$E[\rho] = \langle \psi | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V} | \psi \rangle \quad (2.55)$$

Reescrevendo a equação 2.55, tem-se:

$$E[\rho] = E[\rho] = \langle \psi | \hat{T} + \hat{V} | \psi \rangle + \langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle \quad (2.56)$$

Sendo $F[\rho] = \langle \psi | \hat{T} + \hat{V} | \psi \rangle$ um funcional universal, pois é o mesmo para qualquer sistema de N elétrons. Tem-se que:

$$(2.57)$$

$$E[\rho] = F[\rho] + \langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle$$

Para o estado fundamental:

$$E[\rho_0] = F[\rho_0] + \langle \psi_0 | \hat{U} | \psi_0 \rangle \quad (2.58)$$

Como ρ_0 determina ψ e n determina ψ tem-se que:

$$E[\psi_0] < E[\psi] \quad (2.59)$$

$$\langle \psi_0 | \hat{T} + \hat{V} | \psi_0 \rangle + \langle \psi_0 | \hat{U} | \psi_0 \rangle < \langle \psi | \hat{T} + \hat{V} | \psi \rangle + \langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle \quad (2.60)$$

$$F[\rho_0] + \langle \psi_0 | \hat{U} | \psi_0 \rangle < F[\rho] + \langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle \quad (2.61)$$

$$E[\rho_0] < E[\rho] \quad (2.62)$$

Os teoremas de Hohenberg-Kohn, embora insiram a ideia dos funcionais da densidade eletrônica e retorna uma visão pioneira acerca dos funcionais, ainda não indicam qual a forma da dependência do funcional energia com a densidade. Através do princípio variacional é possível determinar ρ_0 para um dado potencial externo, mas não caminho oposto, ou seja, tendo um dado potencial externo não é possível determinar a densidade que representa este potencial. De fato, o primeiro teorema de Hohenberg-Kohn assegura que com ρ_0 é possível determinar $v(r)$ porém, partindo de uma dada densidade tentativa ρ_0' , o que garantiria que esta determina um potencial externo fisicamente aceitável? Além disso, nota-se que a DFT não fornece uma maneira para se entender as propriedades dos materiais meramente olhando-se a forma da densidade eletrônica. Embora em princípio densidade seja suficiente, a questão é encontrar uma maneira de extrair diretamente da densidade “qualquer” propriedade de um sistema.

Esse problema foi abordado por Kohn e Sham [29], os quais propuseram um método para a obtenção dos operadores em função da densidade eletrônica. A ideia de Kohn e Sham foi substituir o problema original de muitas partículas interagentes por um problema análogo de partículas independentes com a mesma densidade eletrônica do sistema interagente. As ideias fundamentais são:

- A densidade exata do estado fundamental de um sistema de partículas interagentes pode ser representada pela densidade do estado fundamental de um sistema auxiliar de partículas não interagentes.
- O Hamiltoniano do sistema auxiliar é escolhido como tendo um operador energia cinética usual e um potencial efetivo V_{KS} atuando sobre cada elétron do sistema não interagente.

Logo, a ideia principal é que a densidade eletrônica do estado fundamental do sistema interagente pode ser representada pela densidade de um sistema auxiliar de partículas não interagentes submetidas à um potencial efetivo V_{KS} . Com essa aproximação, substitui-se um problema de 3N variáveis para

um de N equações de uma partícula, ou seja, de $3N$ variáveis para N equações de três variáveis, o que traz avanços para a aplicabilidade da DFT. As equações de Kohn-Sham são resolvidas por meio de um procedimento auto consistente similar ao utilizado no método Hartree-Fock calculando o potencial efetivo V_{KS} (Eq. (2.63)) em cada ciclo auto consistente.

$$V_{KS} = v + v_H + v_{xc} \quad (2.63)$$

Em que $v = \frac{\delta V}{\delta \rho(r)}$, $v_H = \frac{\delta U_H}{\delta \rho(r)}$ e $v_{xc} = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho(r)}$. V é a energia potencial da interação núcleo-elétron; U_H é a energia potencial da interação elétron-elétron, chamada de energia de Hartree e E_{xc} é a energia de troca e correlação. A energia de troca-correlação (Eq. 2.64) é oriunda da interação eletrostática não-clássica entre os elétrons, assim, a dinâmica de um elétron influencia a dinâmica dos demais, fazendo com que a dinâmica de um elétron seja correlacionada a dos outros.

$$E[\rho]_{xc} = T_c[\rho] + U_x[\rho] + U_c[\rho] \quad (2.64)$$

Em que T_c é a energia cinética devido a correlação eletrônica, U_x é o termo de troca, também chamado de *exchange*, o qual é fornecido pela equação (2.64) e U_c é o potencial devido a correlação eletrônica, que é desconhecido

$$U_x = -\frac{e^2}{2} \sum_{jk} \int d^3 \vec{r} \int d^3 r_1' \frac{\Phi_j^*(r) \Phi_k^*(r') \Phi_j(r') \Phi_k(r)}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \quad (2.65)$$

Em que $\Phi(\vec{r})$ são auto-estados de uma partícula. Durante esse procedimento, todos os problemas acerca dos efeitos de muitos corpos são inclusos no termo de troca e correlação. Portanto, a sua determinação é crucial para a aplicação dessa metodologia. Os resultados da metodologia proposta por Kohn e Sham mostram que as equações de KS serão exatas apenas se o termo de troca-correlação for exato. A expressão exata para esse termo não é conhecida, nem em função de orbitais de uma partícula. O problema é que não há uma expressão para esse termo. Desta maneira, a qualidade final dos resultados da DFT depende intrinsecamente do potencial de troca-correlação utilizado. Então, uma vez que não se conhece a maneira exata do funcional de troca-correlação a forma de se determinar este funcional é através de algumas aproximações, em que as principais são listadas na próxima seção.

2.3.2 Funcionais para a troca e correlação

A maior dificuldade em realizar cálculos DFT é encontrar melhores aproximações para o termo de troca e correlação. Dentre as aproximações há a Densidade Local (LDA – *Local Density Approximation*), a qual está baseada no modelo de gás uniforme de elétrons. O funcional de troca e correlação é estimado a partir do funcional de troca e correlação de um gás de elétrons. Essa é uma aproximação simples, visto que, a densidade eletrônica em moléculas não é homogênea e, portanto essa aproximação é válida apenas no limite em que a densidade varia pouco. Os trabalhos conduzidos por Vosko, Wilk e Nussair [30] deram origem às bases para o desenvolvimento de funcionais com diferentes níveis de precisão dentro desta aproximação.

Outra aproximação existente é a Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA – *Generalized Gradient Approximation*), o qual é válida também para sistemas heterogêneos por incluírem informações sobre o gradiente de densidade de carga eletrônica, $\nabla\rho$. A idéia principal desta aproximação é incluir a dependência com o gradiente da densidade eletrônica na fórmula da energia de troca-correlação com o objetivo de melhorar a descrição de sistemas em que a densidade eletrônica varie de forma não homogênea. [2-4]. Há várias propostas para o funcional de troca-correlação GGA, sendo que as mais conhecidas são as fundamentadas nos trabalhos de Perdew-Burke-Erzenhof [31] (funcional PBE), de Lee-Yang-Parr-Becke [31-33] (funcional BLYP), Perdew-Wang [34] (funcional PW91).

Muitas contribuições foram acrescentadas ao LDA e ao GGA, de acordo com a crescente necessidade de precisão nos cálculos de algumas grandezas. Os funcionais de energia de troca e correlação são modelados utilizando considerações teóricas do comportamento da densidade de várias situações extremas, e frequentemente algum parâmetro empírico é introduzido. Atualmente tem se utilizado com frequência em cálculos DFT o chamado funcional híbrido, os quais consistem na combinação entre o termo de troca do método HF com o termo de troca de funcionais puros da DFT, com destaque para o funcional B3LYP [35,36]. O funcional B3LYP é largamente utilizado porque fornece resultados confiáveis para vários sistemas químicos.

Novos funcionais de troca-correlação têm sido desenvolvidos e implementados em vários pacotes computacionais de âmbito comum a comunidade de química computacional [37]. Um exemplo destes novos funcionais tem-se os chamados funcionais meta-GGA [38], os quais consistem na expansão do gradiente generalizado de segunda ordem, e também os funcionais que possuem termos de dispersão adicionado na expressão da energia de troca-correlação.

Outro funcional de troca e correlação híbrido meta-GGA é o TPSSh o qual fornece consistentemente uma descrição de alta qualidade de diversos sistemas e propriedades. O custo computacional é comparável aos métodos GGA convencionais. O destaque desse funcional se deve

a uma descrição mais precisa das entalpias de formação, frequências vibracionais e ligações de hidrogênio, quando comparados a outros funcionais LDA ou B3LYP, B3PW91, por exemplo [39].

O desenvolvimento de novos funcionais na área da DFT ainda é uma área de intensa pesquisa. Em especial aqueles que combinem técnica, sofisticação, precisão e exatidão. No entanto, o desempenho dos funcionais para os cálculos das propriedades químicas ainda é muito dependente do sistema a ser estudado e não são uniformes. Dessa maneira, ainda prevalece o bom senso e a análise crítica dos resultados e da própria literatura na escolha de um funcional para cálculos DFT.

2.7 Energia de correlação eletrônica

A energia de correlação eletrônica foi definida por Löwdin como sendo a diferença entre a energia da solução exata da equação de Schrödinger não-relativística, obtida através do método *Full CI* e do estado fundamental no limite do método Hartree-Fock como mostrado na equação (2.66) [40-42].

$$E_{corr} = E_{ex,nr} - E_{HF} \quad (2.66)$$

Em que E_{corr} é a energia de correlação eletrônica, $E_{ex,nr}$ é a energia da solução exata da equação de Schrödinger não-relativística e E_{HF} é a energia obtida pelo método Hartree-Fock. Porém, mesmo empregando um conjunto completo de funções base, o resultado obtido através do método Hartree-Fock não é o exato. Esta definição é bastante satisfatória para muitos casos em que o sistema está próximo à região de equilíbrio molecular (geometria de equilíbrio).

Em termos qualitativos, a energia de correlação pode ser entendida como resultado das interações eletrônicas em razão das posições instantâneas dos outros elétrons do sistema. Embora não seja possível precisar as contribuições individuais da energia de correlação, geralmente divide-se seus efeitos em duas classes diferentes (i) dinâmicas e (ii) estáticas.

(i) A parte estática (“de curta distância”) é considerada responsável por manter os elétrons afastados e é atribuída a um grande número de configurações, isto é, determinantes de Slater ou funções de estado de configuração, com pequenos coeficientes (absolutos) na expansão da função de onda. Em outras palavras, a energia de correlação dinâmica descreve a interação instantânea entre os elétrons devido sua aproximação e é fundamental no estudo de dissociação de moléculas, estados excitados e no tratamento de metais de transição.

(ii) A porção dinâmica da energia de correlação está relacionada com a separação espacial dos elétrons que ocorre, por exemplo, quando se adiciona a função de onda configurações nas quais os orbitais antiligantes estejam ocupados. Em particular, a correlação estática de elétrons abrange uma

combinação adequada de determinantes para explicar as simetrias de spin adequadas e suas interações. Uma visão mais precisa, no entanto, para esse tipo de energia é que ela leva em conta a forte mistura que pode ocorrer entre as configurações Hartree-Fock e as configurações excitadas que têm energias próximas. A energia de correlação estática pode ser contemplada através do funcional de troca e correlação na DFT.

O modelo HF supõe que as partículas se movem em um campo médio gerado por todas as outras partículas e que a função de onda é descrita por um único determinante de Slater construída numa base de funções de onda de 1-elétron. Isto é, apenas uma configuração de camada fechada torna a descrição da energia de correlação para muitos sistemas imprecisa, em especial aqueles em que a distância entre as partículas tende ao infinito. Nesse sentido, os métodos pós Hartree-Fock surgiram com o objetivo de descrever com maior precisão essa energia de correlação, que embora represente menos de 1% da energia total [43,44], é quimicamente muito importante.

Porém, quando os sistemas são muito correlacionados mais de um determinante de Slater é necessário. Isto porquê, o uso de apenas um determinante de Slater resulta em dois problemas principais. O primeiro deles é que a densidade de probabilidade de se encontrar dois elétrons com o mesmo spin na mesma região do espaço é zero, ou seja, impedidos de ocupar a mesma região do espaço. O segundo problema é que os dois elétrons estão sempre restritos ao mesmo orbital molecular (OM) independentemente da posição relativa de um e do outro. O maior reflexo disso é que não se consegue descrever reações homolíticas [11]. Uma das formas de resgatar a energia de correlação eletrônica dinâmica, ou seja, quando métodos tais como CI [2,44]: ou baseados na teoria de perturbação (Møller-Plesset ou teoria perturbativa de muitos corpos) e na teoria *coupled cluster* permitem bons cálculos quantitativos na energia e função de onda.

Dessa maneira, para que a função de onda seja correta em regiões de grandes distâncias internucleares é necessário que a mesma incorpore informações sobre a posição relativa dos elétrons, ou seja, a posição dos elétrons é correlacionada [24]. Além disso, as configurações eletrônicas não devem ser representadas por um orbital duplamente ocupado, mas sim, por uma combinação linear das configurações que podem ser geradas a partir destes OM's. É possível recuperar tanto a correlação dinâmica como a estática através de métodos interação de configuração completa (*FULL CI* - FCI). No entanto, essa metodologia é limitada ao tamanho da molécula, pequeno número de elétrons e pequenos conjuntos de bases atômicas. Dessa maneira, o estudo de sistemas moleculares maiores (quimicamente interessantes) é necessário aproximar a função de onda FCI, que pode ser obtida por métodos quânticos monoconfiguracionais ou multiconfiguracionais.

A estrutura da teoria multiconfiguracional tem por objetivo uma generalização da construção da função de onda eletrônica, através da otimização simultânea dos orbitais e dos coeficientes da expansão CI. Em princípio, o conceito é simples e consiste em duas etapas: (i) o caráter

multiconfiguracional é tratado considerando um conjunto de configurações como referências, e (ii) excitações orbitais dessas referências são construídas para melhorar a flexibilidade da função de onda. Assim, o primeiro passo visa principalmente a resolução de quase-degenerescências em relação a orbitais e configurações fortemente acopladas, e o segundo passo deve incluir a correlação de elétrons restante através de uma soma de diferentes determinantes de Slater. Em um sistema com apenas uma configuração de referência $|\psi_0\rangle$, por exemplo, a função de onda que leva em conta a interação das diferentes configurações possíveis pode ser escrita como:

$$|\Phi_0\rangle = c_0|\psi_0\rangle + \sum_r c_a^r |\psi_a^r\rangle + \sum_{r>s} c_{ab}^{rs} |\psi_{ab}^{rs}\rangle + \sum_{r>s>t} c_{abc}^{rst} |\psi_{abc}^{rst}\rangle + \sum_{r>s>t>u} c_{abcd}^{rstu} |\psi_{abcd}^{rstu}\rangle + \dots \quad (2.67)$$

Em que os índices a, b, c, d correspondem aos estados inicialmente ocupados e os estados r, s, t, u correspondem aos estados para os quais os elétrons foram excitados.

O método CASSCF (*Complete Active Space Self-Consistent Field*) [24,45] foi desenvolvido para tornar possível o estudo de situações com configurações eletrônicas degeneradas e forte mistura configuracional.

2.8 Métodos Multiconfiguracionais: CASSCF

Os processos químicos envolvem de maneira geral, a formação e quebra de ligações químicas, excitações eletrônicas, ionizações tanto para sistemas atômicos, quanto para sistemas moleculares e etc. nos quais pares de elétrons podem ser separados. Embora seja comum que os sistemas (reagentes e produtos) ao redor de sua geometria de equilíbrio possam ser descritos por uma única estrutura de Lewis, o mesmo não pode ser dito em relação ao que ocorre em estados de transição, espécies reativas e estados intermediários [46,47].

O estudo desses processos citados acima envolvendo metais de transição se tornam particularmente complexos porque as ligações químicas formadas são, em sua maioria, fracas, ou seja, a população dos orbitais antiligantes são altas. Além disso, os átomos de metais de transição possuem estados eletrônicos (s^2d^n , s^1d^{n+1} e s^0d^{n+2}) com multipletos muito próximos em energia resultando em sistemas com uma forte mistura de configurações atômicas[41,42,45].

O método SCF multiconfiguracional (*multiconfiguration self-consistent field*, MC-SCF) era o que até então apresentava a maior flexibilidade para explorar as situações expostas anteriormente. Suas primeiras aplicações foram feitas na década de 30 [48,49]. O método MCSCF pode ser considerado como um método interação de configurações em que não apenas os coeficientes CI são

otimizados, mas também são otimizados os orbitais moleculares utilizados na construção dos determinantes[50, 51].

O problema central do método MCSCF é encontrar uma maneira de gerar as configurações adequadas à descrição do sistema, os quais serão utilizadas na expansão da função de onda. O método CASSCF tenta solucionar esse problema, gerando as de forma automática através da divisão do espaço de orbitais em três subespaços, como mostra a Figura 2.1:

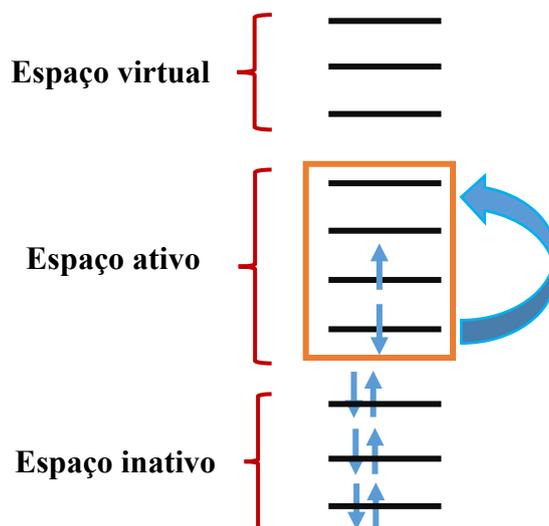


Figura 2.1 Representação esquemática dos orbitais na metodologia CASSCF

- Espaço inativo: os orbitais permanecerão duplamente ocupados em todas as configurações da função de onda, mas serão otimizados. Os orbitais moleculares mais internos (caroço) não são otimizados durante o cálculo, permanecendo iguais aos orbitais obtidos em um cálculo SCF. Em sistemas contendo metais de transição é extremamente importante que os orbitais ns e np sejam mantidos, pelo menos, no espaço inativo.
- Espaço ativo: são aqueles diretamente envolvidos nos processos que se pretende estudar e serão otimizados novamente. A ocupação destes orbitais é variável; nele será feito um FULL CI, gerando todos os determinantes possíveis, ou todas as configurações adaptadas à simetria espacial e de spin (CSFs).
- Espaço virtual: os orbitais terão ocupação igual a zero, em todas as configurações da expansão, ou seja, nenhum elétron é permitido neste espaço.

O grande trunfo do método CASSCF é trocar o problema de escolher quais configurações utilizar na expansão da função de onda pelo problema de escolher quais orbitais serão utilizados no espaço ativo e inativo. A função de onda CASSCF é construída distribuindo-se todos os elétrons de todas as maneiras possíveis dentro do espaço ativo (*Full CI*, interação de configurações completa no espaço ativo), gerando todas as configurações adaptadas a simetria espacial e de spin possíveis para o

problema. Dessa forma, o método CASSCF correlaciona somente os elétrons localizados nos orbitais ativos e, por isso, o método recupera apenas uma parte da energia de correlação eletrônica conhecida como correlação não-dinâmica ou estática.

Portanto, a escolha do espaço ativo é importantíssima para o sucesso do cálculo. Mas como escolher corretamente o espaço ativo? De uma forma geral, o espaço ativo deve conter todos os orbitais relevantes para descrever o problema em estudo [52]. A construção do espaço ativo para sistemas contendo metais de transição requer maior atenção, pois, apresentam vários elétrons desemparelhados e um grande número de estados excitados muito próximos energeticamente. Por exemplo, em grande parte dos metais de transição, o estado fundamental é descrito pela configuração eletrônica $nd^m(n+1)s^2$, mas nas moléculas a ligação química envolve, frequentemente, a configuração $nd^{m+1}(n+1)s^1$, que pode ser energeticamente muito próxima da anterior. De uma forma geral, os sistemas contendo átomos de metais de transição com menos da metade da camada d preenchida pode ser descrito por uma função de onda construída com os orbitais $nd(n+1)s$, mas o restante dos metais de transição deveria, idealmente, ter uma outra camada d (efeito da camada dupla [53]) para a sua descrição; além desses, é necessária a inclusão dos orbitais dos ligantes que interagem com os orbitais atômicos d do metal de transição. Com esse espaço ativo somos capazes de descrever as transições d-d e as transferências de carga.

2.6 O Modelo do Contínuo Polarizável [54-56]

Um fator importante em Química Computacional é a simulação do efeito do solvente. Em cálculos em que o efeito do solvente é considerado importante para a determinação de uma certa propriedade de interesse, as moléculas do mesmo podem ser adicionadas em torno do soluto ou de maneira implícita através de um meio contínuo no qual o soluto é inserido. No primeiro caso, dependendo do tamanho molecular do soluto, tal procedimento pode apresentar um custo computacional bastante elevado devido à quantidade de átomos envolvidos na esfera de solvatação explícita. Já no caso dos modelos contínuos, o solvente pode ser interpretado como um meio que pode ser polarizável pela presença do soluto que possui uma certa polaridade. O modelo do contínuo polarizável (*Polarizable Continuum Model* – PCM) desenvolvido por Tomasi e colaboradores [41] é baseado na equação de Poisson, que é uma equação diferencial de segunda ordem (Equação 2.68), que engloba o potencial eletrostático (ϕ), a densidade de carga ($\rho(\vec{r})$) tal como a densidade de carga de um soluto, e a constante dielétrica (ϵ) do meio no qual a densidade de carga será inserida.

$$\nabla^2 \phi(\vec{r}) = -\frac{4\pi}{\varepsilon} \rho(\vec{r}) \quad (2.68)$$

Quando o soluto é inserido no contínuo (que representa o solvente), ele cria uma cavidade e o trabalho realizado para isso é chamado de energia de cavitação. Esse fenômeno ocorre seguido por uma dispersão de carga que irá polarizar o meio (também pode ocorrer uma repulsão eletrostática entre o soluto e o solvente). A polarização do meio pela molécula do soluto pode causar cargas momentâneas no solvente, que age de volta gerando uma estabilidade eletrostática. Dessa forma, a energia livre de Gibbs da solvatação é escrita pela equação (2.69).

$$\Delta G_{\text{Solvatação}} = \Delta G_{\text{Cavitação}} + \Delta G_{\text{Dispersão}} + \Delta G_{\text{Eletrônico}} + \Delta G_{\text{Repulsão}} \quad (2.69)$$

Em que o primeiro e o segundo termos se referem, respectivamente, ao processo de criação da cavidade e dispersão da carga elétrica no meio; o penúltimo termo é a variação da energia livre de Gibbs devido à solvatação ($G_{\text{gasosa}} - G_{\text{solvatada}}$) e o último termo se refere à energia de repulsão soluto-solvente. A criação da cavidade para o soluto depende dos parâmetros geométricos de cada átomo, dentre os quais, o raio de van der Waals, em que cada átomo é representado por um modelo de esferas superpostas e individuais. Logo, definem-se dois tipos de superfícies: SAS (*Solvent Accessible Surface*) e SES (*Solvent Excluded Surface*). A SAS se refere a área ao redor do soluto em que o solvente tem total acesso; a SES é a área proibida de acesso do solvente, construída por uma molécula de prova, tal como mostra o esquema da Figura 2.2:

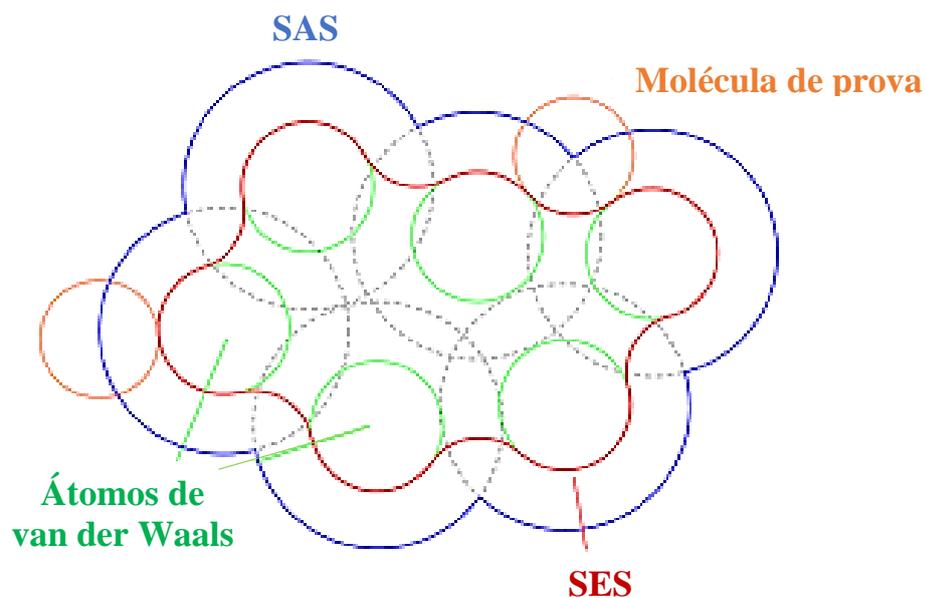


Figura 2.2 Cavidades ocupadas pelos átomos e superfícies SAS e SES, onde esta última é construída por uma molécula de prova. Adaptado da Ref. 2.

Para calcular o efeito do solvente, no Hamiltoniano molecular do soluto, é incluído um potencial eletrostático que irá descrever as interações soluto-solvente como uma perturbação. A resolução da equação de Schrödinger para este novo Hamiltoniano do soluto também é auto consistente, incluindo o PCM nos métodos de campo de reação auto consistente.

2.7 Referências Bibliográficas

1. Hall, N. *Neoquímica. A química moderna e suas aplicações*. Bookman; Porto Alegre, **2004**.
2. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*. John Wiley & Sons Inc., **2003**.
3. Alcácer, L. *Introdução à Química Quântica e Computacional*. 1ª ed. IST Press, Lisboa, **2007**.
4. Fiolhais, C.; Nogueira, F.; Marques, M. *A Primer in Density Functional Theory*. 2ª ed. Springer, New York, **2002**.
5. Stewart, J. J. *Semiempirical Molecular Orbitals Methods, Reviews in Computational Chemistry*, VCH Publishing, New York, volume 1, **1990**.
6. Parr, R. G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
7. Born, M.; Oppenheimer, J. R. *Ann Phys. Leipzig* **84** (**1927**) 457.
8. (a) Hartree, D. R. *Proc. Camb. Phill. Soc.* **24** (1928) 111. (b) Fock, V. Z. *Phys.* **61** (**1930**) 126.
9. Slater, J. C. *Phys. Rev.* **34** (**1929**) 1293.
10. Epstein, S. T. *Chem. Phys. Lett.* **70** (**1980**) 311.
11. Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry. Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publications, New York, **1996**.
12. Lopes, J. L. *A estrutura Quântica da Matéria*, Editora UFRJ, Rio de Janeiro, **1992**.
13. Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* **23** (**1951**) 69.
14. Morgon, N. H.; Custódio, R. *Funções de base: o ajuste variacional*. Campinas, **2001**. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2001/02/18/funcoes-de-base-o-ajuste-variacional>>. Acesso em: 25 de junho de 2019.
15. Ehrenreich, H.; Cohen, M. H. *Phys. Rev.* **115** (**1959**) 786.
16. Löwdin, P. O. J. *Chem. Phys.* **18** (**1953**) 365.
17. Slater, J. C. *Phys. Rev.* **36** (**1930**) 57.
18. Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **19** (**1970**) 553.
19. Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Hehre, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **102** (**1980**) 939.
20. Hay, P. J.; Wadt, W. R. *The J. Chem. Phys.* **82** (**1985**) 299.
21. Hay, P. J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* **82** (**1985**) 270.
22. Wadt, W. R.; Hay, P. J. *J. Chem. Phys.* **82** (**1985**) 284.
23. Kahn, L. R.; Baybutt, P.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Phys.* **65** (**1976**) 3826.
24. Morgon, N. H.; Coutinho, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. Editora Livraria da Física, São Paulo, **2007**.

25. Silva, V. D.; Dias, R. P.; Rocha, W. R. *Chem. Phys. Lett.*, 439 (2007) 69.
26. Ferreira, E. C.; Florentino, P. D.; Rocha, W. R.; Faruk, N. J. *Chem. Phys. B* 113 (2009) 14831.
27. Kohn, W.; Hohenberg, P. *Phys. Rev.* 136 (1964) 864.
28. Capele, K. W. *Braz. J. Phys.* 36 (2006) 1318.
29. Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* 137 (1965) A1697.
30. Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200.
31. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzenhof, M. *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3865.
32. Becke, A. D. *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098.
33. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
34. Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev.* 45 (1992) 13244.
35. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
36. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
37. (a) Koch, W.; Holthausen, M. C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Willey-VCH, Weinhein, 2001. (b) Perdew, J. P.; Kurth, S.; Zupan, A.; Blaha, P. *Phys. Rev. Lett.* 82 (199) 2544.
38. Perdew, J. P.; Kurth, S.; Zupan, A.; Blaha, P. *Phys. Rev. Lett.* 82 (1999) 2544.
39. Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Tao, J.; Perdew, J. P. J. *Chem. Phys.* 119 (2003) 12129.
40. Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B. In *Reviews in Computational Chemistry*. Volume 5, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 1994.
41. Boguslawski, K.; Tecmer, P.; Legeza, O.; Reiher, M. J. *Phys. Chem. Lett.* 3 (2012) 3129.
42. Lischka, H.; Nachtigallová, D.; Aquino, A. J. A.; Szalay, P. G.; Plasser, F.; Machado, F. B. C.; Barbatti, M. *Chem. Rev.* 118 (2018) 7293.
43. Mok, D. K. W.; Neumann, R.; Handy, N. C. *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 6225.
44. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. Chichester: Wiley, 2004.
45. Roos, B. O. *The complete active space self-consistent field method and its applications in electronic structure calculations. Advances in chemical physics; Ab initio methods in quantum chemistry – II*, Ed. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1987.
46. Schmidt, M. W.; Gordon, M. S.; *Annual Rev. Phys. Chem.* 49 (1998) 233.
47. Litzén, U.; Brault, J. W.; Thorne, A. P. *Phys. Scr.* 47 (1993) 628.
48. Frenkel, J. *Wave mechanics, advanced general theory*. Oxford Univ. Press, Oxford, 1934.
49. Hartree, D. R.; Hartree, W.; Swirles, B. *Trans. R. Soc. London Sev. A* 238 (1939) 229.
50. Wahl, A. C.; Das, G. *Multicon.guration Self.Consistent Field. Methods of electronic etructure theory*. Ed. Plenum Press, Nova York, 1977.
51. Shepard, R. *Multicon.guration Self.Consistent Field em Ab initio methods in quantum chemistry*. Ed. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1987.

52. Borin, A. C.; de Araújo, A. V. S. *Quim. Nova* 38 (2015) 738.
53. Andersson, K.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* 191 (1992) 507.
54. Cramer, C. J.; *Essentials of Computational Chemistry*. 2^a ed. Ed. John Wiley & Sons, 2004.
55. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cancès, E. *J. Mol. Struct.: Theochem* 464 (1999) 211.
56. Mennucci, B; Cammi, R. *Continuum Solvation Models in Chemical Physics: From Theory to Applications* John Wiley & Sons, 2007.

Capítulo 3 – Influência das reações de hidrólise no potencial de redução dos complexos de rutênio

3.1 Introdução

Apesar do mecanismo de ação dos compostos de rutênio(III) não ser estabelecido, acredita-se que a ativação por redução e a troca de ligante cloreto por água (aquação) desses complexos são duas etapas importantes para a função antitumoral de tais espécies. Nesse sentido, muitos são os esforços para tentar elucidar o mecanismo de aquação e redução dos compostos estudados nesse trabalho [1-6]. A hipótese de ativação por redução sugere que os compostos de Ru(III) atuam como pró-fármacos que são reduzidas, *in vivo*, pelas condições citoplasmáticas das células tumorais, produzindo o complexo com íon Ru(II) que são mais lábeis em relação a troca de ligantes. Em outras palavras, a redução torna os compostos a base de rutênio – em tese - mais lábeis e reativos no meio biológico. Assim, para serem ativos *in vivo* os complexos de Ru(III), na qualidade de pró-fármacos, devem possuir potencial de redução acessíveis por redutores biológicos como glutatona e ácido ascórbico (de -0,4 para +0,8 V vs NHE (eletrodo normal de hidrogênio))[6-10].

A atividade de fármacos à base de metal depende largamente do ambiente químico e também da geometria de coordenação, os quais também determinam suas propriedades redox. Os conjuntos de ligantes diferentes de NAMI-A, KP1019 e seus derivados modulam os seus potenciais de redução[9,11]. Este pode influenciar a redução *in vivo* de Ru(III) para Ru(II) por agentes biológicos, tais como o ácido ascórbico e glutatona[8,12-14]. Também tem sido sugerido que esses complexos podem ser reduzidos preferencialmente em células tumorais [15,16]. Devido ao seu valor positivo de E° , NAMI-A, KP1019 e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ podem ser facilmente reduzidos *in vivo* por redutores biológicos como glutatona e ácido ascórbico, mesmo antes de sofrer dissociação. Com efeito, tem sido demonstrado que a forma reduzida de NAMI-A tem uma importância crucial em sua robusta atividade anti-metastática em modelos de tumores sólidos[17-19]. A atividade citotóxica do KP1019 é suportada por uma correlação entre o potencial de redução e atividade antiproliferativa em carcinomas do cólon[20].

Estudos eletroquímicos e de redução química de metalofármacos Ru(III) são, portanto, de grande importância para o entendimento de suas atividades biológicas e, são objeto de vários estudos [9, 21-29]. Ravera *et al.* [27] investigaram a química redox dos complexos $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4\text{L}_2]$ (L = imidazol ou indazol) em água a diferentes valores de pH. Para os compostos indazol e imidazol foram obtidos valores entre 0,160 e -0,460 V vs. Ag/AgCl (0,359 V e -0,261 V vs. NHE) e em pH 4,0 para o

potencial de redução bioquímico $E^0(\text{Ru(III)/Ru(II)})$. O potencial de redução bioquímico (E^0) é obtido em pH=7 e a uma temperatura de 310,15 K com o objetivo de reproduzir as condições biológicas encontradas em um organismo vivo. Os autores mostraram que, apesar das semelhanças estruturais, as espécies Ru(II) geradas eletroquimicamente são submetidas a diferentes reações de deslocamento de ligantes. Usando experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN), os autores também mostraram que um dos ligantes axiais imidazólicos é deslocado pela água no complexo imidazol $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_4(\text{Im})_2]^{2-}$ e uma substituição $\text{Cl}^-/\text{água}$ ocorre no indazol complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_4(\text{Ind})_2]^{2-}$. A redução química na presença de glutathione (GSH) também foi observada pelos autores. Reisner et al. [9] que investigaram o comportamento eletroquímico dos complexos $[\text{trans-Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4\text{L}(\text{DMSO})]$ e $[\text{trans-Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4\text{L}_2]$ (L = imidazol, 1,2,4-triazol, indazol) em dimetilformamida (DMF) e DMSO.

Para os complexos NAMI-A e KP1019, os potenciais de redução $E^0(\text{Ru(III)/Ru(II)})$ foram de $-0,220$ e $-0,720$ V versus eletrodo de hidrogênio normal (NHE) respectivamente, em DMF. Os autores mostraram que a equação geral proposta por Lever, [21] que assume uma contribuição aditiva de todos os ligantes ao potencial redox do complexo, prevê muito bem o potencial de redução medido dos complexos de Ru(III), e eles foram capazes de propor uma equação para prever o potencial de redução de complexos carregados negativamente de Ru(III) em meio aquoso a pH 7. Para o complexo $\text{Na}[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]$, Alessio *et al.*[22] obtiveram potenciais de redução $E^0(\text{Ru(III)/Ru(II)})$ de $-0,001$ V vs. eletrodo de calomelano de cloreto de sódio saturado (SSCE). A reação de aquação revelou-se dependente do pH. Na faixa de pH de 7,1 a 9,0 o produto final foi $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_3(\text{DMSO})(\text{H}_2\text{O})(\text{Im})]^-$ e, em pH 6, o produto final detectado foi $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_4(\text{DMSO})(\text{H}_2\text{O})]^-$, com troca do ligante de imidazol por água. Foi demonstrado que em pH fisiológico e 37 °C (tampão fosfato, NaCl a 0,9%), a dissociação passo a passo de dois íons cloreto do NAMI-A ocorre em questão de minutos[30].

Estes complexos anticancerígenos Ru(III) também demonstraram ser reduzidos por redutores biológicos comuns, tais como GSH e ácido ascórbico. Hartmann *et al.*[23] mostraram que, em pH 7 e 0,1 M de tampão fosfato, o complexo $(\text{H}_2\text{Im}) [\text{RuCl}_4(\text{HIm})_2]$ é imediatamente reduzido pela GSH. Schluga *et al.* [26] mostraram que a ligação do KP1019 ao monofosfato de guanosina (GMP) do nucleotídeo de ácido desoxirribonucleico (DNA) é aumentada com a adição de GSH, mas não de ácido ascórbico. Ou seja, o GSH reduz o complexo Ru(III) e facilita a ligação ao nucleotídeo. No entanto, o mecanismo envolvido na redução química destes complexos anticancerígenos Ru(III) ainda não está totalmente esclarecido. Acredita-se que um mecanismo de esfera interna esteja envolvido, ou seja, há primeiro a coordenação da GSH com o metal e a posterior transferência de elétron do ligante para o metal [24,31].

Todos estes resultados sugerem que, no mecanismo associado a estes complexos anticancerígenos de Ru(III), a ativação por redução e troca de ligantes de cloreto por moléculas de

água do solvente (hidrólise ou aquação) são dois passos importantes para a função antitumoral de tais metalofármacos. Depois de ativada, distribuída e localizada nos compartimentos celulares, as formas como os metalofármacos de rutênio matam as células cancerígenas não é bem compreendida.

Enquanto os aspectos qualitativos da hipótese da ativação por redução já são bem reconhecidos, pouco foi feito para investigar sistematicamente o comportamento eletroquímico dos agentes anticancerígenos frente à reação de aquação ou reação de troca do ligante. Neste trabalho os ligantes cloretos são substituídos por água, como mostra a equação genérica 3.1.



Como resultado, há ainda algumas questões em aberto, como por exemplo: Qual a influência do potencial de redução na reação de aquação? Como o potencial de redução é influenciado pela troca dos ligantes?

Com base nas observações listadas acima, três eventos estão relacionados com a atividade biológica dos complexos estudados nesta Tese: (i) redução do centro Ru(III); (ii) reação de troca de cloreto com moléculas de água do meio solvente; e (iii) interação com os alvos biológicos. Estas reações podem competir umas com as outras, como esquematicamente mostrado na Figura 3.1, para o composto NAMI-A. O composto pode inicialmente ser reduzido seguindo a via **B**, gerando o complexo Ru(II) **1B**, e este complexo reduzido pode então sofrer reação de troca de ligante com água do solvente, gerando o complexo monoaquo **2**. Alternativamente, o complexo pode inicialmente sofrer reação de deslocamento de ligante, seguindo a via **A**, gerando a espécie **1A** monoaquo-Ru(III), que é posteriormente reduzida à espécie monoaquo-Ru(II) **2**. Uma vez que as espécies reduzidas de monoaquo-Ru(II) são formadas, outros processos competitivos podem ocorrer como, por exemplo, o deslocamento sucessivo de ligantes cloreto pela água através da via **C** ou interação direta com o alvo biológico **L**, via **D**, gerando o aduto **3** no qual o alvo **L** desloca uma molécula de água. A sequência dos eventos ou, as vias preferidas, dependerão da cinética dessas reações e também do potencial de redução das espécies, concentração de cloretos e estabilidade termodinâmica dos complexos formados.

O comportamento eletroquímico dos complexos NAMI-A, KP1019 e *trans*-[Ru(NH₃)₃(Pz)(Cl)]²⁺, bem como dos seus produtos de hidrólise mais relevantes foram estimados utilizando o modelo Rulíšek e serão apresentados neste capítulo. A interação com os alvos biológicos selecionados neste trabalho será explorada no próximo capítulo.

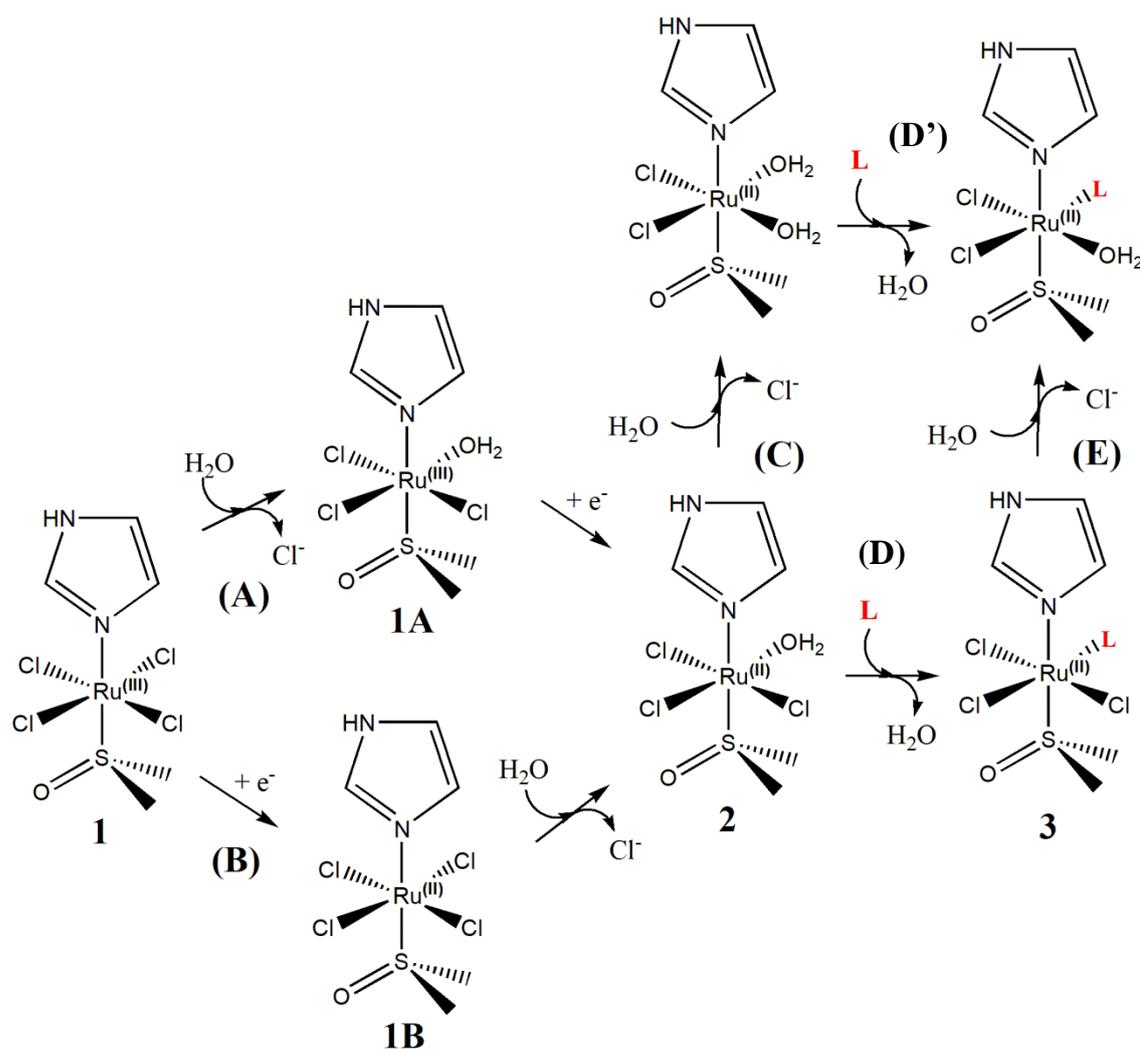


Figura 3.1. Representação esquemática dos possíveis caminhos de reação biológica competitiva para o complexo NAMI-A (**1**). Na via (A) NAMI-A inicialmente sofre reação de deslocamento do ligante gerando a espécie monoaquo-Ru(III) **1A**, que é posteriormente reduzida à espécie monoaquo-Ru(II) **2**. Na via (B) o composto é inicialmente reduzido gerando o complexo Ru(II) **1B** e sofre reação de troca de ligante com água, gerando o complexo monoaquo **2**. Após a geração do complexo **2**, ele pode ser hidrolisado consecutivamente pela via (C) ou interagir com os alvos biológicos **L** na via (D), gerando o aduto **3**. Há ainda a possibilidade da interação com alvo biológico ocorrer após a segunda aquação, como é mostrado pela via **D'**.

3.2 Metodologia Teórica

Para calcular o potencial de redução do centro metálico de Ru(III) para Ru(II), fez-se primeiramente a otimização de geometria e cálculo de frequências vibracionais dos complexos envolvidos na redução. Nas espécies em que o íon metálico apresenta número de oxidação +3 e,

portanto, configuração eletrônica d^5 o estado de spin baixo $S = \frac{1}{2}$ foi avaliado. Nos complexos em que o íon de rutênio apresenta número de oxidação +2 e configuração eletrônica d^6 o estado de spin $S = 0$ foi analisado. Apesar de ambos estados de spin terem sido estudados, apenas espécies de baixo spin foram analisadas nesta Tese. Isso se deve ao fato de serem mais estáveis conforme nossos resultados demonstraram e também por já ter sido reportado na literatura [1,32,33]. Os cálculos de otimização de geometria e frequência vibracional foram realizados utilizando a teoria do funcional de densidades (DFT) [34] com o funcional de troca e correlação meta-GGA híbrido TPSSh [35] e a função de base def2-TZVP e o conjunto de base auxiliar def2-TZVP/J [36,37] para todos os átomos. Efeitos relativísticos foram tratados utilizando o formalismo *Zeroth Order Regular Approximation* (ZORA) [38-40]. Os cálculos das estruturas de camada aberta foram realizados dentro do formalismo não-restrito de Kohn-Sham (UKS), enquanto que para as estruturas de camada fechada foi utilizado o formalismo restrito (RKS). Através desta etapa é possível determinar a energia eletrônica nuclear ($E_{elec-nuc}$) e a contribuição térmica à energia livre de Gibbs (G_{term}) a 298,15K. O potencial de redução dos complexos foi calculado usando a equação 3.2, conforme mostrado por Rulišek [41]:

$$E^0[V] = 27,21(G_{ox}[a.u] - G_{red}[a.u]) - E_{abs}^0(NHE)[V] \quad 3.2$$

Em que G_{ox} e G_{red} é a energia livre de Gibbs das formas oxidadas e reduzidas respectivamente. $E_{abs}^0(NHE)$ é o potencial absoluto do eletrodo normal de hidrogénio que, neste trabalho, foi utilizado o valor recomendado de 4,281 V sugerido por Isse e Gennaro [42]. A energia livre de Gibbs das espécies é obtida usando a equação 3.3.

$$G = E_{elec-nuc} + \Delta G_{solv} + G_{term} \quad 3.3$$

Em que ΔG_{solv} é a energia livre de solvatação, G_{term} é a contribuição térmica à energia livre de Gibbs, obtidos dentro da abordagem de oscilador harmônico e rotor rígido, por fim $E_{elec-nuc}$ é a energia eletrônica nuclear da espécie. A energia livre de Gibbs de solvatação (ΔG_{solv}) foi obtida utilizando o modelo SMD de Truhlar e Cramer [43], como implementado no programa ORCA em que a contribuição eletrostática para tal energia é obtida usando o modelo *Conductor-like Screening Model* (COSMO) de Klamt [44]. Todos os cálculos foram realizados utilizando o pacote computacional ORCA [45].

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Resultados Estruturais

Tabela 3.1 Valores das distâncias de ligação nos complexos $[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]^{1-}$, $[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]_1$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ e seus respectivos produtos de hidrólise obtidas no nível DFT^a.

	$[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]^{1-}$	$[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{Ind})_2]$	$[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Ind})_2]^{1+}$	$[\text{RuCl}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{Ind})_2]^{2+}$
Média r(Ru-Ind)	2,044(2,062) ^(b,c)	2,057(2,056) ^(d)	2,055	2,036
Média r(Ru-Cl)	2,368(2,363)	2,324(2,333)	2,272	2,310
Média r(Ru-H ₂ O)	—	2,177(2,076)	2,145	2,115
	$[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]^{1-}$	$[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{DMSO})\text{Im}]$	$[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DMSO})\text{Im}]^{1+}$	$[\text{RuCl}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{DMSO})\text{Im}]^{2+}$
r(Ru-S)	2,271(2,30) ^(e)	2,244	2,274	2,233
r(Ru-Im)	2,079(2,08)	2,073	2,087	2,087
Média r(Ru-Cl)	2,370(2,34)	2,329	2,277	2,339
Média r(Ru-H ₂ O)	—	2,151	2,139	2,139
	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$		
r(Ru-NH ₃)	2,135	2,137		
r(Ru-N(Pz))	2,127	2,071		
r(Ru-Cl)	2,266	—		
r(Ru-H ₂ O)	—	2,153		

Valores experimentais entre parênteses; ^a Distância de Ligação em Å; ^{b, c} Referências 9, 46; ^d Referência 28; ^e Referência 22.

As distâncias de ligação em torno da esfera de coordenação dos metais nos complexos aqui estudados estão sumarizadas na Tabela 3.1. Como pode ser observado, os parâmetros estruturais apresentam um excelente acordo com os dados experimentais com desvios na ordem de 0,01 Å nos comprimentos de ligação e 0,01° nos ângulos de ligação.

O primeiro composto antitumoral de rutênio que avaliamos foi o KP1019. As Figuras 3.2 e 3.3 mostram as estruturas otimizadas no nível TPSSh/def2-TZVP dos complexos: $\text{trans-[RuCl}_4(\text{Ind})_2]^{1-}$ (KP1019) e dos demais complexos em que o íon cloreto é substituído pelo ligante água, são eles: $\text{trans-[RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{Ind})_2]$, $\text{trans-[RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Ind})_2]^{1+}$, $\text{trans-[RuCl}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{Ind})_2]^{2+}$. Em todas as estruturas mostradas nessa figura o íon de rutênio apresenta carga +3 e os complexos apresentam uma geometria pseudo-octaédrica em torno do centro metálico. KP1019 é uma espécie paramagnética e os resultados mostraram que o excesso de densidades de spin está localizado quase que exclusivamente no orbital d_{z^2} do centro de rutênio com valor de $\rho_\alpha=0,852$.

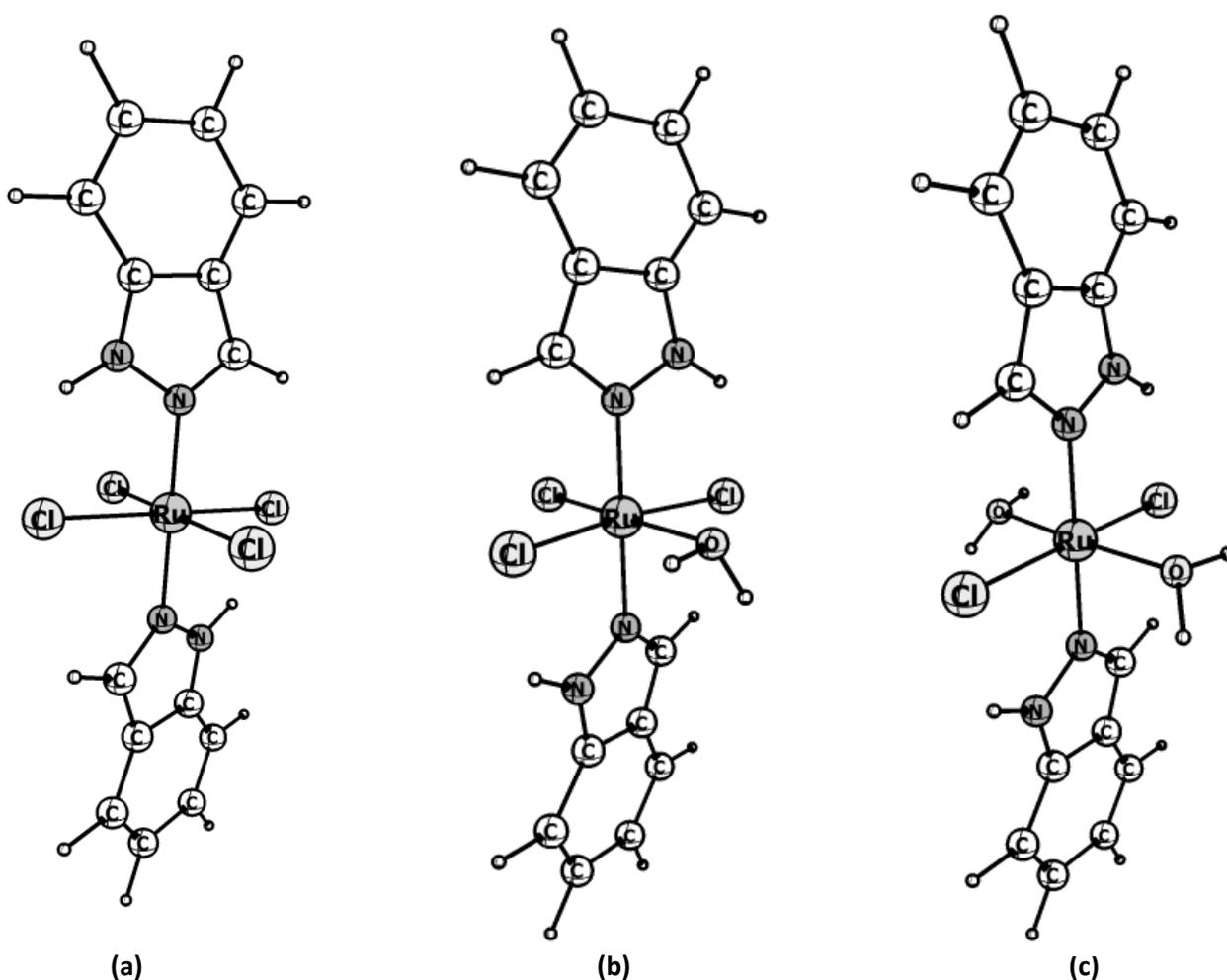


Figura 3.2 Espécies metálicas otimizadas no nível TPSSh/def2-TZVP. Na figura (a) é mostrada a estrutura do KP1019 antes da aquação, (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição trans.

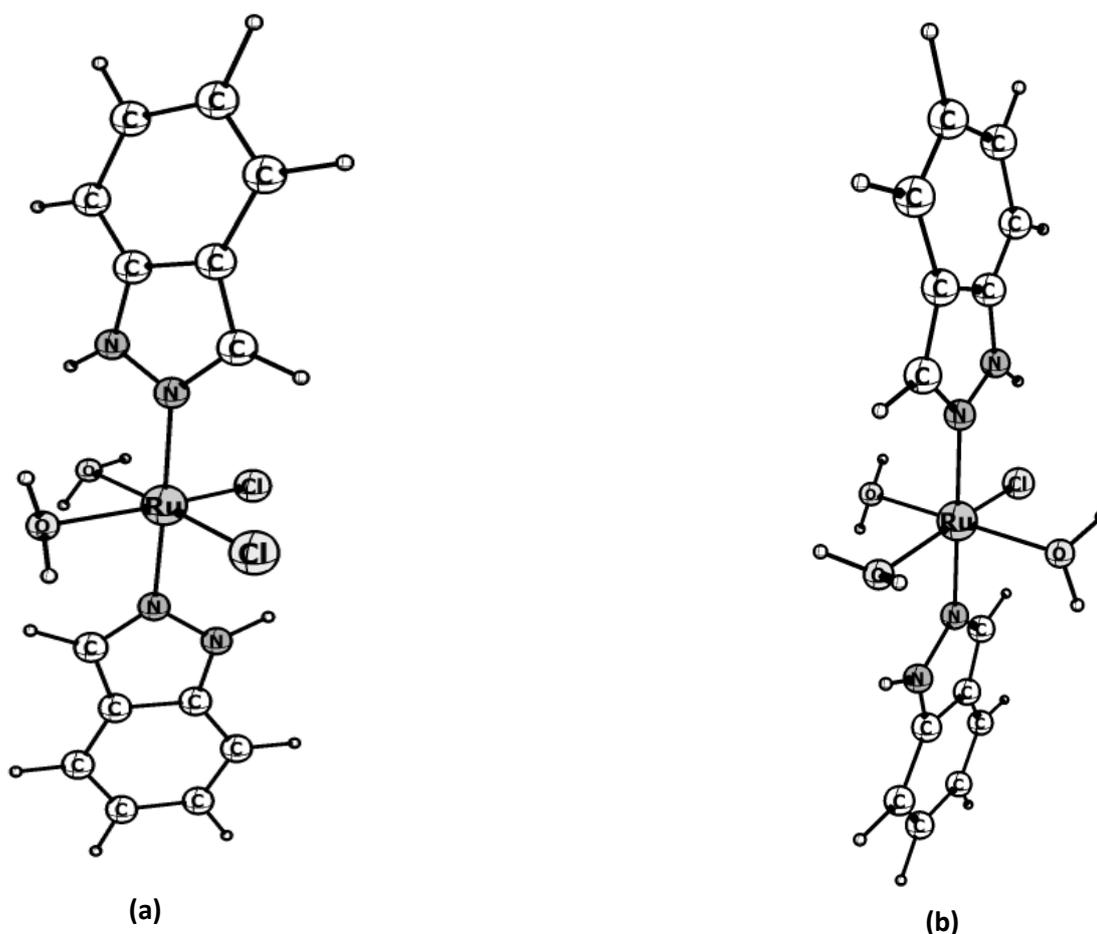


Figura 3.3 Espécies metálicas otimizadas nível TPSSh/def2-TZVP (a) dois ligantes cloretos são substituídos na posição *cis* e (b) após a terceira aquação.

Como pode ser visto nas Figuras 3.2 e 3.3, as espécies apresentam uma geometria similar à octaédrica em torno do centro metálico. Nessas estruturas o íon metálico (Ru (III)) apresenta número de oxidação +3 e configuração eletrônica d^5 . Nossos resultados mostraram que as espécies mais estáveis são as de baixo spin e, tal comportamento se deve ao elevado número de oxidação do metal, a sua posição na tabela periódica (segunda linha de transição) e ao número de coordenação igual a seis. Nossos resultados mostraram também um bom acordo estrutural entre o nível de teoria escolhido e os resultados experimentais, como mostra a Tabela 3.1. É importante ressaltar que as comparações experimentais se deram com os análogos aos sais dos complexos estudados, por exemplo, para o NAMI-A foi utilizado um composto em que o contra-íon era o íon sódio (Na^+), já para KP1019- H_2O a comparação se deu de forma direta com a estrutura cristalina obtida da referência 28.

É observado também que as estruturas são estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares do tipo N-H...Cl (distância N3-H2 1,022Å, H2...Cl3 2,190Å e \angle N3-H2-Cl3 134°) como mostra a figura 3.4 (a). Com o objetivo de avaliar a contribuição dessas ligações de hidrogênio

na estabilização do complexo KP1019 (a), fizemos uma rotação de 45° de um dos grupos indazóis (figura 3.4(a)) de modo a romper tal interação e, em seguida, fizemos um cálculo de energia no ponto no nível de teoria TPSSh/def2-TZVP. Foi então observado uma desestabilização de aproximadamente 10 kcal mol^{-1} na estrutura do KP1019 em relação á geometria otimizada, reafirmando a importância da ligação de hidrogênio intramolecular na estabilização desses complexos.

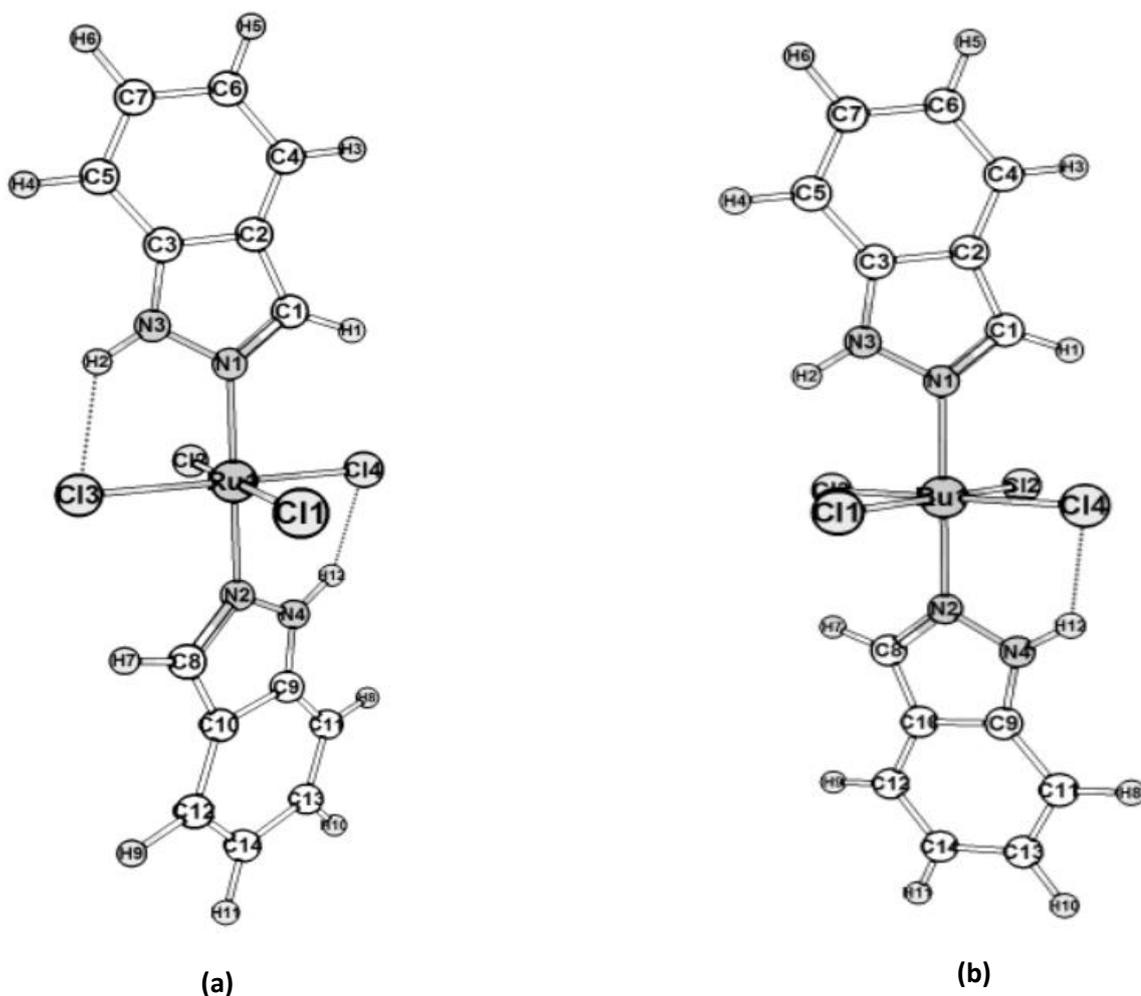


Figura 3.4 Quebra da interação Cl3-Ru-H2(a) através da rotação de 45° do grupo indazol acima do plano equatorial (b).

Na Figura 3.4 (a) é observada ligações de H intramolecular entre os N3-H2 \cdots Cl3 e N4-H12 \cdots Cl4, a primeira ligação de H é quebrada através da rotação de 45° do grupo indazol acima do “plano equatorial”, como pode ser visto na Figura 3.4 (b).

No complexo NAMI-A ($\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]^{1-}$), as posições axiais são substituídas por um ligante DMSO e um ligante imidazol. A substituição dos grupos indazóis pelos ligantes π -acceptor DMSO e σ -doador imidazol nas posições axiais não alteram significativamente a média do comprimento de ligação Ru-Cl na posição equatorial, quando comparamos as estrutura do KP1019 e

NAMI-A. No entanto, observa-se que o comprimento de ligação Ru-N é maior no NAMI-A (2,079Å) quando comparado ao KP1019 (2,044Å), como pode ser visto na Tabela 3.1. Essa diferença se deve ao forte efeito *trans* do átomo de S do ligante DMSO quando comparado ao átomo de nitrogênio do ligante azol. A Figura 3.5 mostra a espécie NAMI-A (a) e os demais complexos em que o íon cloreto foi substituído pelo ligante água.

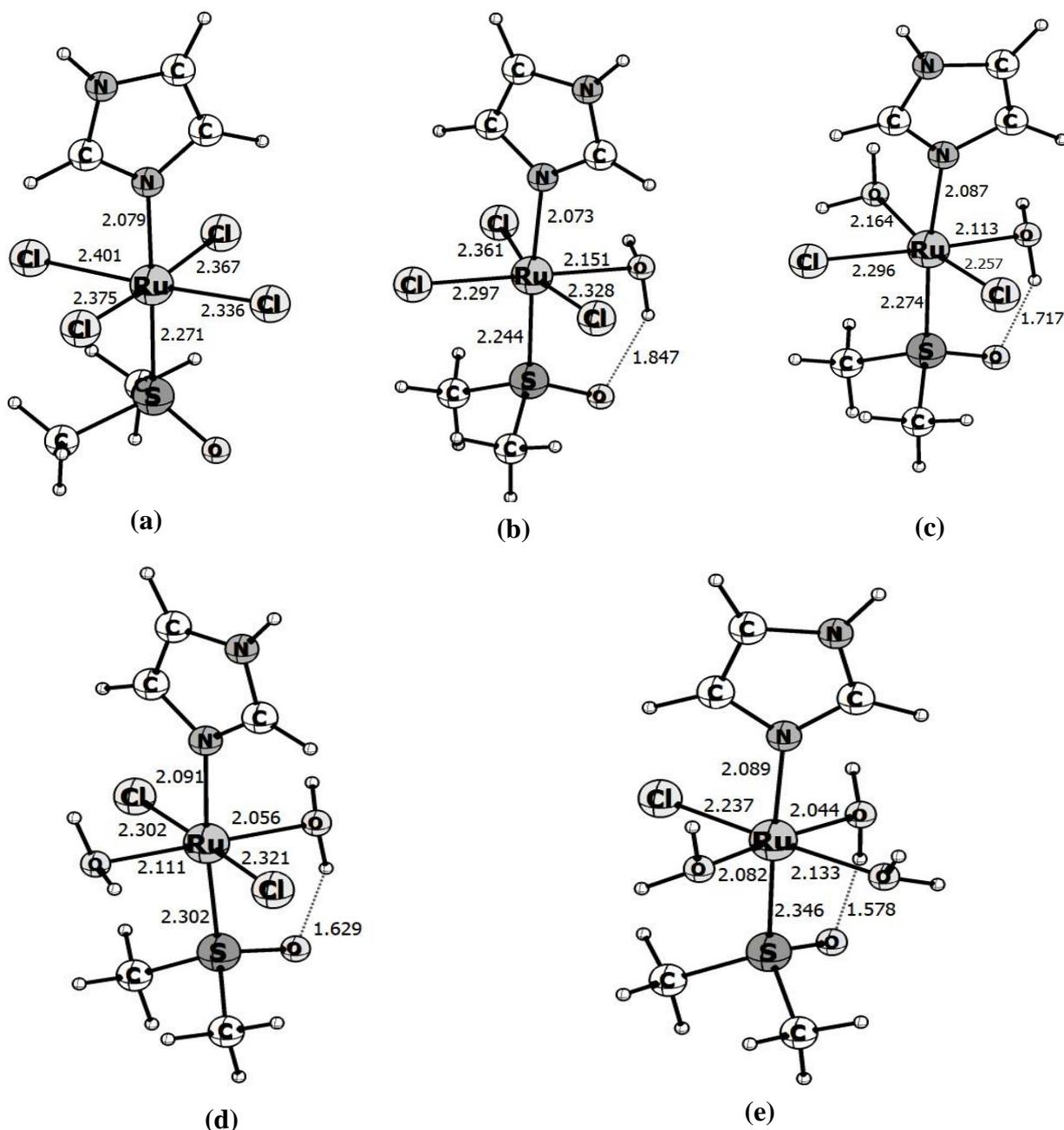


Figura 3.5 Espécies metálicas otimizadas nível TPSSh/def2-TZVP. Na figura (a) é mostrada a estrutura do NAMI-A antes da aquação, (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição *cis*, (d) dois ligantes cloretos são substituídos na posição *trans* e (e) após a terceira aquação.

Como representado na Figura 3.5, essas espécies apresentam também uma geometria similar a octaédrica em torno do centro metálico. Nessas estruturas o íon de Ru também apresenta carga +3 e, portanto, configuração eletrônica d^5 , as espécies são paramagnéticas e os cálculos mostraram que o excesso de densidade de spin alfa está localizado quase que exclusivamente no orbital dz^2 do centro de rutênio com $\rho_\alpha = 0,900$ para NAMI-A. As espécies de (a)-(e) apresentam ligantes DMSO e imidazol na posição axial, enquanto no plano equatorial as estruturas apresentam número variado de ligantes cloreto e água. Pode se observar por meio da Figura 3.5 que a inserção do ligante água é estabilizada através das ligações de H entre o átomo de oxigênio do ligante DMSO e o H da água (distância $O \cdots H$ 1,850Å).

O complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(Pz)(Cl)]²⁺ e seu produto de aquação, em que o ligante cloreto na posição axial é substituído pelo ligante água, são mostrados na figura 3.6.

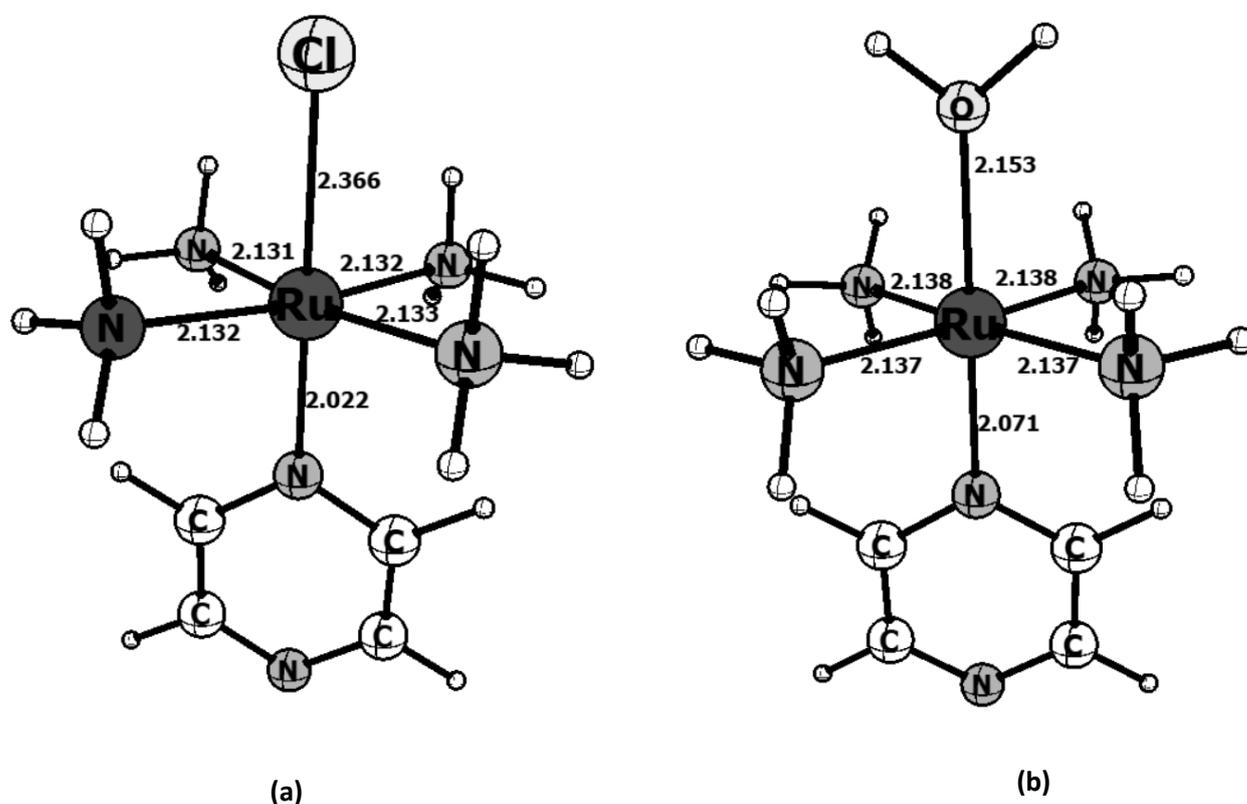


Figura 3.6 Complexo metálico (a) *trans*-[Ru(NH₃)₄(Pz)(Cl)]²⁺ e (b) *trans*-[Ru(NH₃)₄(Pz)(H₂O)]³⁺, obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP.

Os cinco átomos de nitrogênio e o átomo de oxigênio na primeira esfera de coordenação do íon metálico de Ru³⁺ apresentam uma organização pseudo-octaédrica, conforme análise da Figura 3.6. A ligação Ru-Pz é a mais curta dentre as ligações que compõem a primeira esfera de coordenação ao

centro metálico, corroborando com dados experimentais [32,33]. Aqui é também observado que o complexo mais estável é o de spin baixo.

3.3.2 Cálculo dos potenciais de redução

Os dados da Tabela 3.2 mostram que o potencial de redução para o KP1019 tende a diminuir discretamente com a inserção de moléculas de água no sítio de coordenação do Ru(III) e permanece praticamente constante até duas aquações, sendo uma na posição *cis* e a outra na posição *trans*. Observa-se também que após a terceira aquação, este comportamento se inverte e o potencial de redução aumenta discretamente. Nossos resultados mostraram que, ao contrário do KP1019, o potencial de redução do NAMI-A e do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ aumenta com a substituição do ligante cloreto por água. Essa diferença nos potenciais de redução entre os complexos KP1019, NAMI-A, e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ é devida à natureza química dos ligantes na posição axial, sendo que para o KP1019 há a presença de um ligante σ doador fraco (indazóis) e no NAMI-A e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ há presença dos ligantes π -aceptores DMSO e pirazina, respectivamente, os quais estabilizam o Ru(II).

Tabela 3.2 Variação do potencial de redução dos complexos em estudo com o número de aquações, obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP//SMD.

Número de Aquações	Potencial de Redução (V) x NHE		
	KP1019	NAMI-A	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$
0	0,289 (0,00--0,03) ^b	0,0244(0,235) ^a	0,28
1	0,166	0,156	0,75
2	0,183 [0,176] ^c	0,385 [0,467] ^c	—
3	0,293	0,819	—

Valor experimental entre parênteses. ^a referência 22. ^b referência 29 ^c os valores entre colchetes são para o isômero *trans*. NHE: Eletrodo Normal de Hidrogênio.

Estudos eletroquímicos realizados por Brindell *et al.* [47] mostraram que os produtos de hidrólise do NAMI-A têm potenciais redox na faixa de 0,187-0,597 V versus NHE. A onda registrada em $E^0 = 0,597$ V foi atribuída a uma mistura de $[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{DMSO})(\text{Im})]$ e $[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DMSO})(\text{Im})]^+$, correspondendo a um aumento de 0,299 V quando comparado com o valor de $E^0 = 0,298$ V medido para NAMI-A. Também foi observado aumento de 0,12 V no potencial de redução do complexo monoaquado [9,25]. Para o complexo KP1019, observa-se também um aumento no potencial de redução após a primeira hidrólise. Ravera *et al.* [27] mediram o potencial de redução de $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_3(\text{Ind})_2]$

em $-0,072$ V vs. Ag/ AgCl ($0,127$ V vs NHE), o que corresponde a um aumento de $0,088$ V comparado com o potencial de redução do KP1019. Portanto, a tendência observada em nossos valores calculados para NAMI-A e seus produtos de hidrólise estão de acordo com os valores experimentais e mostra que é mais fácil reduzir os produtos hidrolisados do que o composto original. No entanto, para o KP1019, nossos resultados mostram que o potencial de redução diminui após a primeira hidrólise, aumenta muito pouco na segunda hidrólise e retorna quase ao seu valor original após a terceira hidrólise.

Os potenciais de redução calculados utilizando protocolo computacional TPSSh/def2-TZVP/SMD estão de acordo com os valores experimentais disponíveis. A variação observada pode estar relacionada à descrição dos efeitos do solvente, bem como efeitos de acoplamento spin-órbita, como foi apontado por outros autores para o potencial de redução de alguns compostos contendo rutênio [48]. Em alguns casos, a concordância quantitativa é obtida apenas quando moléculas explícitas de solvente são empregadas. Por exemplo, Srnec e colaboradores [49] mostrou que o modelo COSMO pode fornecer energias de solvatação imprecisas para o par redox $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+/2+}$ se a segunda esfera de solvatação não for considerada. O mesmo fenômeno foi observado anteriormente por Jaque e co-autores [50], que empregaram dois novos funcionais de troca e correlação, M11-L e M11, e o modelo de solvatação implícita SMD. Como resultado, obteve-se o potencial de redução de $0,2$ V para o par redox $\text{Ru}^{2+}|\text{Ru}^{3+}$, em concordância quase quantitativa com o experimento, mas, novamente, a segunda camada de moléculas de água teve que ser considerada. Esses resultados indicam que os modelos de solvatação como PCM e COSMO podem ser imprecisos na determinação dos potenciais de redução deste tipo de sistema, graças às ligações de hidrogênio entre a primeira e segunda camada de solvatação. No entanto, foi mostrado recentemente em nosso grupo de pesquisa que o procedimento utilizado neste trabalho produz excelentes resultados para o potencial de redução de complexos de rutênio com ligantes aminas [51].

Nos processos de redução, os elétrons são adicionados no orbital LUMO, portanto espera-se que a energia destes orbitais se correlacione com a tendência do íon metálico em receber o elétron. Assim, as energias dos orbitais HOMO e LUMO dos complexos foram analisados no nível TPSSh/def2-TZVP. As superfícies que indicam as orientações dos orbitais LUMO para o complexo KP1019 com seus derivados das reações de aquação estão representados na Figura 3.7.

Através da Figura 3.7 é possível observar que o orbital LUMO encontra-se centrado no íon metálico em todas as situações analisadas, demonstrando que de fato é o metal quem sofre redução. O orbital LUMO +1 para o KP1019 tem energia superior ao LUMO em mais de $0,21\text{eV}$ garantindo que a redução ocorre via orbital LUMO. Um comportamento semelhante é observado nos complexos que sofreram o processo de aquação, em que o orbital LUMO+1 apresenta energia superior de

aproximadamente 0,4 eV em relação ao LUMO para o complexo $[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{Ind})_2]$. Já para o $[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Ind})_2]^{1+}$, em que dois ligantes cloretos na posição *cis* no plano equatorial são substituídos por água, observa-se uma desestabilização de quase 1eV do orbital LUMO+1 em relação ao LUMO. A mesma análise do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Ind})_2]^{1+}$ pode ser estendida para quando os cloretos são substituídos na posição *trans*. Após a terceira aquação, é observado que o orbital LUMO+1 apresenta energia superior de 0,82 eV em relação ao LUMO.

A Figura 3.8, mostra que os orbitais LUMO no complexo NAMI-A e nos demais que sofreram o processo de aquação são do tipo dx^2-y^2 e estão, portanto, orientados na direção do ligante. Apesar de em todos os complexos aqui estudados observarmos uma diminuição da energia dos orbitais LUMO com a troca de ligantes cloretos, o efeito no potencial de redução é variado. Este resultado mostra a importância da natureza do ligante na posição axial, sendo que no kp1019 há a presença de um ligante inidazol σ -doador que contribui para o aumento na densidade eletrônica no centro metálico, dificultando a redução. Para o NAMI-A e o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ há presença dos ligantes π -aceptores DMSO e pirazina, respectivamente, os quais estabilizam o Ru(II) facilitando a redução.

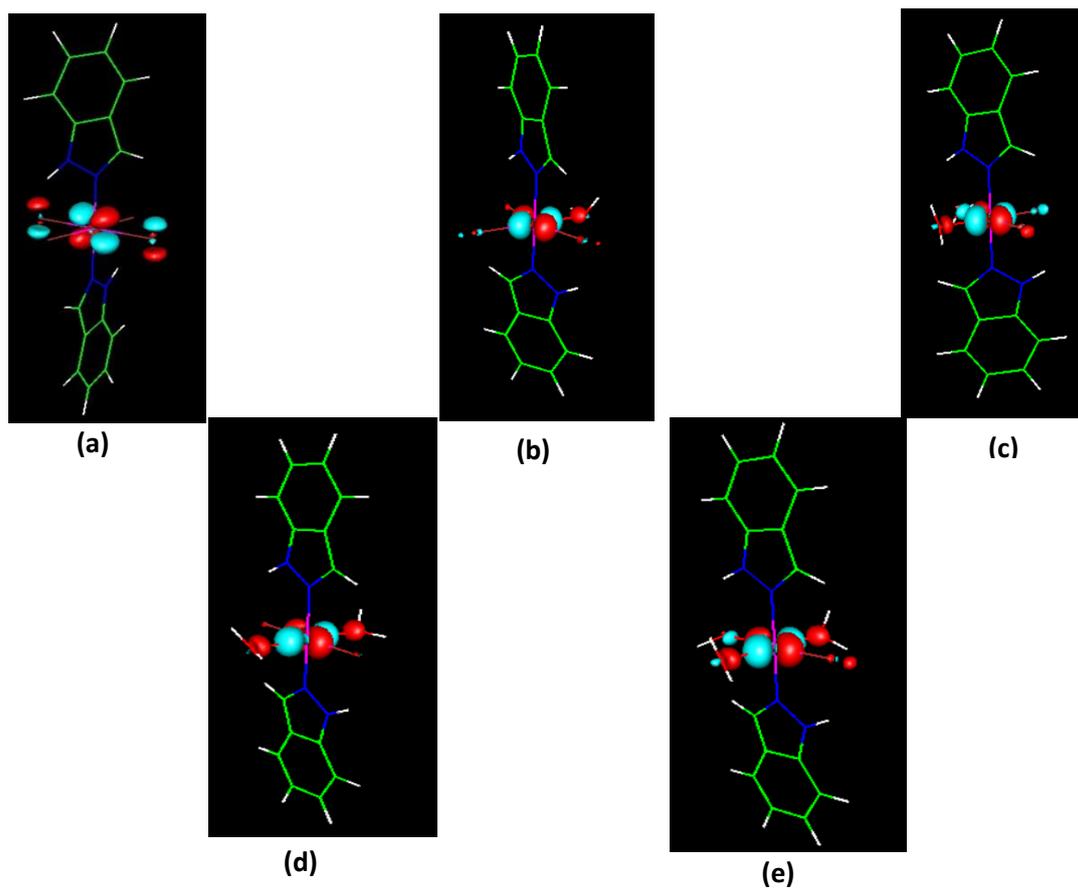


Figura 3.7 Orbitais LUMO para o complexo KP1019 (a) e seus respectivos produtos de aquações obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP. (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição *cis*, (d) dois ligantes cloretos são substituídos na posição *trans* e (e) após a terceira aquação.

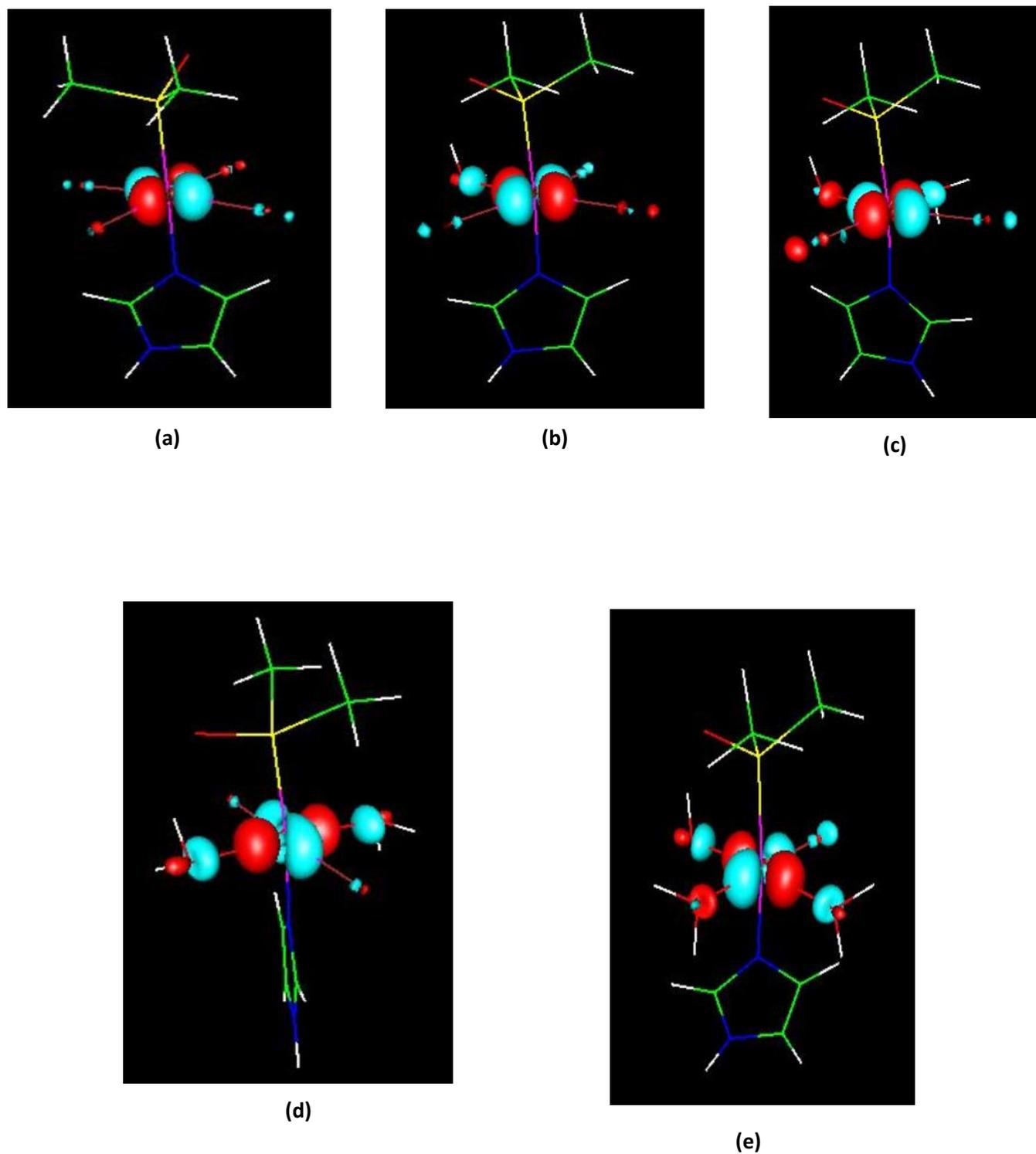


Figura 3.9 Orbitais LUMO para o complexo NAMI-A (a) e seus respectivos produtos de aquações obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP. (b) após a primeira aquação, (c) dois ligantes cloretos são substituídos na posição cis, (d) dois ligantes cloretos são substituídos na posição trans e (e) após a terceira aquação.

Como exemplo, a Figura 3.9 mostra a variação de energia dos orbitais LUMO com a substituição dos ligantes cloreto por água para o complexo NAMI-A.

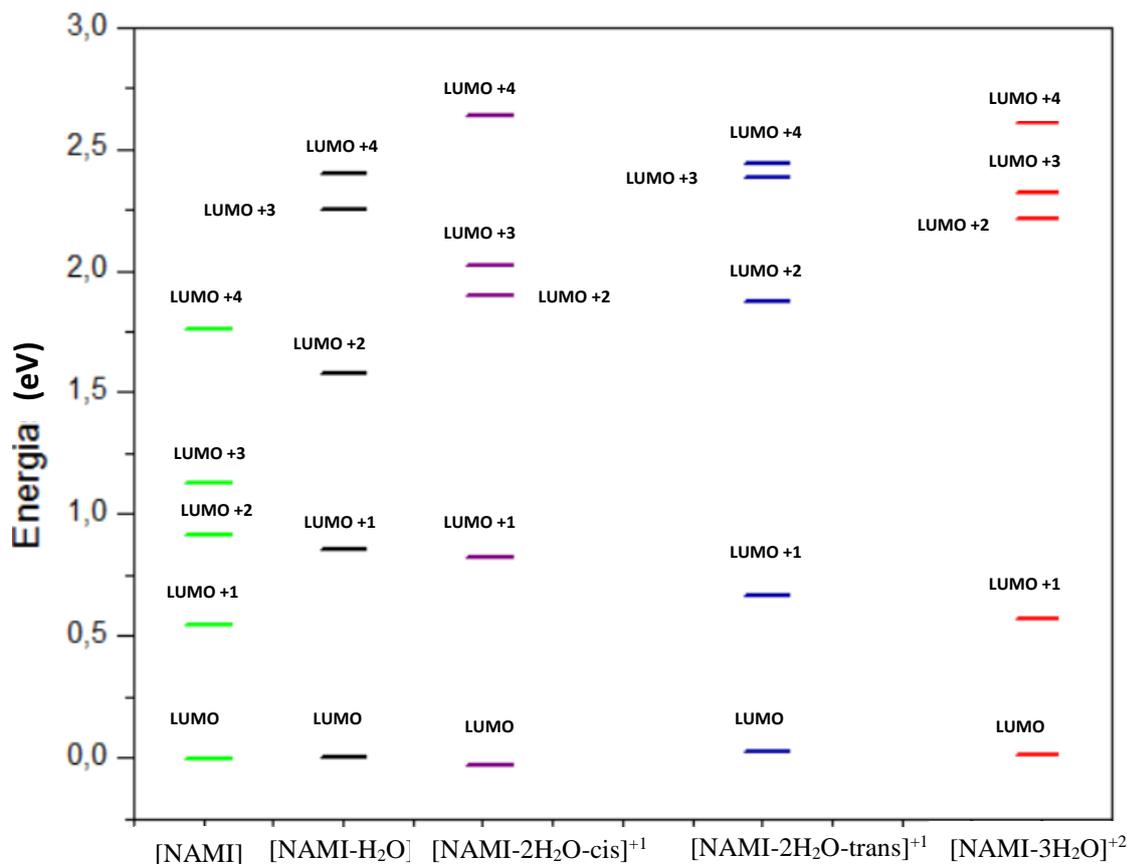


Figura 3.9 Diagrama de energia dos complexos: NAMI-A e suas respectivas substituições do íon cloreto por água, obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP.

Através da Figura 3.9 é possível observar que para o NAMI-A a diferença de energia entre o orbital LUMO +1 e o LUMO é de aproximadamente 0,55 eV e aumenta para 0,85 eV após a reação da primeira aquação. Essa diferença de 0,85 eV se mantém quando dois ligantes cloretos são substituídos por ligantes água na posição *cis*. Quando a substituição é feita na posição *trans*, a diferença de energia entre LUMO e LUMO +1 decresce para 0,63 eV e após a terceira aquação diminui para 0,56 eV. Como em todos os complexos aqui estudados a energia dos orbitais LUMO+1 são muito superiores ao do orbital LUMO, concluímos que a redução ocorre via orbital LUMO.

A termodinâmica da reação de aquação foi investigada e a Tabela 3.3 mostra a energia livre de Gibbs calculada para a reação de troca de ligantes Cl⁻/H₂O para os compostos NAMI-A e KP1019. A partir da tabela, é possível observar que para ambos compostos no estado de oxidação +2 e +3, a reação de troca de cloreto pela água é altamente favorável e a energia livre de Gibbs varia quase linearmente com o número de moléculas de água. Por exemplo, como pode ser visto na Tabela 3.3, a energia livre para a segunda e terceira hidrólise de NAMI-A é 1,95 e 2,80 vezes a energia livre para

a primeira hidrólise, respectivamente, para o estado de oxidação +3, e 2,00 e 2,96 para o estado de oxidação +2. Vale a pena notar que a energia livre para a primeira hidrólise do NAMI-A é quase da mesma magnitude para os estados de oxidação de +2 (-60,4 kcal mol⁻¹) e +3 (-57,4 kcal mol⁻¹), que também é verdade para o KP1019. No entanto, a hidrólise com o Ru(II) é sempre mais favorável que os respectivos complexos Ru(III).

Os resultados cinéticos obtidos no trabalho teórico de Vargiu *et al.*, [1] mostraram uma diminuição na energia de ativação para a primeira hidrólise de aproximadamente 3 kcal mol⁻¹ com a redução de NAMI-A. Para a segunda hidrólise, esta diminuição é ainda mais pronunciada, variando entre 7 kcal mol⁻¹ para a substituição em *cis* e 9 kcal mol⁻¹ para a substituição em posição *trans*. Os cálculos foram realizados no nível B3LYP/6-31G(d,p) de teoria. Estes resultados mostram que a hidrólise dos complexos reduzidos é termodinamicamente mais favorável e cineticamente mais acessível que os correspondentes complexos Ru(III). Por outro lado, quando a mesma análise é feita para o KP1019, observamos que a redução não influencia a energia livre total de Gibbs da reação, uma vez que a magnitude da energia livre da reação é quase a mesma para os complexos Ru(II) e Ru(III). Este fato pode auxiliar na explicação dos diferentes mecanismos de ação de ambos os fármacos

Tabela 3.3 Energia livre de Gibbs calculada para as reações de troca de ligantes envolvendo os ligantes de água e cloreto dos complexos NAMI-A e KP1019 em formas normais e reduzidas.*

NAMI-A		
N	$[\text{Ru}(\text{Cl})_{4-n}(\text{H}_2\text{O})_n(\text{Im})(\text{DMSO})]^{-1+n}$	$[\text{Ru}(\text{Cl})_{4-n}(\text{H}_2\text{O})_n(\text{Im})(\text{DMSO})]^{-2+n}$
1	-57,4	-60,4
2	-111,9 (-108,2) ^a	-120,3 (-118,4) ^a
3	-160,4	-178,8
KP1019		
	$[\text{Ru}(\text{Cl})_{4-n}(\text{H}_2\text{O})_n(\text{Ind})_2]^{-1+n}$	$[\text{Ru}(\text{Cl})_{4-n}(\text{H}_2\text{O})_n(\text{Ind})_2]^{-2+n}$
1	-56,5	-53,6
2	-115,1 (-114,0) ^a	-112,7 (-111,4) ^a
3	-175,3	-175,4

* Para o complexo NAMI-A, as reações de hidrólise foram descritas como: $[\text{Ru}^{\text{III/II}}(\text{Cl})_4(\text{Im})(\text{DMSO})]^{-1/-2} + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow [\text{Ru}^{\text{III/II}}(\text{Cl})_{4-n}(\text{H}_2\text{O})_n(\text{Im})(\text{DMSO})]^{-1+n/-2+n} + n\text{Cl}^-$. Para o KP1019, as reações de hidrólise foram descritas como: $[\text{Ru}^{\text{III/II}}(\text{Cl})_4(\text{Ind})_2]^{-1/-2} + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow [\text{Ru}^{\text{III/II}}(\text{Cl})_{4-n}(\text{H}_2\text{O})_n(\text{Ind})_2]^{-1+n/-2+n} + n\text{Cl}^-$. As energias livres de Gibbs foram calculadas no nível da teoria TPSSh/Def2-TZVP/SMD a 298,15 K e são dados em kcal.mol⁻¹. ^aValores em parênteses são para o isômero *trans*.

A energia livre de Gibbs envolvida na redução de NAMI-A e KP1019 foi calculada como $-98,0$ e $-110,0 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente. Portanto, esses resultados, apesar de qualitativos, sugerem que ambos os complexos têm preferência termodinâmica a serem primeiro reduzidos, antes de sua hidrólise, seguindo assim a via **(B)** mostrado na Figura 3.1. De fato, a solvólise das espécies Ru(II) geradas eletroquimicamente foi observada tanto para o KP1019 quanto para o NAMI-A [8,9,25,29] e, em geral, a reação de troca água/cloreto é acelerada com a redução das espécies Ru(III). Entretanto, no meio biológico, não é fácil atribuir uma via preferencial para o mecanismo de ação, pois vários processos podem alterar o potencial de redução do fármaco e, portanto, alterar a taxa do processo de solvólise. Por exemplo, no meio biológico, os pró-fármacos podem ser reduzidos por redutores biológicos bem conhecidos, tais como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), ascorbato, tocoferol (vitamina E), Cys e GSH, para os quais o potencial de redução no pH fisiológico, está próximo $-0,3$ a $-0,5 \text{ V}$ [51,52]. No entanto, o mecanismo de reação envolvido na redução desses complexos não é conhecido e, portanto, na escala de tempo necessária para a redução biológica desses pró-fármacos, a solvólise pode ocorrer. Experimentos de RMN demonstraram que, sob condições tamponadas, o KP1019 é reduzido em 3,5 h na presença de GSH e dentro de minutos na presença de ácido ascórbico [26]. Tem sido sugerido que o transporte e entrega dos fármacos de Ru(III) ocorrem através da interação com proteínas séricas, como transferrina e albumina [53], e complexos de rutênio não são reduzidos efetivamente enquanto ligados a essas proteínas [29]. Portanto, a aquação pode ocorrer antes da redução e alterar as propriedades redox.

Os resultados relatados nas Tabelas 3.2 e 3.3 também sustentam a hipótese de que as formas reduzidas dos complexos aqui estudados, assim como seus produtos de hidrólise, são relevantes para sua atividade antitumoral, pois sua formação é termodinamicamente favorável e seus potenciais de redução são biologicamente acessíveis. Para ambos os complexos, a termodinâmica dos processos de hidrólise é extremamente favorável e os cálculos de energia livre de Gibbs para as sucessivas reações de hidrólise revelaram que todos os ligantes de cloreto poderiam ser substituídos favoravelmente por água. Esta evidência está de acordo com o recente trabalho de Keppler e colaboradores, [54] que relataram a estrutura de raios X do KP1019 ligado à albumina sérica humana (HSA). Os autores mostraram que o KP1019 perde todos os ligantes originais quando cristalizado com a proteína. Um comportamento análogo também foi observado para os complexos NAMI e NAMI-A [55,56].

Como discutido nesse capítulo, a redução dos complexos NAMI-A e KP1019 parece desempenhar uma função importante em suas ações antitumorais. No entanto, é necessário ter em mente que a labilidade ou a inércia das espécies Ru(III) e Ru(II) dependerá da natureza tanto do grupo de saída como dos ligantes transportadores, além da carga líquida, de modo que generalizar a química desses compostos pode ser muito perigosa. Apenas quando o ligante de saída é aniônico a redução de

um complexo Ru(III) para as espécies Ru(II) correspondentes resulta em um aumento da taxa de troca de ligantes devido à diminuição da carga líquida.

Na verdade, não há ainda evidência experimental inequívoca e conclusiva na literatura, incluindo os compostos líderes de Ru(III) NAMI-A e KP1019, que a redução - embora possível - realmente também ocorre *in vivo*. Ao contrário, em um recente trabalho utilizando o método XANES realizados em NKP1339 (*trans*-[tetracloridobis (1H-indazole) rutenato de sódio (III)]) em vários tecidos (tumor incluído) de um rato portador de SW480 (linha de células do câncer de cólon humano), Blazevic e colaboradores sugerem que o complexo permanece em seu estado de oxidação +3 após 24 horas [57]. Além disso, no mesmo trabalho foi concluído também que a presença de espécies Ru(II) 24 horas após o tratamento pode ser descartada revelando uma clara contradição com o chamado mecanismo de “ativação por redução”.

Outro fator relevante é que sob condições biológicas, os compostos sofrem profundas transformações em seus ambientes de coordenação (muito rapidamente no caso do NAMI-A), devido a interações com biomoléculas e produzindo metabólitos com E° desconhecido [58,59]. De fato, vários autores demonstraram que nem o NAMI-A ou KP1019 (ou seus metabólitos) são efetivamente reduzidos quando ligados a proteínas séricas [60–63]. Assim, a redução ocorreria - na melhor das hipóteses - somente após a liberação da proteína no interior da célula. Essas evidências demonstram a complexidade de estudar processos redutivos envolvendo metais de transição em sistemas biológicos. No entanto, serviram até o momento como ponto de partida para o entendimento do mecanismo de ação de metalofármacos tão promissores no combate ao câncer.

3.4 Conclusão

Nesta etapa do trabalho a correlação entre o potencial de redução e a reação de substituição de ligantes cloretos por água nos complexos NAMI-A, KP1019 e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ foi avaliada. Os resultados estruturais, utilizando o nível de teoria TPSSh/def2-TZVP, revelaram estruturas com geometria octaédrica distorcida em torno do átomo de rutênio. Nossos resultados mostraram também que enquanto o potencial de redução dos compostos NAMI-A e o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ são sensíveis a troca de ligantes, o potencial de redução do KP1019 permanece constante com a aquação. A avaliação da energia livre de Gibbs mostrou que o processo de aquação é favorável para todas as substituições. Foi observado também que nos complexos NAMI-A e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ houve uma diminuição significativa da energia livre de Gibbs para a primeira aquação, indicando que os complexos são reduzidos antes da reação de troca de ligantes. No composto KP1019 a energia livre de aquação permanece praticamente constante com a redução.

Nossos resultados mostraram também que os compostos exibem diferentes comportamentos eletroquímicos após a hidrólise. O potencial de redução do NAMI-A é sensível ao grau de hidrólise, aumentando com o número de ligantes cloreto substituídos pela água. Por outro lado, o potencial de redução do KP1019 não varia com a hidrólise e permanece quase constante. Nossos resultados mostraram que, termodinamicamente, os complexos NAMI-A e KP1019 têm uma preferência termodinâmica a serem reduzidos antes de sofrer hidrólise, já que a energia livre envolvida no processo de redução dos complexos é mais negativa.

Além disso, foi possível concluir que apesar de serem estruturalmente parecidos, NAMI-A e KP1019 apresentam importantes diferenças eletrônicas que afetam fortemente suas respectivas reatividades e, portanto, seus perfis biológicos. O comportamento diferente é provavelmente mediado por suas diferentes interações com as células. De fato, o KP1019 é capaz de entrar nas células em quantidades apreciáveis, enquanto o NAMI-A se localiza principalmente no meio extracelular ou na membrana celular, sendo esta, uma distinção mecanicista crucial [64].

A escolha de pró-farmacos com diferentes mecanismos de ação é essencial para conhecermos como é possível manipular quimicamente um composto para atingir alvos biológicos específicos. Nos complexos estudados neste capítulo, foi possível observar que a mudança de um ligante π -aceptor (DMSO) no NAMI-A para um ligante σ -doador (indazol) no KP1019 é suficiente para alterar a internalização do pró-farmaco devido às diferenças eletrônicas. Assim, se a intenção são alvos biológicos da matriz extracelular com o objetivo de diminuir metástase do câncer, por exemplo, complexos com ligantes capazes de acomodar a carga negativa doada ao metal (pelo alvo biológico, ou por resultado de redução) parecem ser uma opção viável. Por outro lado, se a intenção é que o pró-farmaco seja internalizado pela célula e apresente maior citotoxicidade, ligantes σ -doadores parecem ser uma opção melhor.

3.5 Referências Bibliográficas

1. Vargiu, A. V.; Robertazzi, A.; Magistrato, A.; Ruggerone, P.; Carloni, P. *Phys. Chem. B* **112** (2008) 4401.
2. Bouma, M.; Nuijen, B.; Jansen, M. T.; Sava, G.; Flaibani, A.; Bult, A.; Beijnen, J. H. *Int. J. Pharm.* **248** (2002) 239.
3. King, A.; Pieper, T.; Wissiack, R.; Rosenberg, E.; Keppler, B. K. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6** (2001) 292.
4. Groessl, M.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 1060.
5. Scolaro, C.; Chaplin, A. B.; Hartinger, C. G.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Keppler, B. K.; Sava, G.; Dyson, P. J. *Dalton Trans.* **43** (2007) 5065.
6. Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **232** (2002) 69.
7. Sava, G.; Gagliardi, R.; Bergamo, A.; Alessio, E.; Mestroni, G. *Anticancer Res.* **19** (1999) 969.
8. Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **236** (2003) 209.
9. Reisner, E.; Arion, V. B.; Fátima, M.; Da Silva, C. G.; Lichtenecker, R.; Eichinger, A.; Keppler, B. K.; Kukushkin, V. Y.; Pombeiro, A. J. L. *Inorg. Chem.* **43** (2004) 7083.
10. Clarke, M. J.; Zhu, F.; Frasca, D. R. *Chem. Rev.* **99** (1999) 2511.
11. Gransbury, G. K.; Kappen, P.; Glover, C. J.; Hughes, J. N.; Levina, A.; Lay, P. A.; Musgravee, I. F.; Harris, H. H. *Metallomics* **8** (2016) 762.
12. Webb, M. I.; Walsby, C. J. *Dalton Trans.* **40** (2011) 1322.
13. Levina, A.; McLeod, A. I.; Gasparini, S. J.; Nguyen, A.; De Silva, W. G. M.; Aitken, J. B.; Harris, H. H.; Glover, C.; Johannessen, B.; Lay, P. A. *Inorg. Chem.* **54** (2015) 7753.
14. Jakupec, M. A.; Reisner, E.; Eichinger, A.; Pongratz, M.; Arion, V. B.; Galanski, M.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *J. Med. Chem.* **48** (2005) 2831.
15. Kim, B. J.; Hambley, T. W.; Bryce, N. S. *Chem. Sci.* **2** (2011) 2135.
16. Zhang, J. Z.; Bryce, N. S.; Siegele, R.; Carter, E. A.; Paterson, D.; De Jonge, M. D.; Howard, D. L.; Ryan, C. G.; Hambley, T. W. *Integr. Biol.* **4** (2012) 1072.
17. Rademaker-Lakhai, J. M.; Van Den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 3717.
18. Sava, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M.; Zabucchi, G.; Cocchietto, M.; Bergamo, A.; DiGiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartor, L.; Garbisa, S. *Clin. Cancer Res.* **9** (2003) 1898.
19. Sava, G.; Clerici, K.; Capozzi, I.; Cocchietto, M.; Gagliardi, R.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Perbellini, A. *Anti-Cancer Drugs* **10** (1999) 129.

20. Jakupec, M. A.; Reisner, E.; Eichinger, A.; Pongratz, M.; Arion, V. A.; Galanski, M.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *J. Med. Chem.* **48** (2005) 2831.
21. Costa, G.; Balducci, G.; Alessio, E.; Tavagnacco, C.; Mestroni, G.; *J. Electroanal. Chem.* **296** (1990) 57.
22. Alessio, E.; Balducci, G.; Lutman, A.; Mestroni, G.; Calligaris, M.; Attia, W. M. *Inorg. Chim. Acta* **203** (1993) 205.
23. Hartmann, M.; Lipponer, K.-G.; Kepler, B. K.; *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 267, 137. [24]Frasca, D.
24. R.; Clarke, M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 8523.
25. Ravera, M.; Baracco, S.; Cassino, C.; Zanello, P.; Osella, D. *Dalton Trans.* **15** (2004) 2347.
26. Schluga, P.; Hartinger, C. G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *Dalton Trans.* **14** (2006) 1796.
27. Ravera, M.; Cassino, C.; Baracco, S.; Osella, D. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2006) 740.
28. Cebrián-Losantos, B., Reisner, E., Kowol, C. R., Roller, A., Shova, S., Arion, V. B., & Keppler, B. K. (2008). *Inorg. Chem.* **47** (2008) 6513.
29. Reisner, E.; Arion, V. B.; Kepler, B. K.; Pombeiro, A. J. L.; *Inorg. Chim. Acta* **361** (2008) 1569.
30. Mestroni, G.; Alessio, E.; Sava, G.; Pacor, S.; Coluccia, M. *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany, **1993**.
31. Haukka, M.; Ahlgrén, M.; Pakkanen, T. A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **9** (1996) 1927.
32. Chen, J.; Chen, L.; Liao, S.; Zheng, K.; Ji, L. *Dalton Trans.* **32** (2007) 3507.
33. Chagas, M. A.; Rocha, W. R. *Chem. Phys. Lett.* **612** (2014) 78.
34. Parr, R. G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, **1989**.
35. Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Tao, J.; Perdew, J. P. *J. Chem. Phys.* **119** (2003) 12129.
36. Weigend, F.; Ahlrichs, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005) 3297.
37. Weigend, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006) 1057.
38. van Lenthe, E.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G. *J. Chem. Phys.* **99** (1993) 4597.
39. van Lenthe, E.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G. *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 9783.
40. van Lenthe, E.; van Leeuwen, R.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G. *Int. J. Quantum Chem.* **57** (1996) 281.
41. Rulíšek, L. *J. Phys. Chem. C* **117** (2013) 16871.
42. Isse, A. A.; Gennaro, A. *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 7894.
43. Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378.
44. Klamt, A.; Schuurmann, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* (1993) 799.
45. Neese, F. *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* **2** (2012) 73.

46. Peti, W.; Pieper, T.; Sommer, M.; Keppler, B. K.; Giester, G. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1999 (1999) 1551.
47. Brindell, M.; Piotrowska, D.; Shoukry, A. A.; Stochel, G.; van Eldik, R. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 809.
48. Rulíšek, L.; *J. Phys. Chem. C* 117 (2013) 16871.
49. Srnec, M.; Chalupsky, J.; Fojta, M.; Zendlova, L.; Havran, L.; Hocek, M.; Kyvala, M.; Rulíšek, L. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 10947.
50. Jaque, P.; Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem.* 111 (2007) 5783.
51. Rodrigues, G. L. S.; Rocha, W. R. *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 11821.
52. Hamer, M.; Suarez, S. A.; Neuman, N. I.; Alvarez, L.; Muñoz, M.; Marti, M. A. *Inorg. Chem.* 54 (2015) 9342.
53. (a) Suarez, A. A.; Neuman, N. I.; Muñoz, M.; Álvarez, L.; Bikiel, D. E.; Brondino, C. D.; Ivanović-Burmazović, I.; Miljkovic, J. L.; Filipovic, M. R.; Martí, M. A.; Doctorovich, F.; *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 4720. (b) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Kepler, B. K.; *Chem. Sci.* 5 (2014) 2925.
54. Bijelic, A.; Theiner, S.; Keppler, B. K.; Rompel, A.; *J. Med. Chem.* 59 (2016) 5894.
55. Levina, A.; Lay, P. A.; *Inorg. Chem. Front.* 1 (2014) 44.
56. Casini, A.; Temperini, C.; Gabbiani, C.; Supuran, C. T.; Messori, L.; *Chem. Med. Chem.* 5 (2010) 1989.
57. Blazevic, A.; Hummer, A.A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Filipits, M.; Cibin, G.; Keppler, B. K.; Rompel, A. *Sci. Rep.* 7 (2017) 40966.
58. Liu, M.; Lim, Z. J.; Gwee, Y. Y.; Levina, A.; Lay, P. A.; *Angew. Chem. Int.* 49 (2010) 1661; *Angew. Chem.* 122 (2010) 1705.
59. Levina, A.; Aitken, J. B.; Gwee, Y. Y.; Lim, Z. J.; Liu, M.; Singharay, A. M.; Wong, P. F.; Lay, P. A. *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 3609.
60. Piccioli, F.; Sabatini, S.; Messori, L.; Orioli, P.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1135.
61. Timerbaev, A. R.; Foteeva, L. S.; Rudnev, A. V.; Abramski, J. K.; Połec-Pawlak, K.; Hartinger, C. G.; Jarosz, M.; Keppler, B. K. *Electrophoresis* 28 (2007) 2237.
62. Cetinbas, N.; Webb, M. I.; Dubland, J. A.; Walsby, C. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 131.
63. Webb, M. I.; Walsby, C. J. *Dalton Trans.* 40 (2011) 1322..
64. Alessio, E.; Messori, L. 24(2019). 24(10), 1995.

Capítulo 4 – Interações dos complexos NAMI-A KP1019 e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})(\text{Pz})]^{2+}$ com biomoléculas e nucleobase do DNA

4.1 Introdução

O modo de ação de fármacos a base de Ru é complexo e, em geral, pouco compreendido em relação aos complexos de platina. Diferentes mecanismos de ação antitumoral dos complexos de Ru têm sido propostos, sendo em alguns casos interação direta com o DNA e/ou indução de estresse oxidativo [1-5]. Este comportamento químico é vantajoso, pois, compostos que têm como alvo DNA, um alvo ubíquo presente nas células doentes e saudáveis, tendem a ser sistemicamente mais tóxico do que aqueles com alvos específicos do câncer.

Para se tornarem espécies ativas, tem sido proposta uma etapa de aquação ou solvólise devido à diferença de concentração de íons cloreto $[\text{Cl}^-]$ no plasma sanguíneo e no citoplasma das células [6-8]. Esta diferença faz com que os complexos de rutênio (II), sofram ativação por hidrólise no interior das células cancerígenas através da troca do ligante cloreto por água. A espécie hidrolisada então sofre reações de substituição por biomoléculas e/ou nucleobases.

Depois de ser ativada, distribuídas e localizadas em compartimentos celulares, o fármaco mata a célula cancerígena através de interações com diferentes componentes celulares ou com DNA, o(s) alvo(s) primário(s) é(são) ainda uma questão em aberto. Alguns trabalhos têm sugerido que a ação antimetastática do NAMI-A está relacionada com sua cinética de troca de ligante relativamente rápida, dificultando sua internalização pelas células[9]. Outras publicações sugerem que o NAMI-A atua no bloqueio do ciclo celular no ponto de transição G2/M, devido ao acúmulo de proteínas Cdk1 inativas, que é responsável por informar danos na molécula de DNA [10,11]. Além disso, o NAMI-A também provoca inibição de proteínas topoisomerasas, enzimas importantes nos processos de replicação e empacotamento do DNA [12]. Até o presente momento, observações experimentais indicam que a ação farmacológica do NAMI-A é o resultado de uma variedade de mecanismos concorrentes e que aparentemente não envolvem interação direta com DNA[13,14].

Já a atividade antitumoral do KP1019 está relacionada predominantemente a efeitos citotóxicos que surgem de uma interferência direta com a sinalização celular e vias metabólicas [15]. Mais precisamente, uma das mais recentes e creditadas interpretações do mecanismo molecular do KP1339 tende a descartar um dano direto ao DNA como o principal determinante de sua ação citotóxica[16]. Acredita-se que a atividade citotóxica do KP1019 está baseada no estresse oxidativo e estresse do RE (retículo endoplasmático), em vez de danos ao DNA [1,17]. KP109 têm demonstrado causar estresse oxidativo e perturbação de funções em células cancerosas no ER, através do direcionamento da

proteína reguladora de glicose 78 kDa (GRP78) para um nível normal [1,16,18]. Deste modo, a apoptose é induzida por via mitocondrial intrínseca [15,16]. No entanto, esses mecanismos podem ser apenas parte de um cenário mais complexo.

Algumas observações mais recentes estão de acordo com esta hipótese. Notavelmente, em virtude de sua cinética de troca de ligante relativamente rápida, NAMI-A não é significativamente internalizado pelas células. Essa parece ser uma grande diferença mecanista em comparação com o KP1019, que é internalizado pelas células em quantidades muito maiores. A diferença na captação de rutênio foi robustamente apoiada em um estudo comparativo realizado por Harris *et al.* com base na imagem de fluorescência de raios X de células individuais [19].

Já para o *trans*-[Ru(NH₃)₄(Pz)(H₂O)]²⁺ a ativação da atividade biológica está relacionada com coordenação direta ao DNA preferencialmente nos sítios dos átomos N3 e N7 da guanina e adenina [20,21]. A preferência por esse sítio se deve a disponibilidade estrutural, pois, os outros átomos de nitrogênio estão envolvidos em ligações de hidrogênio responsáveis pela manutenção da estrutura do DNA, ou utilizados em ligações glicosídicas com as moléculas de riboses. Estes dados têm mostrado que as espécies mono-hidrolisadas dos compostos aqui estudados podem interagir com alguns competidores intracelulares influenciando no efeito e biodisponibilidade do fármaco. Exemplos dessas moléculas são: aminoácidos, peptídeos, proteínas, histidina, cisteína, metionina, glutatona e metalotioneína.

Wang e colaboradores [22] demonstraram que os complexos baseados em Ru seguem diferentes mecanismos de reação do que a cisplatina na reação competitiva entre os ligantes do doador S, como os ligantes GSH e doador-N. Neste mecanismo, a reação entre o complexo de rutênio e GSH leva à formação de um composto tiolato de rutênio, que pode então sofrer oxidação por oxigênio para produzir um complexo original de sulfonato. A oxidação da GSH coordenada no complexo tiolato parece fornecer uma rota fácil para a troca de GSH e a formação de ligação a Ru-N7. Isso pode fornecer um mecanismo único de ação e explicar a falta de resistência cruzada com medicamentos de platina, que é uma vantagem clínica em potencial. Outras atividades citotóxicas de NAMI-A e KP1019 podem ser atribuídas às suas interações com nucleobases de DNA em geral ao sítio N7 da guanina [1,23]. Vale ressaltar que a interação de compostos de rutênio com ácido nucléico e derivados gera compostos com propriedades químicas e fotofísicas com importantes aplicações em nanotecnologias, diagnósticos e terapias médicas, e recentemente revisado por Flamme *et al.* [24].

Apesar da importância dessas interações competitivas na biodisponibilidade e efeitos do fármaco, poucos estudos teóricos sobre a competição entre nucleotídeos N-doadores, aminoácidos S-doador e peptídeos por complexos anticancerígenos de rutênio (II) têm sido reportados. Entretanto, entender as diferentes características estruturais, bem como as propriedades termodinâmicas da formação de

adutos de Ru (II) com alguns alvos biológicos estratégicos e as nucleobases do DNA, tanto em fase gás, e, principalmente em solução, são etapas importantes que ajudam a compreender a interação destes compostos no meio celular. Nesta linha, trabalhos teóricos que auxiliem algumas dessas etapas são muito bem-vindos. Por estes motivos, nesta etapa do trabalho, nos ocupamos em descrever a termodinâmica de solvatação dos complexos de rutênio com os alvos biológicos cisteína (Cys), glutathiona (GSH), guanina (nos sítios de coordenação N3 e N7), através de ciclos termodinâmicos, determinando-se a energia livre do processo em solução aquosa no nível de teoria DFT. As estruturas dos alvos biológicos são mostradas na Figura 4.1.

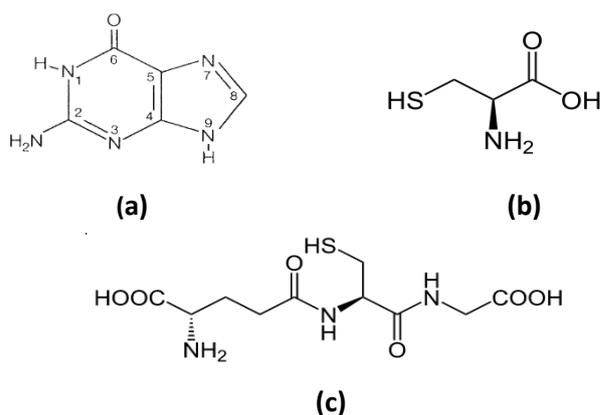


Figura 4.1 Estrutura dos alvos biológicos (a) guanina (nos sítios de coordenação N3 e N7), (b) cisteína (Cys) e (c) glutathiona (GSH), estudados via reação com o complexo de rutênio.

Como discutido na seção 1.1, células cancerosas apresentam uma maior concentração de GSH em relação a células saudáveis, sendo que mais de 90% na forma reduzida e uma quantidade inferior a 10% na forma oxidada de dissulfeto (GSSG). O aumento nos níveis de GSH em relação ao de GSSG, é um indicativo de estresse oxidativo, o qual pode conduzir a apoptoses [21,22]. As estruturas da glutathiona em sua forma reduzida e oxidada são mostradas na Figura 4.2.

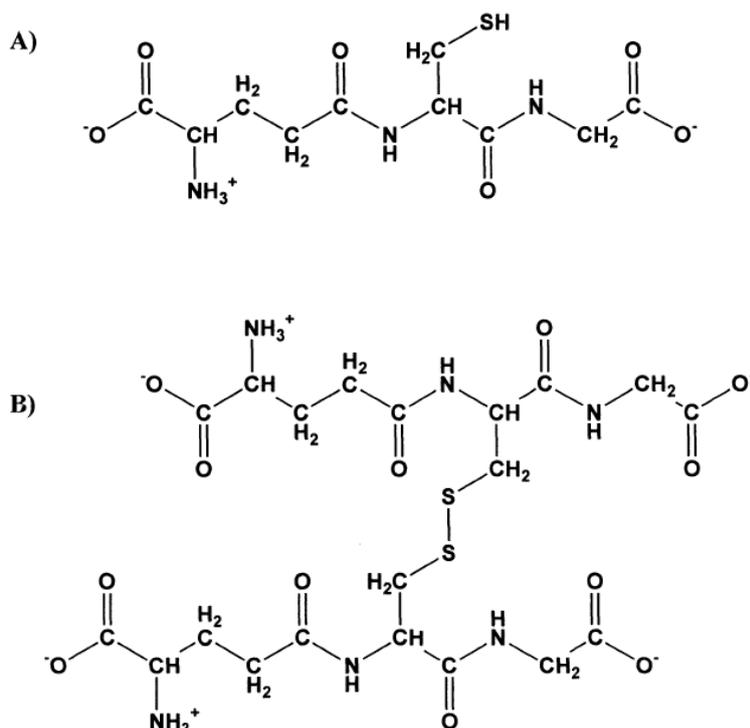
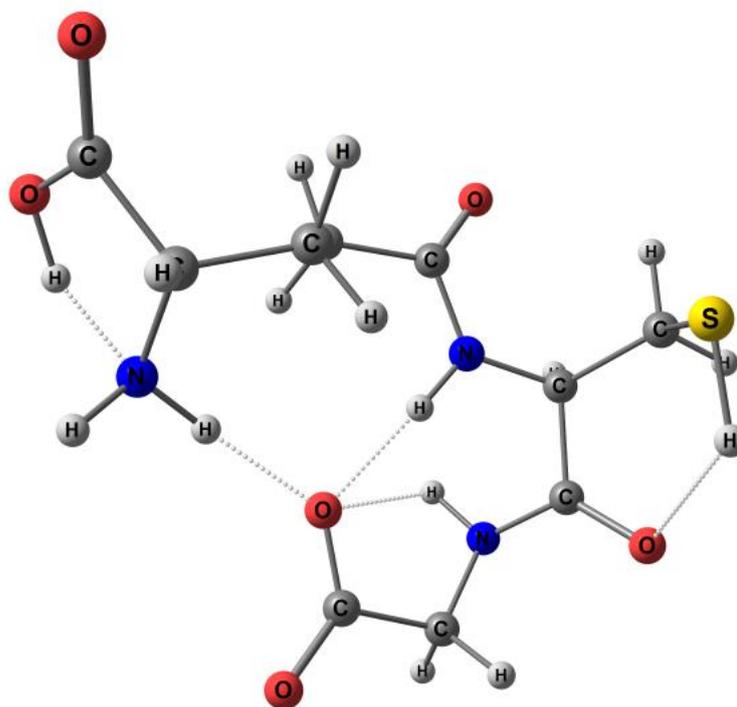
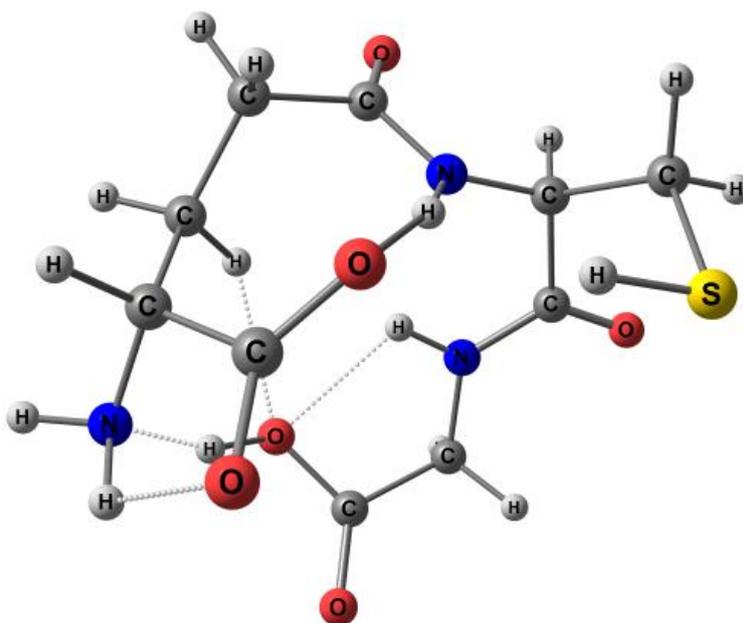


Figura 4.2 Estruturas das formas reduzida GSH (A) e oxidada, GSSG (B), da Glutathiona existindo no pH fisiológico.

A GSH já teve seu espaço conformacional bem explorado por simulações computacionais e trabalhos experimentais [25-28], sendo mostrado que sua estrutura é bem flexível e não apresenta uma forte preferência conformacional em qualquer pH. Por isso, adotamos para estudo uma forma estendida [27], e outra circular obtida por estudo conformacional realizado no programa TINKER [29] (Figura 4.3). A análise conformacional da glutathiona foi realizada em meio aquoso com constante dielétrica $\epsilon_0 = 78,39$ e como resultado foram obtidas 6818 estruturas conformacionais diferentes. Através da subrotina *Analyze* a estrutura de menor energia foi selecionada e utilizada nas demais etapas do protocolo computacional.



(a)

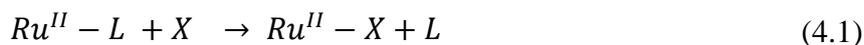


(b)

Figura 4.3 Estruturas estendida (a) e circular (b) da GSH, utilizadas para no estudo de formação dos adutos de Ru-GSH.

Muitas reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizáveis, contudo há outros possíveis sítios de coordenação com metais de transição em sua estrutura, por exemplo, os grupos carboxilatos e aminos. Em nosso trabalho, focamos na coordenação entre o centro metálico e glutatona via átomo de enxofre, pois, segundo a classificação de Pearson, o rutênio é um ácido macio e tem maior afinidade pelo átomo de enxofre.

Para avaliar teoricamente a interação entre os complexos estudados nesta Tese e as biomoléculas selecionadas, voltamos ao esquema mostrado no Capítulo 3 (Figura 3,1) que mostra as diferentes possibilidades reacionais dos complexos. Foi concluído neste capítulo que enquanto o NAMI-A exibe uma preferência pela via em que ocorre primeiro a redução e depois a reação de aquação (hidrólise) o KP1019 não apresenta vias preferenciais. De posse dessa informação, é possível continuar o estudo das interações com o ligante (**L**) tendo em vista o perfil eletroquímico destes compostos. Para o NAMI-A a via preferencial **B** será mantida e primeiramente será analisado a formação dos adutos pela reação do complexo hidrolisado com a glutatona, cisteína e nucleobase do DNA representada aqui conforme a seguinte equação química genérica:



Em que o ligante $L=H_2O$ nos complexos $[RuCl_3(H_2O)(Ind)_2]^{1-}$, $[RuCl_3(H_2O)(DMSO)(Im)]^{1-}$ e $[Ru(NH_3)_4(H_2O)(Pz)]^{2+}$ são substituídas pelas biomoléculas (X) e a nucleobase guanina do DNA nos sítios N3 e N7.

No entanto, como o mecanismo de ação dos complexos ainda são desconhecidos e o KP1019 não apresenta via preferencial de reação, foi analisado duas novas possibilidades como mostrada na Figura 4.4 para o composto NAMI-A. Na primeira possibilidade, o composto pode inicialmente sofrer reação de troca de ligantes antes da redução (via **E**), pois, como mostrado no Capítulo 3, esse é um processo espontâneo. Como resultado será gerado a espécie mono-aquo-Ru(III) (**1E**). Este complexo pode então interagir diretamente com o alvo biológico **L** formando o composto (**2E**) em que o centro metálico permanece oxidado. A segunda possibilidade é a via (**D'**), onde a interação com alvo biológico ocorrerá após a segunda aquação e os reagentes serão, portanto, os compostos aquo-Ru(II) (**1D'**) e (**2D'**) em que os ligantes água podem ser substituídos tanto na posição *cis* como na posição *trans* em relação aos ligantes cloretos. As energias livres de Gibbs para ambos processos são próximas e favoráveis, em torno de 120 (formação dos isômeros *cis* e *trans*) e 114 (formação dos isômeros *cis* e *trans*) kcal mol⁻¹ para o NAMI-A e KP1019 respectivamente como foi mostrado na Tabela 3.3. Em seguida há o deslocamento da molécula de água pelo alvo biológico **L**, formando os compostos **L-**

Ru(II) nas posições *cis* (**3D'**) e *trans* (**4D'**). Outros processos competitivos podem ocorrer, como por exemplo o deslocamento sucessivo de cloreto pela água através da via (**E**) ou interação direta com o alvo biológico **L** pela via (**D**) gerando o aduto reduzido no qual o alvo **L** desloca uma molécula de água. A sequência dos eventos ou, as vias preferidas, dependerão da cinética dessas reações e também do potencial de redução das espécies, concentração de cloretos e estabilidade termodinâmica dos complexos formados

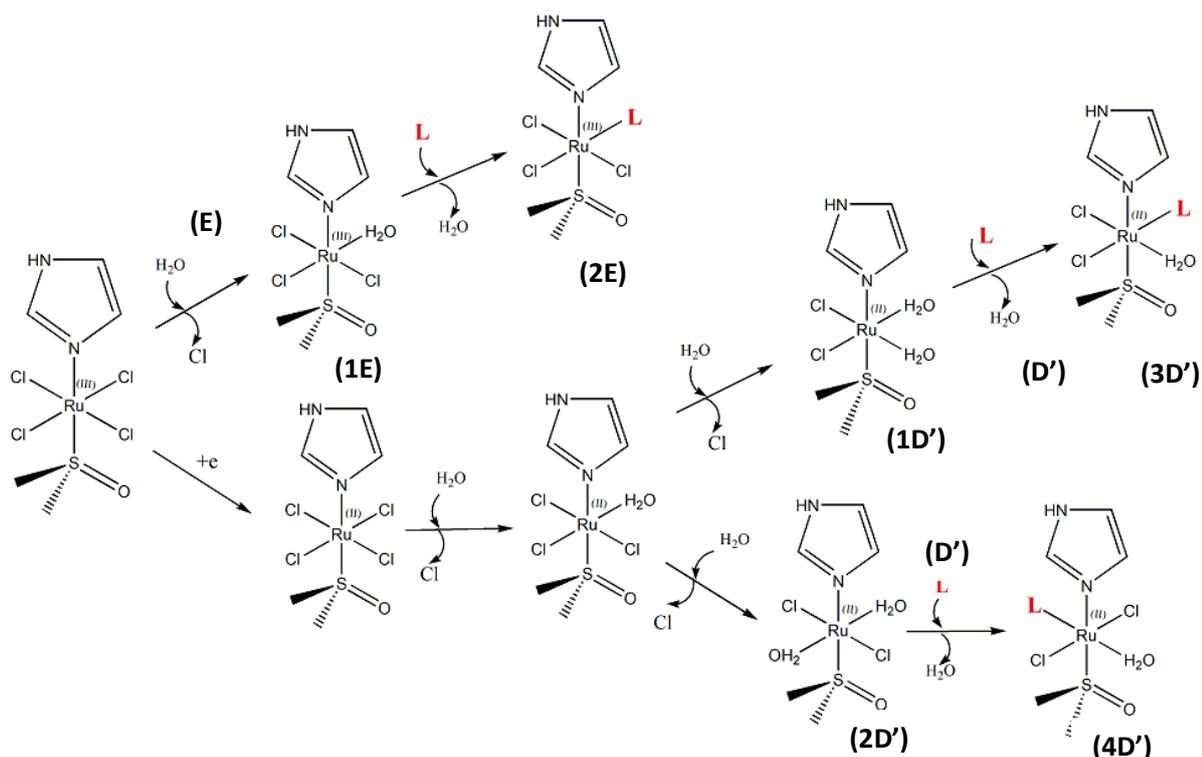


Figura 4.4 Representação esquemática dos possíveis caminhos de reação biológica competitiva para o complexo NAMI-A. Na via (**E**) NAMI-A inicialmente sofre reação de deslocamento do ligante gerando a espécie (**1E**) de mono-aquo-Ru(III), que posteriormente interage com alvo biológico **L**, gerando o composto Ru^{III}-**L**(**2E**). Na via (**D'**) o composto já reduzido e hidrolisado pela segunda vez interage com os alvos biológicos **L**, gerando os adutos **3D'** e **4D'**.

4.2 Metodologia Teórica

Os cálculos de otimização de geometria e frequências vibracionais foram realizados ao nível DFT [30] de teoria utilizando o funcional de troca-correlação TPSSh[31]. Este foi escolhido em virtude de fornecer valores de parâmetros geométricos em bom acordo com valores experimentais [32]. Foi utilizado o conjunto de funções de base def2-TZVP [33] e o e conjunto de base auxiliar def2-TZVP/J [34] para todos os átomos. Efeitos relativísticos foram tratados utilizando o formalismo *Zeroth Order Regular Approximation* (ZORA) [35,36]. O efeito do solvente foi incluído utilizando o modelo

contínuo *Conductor-like Screening Model* COSMO [37] desenvolvido por Klamt e o SMD, desenvolvido por Truhlar and Cramer [38] mantendo o mesmo nível de teoria do cálculo de otimização e frequência. Todos os cálculos foram realizados no programa ORCA [39]. A energia livre de Gibbs foi considerada a fim de verificar a espontaneidade de formação dos adutos resultantes da interação dos complexos estudados nesse trabalho com as biomoléculas cisteína, glutatona e a base guanina do DNA (ver figura 4.7). A correção térmica para a energia do ponto zero a 298,15K foi obtida através do cálculo da frequência já referido. Neste sentido, a energia livre em vácuo ($\Delta G_{gás}$) é definida como a soma entre a energia eletrônica e a correção térmica. O efeito do meio de solvente ($\Delta G_{solvatação}$) foi incluído com o modelo contínuo COSMO, em que apenas as interações eletrostáticas são consideradas e o modelo SMD que inclui os termos de cavitação e dispersão. Assim o ΔG total das reações químicas propostas são calculadas através do ciclo termodinâmico apresentado na Figura 4.5.

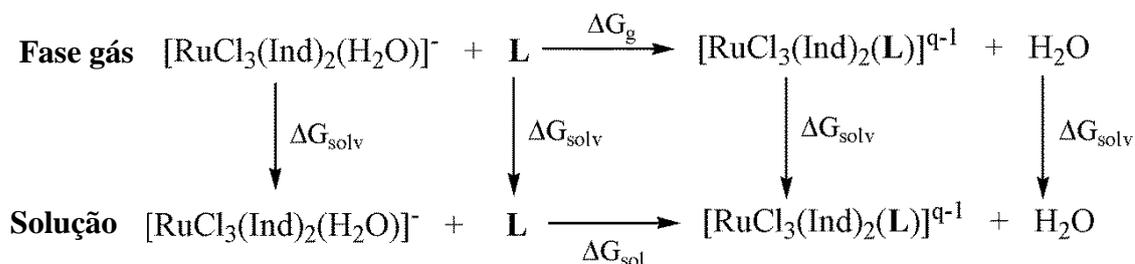


Figura 4.5. Esquema do ciclo termodinâmico proposto para a descrição do processo de solvatação dos adutos. Onde **L** = cisteína (Cys), glutatona (GSH), sítios GN7 e GN3 da guanina.

Portanto:

$$\Delta G_{solução} = \Delta G_{gás} + \Delta(\Delta G_{solvatação}) \quad 4.2$$

Em que:

$\Delta G_{solução}$ = variação da energia livre de Gibbs da reação em solução.

$\Delta G_{gás}$ = variação da energia livre de Gibbs da reação em fase gasosa.

$\Delta G_{solvatação}$ = energia livre de Gibbs envolvida na solvatação da espécie.

Na Figura 4.6 está sumarizado as possibilidades dos adutos formados entre NAMI-A^{II}, em que o íon metálico apresenta carga +2 e as biomoléculas selecionadas. Vale ressaltar que os ligantes contendo enxofre são capazes de protonar o grupo de saída (H₂O) formando o íon hidrônio graças aos seus valores de pKa. Por esse motivo, a interação dos complexos reduzidos com glutatona em sua conformação tanto circular, quanto estendida e com a cisteína é capaz de deslocar tanto o ligante água

como também é possível que o H da ligação S-H seja transferido para o grupo de saída formando o íon hidrônio. Como já destacado, nosso trabalho tem por objetivo o estudo termodinâmico global desses processos e o mecanismo de reação não será abordado. Os demais complexos estudados em sua forma reduzida seguem o mesmo padrão de reatividade mostrado na Figura 4.6 e, por isso, suas representações esquemáticas foram omitidas.

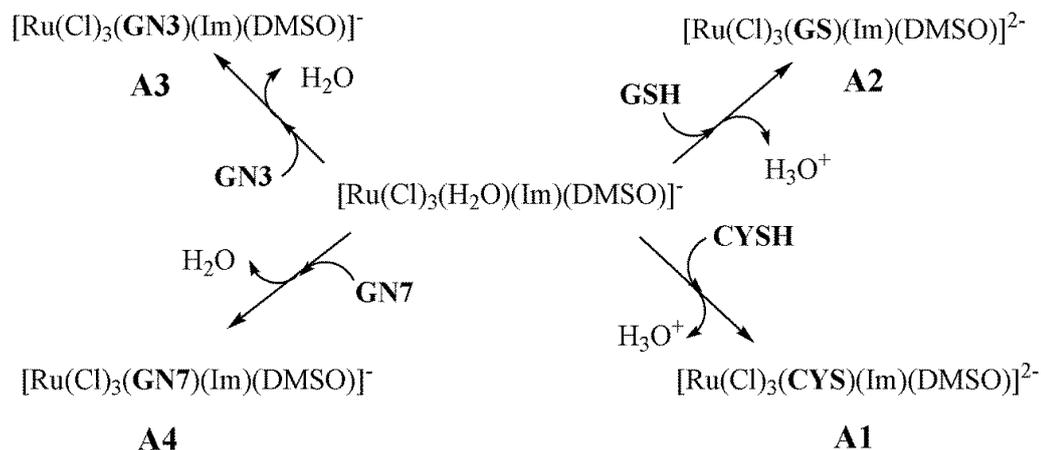


Figura 4.6 Representação esquemática das reações entre os complexos Ru(II)-monoaquo de NAMI-A com os sítios GN3 e GN7, CysH e GSH.

4.3 Resultados Estruturais

4.3.1 Detalhes Geométricos

As Figuras 4.7 e 4.8 mostram as estruturas otimizadas para os adutos formados $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{1-}$ com $\text{L} = \text{Cys}$, GSH , GN7 e GN3 de acordo com a equação 4.1. Os dados geométricos obtidos estão relacionados na tabela 4.1. Pela análise dos valores presentes na Tabela 4.1, observamos que as espécies coordenadas ao centro metálico conferem a este sítio uma forma geométrica pseudo-octaédrica. A competição entre a base guanina e as espécies Cys e GSH, com átomos de S doadores de elétrons, por complexos de rutênio (II) foi investigada e os parâmetros geométricos obtidos encontram-se, também, listados na Tabela 4.1. Resultados experimentais relatam a preferência de complexos de Ru(II) e Ru(III), pela ligação ao sítio ativo N7 da guanina, pois este está mais disponível para a ligação nas nucleobases[20,21]. A interação com a cisteína foi realizada para termos um protótipo de prováveis mudanças ao estudarmos a coordenação via GSH, uma vez que este aminoácido faz parte de sua estrutura. Visto que a GSH já teve seu espaço conformacional

bem explorado por simulações computacionais e trabalhos experimentais, realizamos as otimizações para este tripeptídeo a partir de uma conformação em pH fisiológico [25-28].

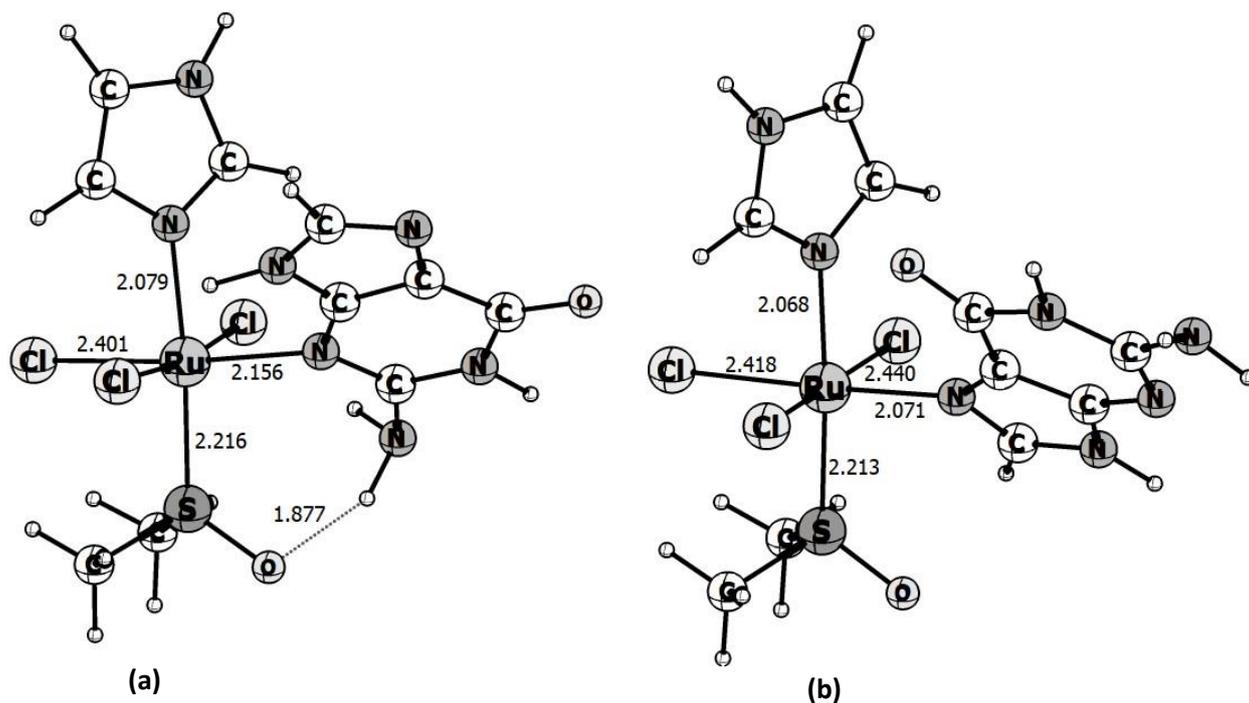


Figura 4.7 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-1}$ com $\text{L} = \text{GN3}$ (a), GN7 (b) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP.

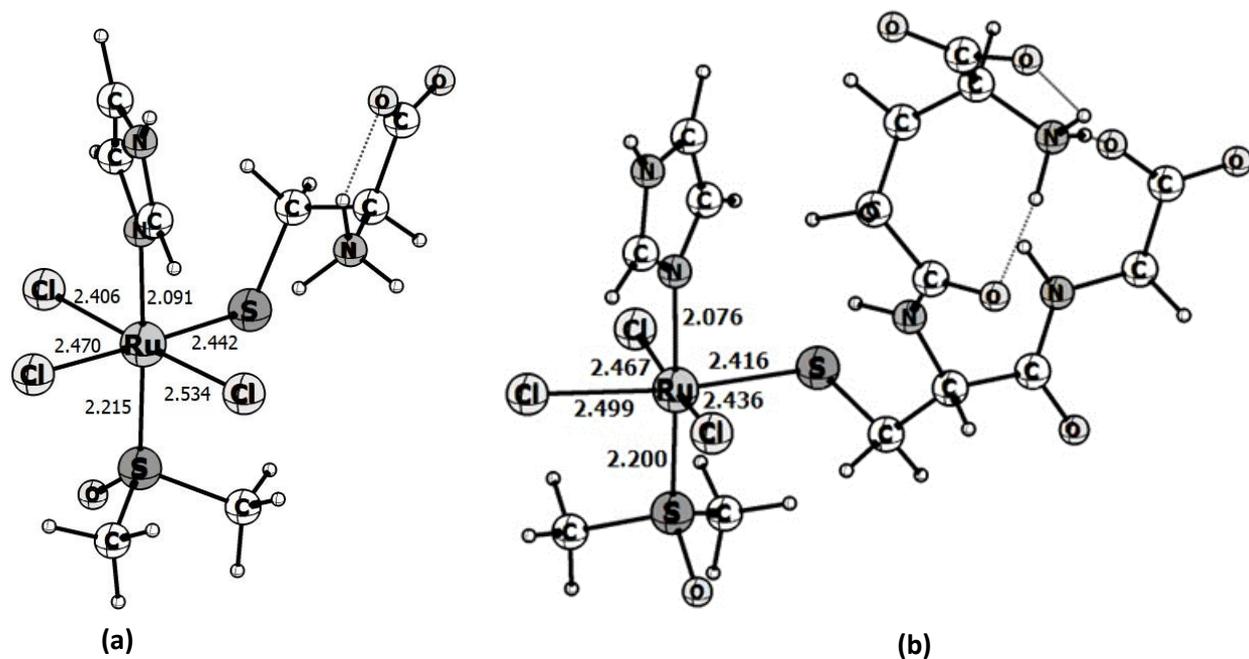


Figura 4.8 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-1}$ com $\text{L} = \text{Cys}$ (a), GSH (b) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP.

Tabela 4.1 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-1}$ com $\text{L} = \text{Cys}, \text{GSH}, \text{GN7}$ e GN3 utilizando o funcional TPSSh e funções de def2-TZVP (Figuras 4.7 e 4.8).

Parâmetro	Ru-Cys	Ru-GSH _(linear)	Ru-GN7	Ru-GN3
r(Ru-S) ou r(Ru-G)	2,442	2,388	2,071	2,156
r(Ru-N(Im))	2,091	2,080	2,068	2,079
r(Ru-S(DMSO))	2,215	2,198	2,213	2,216
Média r(Ru-Cl)	2,470	2,480	2,428	2,426
$\angle \text{S-Ru-N(Im)}$ ou $\angle \text{G-Ru-N(Im)}$	96	88	90	89
$\angle \text{S(DMSO)-Ru-S}$ ou $\angle \text{S(DMSO)-Ru-G}$	88	94	94	96
$\angle \text{S-Ru-Cl}$ ou $\angle \text{G-RuCl}$	91	89	88	91
$\angle \text{S-Ru-Cl}$ ou $\angle \text{G-RuCl (trans)}$	178	176	177	175
$\angle \text{Cl-Ru-Cl}$	89	90	92	89
$\angle \text{Cl-Ru-Cl (trans)}$	176	172	174	172

Distância em Å e ângulos em graus.

As Figuras 4.9 e 4.10 mostram as estruturas otimizadas no nível TPSSh/def2-TZVP para os adutos formados $[\text{RuCl}_3(\text{Ind})_2\text{L}]^{2-}$, com $\text{L} = \text{Cys}, \text{GSH}, \text{GN7}$ e GN3 . As distâncias de ligação em torno da esfera de coordenação dos complexos aqui estudados estão sumarizadas na Tabela 4.2. Como pode ser visto pela Tabela 4.2, todas as espécies otimizadas apresentam essencialmente uma estrutura octaédrica distorcida ao redor do átomo de rutênio. Observamos que há uma tendência para um menor comprimento de ligação referente a Ru(II)-Nucleobase, em ambos os sítios de coordenação (N7 e N3). Sendo que essa tendência torna-se mais acentuada quando temos a coordenação pelo N7 da guanina.

Comparando os dados das Tabelas 4.1 e 4.2, observamos também que quando o ligante na posição axial é o indazol nos adutos formados a partir do KP1019 reduzido, a média dos comprimentos de ligação Ru(II)-Cl no plano equatorial tende a diminuir, se comparados com os adutos formados a partir do NAMI-A reduzido, em que a posição axial é ocupado por um ligante DMSO. Esta observação pode ser explicada pelo fato do indazol ser um ligante doador, frente ao DMSO que é um forte acceptor π . Portanto, a ligação Ru(II)-In é mais intensificada, o que provoca uma diminuição na média de comprimento das ligações Ru(II)-Cl nos adutos formados a partir do KP1019 em comparação com os complexos formados a partir do NAMI-A reduzido com os alvos biológicos abordados neste trabalho. Com base ainda nos parâmetros estruturais para os competidores biológicos cisteína e glutatona, observa-se que o comprimento de ligação Ru(II)-GSH é menor

quando comparado a distância de ligação Ru-CYS. Este fato indica uma preferência do íon metálico pelo tripeptídeo.

As espécies oxidadas tanto para NAMI-A como para o KP1019 também foram estudadas e as distâncias de ligação para os adutos formados entre os complexos monoaquo-Ru^{III} e os alvos biológicos, cisteína e guanina nos sítios de ligação N3 e N7 está mostrado na Tabela 4.3. Infelizmente, não foi possível obter convergência para o cálculo de otimização dos complexos monoaquo-Ru^{III} com a glutatona em nenhuma de suas conformações. As estruturas dos adutos formados serão omitidas, com o objetivo de dar maior fluidez ao texto e destacar diferenças químicas que são mais relevantes. Seguindo então a via C de reação mostrada na Figura 4.4, os produtos formados exibem também uma geometria octaédrica distorcida em torno do centro metálico. Novamente é observado que a distância de ligação entre o centro metálico e a guanina, tanto no sítio N3 como no sítio N7 é menor quando comparada a ligação Ru^{III}-S da cisteína. Esta diferença é novamente mais acentuada para o aduto formado com sítio N7 da guanina, indicando um possível sítio preferencial de ligação.

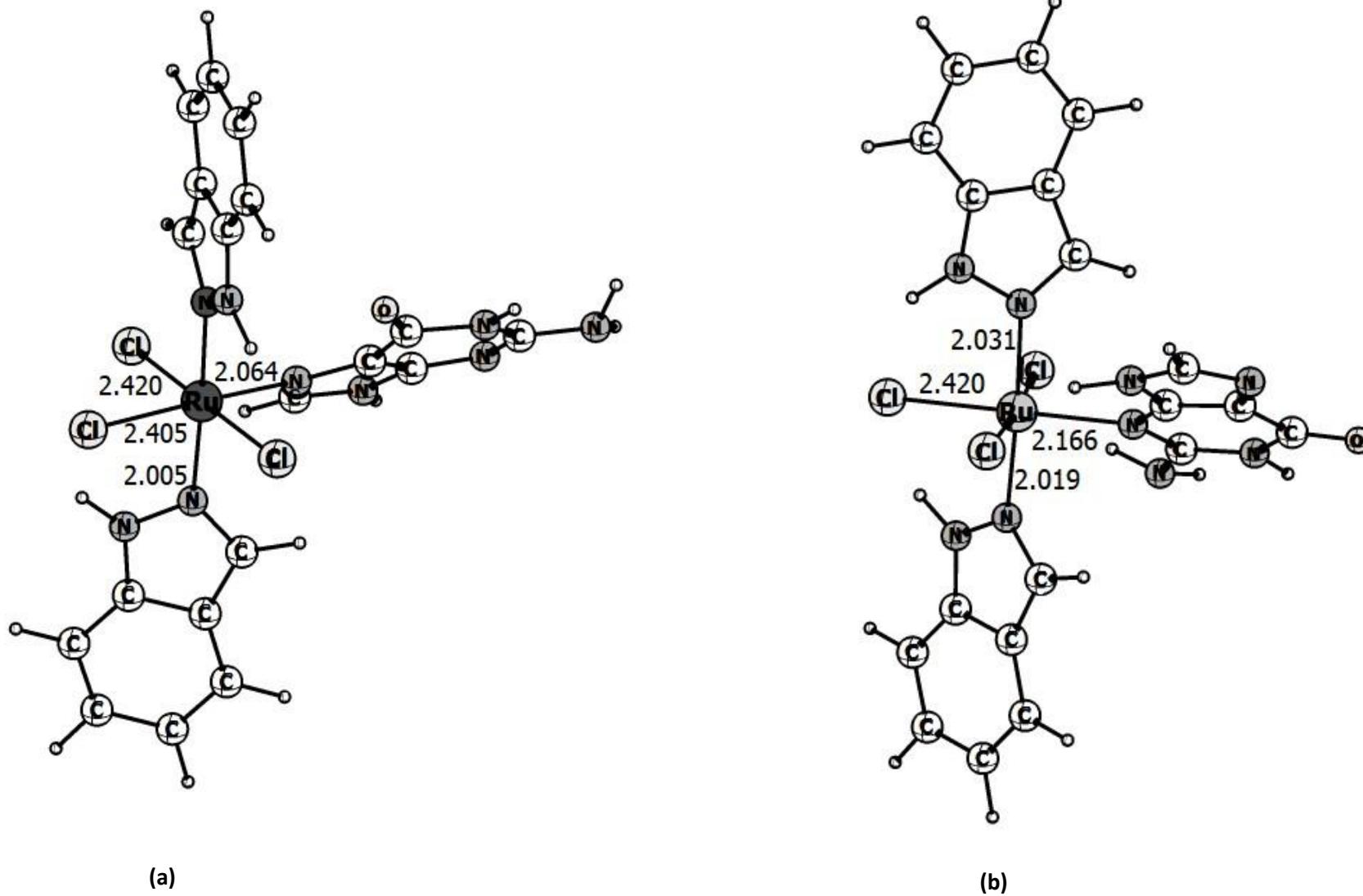


Figura 4.9 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{L}]-1$ com $\text{L} = \text{GN3}$ (a), GN7 (b) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP .

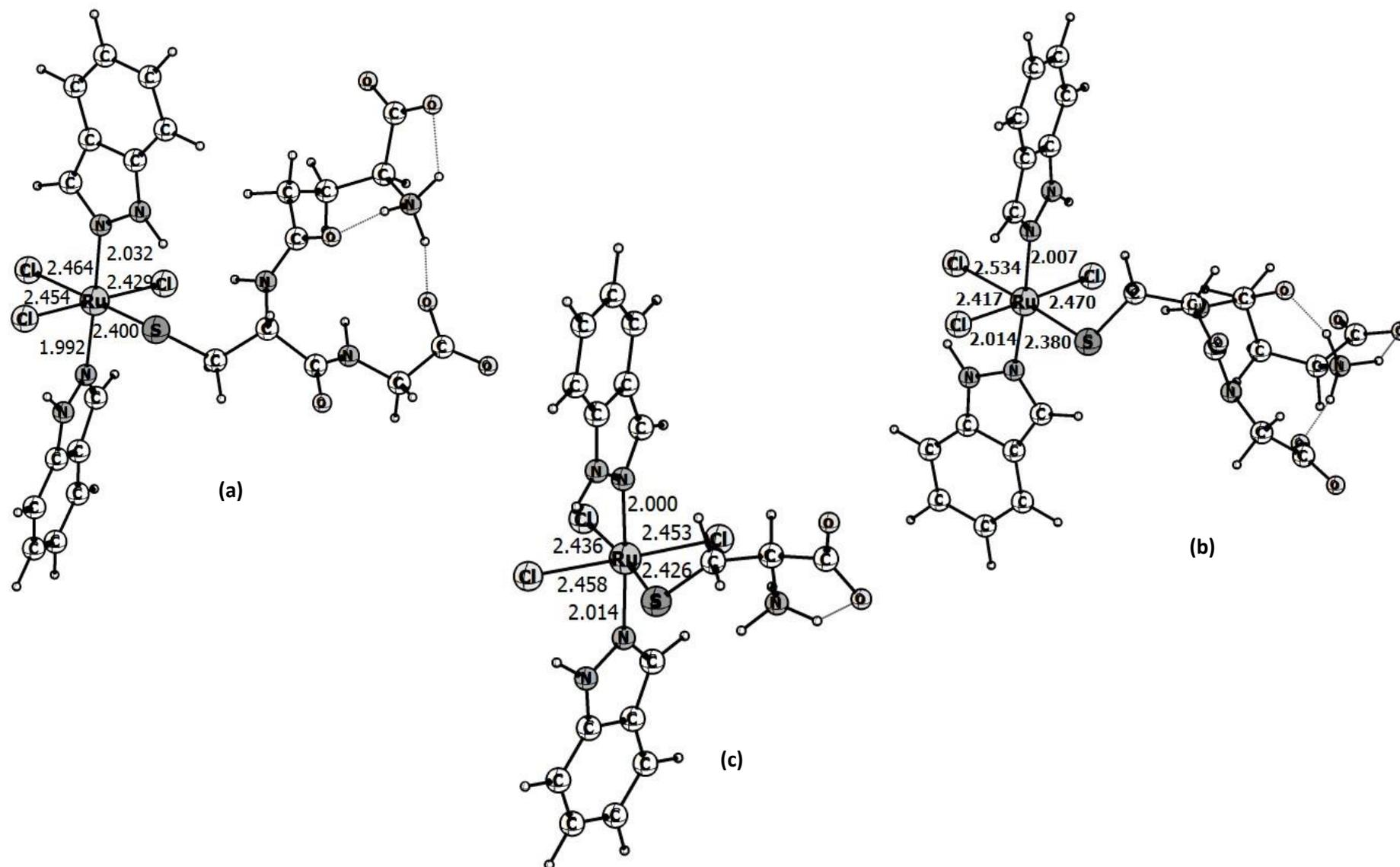


Figura 4.11 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos $[RuCl_3(In)_2L]^{-1}$ com $L = GSH\text{-linear}$ (a), $GSH\text{-circular}$ (b) e CYS (c) utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP.

Tabela 4.2 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{L}]^{-1}$ com $\text{L} = \text{Cys}, \text{GSH}, \text{GN7}$ e GN3 utilizando o funcional TPSSh e funções de def2-TZVP (Figuras 4.9 e 4.10).

Parâmetro	Ru-Cys	Ru-GSH _(linear)	Ru-GN7	Ru-GN3
r(Ru-S) ou r(Ru-G)	2,428	2,400	2,064	2,166
Média r(Ru-N(In))	2,008	2,012	2,015	2,025
Média r(Ru-Cl)	2,444	2,449	2,416	2,427
$\angle \text{S-Ru-N(In)}$ ou $\angle \text{G-Ru-N(In)}$	90	90	92	92
$\angle \text{N(In)-Ru-N(In)}$	178	178	177	177
$\angle \text{S-Ru-Cl}$ ou $\angle \text{G-Ru-Cl}$	95	90	89	93
$\angle \text{S-Ru-Cl}$ ou $\angle \text{G-Ru-Cl}$ (<i>trans</i>)	172	177	176	180
$\angle \text{Cl-Ru-Cl}$	88	90	91	87
$\angle \text{Cl-Ru-Cl}$ (<i>trans</i>)	177	179	177	175

Comprimentos de ligação em Å, ângulos de ligação em graus.

Tabela 4.3 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos monoquo-Ru(III)-L com L = Cys, GN7 e GN3 utilizando o funcional TPSSh e funções de def2-TZVP.

NAMI ^{III} -L			
Parâmetro	Ru-Cys	Ru-GN7	Ru-GN3
r(Ru-S) ou r(Ru-G)	2,312	2,128	2,170
r(Ru-N(Im))	2,106	2,068	2,086
r(Ru-S(DMSO))	2,276	2,284	2,295
r(Média Ru-Cl)	2,405	2,405	2,346
KP1019 ^{III} -L			
r(Ru-S) ou r(Ru-G)	2,308	2,138	2,155
r(Ru-N(In))	2,044	2,053	2,055
Média r(Ru-Cl)	2,398	2,337	2,348

Valores em Å

Ao comparar os dados da Tabela 4.3 com as formas reduzidas dos compostos (Tabela 4.2 e Tabela 4.3), observamos que enquanto há um alongamento na distância de ligação entre o íon metálico e a guanina em ambos os sítios, a interação com a cisteína mostra-se mais favorável nas espécies oxidadas devido a diminuição 0,13 Å e 0,12 Å para os adutos formados através do monoquo-Ru^{III}, oriundos da reação de troca de ligantes do NAMI-A e do KP1019 respectivamente. Esse resultado pode indicar uma possível rota de redução dos complexos estudados nesse trabalho, pois, como mostrado por Wang e colaboradores [21,22] os compostos a base de rutênio podem interagir com ligantes doadores de enxofre como cisteína e glutatona através de um processo oxo/reduzitivo que facilitaria a formação da ligação a Ru-N7. De fato, utilizando apenas a distância de ligação como critério, observa-se nos compostos reduzidos a interação com as nucleobases são mais favoráveis. Porém, para uma análise mais detalhada e quimicamente fundamentada outros fatores devem ser levados em consideração, como superposição de orbitais, efeitos de doação e retro-doação eletrônica entre outros.

A análise estrutural dos adutos formados pela rota **D**, tanto na posição *cis* quanto na posição *trans* será omitida, pois seus aspectos principais já foram abordados nos sistemas discutidos até aqui. Porém seus dados energéticos estarão expostos na Tabela 4.7.

Analisaremos agora os adutos formados a partir da interação do complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})(\text{Pz})]^{2+}$ com as biomoléculas cisteína, glutatona e com a base guanina do DNA. As geometrias dos adutos formados são mostrados nas figuras 4.11 e 4.12 mostram as estruturas otimizadas para os adutos formados. Os dados geométricos obtidos estão relacionados na tabela 4.4. Pela análise destes valores em fase gás, observamos que as espécies coordenadas ao centro metálico conferem a este sítio uma forma geométrica pseudooctaédrica. Novamente observamos uma preferência dos complexos de Ru(II) pela ligação ao sítio ativo N7 da guanina devido a um menor comprimento para a ligação Ru-GN7 em relação à ligação Ru-GN3. Esta evidencia sugere e reforça ser mais favorável a ligação de complexos de rutênio a este sítio da base purínica do DNA. A ocorrência de ligações de hidrogênio entre o grupo carbonil da guanina e ligantes amônia, com orientação favorável no plano equatorial do complexo metálico, são uma provável evidência da maior estabilização da ligação ao sítio N7 desta nucleobase. Além disso, os átomos N7 estão mais disponíveis para a ligação nas nucleobases e apresentam menor impedimento estérico.

A competição entre a base guanina e as espécies Cys e GSH, com ligantes S-doadores de elétrons, por complexos de rutênio (II) foi investigada e os parâmetros geométricos obtidos encontram-se, também, listados na Tabela 4.4. Ao analisarmos os resultados para estes adutos observa-se que o comprimento da ligação Ru-S varia muito pouco em fase gasosa. No entanto, nota-se uma considerável variação no ângulo de ligação C-S-Ru de 115° a 122° , da cistéina a glutatona coordenadas, respectivamente, o que pode propiciar um menor impedimento estérico sobre o átomo de S nas espécies Ru-GSH, tornando-o um pouco mais susceptível a reações de substituição de ligantes neste sítio de coordenação do metal.

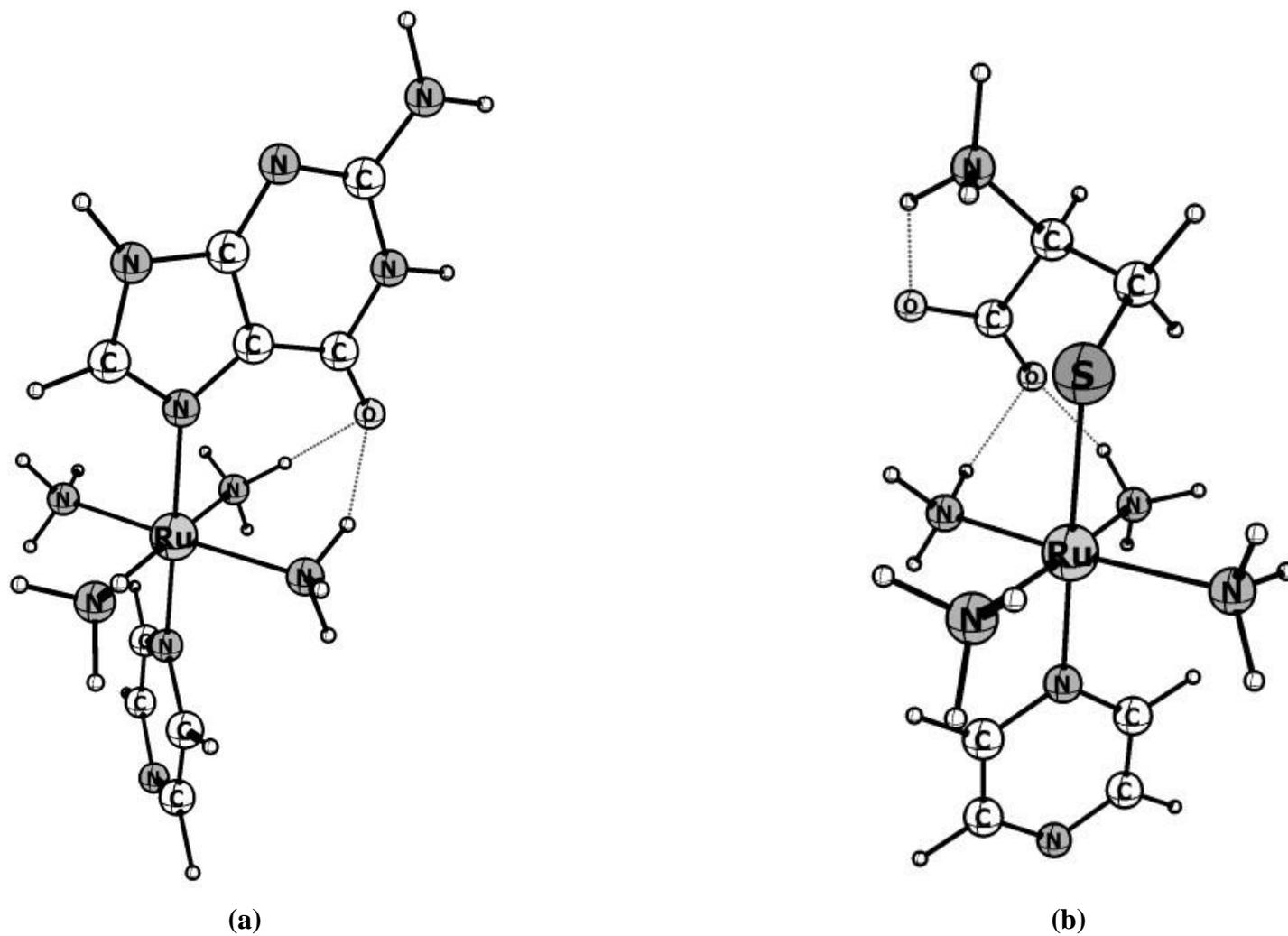


Figura 4.12 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{pz})\text{L}]^{2+}$ com $\text{L} = \text{GN7}$ (a), (b) $\text{L} = \text{CYS}$ utilizando o funcional TPSSh e funções de base def2-TZVP .

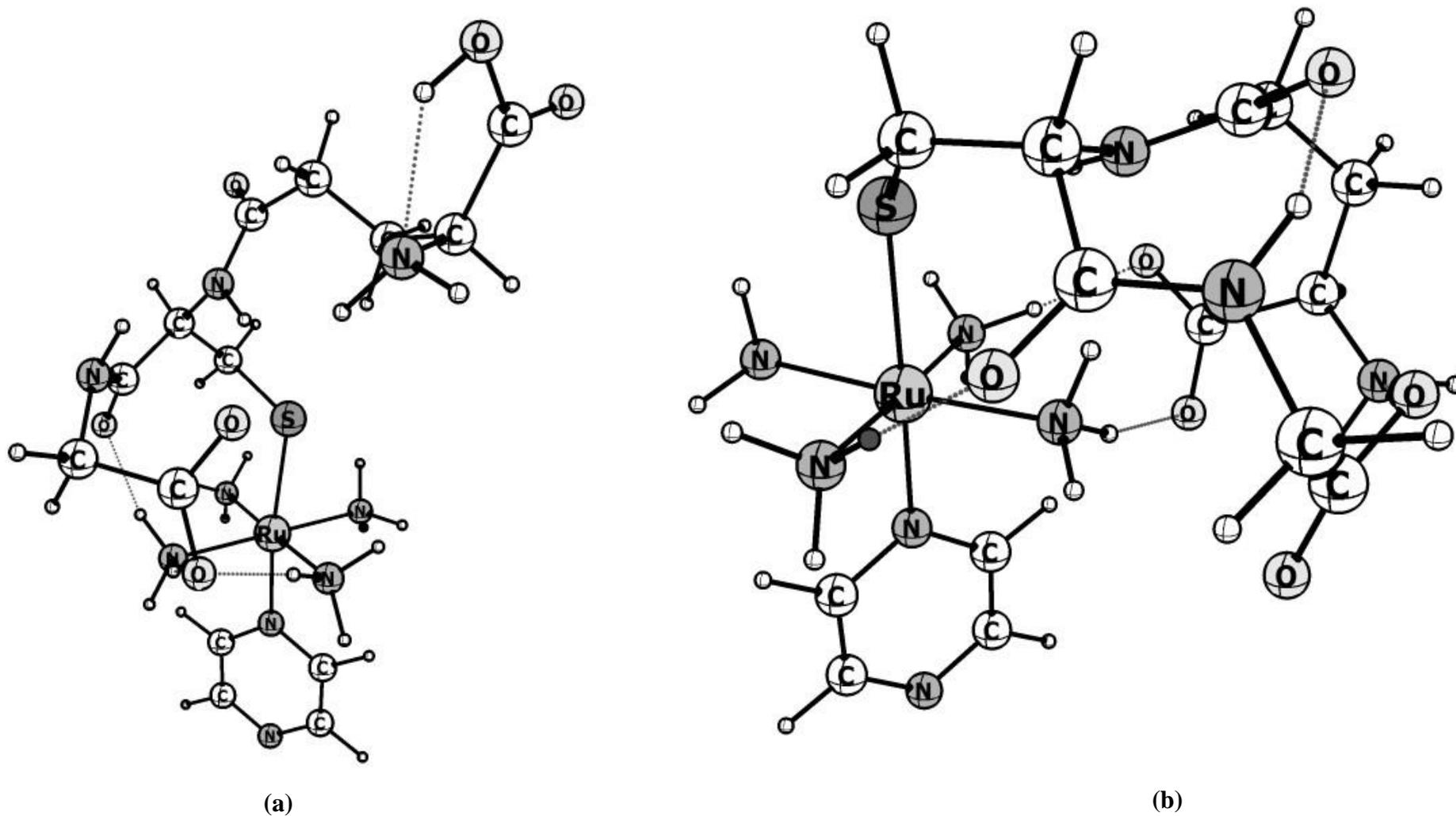


Figura 4.13 Estruturas otimizadas no nível de teoria DFT para os adutos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{pz})\text{L}]^{2+}$ com $\text{L} = \text{GSH}$ (estendida (a) e circular (b))

Tabela 4.4 Valores dos parâmetros estruturais otimizados no nível DFT para os adutos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{pz})\text{L}]^{2+}$ com L = Cys, GSH, GN7 e GN3.

Parâmetro	Ru-Cys	Ru-GSH _(linear)	Ru-GSH _(circular)	Ru-GN7	Ru-GN3
r(Ru-S) ou r(Ru-G)	2,388	2,392	2,363	2,115	2,265
r(Ru-N(Pz))	2,028	2,024	2,003	2,037	2,030
Média r(Ru-NH ₃)	2,132	2,128	2,128	2,139	2,137
∠ S-Ru-N(Pz) ou ∠ G-Ru-N(Pz)	173	173	172	179	178
Média ∠ S-Ru-NH ₃ ou ∠ G-Ru- NH ₃	89	88	89	90	89
Média ∠ NH ₃ -Ru-NH ₃	90	90	90	90	90
Média <i>trans</i> ∠ NH ₃ -Ru-NH ₃	177	177	176	177	176
∠ C-S-Ru	115	119	118	—	—

Comprimentos de ligação em Å, ângulos de ligação em graus.

4.3.2 Interações com alvos biológicos

Nesta seção três processos competitivos serão descritos. O primeiro deles será a formação dos adutos através das espécies monoaquo-Ru^{II}, como esquematizado pela Equação 4.1. No segundo processo os compostos reagentes NAMI-H₂O e KP1019-H₂O permanecem oxidados seguindo a rota de reatividade **E** mostrada na Figura 4.4 e por fim a via mecanística **D'** em que os compostos são primeiramente reduzidos e a interação com o alvo biológico se dá após a segunda reação de troca de ligantes Cl/H₂O, também mostrado na Figura 4.4. A variação da energia livre de Gibbs em solução ($\Delta G_{\text{(solução)}}$), para as reações analisadas neste trabalho, foi obtida levando-se em consideração o ciclo termodinâmico da Figura 4.5. Cálculos de frequência vibracional foram realizados com o intuito de se obter a correção térmica e a energia de ponto zero, com as quais analisamos a variação da energia livre de Gibbs em fase gasosa ($\Delta G_{\text{(gás)}}$). O efeito do meio solvente incluído pela aproximação do solvente implícito COSMO forneceu os valores de $\Delta G_{\text{solvatação}}$. Nas reações de formação dos adutos de Cys e GSH a ligação sulfidrila dos grupos tióis foram consideradas protonada nas espécies reagentes. Observa-se, pela análise da Tabela 4.5 que a variação da energia de Gibbs em fase gás é negativa e, portanto o processo é energeticamente favorável para os adutos Ru-GN, no sítio N7, para os complexos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-1}$ e $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{L}]^{-1}$, porém desfavorável para o sítio N3 de ambas espécies. Quando L=Cys ou GSH, observa-se que a interação em fase gás é desfavorável para ambos adutos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-n}$ e $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{L}]^{-n}$. No entanto, a inserção do meio solvente muda dramaticamente o perfil energético de interação e a energia livre dos adutos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-n}$ e $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{L}]^{-n}$, em que L=Cys ou GSH, torna-se menor quando comparado com a nucleobase. Em um recente trabalho Wang e colaboradores mostrou que complexos a base de Ru segue um mecanismo de reação diferente da cisplatina na reação competitiva entre ligantes S-doador como GSH e ligantes N-doador [21,22]. Nesse mecanismo a reação entre o complexo de rutênio e a GSH leva a formação de um composto rutênio tiolato, que pode então sofrer oxidação pelo dióxigênio para produzir um complexo sulfenato original. A oxidação da glutathione coordenado no complexo tiolato parece fornecer uma rota fácil para o deslocamento da glutathione e a formação da ligação Ru-N7. Isto pode proporcionar um mecanismo único de ação e explicar a falta de resistência cruzada com os fármacos de platina, uma potencial vantagem clínica.

Através dos resultados mostrados na Tabela 4.5 é possível concluir, considerando a energia livre em solução $\Delta G_{\text{(solução)}}$, que a interação dos complexos NAMI^{II}-H₂O e KP1019^{II}-H₂O com o sítio GN3 é desfavorável. A interação com a guanina no sítio GN7 da guanina é apenas ligeiramente favorável em solução, com $\Delta G_{\text{(solução)}} = -0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ para NAMI^{II}-H₂O e $-4,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a interação com KP1019^{II}-H₂O. É interessante notar que a interação de ambos os complexos com a forma

desprotonada do GSH e Cys, gerando os complexos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})(\text{Cys})]^{2-}$, $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2(\text{Cys})]^{2-}$, $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})(\text{GS})]^{2-}$, $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2(\text{GS})]^{2-}$, com carga total -2 , é altamente desfavorável para acontecer em solução. Isso pode ser atribuído à interação desfavorável entre duas espécies carregadas negativamente. Por outro lado, a coordenação do GSH na forma protonada é ligeiramente favorável para $\text{NAMI}^{\text{II}}\text{-H}_2\text{O}$ e $\text{KP1019}^{\text{II}}\text{-H}_2\text{O}$ com energias livre de Gibbs de $-0,7$ e $-2,6$ kcal mol $^{-1}$, respectivamente, para a reação de deslocamento de água. Além disso, o deslocamento de água pela cisteína protonada também é favorável para ambos os complexos. Como é bem conhecido que NAMI-A e KP1019 interagem com GSH sob condição tamponada[23], esses resultados sugerem, portanto, que os ligantes doadores de S podem interagir com os fármacos metálicos na forma protonada, o que leva a uma energia livre de Gibbs negativa para a reação. Para ambos os complexos, a interação com os alvos GN7 e GSH é da mesma magnitude, significando que estes ligantes podem competir pela ligação ao metalofármaco. E, no caso do KP1019 , a interação com o Cys também é da mesma magnitude. Os valores de energia livre positivos (ou apenas ligeiramente positivos) para a interação dos complexos com os sítios GN3 e GN7 sugerem que o principal mecanismo de ação do NAMI-A e do KP1019 pode não envolver a interação direta com o DNA. De fato, foi demonstrado que a atividade citotóxica do KP1019 é baseada em efeitos relacionados ao estresse do RE enquanto o NAMI-A interage com algumas proteínas responsáveis pela replicação do DNA [10,11,12,16,18].

Para o aduto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$, em que $\text{L}=\text{GN3}, \text{Cys}, \text{GSH}$ ou GN7 observamos que a variação da energia livre de Gibbs no estado gasoso é favorável para todos os adutos formados, exceto para o Ru-GN3 para o qual nossos resultados e estudos teóricos anteriores com complexos correlatos de rutênio (II) indicam ser desfavorável esta ligação. Observa-se que a variação líquida para as reações com os dois sítios ativos da nucleobase purínica do DNA fornece uma variação para a energia livre de Gibbs em solução como um processo espontâneo em solução em relação à interação com o sítio da guanina N7 e, novamente desfavorável para a ligação ao sítio GN3. Em relação aos adutos, nos quais temos a formação das ligações Ru-S , nota-se pela análise dos resultados que a variação da energia livre de Gibbs em solução é negativa sendo o processo espontâneo termodinamicamente. Ressalta-se ainda a grande diferença em relação ao ΔG em solução para os adutos de cisteína e glutatona, sendo estes energeticamente mais favoráveis. A diferença de reatividade entre o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$ e os complexos $\text{NAMI}^{\text{II}}\text{-H}_2\text{O}$ e $\text{KP1019}^{\text{II}}\text{-H}_2\text{O}$ pode ser explicada também observando a carga total destes complexos. Enquanto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$ apresenta carga total positiva com valor $+2$, complexos $\text{NAMI}^{\text{II}}\text{-H}_2\text{O}$ e $\text{KP1019}^{\text{II}}\text{-H}_2\text{O}$ apresentam carga negativa -1 . Por esse motivo, a interação com grupos sulfidrila desprotonados (carregados negativamente) é mais favorável para a espécie carregada positivamente.

Reavaliando a Figura 4.11(b) podemos perceber que a formação de ligações de hidrogênio do grupo carboxilato do resíduo de glicina e do oxigênio da carbonila do resíduo central de cisteína com amônias equatoriais ao centro metálico podem estar influenciando no processo reacional global. Nossos resultados mostraram que a variação da energia livre de Gibbs em solução sofre influencia da conformação adotada pelo ligante GS ao redor da esfera de coordenação do centro metálico de Ru(II). Nossos resultados mostram ainda que a formação dos adutos de rutênio (II) de interesse podem ser alvo de competições, pois, mais de uma interação são energeticamente favoráveis. É importante ressaltar que nosso estudo é exclusivamente termodinâmico, e a cinética destes processos reacionais certamente desempenha um papel importante na interação preferencial.

Avaliando o segundo processo reacional competitivo em que os compostos reagentes NAMI-H₂O e KP1019-H₂O permanecem oxidados (rota **E** - Figura 4.4) é possível concluir com base nos dados apresentados na Tabela 4.6, que a interação dos complexos NAMI^{III}-H₂O e KP1019^{III}-H₂O é desfavorável para todos os alvos biológico, a exceção do sítio N7 da guanina. A interação com a guanina no sítio GN7 é apenas ligeiramente favorável em solução, com $\Delta G_{(\text{solução})} = -4,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a interação com KP1019^{III}-H₂O. Esses valores contrastam com os dados encontrados para as espécies reduzidas, em especial para o NAMI-A, que apresenta $\Delta G_{(\text{solução})}$ negativo para o sítio GN7 da guanina. No entanto, observa-se um decréscimo no valor positivo das energias livres de interação com os demais sítios (GN3 e CYS). Esse fato, pode estar relacionado com a maior carga positiva do centro metálico que é capaz de interagir mais fortemente com uma região negativa. Levando em conta a definição de Lewis, seria um ácido mais forte que seu análogo na forma reduzida. Contudo, outros parâmetros também devem ser analisados, como a cinética da reação, estabilização do campo cristalino, entre outros.

Tabela 4.5 Energia livre de Gibbs calculada (em kcal mol⁻¹) para a reação dos complexos Ru(II)-monoaquo (NAMII-H₂O, KP1019II-H₂O e [Ru(NH₃)₄(pz)H₂O]²⁺) com a nucleobase de guanina nos locais N3 (GN3) e N7 (GN7), cisteína (CYSH) e glutathiona (GSH).

Biomolécula (L)	$\Delta G(\text{solução})$ (kcal/mol)		
	[RuCl ₃ (DMSO)(Im)(H ₂ O)] ⁻ (NAMII ^{II} -H ₂ O)	[RuCl ₃ (In) ₂ (H ₂ O)] ⁻ (KP1019 ^{II} -H ₂ O)	[Ru(NH ₃) ₄ (Pz)H ₂ O] ²⁺
GN3	11,3	0,9	10,0
GN7	-0,4	-4,8	-6,1
CYSH ^a	20,0	18,1	-1,7
	(-11,9)	(-4,1)	
GSH ^b	32,9	24,6	-32,2
	[-0,7]	[-2,6]	
GSH – circular	27,6	18,6	-26,3

* As reações envolvidas nos cálculos estão esquematizadas na equação 4.1 Para cada reação, um ciclo termodinâmico, como exemplificado na figura 4.5, foi usado. ΔG_{sol} é a energia livre de Gibbs para a reação em solução calculada de acordo com a equação 4.2. As energias livres de Gibbs foram calculadas no nível teórico de TPSSh/Def2-TZVP /SMD a 298,15 K. ^a Valores obtidos entre parênteses foram obtidos para a reação de deslocamento da água pelo ligando CYSH neutro. ^b Valores entre parênteses foram obtidos para a reação de deslocamento da água pelo ligante GSH neutro.

Já para o KP1019, não se observa uma mudança significativa no perfil energético da energia livre de Gibbs entre as espécies monoaquo reduzidas e oxidadas. Em ambos os casos o $\Delta G_{(\text{solução})}$ é favorável apenas para o sítio N7 da guanina e curiosamente em ordem de grandeza próxima. Em relação a inserção do meio solvente, observa-se uma influência significativa apenas para o $\Delta\Delta G_{(\text{solvatação})}$ do aduto formado com a cisteína, revelando um efeito estabilizador anunciado quando comparado com os demais alvos biológicos.

Em um estudo recente, Shah e colaboradores [40] investigaram os mecanismos de reações do NAMI-A e seus produtos mono e di-hidrolisados no sítio N7 da guanina, utilizando teoria do funcional de densidade no nível de teoria (M06-2X/LanL2DZ/6-31G**) em fase gás. Nesse estudo ficou evidenciado a importância da reação de aquação na ativação do NAMI-A e também que mesmo as espécies hidrolisadas oxidadas interagem com o sítio N7 da guanina. A energia livre de interação é ligeiramente favorável da ordem de $-2,3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Nossos resultados demonstram que tal interação é desfavorável por um valor também ligeiramente positivo, essa discordância de resultado pode estar relacionada com o nível de teoria utilizado nos trabalhos. Porém, é evidente em ambos trabalhos que a inserção do meio solvente favorece a interação com a nucleobase do DNA.

Tabela 4.6 Variação da energia livre de Gibbs em solução ($\Delta G_{(\text{solução})}$)* para as reações de formação dos adutos com as espécies metálicas oxidadas.

L	[RuCl ₃ (DMSO)(Im)L] ^q			[RuCl ₃ (In) ₂ L] ^q		
	$\Delta G_{(\text{gás})}$	$\Delta\Delta G_{(\text{solvatação})}$	$\Delta G_{(\text{solução})}$	$\Delta G_{(\text{gás})}$	$\Delta\Delta G_{(\text{solvatação})}$	$\Delta G_{(\text{solução})}$
CYS	156,76	-148,01	8,75	142,79	-136,78	6,01
GN7	2,27	-1,15	1,13	-5,26	0,71	-4,55
GN3	5,38	1,50	7,0	-5,99	7,19	1,20

Valores em kcal mol^{-1} ; para L= GN3, GN7 q = 0 e para L= CYS q = -1.

O terceiro processo competitivo é o **D'** (Figura 4.4) em que os compostos são primeiramente reduzidos e a interação com o alvo biológico se dá após a segunda reação de troca de ligantes Cl/H₂O. As energias livres de solvatação foram obtidas utilizando o ciclo termodinâmico mostrado na Figura 4.5 e seus valores estão sumarizados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 Variação da energia livre de Gibbs de solução ($\Delta G(\text{solução})$)* para as reações de formação dos adutos entre os alvos biológicos GN3,GN7,CYS e as espécies metálicas di-hidrolisados obtidas no nível TPSSh/DEF2-TZVP//SMD de teoria.

Biomolécula (L)	Isômeros <i>Cis</i>					
	Ru ^{II} -NAMI-2H ₂ O			Ru ^{II} -KP1019-2H ₂ O		
	$\Delta G(\text{gás})$	$\Delta\Delta G(\text{solvatação})$	$\Delta G(\text{solução})$	$\Delta G(\text{gás})$	$\Delta\Delta G(\text{solvatação})$	$\Delta G(\text{solução})$
Guanina (sítio N3)	-8,0	7,1	-0,9	-11,0	10,0	-1,0
Guanina (Sítio N7)	-11,37	1,06	-10,32	-19,64	8,00	-11,64
Cisteína (CYS)	158,71	-148,65	10,06	139,55	-118,14	21,41
	Isômeros <i>Trans</i>					
	Ru ^{II} -NAMI-2H ₂ O			Ru ^{II} -KP1019-2H ₂ O		
	$\Delta G(\text{gás})$	$\Delta\Delta G(\text{solvatação})$	$\Delta G(\text{solução})$	$\Delta G(\text{gás})$	$\Delta\Delta G(\text{solvatação})$	$\Delta G(\text{solução})$
Guanina (sítio N3)	-10,75	9,55	-1,21	-11,04	8,74	-2,30
Guanina (Sítio N7)	-2,27	-0,14	-2,41	-24,30	19,68	-4,58
Cisteína (CYS)	161,67	-140,83	20,84	56,58	-48,68	7,89

*Valores em kcal.mol⁻¹

Os dados apresentados na Tabela 4.7 revelam que múltiplas aquações favorecem a interação dos complexos reduzidos Ru^{II}-2H₂O com a nucleobase do DNA em ambos os sítios. Esse resultado ressalta a importância da reação de troca de ligantes na ativação dos metalofármacos a base de rutênio, bem como a influência da redução do íon metálico nos processos de interação dos complexos. Nossos resultados se mostram mais uma vez em linha com a investigação de Shah e colaboradores [40], em que foi estudado a influência da reação de aquação na reatividade do NAMI-A e seus derivados oxidados com o sítio N7 da guanina.

Retomando o esquema apresentado na Figura 4.4, concluímos com base nos valores de energia livre que enquanto o NAMI-A apresenta uma preferência explícita em ser ativado através da redução e, por conseguinte pela reação de troca de ligantes, o KP1019 é indiferente pelo menos ao estado de oxidação na interação com alvos biológicos selecionados. Isso fica claro analisando os resultados

energéticos oriundos da via **E** em que as espécies monoaquo-Ru(III) interage com alvo biológico **L**, gerando o composto Ru(III)-**L** (compostos oxidados). Através dos dados mostrados nas Tabelas 4.5 e 4.6, observa-se que não há mudança no perfil de interação do composto KP1019 reduzido ou oxidado, enquanto para o NAMI-A, o perfil muda drasticamente, isto é, as interações são desfavoráveis para todas as biomoléculas. Já pela via **D'**, é observado uma diminuição da energia livre de solvatação entre as espécies diaqua e guanina em ambos os sítios, indicando que múltiplas aquações favorecem a ativação de ambos os complexos em uma escala maior que a redução.

Portanto, segundo os resultados apresentados a via preferencial de reação seria a via **D'**, em que o composto é inicialmente reduzido e em seguida sofre duas reações de troca de Cl⁻ por H₂O subsequentes. Por fim, os compostos *cis* e *trans*-Ru(II) gerados interage com os alvos biológicos **L**. Novamente, é importante lembrar que nosso estudo é de caráter apenas termodinâmico e que a sequência dos eventos ou, as vias preferidas, dependerão ainda da cinética destas reações, do potencial de redução das espécies, concentração de cloretos e estabilidade termodinâmica dos complexos formados.

4.4 Conclusão

Nesta etapa do trabalho avaliamos, através de ciclos termodinâmicos, a variação da energia livre de Gibbs em solução para a formação de adutos Ru-X em que X = cisteína (Cys), glutathiona (GSH), guanina nos sítios GN7 e GN3. Foram verificadas três possibilidades com o intuito de avaliar a competição entre os alvos biológicos, o efeito da redução bem como da reação de aquação na ativação dos complexos NAMI-A e KP1019. Pela análise dos resultados estruturais, obtidos no nível TPSSh/def2-TZVP verificamos que as estruturas apresentam geometria octaédrica distorcida em torno do átomo de rutênio.

Para a primeira possibilidade, expressa através da Equação 4.1, em que os complexos foram primeiramente reduzidos e depois sofreram uma reação de aquação, foi observado que a variação da energia de Gibbs em fase gás é energeticamente favorável para os adutos Ru-GN, tanto no sítio N3 como no sítio N7, para os complexos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{X}]^{-1}$ e $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{X}]^{-1}$ respectivamente. Porém, quando X=Cys ou GSH, observa-se que a interação em fase gás é desfavorável para ambos adutos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{L}]^{-n}$ e $[\text{RuCl}_3(\text{In})_2\text{L}]^n$. Além disso, foi mostrado que a inserção do solvente altera dramaticamente o perfil energético de interação dos complexos estudados com os alvos biológicos. Para os adutos formados a partir do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$ foi observado que a variação da energia de Gibbs em fase gás é energeticamente favorável praticamente para todos os adutos, exceto para o adulto de Ru-GN3.

Os resultados energéticos mostraram ainda uma provável competição entre a glutatona e a nucleobase do DNA pela substituição ao centro metálico de rutênio ao deslocar a molécula de água, nos adutos formados a partir dos complexos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{X}]^{-1}$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$, pois, ambas as reações são energeticamente espontâneas. Tem sido mostrada na literatura reações sobre sítio Ru-S de coordenação em complexos de rutênio (II) em que a ligação Ru-GS sofre um processo de oxidação[21,22]. Tal possibilidade indica uma provável rota para o deslocamento da ligação S na glutatona pela nucleobase GN7 do DNA. Acredita-se que moléculas de água possam atuar como doadores de átomos de oxigênio nesta via de reação. Com isso esta mudança estrutural na ligação Ru-S, formando o complexo sulfenato do tipo Ru-SOG, antes de uma nova ligação química ao DNA, podem ser indícios de favorecimento ao processo de oxidação. Os valores de energia livre desfavoráveis (ou apenas ligeiramente favoráveis) para a interação dos complexos com guanina nos locais N3 e N7 sugerem que o mecanismo principal de ação de NAMI-A e KP1019 pode não envolver a interação direta com o DNA.

A segunda possibilidade analisada é semelhante mostrada pela Equação 4.1, porém, a espécie reativa permanece em sua forma oxidada. Aqui, o objetivo é verificar o efeito da redução na interação dos compostos $\text{NAMI}^{\text{III}}\text{-H}_2\text{O}$ e $\text{KP1019}^{\text{III}}\text{-H}_2\text{O}$ com os alvos biológicos selecionados. Os resultados mostraram que, enquanto o NAMI-A apresenta uma preferência explícita em ser ativado através da redução e, por conseguinte pela reação de troca de ligantes, o KP1019 é indiferente pelo menos ao estado de oxidação na interação com alvos biológicos selecionados, pois, não há mudança no perfil energético de interação do composto KP1019 reduzido ou oxidado.

Já a terceira via mecanística, teve por objetivo avaliar a influência da reação de troca de ligantes na reatividade dos compostos reduzidos $\text{NAMI}^{\text{II}}\text{-2H}_2\text{O}$ e $\text{KP1019}^{\text{II}}\text{-2H}_2\text{O}$ com as biomoléculas selecionadas. Por esse motivo, dois ligantes cloretos foram substituídos por ligantes águas na posição *cis* e na posição *trans*. Os resultados revelam que múltiplas aquações favorecem a interação dos complexos reduzidos $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-2H}_2\text{O}$ com a nucleobase do DNA em ambos os sítios. Na posição *trans* o sítio N3 é menos favorecido, pois encontra-se com maior impedimento estérico comparado ao sítio N7 que é mais espontâneo na posição *cis*.

Como nota final, é importante mencionar que, apesar dos acordos com algumas evidências experimentais, nosso estudo foi focado na termodinâmica do processo, para discutir as interações preferenciais. No entanto, a cinética dos processos estudados neste trabalho certamente desempenhará um papel importante na determinação da via preferencial para essas interações competitivas.

4.4 Referências Bibliográficas

1. Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. *Chem. Sci.* **5** (2014) 2925.
2. Sharma, A. R.; Gangrade, D. M.; Bakshi, S. D.; John, J. S. *Int. J. Chem. Tech Res.* **6** (2014) 828.
3. Nazarov, A. A.; Gardini, D.; Baquie, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Serkova, T. P.; Shevtsova, E. P.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. *Dalton Trans.* **42** (2013) 2347.
4. Adhireksan, Z.; Davey, G. E.; Campomanes, P.; Groessl, M.; Clavel, C. M.; Yu, H.; Nazarov, A. A.; Yeo, C. H. F.; Ang, W. H.; Dröge, P.; Rothlisberger, U.; Dyson, P. J.; Davey, C. A. *Nat. Commun.* **5** (2014) 3462.
5. Novak, M. S.; Büchel, G. E.; Keppler, B. K.; Jakupec, M. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **21** (2016) 347.
6. Giannini, F.; Süss-Fink, G.; Furrer, J., *Inorg. Chem.* **50** (2011) 10552.
7. Renfrew, A.; Phillips, A. D.; Tapavcza, E.; Scopelliti, R.; Rothlisberger, U.; Dyson, P. J. *Organometallics* **28** (2009) 5061.
8. Wang, F.; Chen, H.; Parsons, S.; Oswald, I. D. H.; Davidson, J. E.; Sadler, P. J., *Chem. Eur. J.* **9** (2003) 5810.
9. Aitken, J. B.; Antony, S.; Weekley, C. M.; Lai, B.; Spiccia, L.; Harris, H. H. *Metallomics* **4** (2012) 1051.
10. Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G. *J. Inorg. Biochem.* **106** (2012) 90.
11. Han Ang, W.; Dyson, P. J. *Euro. J. Inorg. Chem.* **20** (2006) 4003.
12. Qian, C.; Wang, J. Q.; Song, C. L.; Wang, L. L.; Ji, L. N.; Chao, H. *Metallomics* **5** (2013) 844.
13. Bergamo, A.; Sava, G. *Chem. Soc. Rev.* **44** (2015) 8818.
14. Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. *Metallomics* **1** (2009) 458.
15. Meier-Menches, S. M.; Gerner, C.; Berger, W.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *Chem. Soc. Rev.* **47** (2018) 909.
16. Flocke, L. S.; Trondl, R.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *Invest. New Drugs* **34** (2016) 261.
17. Kapitza, S.; Jakupec, M. A.; Uhl, M.; Keppler, B. K. Marian, B. *Cancer Lett.* **226** (2005) 115.
18. Bierle, L. A.; Reich, K. L.; Taylor, B. E.; Blatt, E. B.; Middleton, S. M.; Burke, S. D.; Stultz, L. K.; Hanson, P. K.; Partridge, J. F.; Miller, M. E. *PLoS One* **10** (2015) e0138085.
19. Aitken, J. B.; Antony, S.; Weekley, C. M.; Lai, B.; Spiccia, L.; Harris, H. H. *Metallomics* **4** (2012) 1051.
20. Besker, N.; Coletti, C.; Marrone, A.; Re, N. *J. Phys. Chem.* **111** (2007) 9955.

21. (a) Wang, F.; Chen, H.; Parkinson, J. A.; Murdoch, P. D. S.; Sadler, P. J., *Inorg. Chem.* **41** (2002) 4509. (b) Wang, F.; Xu, J.; Habtermarian, A.; Bella, J.; Sadler, P. J., *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 17734.
22. Wang, F.; Xu, J.; Wu, K.; Weidt, S. K.; Mackay, C. L.; Langridge-Smith, P. R. R.; Sadler, P. J. *Dalton Trans.* **42** (2013) 3188.
23. Schluga, P.; Hartinger, C. G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Kepler, B. K. *Dalton Trans.* (2006) 1796.
24. Flamme, M.; Clarke, E.; Gasser, G.; Hollenstein, M. *Molecules* **23** (2018) 1515.
25. Fiser, B.; Szori, M.; Jójárt, B; Izsák, R.; Csizmadia, I.; Viskolcz, B. *J. Phys. Chem. B* **115** (2011) 11269.
26. Zhang, R.; Zeng, W.; Meng, X.; Huang, J.; Wu, W. *Chemical Physics* **405** (2012) 130.
27. Lampela, O.; Juffer, A. H.; Rauk, A. *J. Phys. Chem. A* **107** (2003) 9208.
28. Zhang, R.; Wu, W.; Luo, S. *J. Solution Chem.* **40** (2011) 1784.
29. Ponder, J. W.; Richards, F. M. *J. Comput. Chem.* **8** (1987) 1016.
30. Parr, R. G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. University Press, Oxford, **1989**.
31. Weigend, F.; Ahlrichs, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005) 3297.
32. Rodrigues, G. L. S.; Rocha, W. R. *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 11821.
33. Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Tao, J.; Perdew, J. P. *J. Chem. Phys.* **119** (2003) 12129.
34. van Lenthe, E.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G. *J. Chem. Phys.* **99** (1993) 4597.
35. van Lenthe, E.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G. *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 9783.
36. Weigend, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006) 1057.
37. Klamt, A.; Schuurmann, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2.* (1993) 799.
38. Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378.
39. Neese, F. *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* **2** (2012) 73.
40. Shah, P. K.; Bhattacharjee, K.; Shukla, P. K. *RSC Advances* **6** (2016) 113620.

Capítulo 5 – Entendendo a Estrutura Eletrônica e a Natureza dos Mecanismos de Interação do Óxido Nítrico com NAMI-A

5.1 Introdução

Os complexos de rutênio têm sido investigados como fármacos anticâncer que podem ser uma alternativa viável aos medicamentos tradicionais de platina devido à sua baixa toxicidade [1-3]. Entre o grande grupo de complexos de rutênio sintetizados estão *trans*-tetracloreto de (dimetilsulfóxido) imidazole rutenato (III) [Im] *trans*-[RuCl₄(Im)(DMSO)], conhecido como NAMI-A que destaca-se pela sua atividade anti-metastática e baixa citotoxicidade - em média, mais de 1000 vezes menos citotóxico em relação à cisplatina- [4]. Em camundongos, o NAMI-A demonstrou excelente atividade e seletividade contra metástases pulmonares de vários tumores metastáticos sólidos, incluindo um NSCLC (*Non-small-cell lung carcinoma*) de origem humana enxertado em camundongos [5-7]. Em virtude dessas propriedades, o NAMI-A foi o primeiro composto a ser testado em seres humanos e se tornou um marco no campo de pesquisa de fármacos anticancerígenas envolvendo metais [8]. No entanto, apesar de numerosas investigações, o alvo molecular do NAMI-A e por que ele é inativo em tumores primários ainda é desconhecido.

Várias tem sido as propostas de mecanismo de ação do NAMI-A, como mostrado no Capítulo 4. Entre essas propostas está a hipótese de que os efeitos biológicos do NAMI-A se devem aparentemente a ligação do rutênio aos colágenos da matriz extracelular e das integrinas (proteínas intermediadoras na comunicação entre o citoesqueleto celular e proteínas plasmáticas) da superfície celular, levando ao aumento da adesão e à redução da invasividade das células cancerosas. Essa hipótese é suportada pelo trabalho de Harris *et al.* que revela com base na imagem de fluorescência de raios X de células individuais uma internalização de NAMI-A bastante modesta comparado ao KP1019, como mostra a Figura 5.1[9].

Através da Figura 5.1 é possível observar claramente que KP1019 e NAMI-A têm diferentes destinos celulares. Enquanto células tratadas com KP1019 apresentam uma co-localização de P com Ru (Figura 5.1 (A)), indicando captação do fármaco no núcleo, não houve mudança na distribuição elementar celular após tratamento com NAMI-A (Figura 5.1 (B)). Outra observação interessante, é que em células tratadas com KP1019 há uma mudança na distribuição de ferro, indicando que o rutênio entra nas células via receptores de transferrina e pode alterar o metabolismo do ferro. Por outro lado, a ausência de mudanças significativas no conteúdo elementar ou distribuição no interior

da célula (em particular, ferro), é indicativo de que NAMI-A não é internalizado pela célula, ou seja, o sítio de ligação primário é extracelular [9].

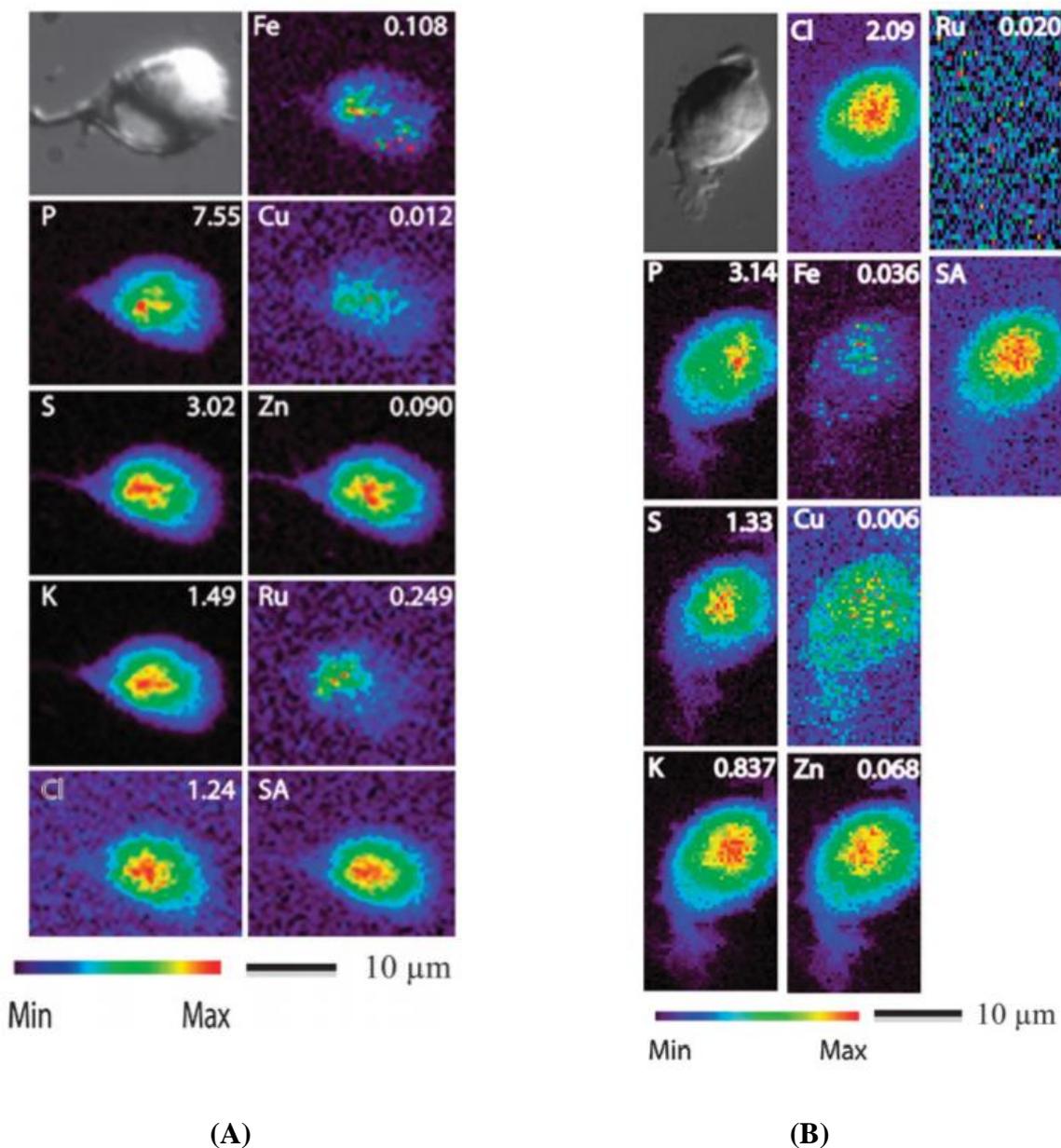


Figura 5.1 Micrografia óptica, espalhamento de raios-X (SA) e mapas de distribuição elementar de XRF de P, S, K, Cl, Fe, Cu, Zn e Ru de uma célula SH-SY5Y tratada com 200 μM KP1019 (A) e NAMI-A (B) durante 4 h. As densidades máximas da área são dadas em μgcm^{-2} para cada elemento. Retirada da referência [9].

Dessa forma, a atividade de NAMI-A contra metástases já desenvolvidas é talvez mais razoavelmente atribuída às suas propriedades anti-angiogênicas, que foram confirmadas na membrana corioalantóica de pinto e no modelo de córnea de olho de coelho [10,11]. Por outro lado,

a modesta captação celular de rutênio está de acordo com seus efeitos escassos no nível citosólico [9] e sua baixa citotoxicidade.

A angiogênese é a formação de novos vasos capilares a partir de vasos sanguíneos já existentes, para melhorar a isquemia patológica crônica, cicatrização de feridas, crescimento tumoral e também favorecer o processo de metástase [12]. Tem sido mostrado que o ambiente de hipóxia é um sinalizador para o mecanismo de crescimento desses novos vasos, devido a maior necessidade de fluxo sanguíneo em células cancerígenas [13,14]. Dessa maneira a angiogênese é considerada responsável pelo crescimento de tumores primários de suas metástases e, portanto, identificada como alvo para o controle farmacológico de tumores malignos [15-17]. O primeiro artigo que indicava a participação do NO (óxido nítrico) na angiogênese foi publicado por Pipili-Synetos e co-autores [18], desde então diversos estudos tem se dedicado a compreender o mecanismo de formação de novos capilares e mostrando que o NO está diretamente envolvido na angiogênese [19-23].

O NO tem ampla atividade em todas as fases dos tumores malignos e, em baixas concentrações, atua como uma via de desinibição; promover o crescimento do câncer ou aumentar a metástase; entre outros. Em altas concentrações, o NO é capaz de suprimir a progressão do câncer, induzindo a apoptose e diminuindo o efeito angiogênico e metastático [24-26]. Devido ao envolvimento do NO nos diversos eventos que contribuem para a progressão tumoral e a capacidade dos complexos de rutênio de interagirem com o NO, uma teoria de que essa molécula sinalizadora é um dos alvos da atividade antimetastático NAMI-A tem sido proposta [10,11].

5.1.1. Uma breve apresentação do óxido nítrico – NO – sua química de coordenação e reatividade de complexos nitrosilados de rutênio

Suponhamos que ao ler esta Tese você consiga armazenar em sua memória tardia parte do que foi apresentado aqui. Para isso, você estará, provavelmente, fazendo uso de uma das moléculas mais simples e versáteis do seu organismo: o óxido nítrico (NO). Apesar de ser uma molécula diatômica, está longe de ser um sistema simples a ser estudado devido à sua instabilidade no ambiente biológico e sua curta duração. No entanto, tem sido objeto de intensa investigação nas últimas décadas devido a sua importância em funções bioquímicas, potenciais ações terapêuticas para diferentes distúrbios malignos e o mais importante, por sua produção endógena. Por esses motivos, a Revista Science considerou o NO como a Molécula do Ano em 1992 [27].

A função biológica desempenhada pelo NO é dependente de sua concentração. Em baixas concentrações atua, por exemplo, como transdutor de sinal em muitos processos fisiológicos, e em

altas concentrações, como mecanismo de defesa citotóxico contra patógenos ou tumores [28-31]. Estudos têm mostrado, porém, que em altas concentrações e longo período de exposição o NO pode causar doença inflamatória intestinal [32], distúrbios degenerativos [33] e câncer [34,35].

A produção endógena do NO foi considerada uma quebra de paradigma na sinalização molecular de mamíferos [36], pois, o NO era até então conhecido pela sua alta toxicidade por ser também um radical livre que o torna um agente químico altamente reativo. *In vivo* o NO é sintetizado por três enzimas conhecidas como NO sintase (NOS) [37,38]. Nesse processo, o aminoácido L-arginina é transformado em um intermediário NG-hidroxi-L-arginina e por fim o nitrogênio guanidino terminal juntamente com O₂ são transformados em NO e L-citrulina pela ação das NOS. O rendimento da reação é dependente da disponibilidade de vários cofatores e cosubstratos, tais como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e tetrahydrobiopterina(BH₄). Além disso, a quantidade de NO produzida no interior da célula é dependente do tipo das isoformas de NOS utilizada, podendo variar de nano molar (nM) a micro molar (μM) [30,31,39–41].

Do ponto de vista químico, o NO possui configuração eletrônica $(1\sigma)^2(1\sigma^*)^2(2\sigma)^2(2\pi)^4(2\pi^*)^1$ como mostrado na Figura 5.2 e é, portanto, classificada como um radical. O elétron desemparelhado é oriundo do átomo de nitrogênio que possui um número ímpar de elétrons. A coordenação com sítios metálicos normalmente é realizada pelos elétrons não-ligados do nitrogênio, embora às vezes possa coordenar pelo oxigênio [42].

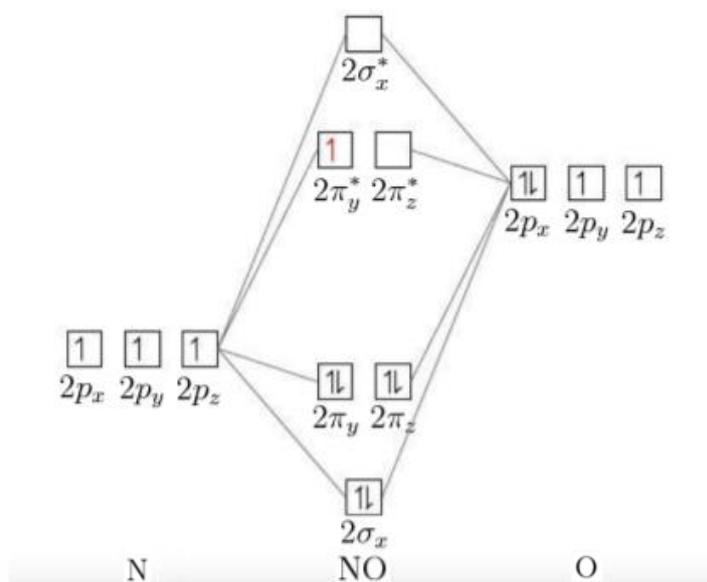


Figura 5.2 Diagrama de orbitais moleculares para a molécula NO. Adaptada Ref [42].

O fato de haver um elétron desemparelhado em orbital anti-ligante ($2\pi_y^*$), como mostra a Figura 5.2, torna o NO uma espécie bastante reativa, sendo capaz de assumir uma forma catiônica ou ainda formar dímeros com diferentes estados de spin [43]. O modo de coordenação do óxido nítrico com um centro metálico é dependente do seu estado de oxidação formal. Assim, se o NO se coordena via estado de oxidação NO^\cdot ou NO^- , devemos esperar coordenação do tipo angular a fim de maximizar a interação HOMO/SOMO [44, 45]. Já para o estado de oxidação formal NO^+ é esperado um ângulo de ligação próximo ao linear [46, 47]. Coordenações através do átomo de oxigênio e em ponte também são possíveis de acontecer, embora sejam mais raras. A Figura 5.3 mostra uma representação esquemática dos modos principais de coordenação do NO com o centro metálico.

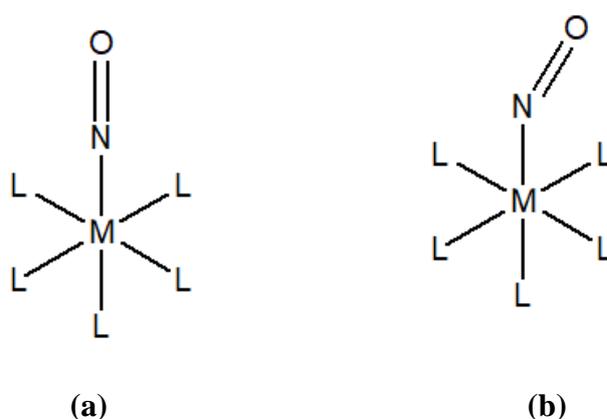


Figura 5.3 Principais modos principais de coordenação do NO ao centro metálico. (a) linear e (b) angular.

Os modos de coordenação, no entanto, não dependem apenas do ligante NO, são influenciados também pelo metal em que será realizado a coordenação e seu estado eletrônico. Normalmente, quando há orbitais d suficientemente baixos em energia e vazios ou com elétrons desemparelhados, o elétron desemparelhado do NO pode ser transferido para o metal provocando uma coordenação de NO^+ .

Para o rutênio, normalmente os complexos $\{\text{RuNO}\}^n$, com $n = 6$, sendo n a soma dos elétrons dos orbitais d do Ru e dos elétrons presente no orbital π do NO, o estado fundamental apresenta coordenação linear e multiplicidade de spin singleto [49]. Nos estados tripleto, esses complexos geralmente assumem a coordenação angular porque há um deslocamento de densidade eletrônica em direção aos orbitais π^* do NO. Como um caso geral, os complexos de $\{\text{RuNO}\}^6$ não sofrem reações de substituição de NO em condições termodinâmicas normais, e isso deve ser

realizado por meio de processos químicos ou fotoquímicos redutores [48, 49]. Essas observações mostram que elucidar a natureza dessa interação Ru-NO é uma tarefa complexa.

Em um trabalho muito recente, Li e colaboradores [50] investigaram teoricamente o mecanismo da reação de nitrosilação dos complexos monohidrolisados de NAMI-A, bem como suas subsequentes reações de hidrólise de complexos nitrosilo de rutênio nos estados singlete e tripleto. As energias livres de ativação foram calculadas combinando o método QM/MM (ABEEM) com a teoria de perturbação da energia livre, e o meio solvente explícito foi simulado por um campo de força polarizável ABEEM $\sigma\pi$. Os resultados indicam que o ângulo Ru-N-O do complexo rutênio nitrosilo com a forma $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{-NO}]$ está na faixa de 135,6 –138,4, indicando uma coordenação angular e dos complexos nitrosil de rutênio com a forma $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+]$ está num intervalo de 172,9 –179,6, ou seja, o NO doa o elétron desemparelhado para o átomo Ru(III) e os estados de oxidação formais tornam-se $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+]$. Outra informação importante é que os dados de energia livre de ativação mostram uma coexistência dos estados de spin singlete e tripleto no complexo nitrosila de rutênio em solução aquosa. Esse resultado demonstra uma interação competitiva entre os estados de spin, além de explicitar reações de troca de ligantes envolvendo NO nem sempre ocorrem com apenas uma transferência de elétrons. De fato, no trabalho de Rodrigues e Rocha [51] foi mostrado que a formação de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{NO})]^{3+}$ em seu estado singlete mais estável pode ocorrer através de pelo menos dois cruzamentos de superfícies singlete-triplete.

Castellarin e colaboradores [52] investigaram os modelos celulares os macrófagos murinos peritoneais e as linhas de células endoteliais EA.hy926, mimetizando *in vitro* o processo angiogênico. Nessa publicação foi mostrado que o NAMI-A reduz a produção e a liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais de EA.hy926 e, conseqüentemente, inibe sua capacidade invasiva; também inibe fortemente a angiogênese em esponjas de matrigel implantadas subcutaneamente em camundongos saudáveis. Estes dados suportam a atividade anti-angiogênica dos compostos de rutênio testados e contribuem para explicar a atividade seletiva de NAMI-A contra metástases de tumor sólido, o compartimento do tumor no qual a angiogênese está fortemente envolvida.

Oszajca e colaboradores [53] por sua vez estudaram reatividade de NAMI-A em relação ao NO em solução aquosa sob condições fisiológicas (pH = 7,4, $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ M}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$). Os resultados apresentados apontam que o NAMI-A pode interferir, sob condições fisiológicas, no metabolismo do NO através da formação do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+]$. Contudo, sob condições selecionadas, os complexos nitrosil não podem liberar o óxido nítrico via redução de um elétron. Isso se deve ao potencial de redução relativamente baixo do grupo NO^+ ligado a Ru^{II} (-0,69 V), determinado em estudos eletroquímicos.

Diante da importância do controle sistemático do conteúdo de NO livre em tumores como uma nova abordagem para inibir a angiogênese tumoral e das evidências teóricas e experimentais revelando que a interação entre o NAMI-A (em especial seus produtos de hidrólise) com o NO são favoráveis, temos por objetivo neste capítulo explorar o mecanismo detalhado da nitrosilação do aduto monoaquo-NAMI-A (NAMI^{III}-H₂O).

5.2 Metodologia Teórica

Para melhor compreensão, os complexos derivados de NAMI-A[Ru(Cl)₄(Im)(DMSO)]⁻: [Ru(Cl)₃(Im)(DMSO)(H₂O)], primeiro produto de hidrólise e [Ru(Cl)₃(Im)(DMSO)(NO)]⁻ produto de nitrosilação serão denominados de NAMI-A-H₂O e NAMI-A-NO, respectivamente.

A otimização de geometrias de todos os estados estacionários dos complexos, incluindo os mínimos e os estados de transição, foi realizada no software ORCA [54,55] usando o nível de teoria DFT [56], o funcional híbrido B3LYP [57] e o conjunto de base def2-TZVP [38], todos em fase gasosa e acompanhados por análises vibracionais. Para acelerar os cálculos, as abordagens *Resolution of Identity* (RI) [39] e *Chain of Sphere* (COS) [40] foram utilizadas para os termos de Coulomb e termos de troca da matriz Fock, respectivamente. As estruturas de camada aberta foram tratadas com o formalismo não restrito Hartree-Fock (UHF) ou Kohn-Sham (UKS).

As superfícies de energia potencial (PES) para as reações foram construídas usando a abordagem de caminho de novas energias, em que escolhemos uma coordenada interna que deve contribuir mais para os processos de reação e mantemos fixa em uma faixa de valores, enquanto o restante das coordenadas é totalmente otimizado. Neste trabalho, em que a principal reação estudada é a nitrosilação de NAMI-A-H₂O, a coordenada escolhida foi a ligação Ru-NO, que foi mantida fixa em 10 passos iguais entre 3,8 Å e 2,0 Å, enquanto o restante do sistema foi otimizado. Estes cálculos foram realizados no mesmo nível de teoria DFT/def2-TZVP em que as otimizações foram feitas também em fase gasosa. Como mostramos anteriormente em nosso grupo [51], os complexos do tipo {Ru-NO}⁶ geralmente têm dois estados de spin acessíveis, sendo estes os estados singlete e tripleto. Portanto, as PESs do sistema NAMI-A-H₂O + NO foram construídos em ambos os estados eletrônicos. Esta abordagem de diferentes superfícies eletrônicas para o mesmo sistema usada neste trabalho já foi explorada do ponto de vista termodinâmico[50]. Aqui, usaremos uma perspectiva diferente para desvendar os aspectos mecanísticos, com foco na natureza da estrutura eletrônica dos sistemas.

Para esse tipo de reação, também mostramos que as superfícies singlete e tripleto podem se cruzar em mais de um ponto. Esses cruzamentos devem ser relevantes para o mecanismo de capturação

de NO. Com as estruturas iniciais dos pontos mais próximos aos cruzamentos de superfície entre os estados singleto e tripleto, (MECP- *minimum energy crossing point*) [61-63] foram realizadas buscas utilizando o mesmo nível de teoria.

Para avaliar a quantidade e as características da correlação estática do sistema, foram realizados cálculos de densidade de ocupação fracional (FOD) [64,65]. Nesses cálculos, escolhemos os orbitais com ocupação fracionária entre 1,98 e 0,02 para serem selecionados como espaços ativos para cálculos adicionais CASSCF (*Complete Active Space Self Consistent Field*) [66,67]. Os cálculos do FOD foram feitos com as configurações padrão do ORCA, que usa o DFT com o conjunto de funções def2-TZVP e funcional TPSS [49].

Cálculos CASSCF geralmente não são diretos, mesmo para um conjunto de sistemas similares. Portanto, apesar de usar a abordagem inicial para escolher os espaços ativos com base nos resultados do FOD, isso nem sempre levou à convergência e ajustes nos espaços ativos dos cálculos tiveram que ser feitos individualmente. O conjunto de base def2-TZVP foi utilizada para tratar todos os elétrons do sistema com correções escalares-relativísticas de segunda ordem incluídas de acordo com o hamiltoniano Douglas-Kroll-Hess (DKH) [50]. Os efeitos do acoplamento spin-orbita (SOC - *spin-orbit coupling*) [51] também foram levados em consideração, conforme implementado no programa ORCA. Em relação à energética, todos os cálculos do CASSCF tiveram alguma quantidade de correlação dinâmica incluída através das correções perturbativas na abordagem NEVPT2 [52,53]. Quando incluídos, os efeitos do solvente (na água) foram contabilizados pelo método de solvente implícito CPCM [54] em conjunto com as correções SMD do modelo de Truhlar e Cramer [55], conforme implementado no programa ORCA.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Resultados geométricos

A Figura 5.4 mostra as estruturas otimizadas dos complexos NAMI-A, NAMI-A-H₂O e NAMI-A-NO, sendo que a última possui estruturas para os estados de spin acessíveis singleto e tripleto. Complementarmente, a Tabela 5.1 resume os resultados das estruturas geométricas mais importantes para os complexos. Como podemos ver na Figura 5.4, todas as espécies têm uma geometria octaédrica distorcida, em que o centro metálico é, em princípio, Ru³⁺. As possibilidades singleto e tripleto para os complexos NAMI-A-NO surge do fato de que ambos Ru³⁺ e NO possuem um elétron desemparelhado (sistema {RuNO}⁶), que podem se unir, formando o estado singleto final e mais estável [51-53], ou pode ficar desacoplado, formando o estado tripleto. Pode-se observar

que os resultados da Tabela 5.1 indicam uma boa concordância com valores experimentais [77] o que geralmente é verdade para cálculos DFT/B3LYP.

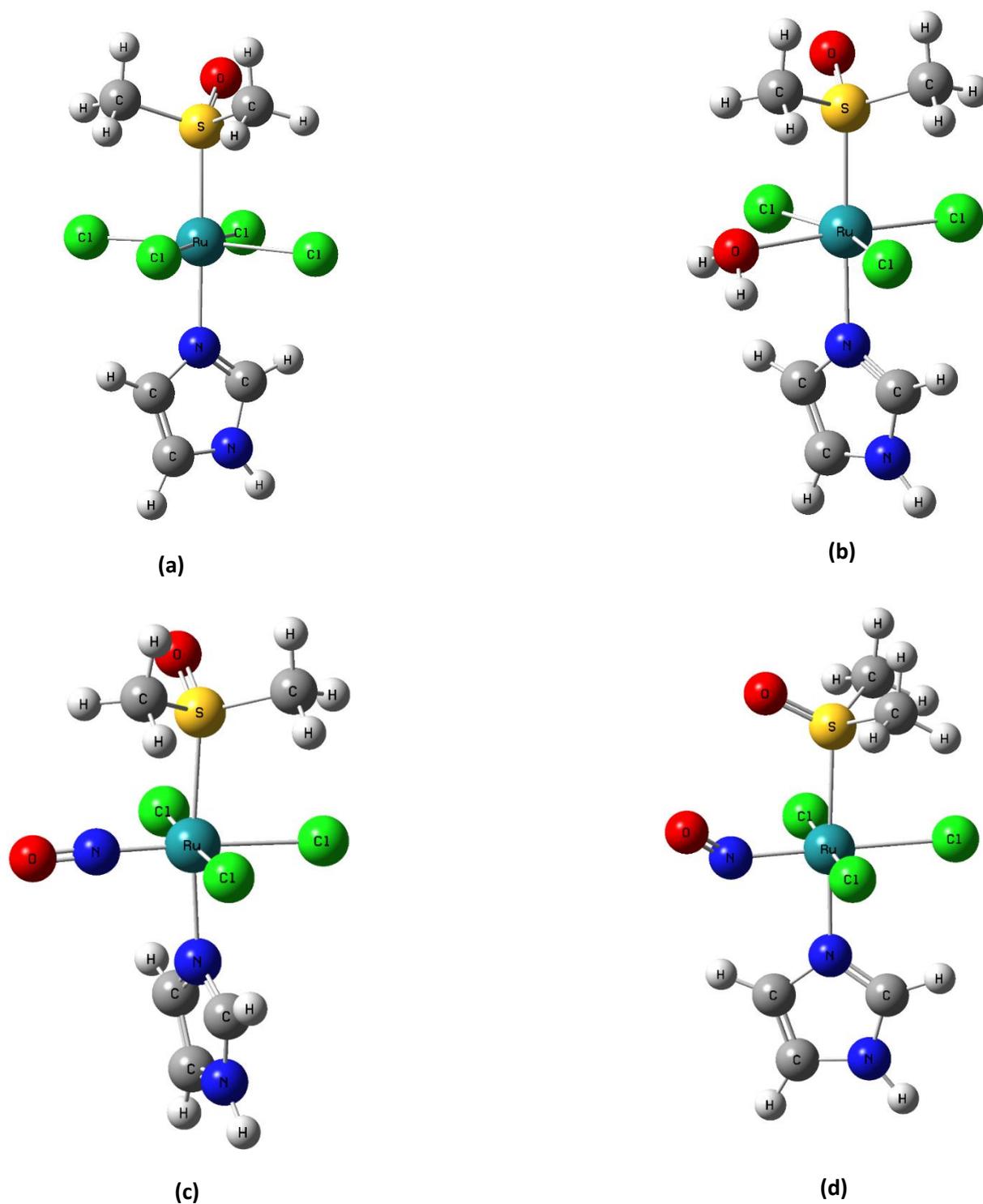


Figura 5.4 Estruturas otimizadas: (a) NAMI-A; (b) NAMI-H₂O; (c) NAMI-NO singlete e (d) tripleto realizadas no nível B3LYP / DEF2-TZVP de teoria.

Foi verificado que a inclusão do solvente implícito não altera significativamente o comprimento médio das ligações de rutênio em todas as posições de coordenadas, com apenas alguma distorção significativa ($\sim 0,01 \text{ \AA}$) para a ligação Ru-H₂O no complexo NAMI-A-H₂O.

Tabela 5.1 Parâmetros estruturais dos complexos otimizados NAMI-A, NAMI-H₂O, NAMI-NO em estados singlete e tripleto no nível B3LYP/DEF2-TZVP em fase gasosa.

	RuCl ₄ (DMSO)Im] ¹⁻	[RuCl ₃ (H ₂ O)(DMSO)Im]	RuCl ₃ (NO)(DMSO)Im]*	RuCl ₃ (NO)(DMSO)Im]
r(Ru-S)	2,317(2,30)**	2,318	2,422	2,423
r(Ru-Im)	2,114(2,08)	2,145	2,129	2,122
Media r(Ru-Cl)	2,406(2,34)	2,348	2,402	2,377
r(Ru-H ₂ O)	—	2,239	—	—
r(Ru-NO)	—	—	1,735	1,913
∠ (Ru-N-O)	—	—	177,8	141,1

* Estado singlete. Distâncias de ligação em Å e ângulos em graus.

** Referência [76]: NAMI-A - análogo ao sal de sódio NAMI-A

5.3.2 Estados de transição, reatividade

Para se tornar uma espécie ativa no ambiente biológico, o NAMI-A sofrerá reação de hidrólise devido à diferença na concentração de íons cloreto [Cl⁻], no plasma sanguíneo e no citoplasma das células. Assim, fornecendo um local de coordenação para reações de troca de ligante [78-81]. Esta etapa é amplamente estudada na literatura e não será abordada neste trabalho. No entanto, o reagente considerado será o principal produto da reação de solvólise do NAMI-A: o complexo NAMI-A-H₂O. A reação a ser estudada está esquematizada na equação 5.1.



Tanto o NO como o NAMI-A-H₂O têm um elétron desemparelhado, por esse motivo, existem pelo menos três possibilidades para a substituição da molécula de água por NO no complexo NAMI-A-H₂O mostra a Figura 5.5. A primeira possibilidade seria a reação ocorrer apenas na superfície de energia singlete (via **A**), a segunda seria apenas pela superfície de energia potencial tripleto (via **B**).

A última opção só pode acontecer desde que haja pelo menos um cruzamento de superfície envolvendo os estados singlete e tripleto. Esses tipos de reações, quando há pelo menos uma mudança na configuração do spin, são chamadas de reações proibidas por spin e geralmente exigem uma abordagem teórica diferente da teoria do estado de transição (TST - *Transition State Theory*). Neste trabalho, usamos ferramentas de química quântica para investigar o mecanismo geral da reação de captura de NO pelo complexo NAMI-A-H₂O, que abrange todas as possibilidades discutidas acima.

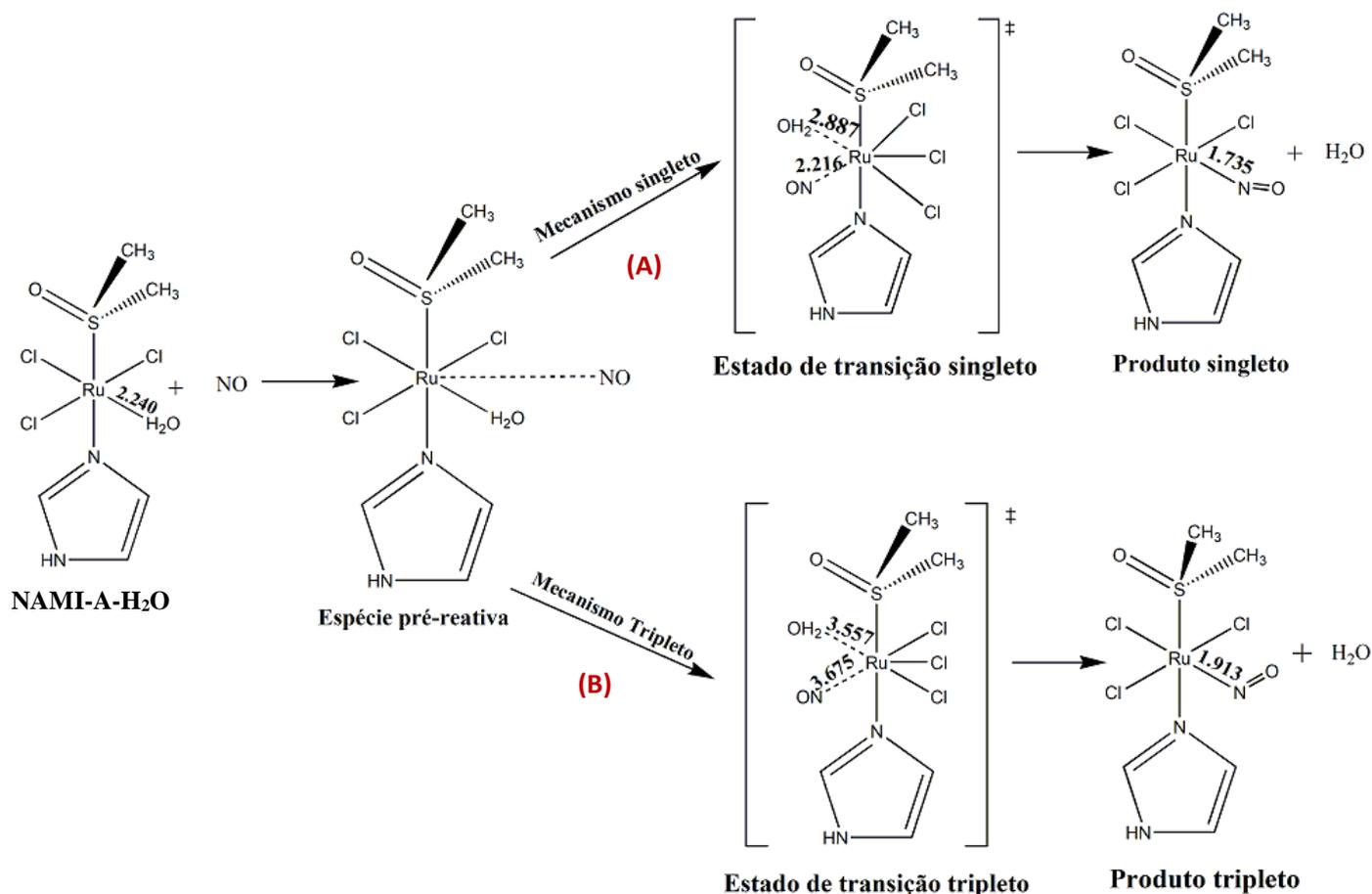


Figura 5.5 Possíveis rotas para a substituição da H₂O por NO no complexo NAMI-H₂O. Na via A, a reação segue uma curva de energia potencial exclusivamente singlete e na via B a troca de ligantes H₂O-NO é realizada na superfície de energia potencial tripleto.

Pela Figura 5.5 é possível observar que a espécie reagente NAMI-A-H₂O em seu estado dubleto se aproxima da molécula – com um elétron desemparelhado – NO formando uma espécie pré-reativa em que há uma mistura de estado de spin singlete e tripleto. O estado predominante dependerá dentre outros fatores da energia e ocupação dos orbitais d do metal, no entanto, a formação de espécies tanto singlete como tripleto são possíveis. Assumindo em um primeiro momento que a espécie pré-reativa seguirá a superfície de energia potencial exclusivamente singlete (via **(A)**).

Para o caminho da superfície singlete, foi caracterizado um estado de transição (TS) com uma frequência imaginária de 122,6i cm⁻¹. O deslocamento nuclear associado a esta frequência mostra um movimento concertado envolvendo a saída de H₂O e a entrada de NO. A distância entre H₂O e NO até o centro do rutênio é de 2,887 e 2,216 Å, respectivamente. Ao longo da reação, a distância r(Ru-H₂O) aumenta de 2,201 Å no reagente para 2,887 Å no TS, enquanto a distância r(Ru-NO) diminui de 3,721 Å no reagente para 2,216 Å no TS. No produto, a distância r(Ru-H₂O) = 4,021 Å, r(Ru-NO) = 1,746 Å e o ângulo Ru-NO = 170 °. Com base nas variações de distância de ligação entre o reagente e o estado de transição e também entre o produto e o estado de transição é possível calcular a taxa de quebra da ligação Ru-H₂O e formação da ligação Ru-NO. Os resultados mostram que há 31% de quebra de ligação e 27% de formação de ligação, indicando que a reação segue um mecanismo concertado de caráter dissociativo.

A energia livre de Gibbs foi considerada para verificar a espontaneidade da formação dos adutos resultantes da interação do NAMI-H₂O com o NO, para as vias **(A)** e **(B)**, a partir da aproximação da correção térmica pela energia do ponto zero (ZPE) em 298,15 K. A ZPE foi obtida por meio do cálculo de frequência descrito na metodologia teórica no nível B3LYP/def2-TZVP. Nesse sentido, a energia livre no vácuo ($\Delta G_{gás}$) é definida como a soma entre a energia eletrônica e a correção térmica de acordo com a Equação 5.2;

$$\Delta G_{gás} = \Delta E + G_{term} \quad 5.2$$

Em que ΔG_{gas} é a variação de energia livre de Gibbs da reação em fase gasosa, ΔE é a energia eletrônica e G_{term} a correção térmica.

A Figura 5.6 mostra os valores da energia livre de ativação e da reação para o mecanismo de troca H₂O-NO exclusivamente singlete para o complexo [RuCl₃(H₂O)(Im)(DMSO)]. R1, TS1 e P1 representam o aduto reagente, o estado de transição e o aduto produto da reação, respectivamente. Os valores em vermelho referem-se as espécies solvatadas e serão discutidos abaixo. É conhecido que o produto [RuCl₃(NO)(Im)(DMSO)] é de baixo spin (S = 0). Portanto, nesse processo reativo, podemos tomar como hipótese que o NO doa seu elétron não emparelhado ao Ru, de modo que o

Ru(III) seja reduzido a Ru(II) resultando assim na configuração $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+]$. Essa hipótese será investigada um pouco mais adiante em termos dos cálculos CASSCF.

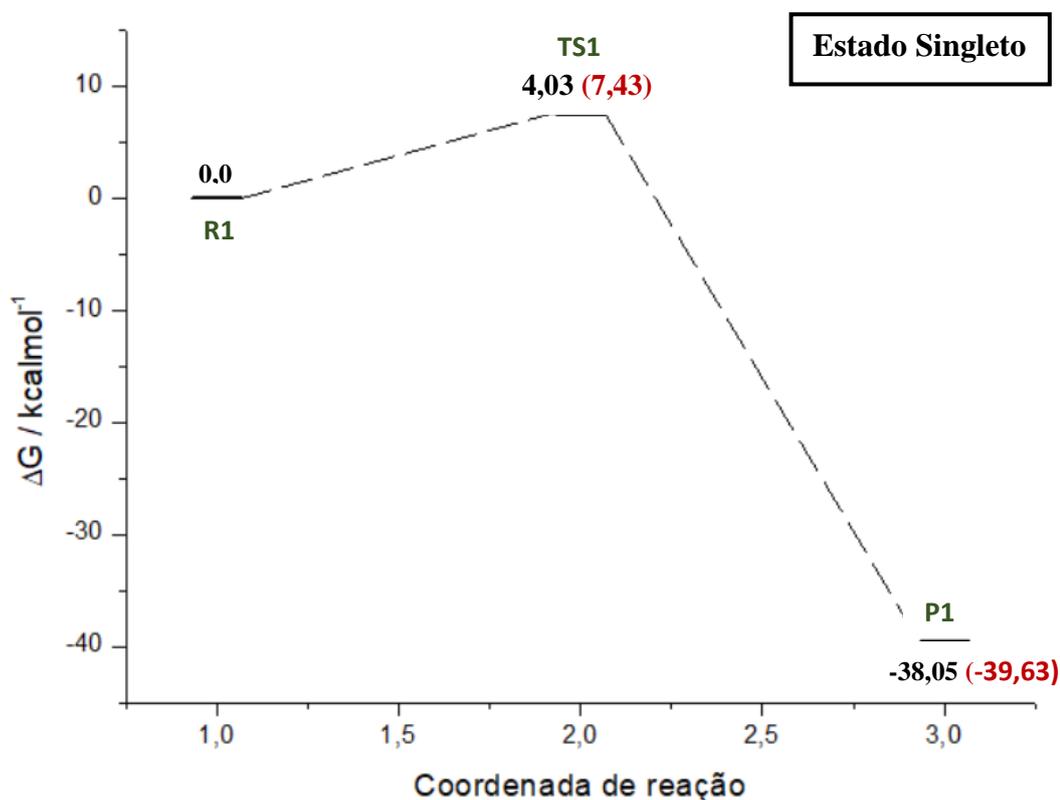


Figura 5.6 Perfil de energia potencial para a reação de troca de ligantes H₂O-NO no estado de spin singleto. R1 refere-se ao reagente, TS ao estado de transição e P1 ao produto.

A Figura 5.6 mostra que a energia livre de ativação da reação no estado singleto é 4,03 kcal mol⁻¹ e a energia livre total é -38,05 kcal mol⁻¹ em fase gás, indicando que o processo é favorável. O efeito do meio solvente foi incluído utilizando o modelo contínuo CPCM, em que são consideradas apenas a energia de cavitação e as interações eletrostáticas. Os cálculos foram feitos no nível teórico B3LYP/def2-TZVP/CPCM(SMD). A energia livre total será então dada pela equação 5.3:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{gás} + \Delta(\Delta G_{solvatação}) \quad 5.3$$

Em que ΔG_{sol} é a variação de energia livre de Gibbs da reação da solução, $\Delta G_{gás}$ é a variação de energia livre de Gibbs da reação da fase gasosa e $\Delta(\Delta G_{solvatação})$ é a variação da variação da energia livre de Gibbs envolvida na solvatação das espécies.

Os resultados obtidos através da Equação 5.3, mostra que a inclusão do solvente aumenta a energia livre de ativação para $7,43 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e diminui discretamente a energia livre total da reação. Este resultado indica que o processo em meio aquoso permanece espontâneo, porém, tem sua taxa de reação diminuída. Como o processo reacional estudado neste capítulo trata-se da saída do ligante H_2O para a entrada do ligante NO , é esperado que a inclusão de moléculas de água mesmo em um modelo de contínuo dielétrico desloque o equilíbrio no sentido dos reagentes, tornando a reação mais lenta.

Para o caminho da superfície exclusivamente tripleto (via **(B)**), foi caracterizado um estado de transição com frequência imaginária menor comparada ao singlete de $71,0i \text{ cm}^{-1}$, sendo as distâncias entre o grupo de saída e o grupo entrada ao íon central maior, $3,557$ e $3,675 \text{ \AA}$, respectivamente. Ao longo do caminho da reação, a distância $r(\text{Ru-NO})$ aumenta $1,341 \text{ \AA}$ ($2,216 \text{ \AA}$ no reagente para $3,557 \text{ \AA}$ em TS), enquanto a distância $r(\text{Ru-O})$ diminui $1,127 \text{ \AA}$ ($4,802$ no reagente para $3,675 \text{ \AA}$ em TS). No aduto do produto, a distância $r(\text{Ru-H}_2\text{O}) = 4,840 \text{ \AA}$, $r(\text{Ru-NO}) = 1,913 \text{ \AA}$ e o ângulo $\text{Ru-NO} = 141^\circ$. O estado de transição envolvendo o mecanismo tripleto, por outro lado, possui 61% de taxa de quebra da ligação e 92% de formação da ligação, indicando um mecanismo concertado de caráter associativo.

Os dados energéticos em fase gás e em solução para a reação de troca de ligantes $\text{H}_2\text{O-NO}$ no estado de spin tripleto, calculados no mesmo nível de teoria do estado singlete, foram avaliados pelas Equações 5.2 e 5.3, respectivamente, e na Figura 5.7 é possível observar o perfil da energia livre dos caminhos de reação para $[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{Im})(\text{DMSO})]$ ocorrendo no estado de spin do tripleto. A energia livre de ativação da reação no estado tripleto, calculado pela Equação 5.2, é maior comparada ao estado singlete, assumindo um valor de $13,80 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e a energia livre total é $3,16 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em fase gás, indicando que o processo é desfavorável. Porém, a inserção do meio solvente (valores em azul) no nível de teoria B3LYP/DEF2-TZVP/CPCM/SMD e através da Equação 5.3, muda o perfil do processo reacional, tornando-o o favorável com uma energia livre total de $-1,05 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Já a energia livre de ativação aumenta para $14,46 \text{ kcal.mol}^{-1}$ indicando novamente uma diminuição na taxa de reação química. Este fato novamente deve-se ao efeito do solvente no equilíbrio químico.

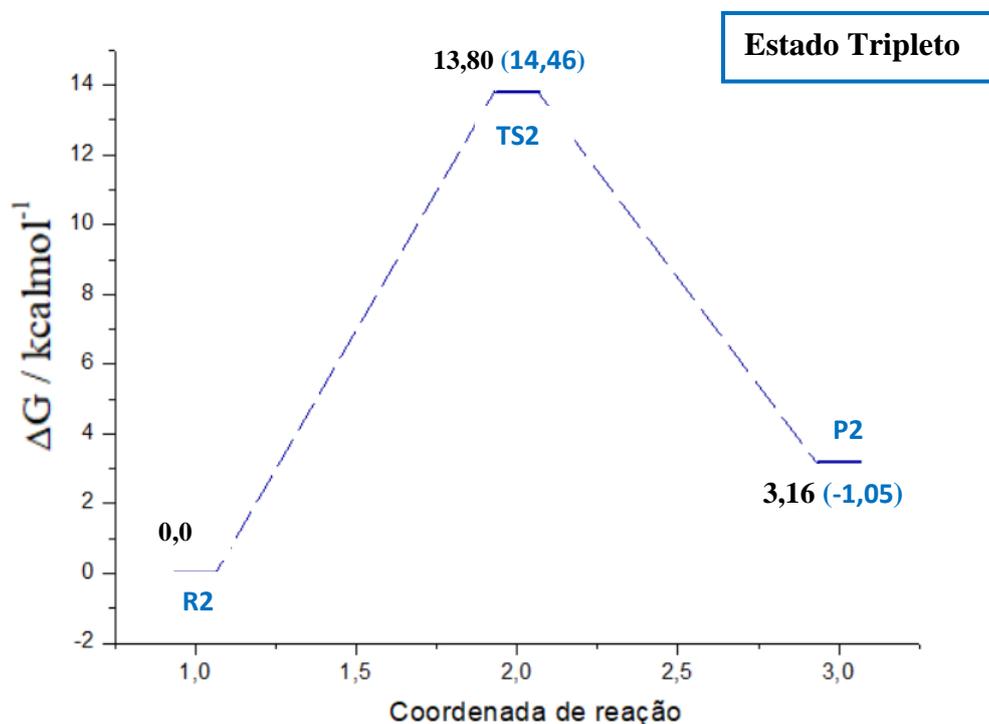


Figura 5.7 Perfil de energia potencial para a reação de troca de ligantes H₂O-NO no estado de spin tripleto. R2 refere-se ao reagente, TS2 ao estado de transição e P2 ao produto, todos no estado de spin tripleto.

No caminho de reação tripleto, o elétron desemparelhado do NO não só se acopla ao elétron desemparelhado do Ru, como também permanece com a maior parte de sua densidade no NO, não havendo transferência de carga significativa. Essa afirmação também será investigada por meio dos estudos CASSCF.

Comparando as Figuras 5-6 e 5-7, é possível observar que tanto o produto tripleto $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{Im})(\text{NO})]^-$ como o produto singleto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_4(\text{Im})(\text{NO})^+]^-$ podem ser formados em solução aquosa. Além disso, a reação é espontânea no estado de spin singleto e tripleto e ocorre mais rápida no estado de spin singleto comparado ao estado de spin tripleto. Os resultados apresentados aqui estão de acordo com o trabalho recente de Li e colaboradores [50], discutido na introdução desse capítulo. Entretanto, temos que levar em conta que os reagentes podem não existir inicialmente no estado total singleto, portanto faz-se necessária uma análise mais aprofundada da estrutura eletrônica do sistema por cálculos multiconfiguracionais como o CASSCF. A terceira possibilidade mecanística para a reação de troca de ligantes H₂O-NO analisada nessa Tese, envolve o cruzamento

entre as superfícies de energia singleto e tripleto em um ou mais pontos da reação, se considerarmos a reação se processando apenas através de superfícies únicas de Born-Oppenheimer a cada momento. Essa possibilidade é considerada, tendo em vista que tanto o NO ($S = 1/2$) como o complexo $[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{Im})(\text{DMSO})]$ ($S = 1/2$) possuem separadamente um elétron desemparelhado. Assim, embora possamos pensar nessas reações ocorrendo em qualquer uma das superfícies, a multiplicidade de spin do produto final será preferencialmente singleto, visto que este é significativamente mais estável e o único verificado experimentalmente [50-53]. Em outras palavras, a reação deve envolver pelo menos um ponto de cruzamento de superfície. Esse tipo de transição não-radiativa entre estados eletrônicos com duas multiplicidades de spin diferentes é chamado de cruzamento entre sistemas e pode ser adequadamente investigada usando a teoria do estado de transição não-adiabática (NA-TST) [62, 62, 83], que envolve a determinação de um ou mais pontos de cruzamento de energia mínima ou MECP - Mínimo Energy Crossing Point). O MECP é o ponto de mínimo em um subespaço completo das superfícies de energia potencial, e a obtenção de sua estrutura é largamente dependente do nível de teoria utilizado. Para calcular a probabilidade de transição entre as duas curvas, é necessário calcular o acoplamento spin-órbita no MECP, o que geralmente requer cálculos multiconfiguracionais, impondo assim restrições ao tamanho do sistema em estudo. No entanto, com base nas propriedades do MECP, uma descrição qualitativa do processo pode ser obtida [62] e, esta foi a abordagem utilizada neste trabalho.

Na Figura 5.8, é possível observar que a reação ocorre da direita para a esquerda com a formação do complexo Ru-nitrosil. Como podemos ver, a reação de formação começa na superfície tripleto de menor energia com os spins desemparelhados. À medida que o NO se aproxima do centro metálico, as duas superfícies se cruzam em 3,14 Å, antes da região do estado de transição da superfície da tripleto. A estrutura e energia associada a este MECP, foi obtida usando as sugestões de Harvey et al. [62] e implementado no programa ORCA. Neste ponto, a reação pode seguir a superfície de energia potencial singleto com uma pequena barreira energética comparada ao tripleto, ou continuar em sua superfície de origem, que apresenta uma barreira de ativação qualitativamente bastante superior. É importante ressaltar que essas mudanças de superfícies são proibidas por spin e impactam diretamente na cinética da reação. Analisando ainda a Figura 5.8, observamos que uma aproximação adicional do NO ao complexo de Ru^{III} ($r_{\text{Ru-NO}} = 1,853 \text{ \AA}$) ao longo da superfície singleto atinge o MECP-II, no qual há possibilidade de outro salto para a superfície tripleto. A estrutura obtida para este MECP foi muito próxima do MECP-I, indicando que talvez esses pontos correspondem a duas estruturas próximas de MECP na costura de interseção entre as duas superfícies. No entanto, essa diferenciação não é possível com a análise qualitativa realizada. Após MECP-II, outro ponto de cruzamento é obtido no MECP-III, no qual há possibilidade de ocorrer

um salto final do tripleto para a superfície singleto ($r_{\text{Ru-NO}} = 1,975 \text{ \AA}$), gerando o produto final $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{Im})(\text{DMSO})]$ no estado singleto.

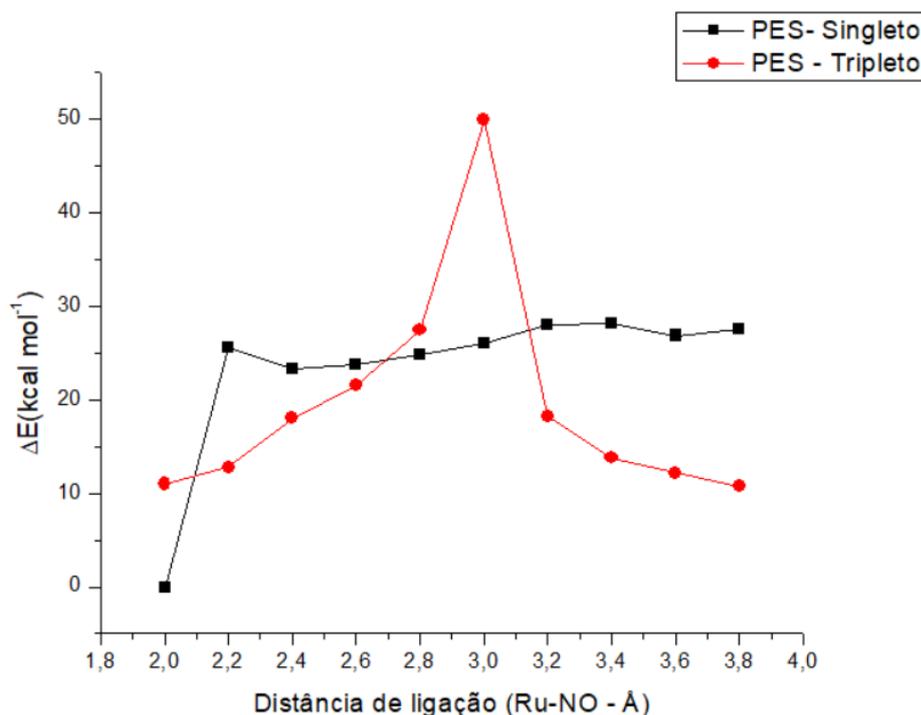


Figura 5.8 Superfície de energia potencial singleto e tripleto para a reação de troca de ligante $\text{H}_2\text{O-NO}$ calculado no nível B3LYP/def2-TZVP de teoria.

Os pontos de cruzamento II e III, podem ser vistos como mínimos locais na costura da região de interseção, ambos próximos ao ponto mínimo de cruzamento de energia global. Vale a pena notar que o processo inverso, a liberação de NO dos complexos de nitrosil (da esquerda para a direita na Figura 5.8) tem barreiras de energia muito diferentes. A liberação do complexo singleto $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{Im})(\text{DMSO})]$ possui energia de ativação $\sim 25 \text{ kcal mol}^{-1}$, muito semelhante ao valor obtido para o complexo nitrosil Ru(II). No entanto, a liberação do estado tripleto pode ser muito favorável através do MECP, tendo energia de ativação menor ($\sim 18 \text{ kcal mol}^{-1}$). Este resultado sugere que, se o complexo singleto for excitado para o estado tripleto, a liberação de NO pode ser aumentada grandemente.

5.3.3 CASSCF

Como foi visto anteriormente, para o processo reacional ocorrendo na superfície singleto, em determinado momento da reação, seja antes, durante ou depois da formação do estado de transição, o elétron desemparelhado do NO deve ser transferido para o centro metálico de forma a se obter o

produto que possui coordenação linear e, portanto, deve ter configuração $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+]$. Afim de investigar essa afirmação, foram realizados cálculos CASSCF e SA-CASSCF a partir das três estruturas de cada ponto estacionário localizado nas superfícies singleto e tripleto, utilizando-se a metodologia descrita na seção de detalhes computacionais.

A tabela 5.2 mostra as energias totais computadas com CASSCF+NEVPT2 para as estruturas dos estados estacionários obtidas com os cálculos DFT. Nos cálculos de Estado Médio, SA (State Averaged), a função de onda total é aproximada pela média ponderada da função de onda de cada estado eletrônico. Para os cálculos realizados neste trabalho, foi dado um peso igualitário de 50% para cada um dos estados singleto e tripleto. Nesta tabela, a menor energia total para cada estado estacionário está marcada em negrito.

Como podemos ver, para o caso dos reagentes, a menor energia total corresponde a função de onda SA para as geometrias DFT/tripletto. Assim, a estrutura eletrônica mais estável é melhor descrita pela geometria DFT/tripletto com uma função de onda composta pela média dos estados singleto e tripleto, e não só por um único estado de spin. Isso é esperado pois a longas distâncias o elétron desemparelhado do NO e do Ru não interagem e, portanto, não deveriam existir significativas diferenças entre singleto e tripleto.

Para o estado de transição (TS), o mesmo é verdade, e novamente a estrutura eletrônica que melhor descreve esse estado é a geometria DFT/tripletto com a função de onda SA. Também se verifica que a função de onda SA tem a mesma energia da função puramente tripletto, o que é um indicativo que o estado singleto tem a mesma energia do estado tripletto, e nessa estrutura de TS os elétrons desemparelhados ainda não se acoplam. Esse resultado é interessante pois indica que o mecanismo de reação acontece primeiro com o rearranjo dos átomos e formação de um estado de transição, para que em seguida com a orientação adequada, forme-se o produto singleto em que os dois elétrons antes desemparelhados se acoplam. Essa hipótese será aprofundada na próxima seção. Para os produtos, como esperado, a função de onda CAS total é melhor descrita pelo estado 100% singleto na geometria singleto. Isso não significa necessariamente que o estado fundamental dos produtos não tem nenhuma contribuição do estado tripletto, mas apenas que o peso deste é muito menor que do estado singleto.

Tabela 5.2 Energias CASSCF e SA-CASSCF (50% singleto e 50% tripleto) com correção NEVPT2 dos pontos estacionários dos caminhos de reação calculados pela DFT.*

	Reagentes		TS		Produtos	
	CAS	SA-CAS	CAS	SA-CAS	CAS	SA-CAS
g-sing*	-7044,776303	-7045,425769	-7045,564376	-7045,465137	-7045,634316	-7045,582499
g-trip*	-7045,572162	-7045,586165	-7045,573647	-7045,573606	-7045,560354	Não Converg

g-sing = geometria dos estados estacionários da superfície do estado singleto computados pela DFT.

g-trip = geometria dos estados estacionários da superfície do estado tripleto computados pela DFT.

* Resultados em u.a.

Tomando-se as energias mais estáveis, em negrito, para cada um dos pontos estacionários mostrados na Tabela 5.2 podemos construir um novo perfil reacional que está mostrado na Figura 5.9, e corresponde ao perfil SA-CASSCF, em que podemos considerar uma aproximação mais realista do sistema, transitando entre uma combinação dos estados monoconfiguracionais singleto e tripleto da DFT. Pode-se observar na figura que a nova energia de ativação é de $7,53 \text{ kcal mol}^{-1}$, com uma energia total de reação de aproximadamente $-30 \text{ kcal mol}^{-1}$, o que é uma combinação dos resultados unicamente DFT, e é totalmente compatível com os dados experimentais contidos na literatura [50-53]. Deve-se reforçar que essa energia é puramente eletrônica e em fase gasosa.

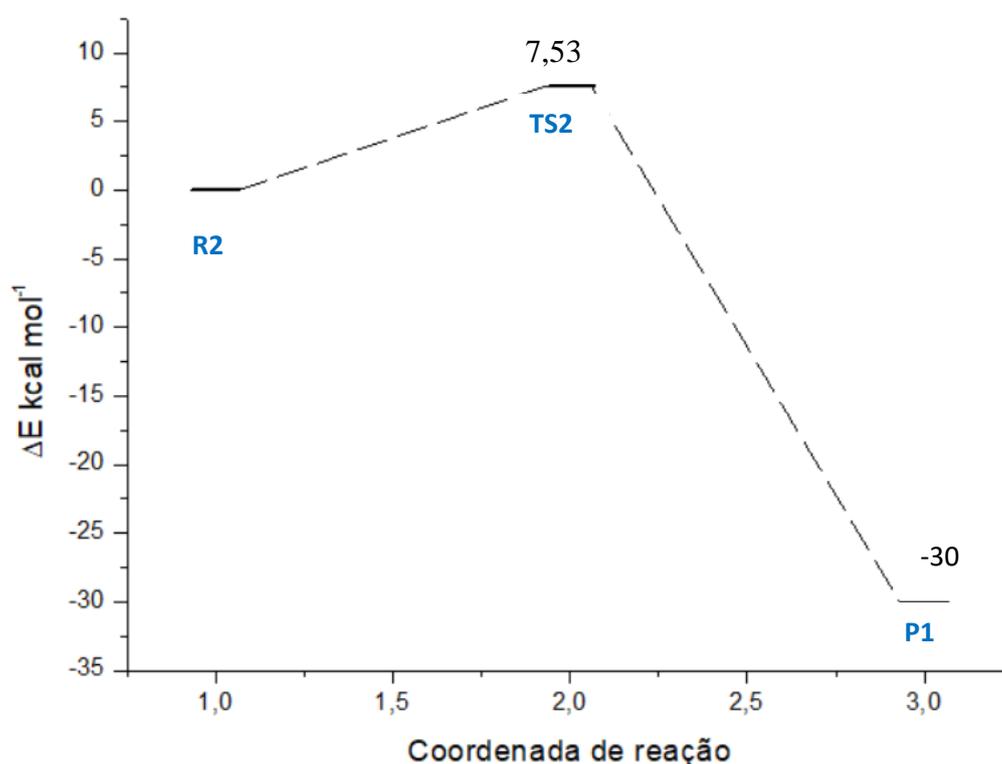


Figura 5.9 Perfil de energia potencial para a reação de troca de ligantes H₂O-NO corrigida via método SA-CASSCF/NEVPT2 (50% singleto + 50% tripleto). R2 refere-se ao reagente no estado tripleto, TS2 ao estado de transição no estado tripleto e P1 ao produto no estado no estado singleto

As Figuras 5.10 e 5.11 contém os orbitais do espaço ativo CASSCF(4,4) que contém maior contribuição dos orbitais $\pi(\text{NO})$ e $d(\text{Ru})$ para as estruturas estacionárias da Figura 5.9. Como podemos ver, nos reagentes e no estado de transição, não há ainda a combinação dos orbitais dos elétrons desemparelhados de cada reagente, de forma que o sistema é composto por NO^0 e Ru^{III} .

Assim, o rearranjo atômico se dará antes do acoplamento dos spins. Por outro lado, no produto singlete, podemos verificar que os orbitais HOMO e HOMO-1 possuem um maior caráter de $d(\text{Ru})$, enquanto o LUMO e LUMO+1 um maior caráter $\pi^*(\text{NO})$ com $d(\text{Ru})$, formando um estado fundamental de predominância $\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+$. Entretanto, os orbitais LUMO e LUMO+1 ainda tem uma ocupação relevante de aproximadamente 0,20 frente a ocupação de 2,80 dos orbitais HOMO e HOMO+1, indicando que ainda há uma contribuição relativamente grande da ordem de 7% do estado $\text{Ru}^{\text{III}}\text{NO}^0$.

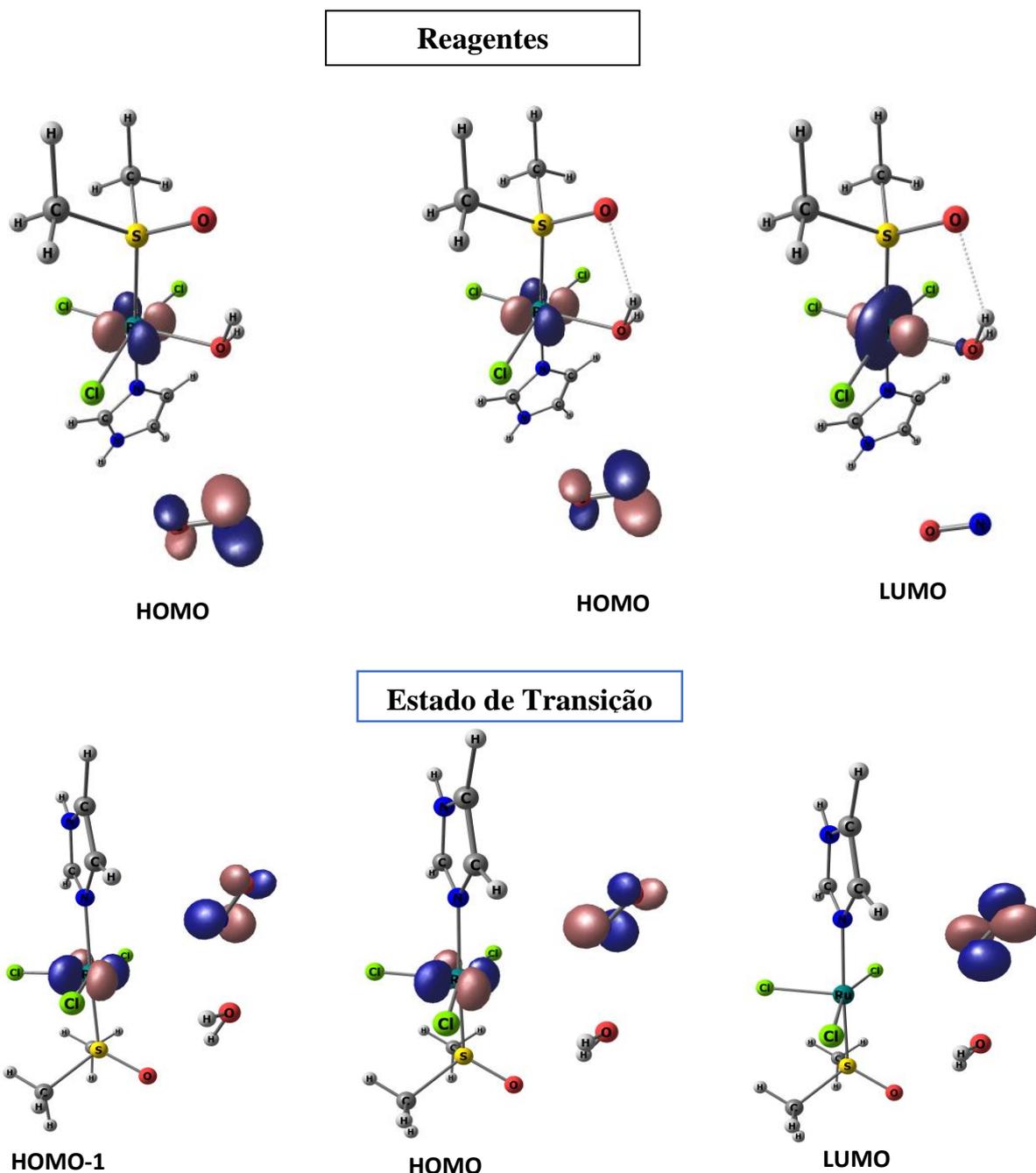
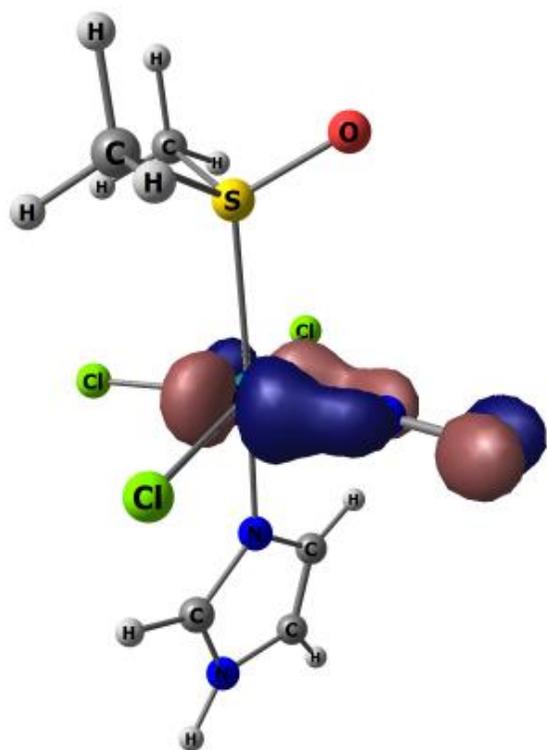
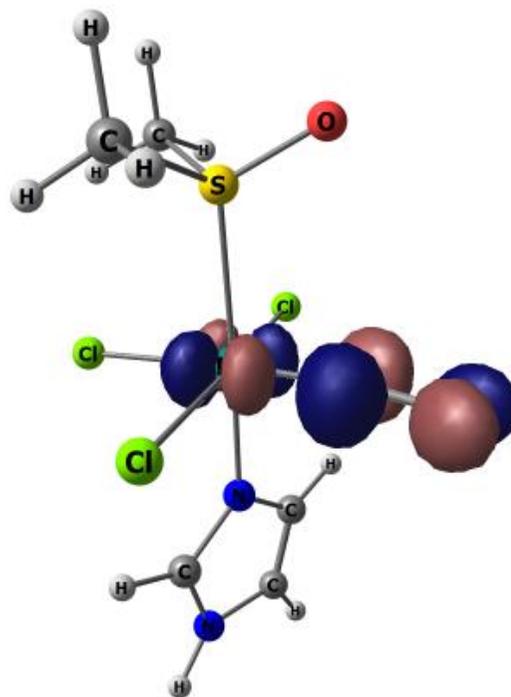


Figura 5.10 Orbitais CASSCF de fronteira otimizados (espaço ativo) para os reagentes e estado de transição mostrados no novo perfil de reação da Figura 5.9.

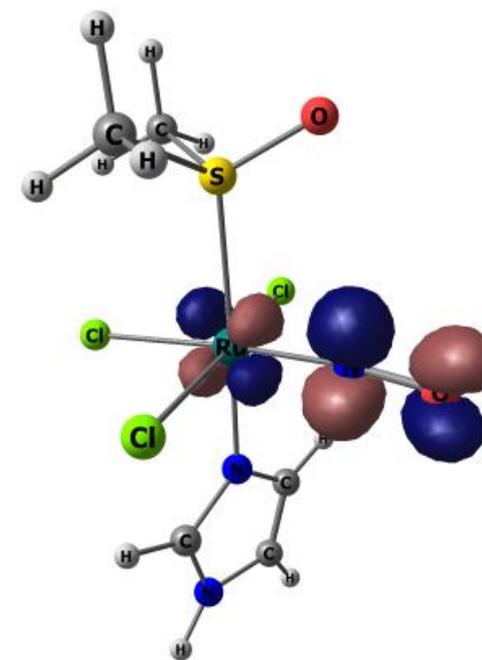
Produtos



HOMO-1



HOMO



LUMO

Figura 5.12 Orbitais CASSCF de fronteira otimizados (espaço ativo) para os produtos mostrados no novo perfil de reação da Figura 5.9.

5.3.4 Cruzamento entre sistemas e MECP

Utilizando o tratamento da função de onda CASSCF, chegamos a um mecanismo em que agora os estados singlete e tripleto dos reagentes e do estado de transição não se encontram mais separadamente, mas sim combinados em uma função de onda total melhorada. Entretanto, em algum momento da reação esses spins devem se acoplar, gerando o produto singlete. A Tabela 5.3 mostra o valor do desdobramento de energia tripleto-singlete além da constante de acoplamento spin-orbita (SOC), calculados com o método SA-CASSCF, para as estruturas localizadas ao longo da SEP do estado tripleto, mostrado na Figura 5.9. Podemos ver que o desdobramento entre os estados assim como a SOC permanece próximo de 0 até uma distância $r(\text{Ru-NO})$ de 2,80 Å, que é um pouco menor do que a do estado de transição localizado na Figura 5.5. Mais um indicativo que, após o estado de transição os elétrons desemparelhados começam a se acoplar. Podemos observar que a partir desse ponto existe uma variação entre as estabilidades dos estados singlete e tripleto, com um aumento considerável do valor de SOC até o valor máximo de $\sim 70 \text{ cm}^{-1}$ no ponto do MECP-III. Portanto, após o rearranjo atômico, o cruzamento entre sistemas com consequente acoplamento dos spins eletrônicos deve acontecer no ponto do MECP-III, em que concomitantemente haverá a transferência de carga $\text{NO} \rightarrow \text{Ru}$. A Figura 5.12 contém os orbitais SA-CASSCF da estrutura do MECP-III e corrobora com essa afirmação. Nela, pode-se verificar que os orbitais de fronteira do MECP, diferentemente do estado de transição, mostram uma já significativa combinação $\pi^*(\text{NO})^+d(\text{Ru})$, caminho pelo qual a superfície singlete deve ser atingida.

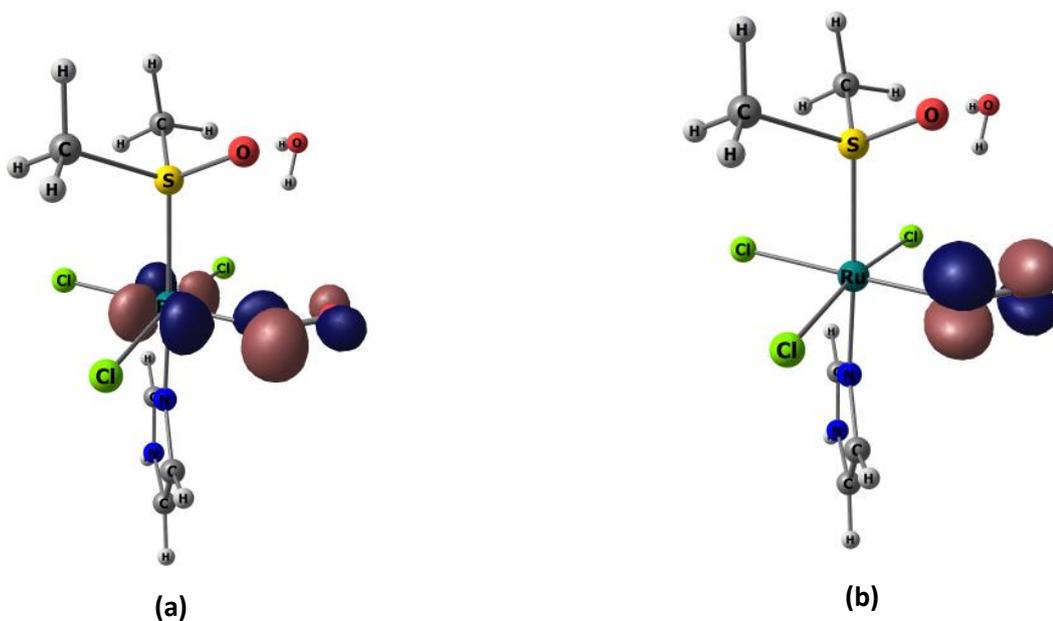


Figura 5.13 Orbitais CASSCF de fronteira (espaço ativo) para o MECP-III. (a) orbital HOMO (b) orbital LUMO.

Tabela 5.3 Desdobramento energético tripleto-singlete (ΔE_{t-s}) e constante de acoplamento spin-órbita (SOC) para estruturas localizadas na superfície de energia potencial tripleto como mostrada na Figura 5.9.

rRu-NO (Å)	3,80	3,60**	3,40	3,20	3,00	2,80	2,60	2,40	2,20	2,00	1,97 (MECP)
ΔE_{t-s}^* (kcal mol ⁻¹)	0,03	0,03	0,02	0,01	-0,01	2,59	-0,56	-0,62	1,73	8,66	0,00
SOC (cm⁻¹)	0,16	0,19	0,20	0,12	0,24	7,49	4,68	8,97	28,11	58,61	66,19

* Nível SA-CASSCF/NEVPT2

**r(Ru-NO) – região - TS = 3,6

5.3.5 Conclusão

Neste capítulo, a interação do complexo NAMI-H₂O com o NO foi investigada no nível de teoria B3LYP/DEF2-TZVP através de 3 possíveis mecanismos. Em dois deles apenas uma superfície de energia potencial Born–Oppenheimer (SEP) foi tratada, sendo a primeira exclusivamente singleto e a segunda exclusivamente tripleto. A terceira possibilidade envolveu cruzamento de ambas as superfícies em um ou mais pontos da reação.

Analisando primeiro as vias de SEP exclusivas, os resultados mostraram que em fase gás apenas o produto singleto mais estável é formado com $\Delta G = -30,05 \text{ kcal mol}^{-1}$, enquanto a formação do produto tripleto apresenta um ΔG positivo no valor de $3,16 \text{ kcal mol}^{-1}$. Além disso foi possível observar que a cinética da SEP singleto é aproximadamente três vezes mais rápida comparada a SEP tripleto. A inserção do meio solvente no nível de teoria B3LYP/def2-TZVP/CPCM(SMD) altera o perfil reacional, tornando espontânea a formação do produto em ambos estado de spin, porém, provoca uma diminuição na cinética da reação. Este resultado, mostrou a necessidade do uso de cálculos multiconfiguracionais como o CASSCF. Além disso, tanto o NO ($S = 1/2$) como o complexo [RuCl₃(H₂O)(Im)(DMSO)] ($S = 1/2$) possuem separadamente um elétron desemparelhado e assim os reagentes podem não existir inicialmente no estado total singleto ou tripleto e sim em uma mistura de ambos.

O resultado multiconfiguracional mostrou que a estrutura eletrônica mais estável para o reagente é melhor descrita pela geometria DFT/tripletto com uma função de onda composta pela média dos estados singleto e tripleto. O mesmo foi observado para o estado de transição, indicando que o mecanismo de reação acontece primeiro com o rearranjo dos átomos e formação de um estado de transição para depois haver acoplamento de spin. Para os produtos, como esperado, a função de onda CAS total é melhor descrita pelo estado 100% singleto na geometria singleto. De posse dessa informação é possível concluir que o mecanismo corrigido se passa por um reagente e estado de transição tripletos e a formação de um produto singleto. As energias eletrônicas corrigidas apresentam valores de $7,53$ e $-30 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectivamente.

Para estudar as transições entre os estados de spin, foi determinado primeiramente 3 MECP's (MECP - Mínimo Energy Crossing Point)), a análise estrutural permitiu concluir que os MECP I e II são muito parecidos e, por isso, convergem para somente um, totalizando 2 MECP's relevantes. Utilizando o tratamento da função de onda CASSCF, foi possível concluir que o cruzamento entre sistemas com consequente acoplamento dos spins eletrônicos deve acontecer no ponto do MECP-III,

em que concomitantemente haverá a transferência de carga $\text{NO} \rightarrow \text{Ru}$ e a formação do produto de configuração $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+]$.

Nossos resultados permitem concluir que a captação do NO pelo NAMI- H_2O pode ser uma possível rota mecanística que justifica a robusta atividade antimetástica do NAMI-A, pois, a concentração de NO livre está intimamente ligada com a progressão do tumor através da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Sendo o NAMI-A capaz de abstrair o NO, sua concentração é diminuída e como consequência a progressão do tumor maligno é afetada. Os dados de energia livre de Gibbs de ativação revelam uma barreira relativamente baixa, indicando que a cinética de troca de ligantes $\text{H}_2\text{O}/\text{NO}$ é compatível com as taxas de reação ocorridas em meio biológico.

5.4 Referências Bibliográficas

1. Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. *Metallomics 1* (2009) 458.
2. Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J.; Beijnen, J.; Sava, G. *J. Inorg. Biochem.* 106 (2012) 90.
3. Clarke, M. J.; *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 69.
4. Pluim, D.; van Waardenburg, R. C. A. M.; Beijnen, J. H. ; Schellens, J. H. M. *Cancer Chemother. Pharma.* 54 (2004) 71.
5. Sava, G.; Bergamo, A.; Zorzet, S.; Gava, B.; Casarsa, C.; Cocchietto, M.; Furlani, A.; Scarcia, V.; Serli, B.; Iengo, E.; Alessioand, E.; Mestroni, G. *Euro. J. Cancer* 38 (2002) 427.
6. Sava, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M.; Zabucchi, G.; Cocchietto, M.; Bergamo, A.; DiGiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartorand, L.; Garbisa, S. *Clinical Cancer Res.* 9 (2003) 1895.
7. Gava, B.; Zorzet, S.; Spessotto, P.; Cocchietto, M.; Sava, G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 284.
8. Leijen, S.; Burgers, S. A.; Baas, P.; Pluim, D.; Tibben, M.; vanWerkhoven, E.; Alessio, E.; Sava, G.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Invest. New Drugs.* 33 (2015) 201.
9. Aitken, J. B.; Antony, S.; Weekley, C. M.; Lai, B.; Spiccia, L.; Harris, H. H. *Metallomics 4* (2012) 1051.
10. Vacca, A.; Bruno, M.; Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Ribatti, D.; Bergamo, A.; Garbisa, S.; Sartor, L.; Sava, G. *Cancer* 86 (2002) 993.
11. Morbidelli, L.; Donnini, S.; Filippi, S.; Messori, L.; Piccioli, F.; Orioli, P.; Sava, G.; Ziche, M. *Cancer* 88 (2003) 1484.
12. Ziche, M.; Morbidelli, L. *J. Neuro-Oncol.* 50 (2000) 139.
13. Kim, J. H.; Jung, Y.; Kim, B. -S.; Kim, S. H. *Biomaterials* 34 (2013) 1657.
14. Morbidelli, L.; Parenti, A.; Giovannelli, L.; Granger, H. J.; Ledda, F.; Ziche, M. *British J. Pharma.* 124 (1998) 1286.
15. Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* 86 (1996) 353.

16. Giacomini, A.; Chiodelli, P.; Matarazzo, S.; Rusnati, M.; Presta, M.; Ronca, R. *Pharma. Res.* **107** (2016) 172.
17. Zhao, Y.; Adjei, A. A. *The oncologist* **20** (2015) 660.
18. Pipili-Synetos, E.; Sakkoula, E.; Maragoudakis, M. *British J. Pharm.* **108** (1993) 855.
19. Ishioka, M.; Ishizuka, Y.; Shintani, S.; Yanagisawa, T.; Inoue, T.; Sasaki, J.; Watanabe, H. *Tissue and Cell* **46** (2014) 122.
20. Hung, Y. -W.; Leung, Y. -M.; Lin, N. -N.; Lee, T. -F.; Kuo, J. -S.; Tung, K. -C.; Gong, C. -L. *Neuroscience* **286** (2015) 231.
21. Ziche, M.; Morbidelli, L.; Masini, E.; Granger, H.; Geppettiand, P.; Ledda, F. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **192** (1993) 1198.
22. Kapadia, M. R.; Eng, J. W.; Jiang, Q.; Stoyanovsky, D. A.; Kibbe, M. R. *Nitric Oxide* **20** (2009) 279.
23. Ziche, M.; Morbidelli, L.; Masini, E.; Amerini, S.; Granger, H. J.; Maggi, C. A.; Geppetti, P.; Ledda, F. *J. Clin. Invest.* **94** (1994) 2036.
24. Fukumura, D.; Kashiwagi, S.; Jain, R. K. *Nat. Rev. Cancer* **6** (2006) 521.
25. Wink, D.; Vodovotz, Y.; Cook, J.; Krishna, M.; Kim, S.; Coffin, D.; DeGraff, W.; Deluca, A.; Liebmann, J.; Mitchell, J. *Biochem. Biokhim.* **63** (1998) 802.
26. Bonavida, B.; Baritaki, S.; Huerta-Yepez, S.; Veja, M. I.; Jazirehi, A. R.; Berenson, J. *Nitric oxide (NO) and Cancer* (2010) 459.
27. Koshland, D. *Science* **258** (1992) 1861.
28. Ignarro, L. J. *Nitric Oxide* (2000) 3.
29. Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. *Physiol. Rev* **87** (2007) 315.
30. Basudhar, D.; Ridnour, L. A.; Cheng, R.; Kesarwala, A. H.; Hei-neck, J.; Wink, D. A. *Coord. Chem. Rev.* **306** (2016) 708.
31. Thomas, D. D.; Ridnour, L. A.; Isenberg, J. S.; Flores-Santana, W.; Switzer, C. H.; Donzelli, S.; Hussain, P.; Vecoli, C.; Paolucci, N.; Ambset, S. *Free Radical Bio. Med.* **45** (2008) 18.
32. Shah, V.; Lyford, G.; Gores, G.; Farrugia, G. *Gastroenterology* **126** (2004) 903.
33. Knott, A. B.; Bossy-Wetzel, E. *Antioxidants & Redox Signal.* **11** (2009) 541.
34. Wink, D. A.; Ridnour, L. A.; Hussain, S. P.; Harris, C. C. *Official J. Nitric Oxide Soc.* **19** (2008) 65.
35. Lala, P. K.; Chakraborty, C. *Lancet Oncol.* **2** (2001) 149.
36. Fukuto, J. M.; Bianco, C. L.; Chavez, T. A. *Free Radical Bio. Med.* **47** (2009) 1318.
37. Geller, D. A.; Nussler, A. K.; Di Silvio, M.; Lowenstein, C. J.; Shapiro, R. A.; Wang, S. C.; Simmons, R. L.; Billiar, T. R. *Proceed. Nation. Academy Sci.* **90** (1993) 522.
38. Knowles, R. G.; Moncada, S. *Biochem. J.* **298** (1994) 249.
39. Flora Filho, R.; Zilberstein, B. *Revista Assoc. Méd. Brasil.* **46** (2000) 265.
40. Huang, Z.; Fu, J.; Zhang, Y. *J. Med. Chem.* **60** (2017) 7617.
41. Malinski, T.; Bailey, F.; Zhang, Z.; Chopp, M. J. *Cerebral Blood Flow & Metab.* **13** (1993) 358.

42. Huheey, J. E., Keiter, E. A., Keiter, R. L., and Medhi, O. K., *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*. Pearson Education, **2006**.
43. Dinerman, C. E.; Ewing, G. E. *J. Chem. Phys.*, **53** (1970) 626.
44. Ford, P. C.; Pereira, J. C. M.; Miranda, K. M.; Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry, Biochemistry and Medicine II. Ed. Springer, Berlin Heidelberg, **2013**.
45. Kaim, W. *Advances in Inorganic Chemistry*; Olabe, J. A., van Eldik, R. Eds.; NO_x Related Chemistry; Academic Press, 2015; Vol. 67; pp 295.
46. Enemark, J. H.; Feltham, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 5002.
47. Enemark, J. H.; Feltham, R. D. *Top. Stereochem.* **12** (1981) 155.
48. Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **236** (2003) 209.
49. Bottomley, F. *Coord. Chem. Rev.* **26** (1978) 7.
50. Li, H.; Wang, D.; Zhao, X.; Lu, L. N.; Liu, C.; Gong, L. D.; Yang, Z. Z. *J. Comput. Chem.* **40** (2019) 1141.
51. Rodrigues, G. L. S.; Rocha, W. R. *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 11821.
52. Castellarin, A.; Zorzet, S., Bergamo, A., & Sava, G. *Inter. J. Mol. Sci.* **17** (2016) 1254.
53. Oszajca, M.; Kuliś, E.; Stochel, G.; Brindell, M. *New J. Chem.* **38** (2016) 3386.
54. Neese, F. *Rev. Comput. Mol. Sci.* **2** (2012) 73.
55. Neese, F. *Rev. Comput. Mol. Sci.* **8** (2018) e1327.
56. Parr, R. G. Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, **1989**.
57. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **37** (1988) 785.
58. Weigend, F.; Ahlrichs, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005) 3297.
59. Neese, F. *J. Comput. Chem.* **24** (2003) 1740.
60. Neese, F.; Wennmohs, F.; Hansen, A.; Becker, U. *Chem. Phys.* **356** (2009) 98.
61. Harvey, J. N. *Rev. Comput. Mol. Sci.* **4** (2014) 1.
62. Harvey, J. N.; Aschi, M.; Schwarz, H.; Koch, W. *Theor. Chem. Accounts Theory, Comput. Model. (Theoretica Chim. Acta)* **99** (1998) 95.
63. Harvey, J. N. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** (2007) 331.
64. Grimme, S.; Hansen, A. *Angew. Chemie* **54** (2015) 12308.
65. Mermin, N. D. *Phys. Rev.* **137** (1965) A1441.
66. Siegbahn, P. E.; Almlöf, J.; Heiberg, A.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **74** (1981) 2384.
67. Roos, B. O.; Taylor, P. R.; Siegbahn, P. E. *Chem. Phys.* **48** (1980) 157.
69. Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Tao, J.; Perdew, J. P. J. *Chem. Phys.* **119** (2003) 12129.
70. Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, Oxford, **1989**.
71. Neese, F. *J. Chem. Phys.* **122** (2005) 034107.
72. Angeli, C.; Cimiraaglia, R.; Evangelisti, S.; Leininger, T.; Malrieu, J. -P. *J. Chem. Phys.* **114** (2001) 10252.
73. Angeli, C.; Cimiraaglia, R.; Malrieu, J. -P. *Chem. Phys. Lett.* **350** (2001) 297.

74. Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* (1998) 1995.
75. Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 6378.
76. Alessio, E.; Balducci, G.; Lutman, A.; Mestroni, G.; Calligarisand, M.; Attia, W. *Inorganica Chimica Acta* 203 (1993) 205.
78. Giannini, F.; Süß-Fink, G.; Furrer, J.. *Inorg. Chem.* 50 (2011) 10552.
79. Renfrew, A.; Phillips, A. D.; Tapavcza, E.; Scopelliti, R.; Rothlisberger, U.; Dyson, P. J. *Organometallics* 28 (2009) 5061.
80. Wang, F.; Chen, H.; Parsons, S.; Oswald, I. D. H.; Davidson, J. E.; Sadler, P. J.. *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 5810.
81. Vargiu, A. V.; Robertazzi, A.; Magistrato, A.; Ruggerone, P.; Carloni, P. *Phys. Chem. B* 112 (2008). 4401.

Capítulo 6 – Comentários finais e perspectivas

O desenvolvimento deste trabalho possibilitou estudar e entender, mediante a aplicação de ferramentas modernas teórico-computacionais, propriedades estruturais, eletrônicas e energéticas de compostos de coordenação com importância biológica, cujo centro metálico apresenta os íons Ru (II) e Ru (III).

No capítulo 3 a influência da reação de aquação nos potenciais de redução dos complexos NAMI-A, KP1019 e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ foi avaliada. Os resultados estruturais, utilizando o nível de teoria TPSSh/def2-TZVP, revelaram estruturas com geometria octaédrica distorcida em torno do átomo de rutênio. Nossos resultados mostraram também que enquanto o potencial de redução dos compostos NAMI-A e o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3(\text{Pz})(\text{Cl})]^{2+}$ são sensíveis a troca de ligantes, o potencial de redução do KP1019 permanece constante com a aquação. Este resultado indica que o mecanismo de ação desses fármacos pode ser diferente. Outra observação importante foi a de que, tanto para os complexos quanto para seus produtos de hidrólise, o potencial de redução é acessível biologicamente indicando que a forma reduzida dos complexos aqui estudados bem como seus produtos de hidrólise são relevantes para a sua atividade antitumoral.

No capítulo 4 deste trabalho avaliamos, através de ciclos termodinâmicos, a variação da energia livre de Gibbs em solução para a formação de adutos $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-X}$ onde X = cisteína (Cys), glutathiona (GSH), guanina nos sítios GN7 e com o intuito de avaliar a competição entre os alvos biológicos. Os resultados energéticos mostraram uma provável competição entre a glutathiona e a nucleobase guanina do DNA pela substituição de água ao centro metálico, nos adutos formados a partir dos complexos $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{Im})\text{X}]\text{-1}$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{Pz})\text{L}]^{2+}$. Observamos também que o solvente desempenha um papel importante na estabilização da formação dos adutos. Essa análise pode ser um indicativo de um possível mecanismo de redução dos complexos para posterior interação com DNA. O efeito da redução bem como da reação de aquação na ativação dos metalofármacos NAMI-A e KP1019 também foram avaliados. Foi possível observar a diferença de comportamento químico entre ambos metalofármacos indicando uma possível explicação para o diferente mecanismo de ação desses fármacos. Enquanto o KP1019 é insensível ao estado de oxidação na interação com as biomoléculas, o NAMI-A apresenta uma preferência explícita em ser ativado através da redução. No entanto, múltiplas aquações favorecem a interação dos complexos reduzidos $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-2H}_2\text{O}$ com as biomoléculas selecionadas nesta Tese.

O capítulo 5 foi dedicado a compreensão do mecanismo de reação de troca de ligantes $\text{H}_2\text{O}/\text{NO}$ no cento metálico. Esta é uma etapa importante do trabalho, pois nosso objetivo é dar luz ao efeito antimetastático com NAMI-A. Nossos resultados mostraram que em solução aquosa a reação é energeticamente favorável tanto para o estado tripleto quanto para o estado singleto, sendo necessário o uso de métodos multiconfiguracionais. O resultado multiconfiguracional mostrou que a estrutura eletrônica mais estável para o reagente e estado de transição é melhor descrita pela geometria DFT/triplete com uma função de onda composta pela média dos estados singleto e tripleto. Para os produtos, a função de onda CAS total é melhor descrita pelo estado 100% singleto na geometria singleto. Ou seja, primeiramente há um rearranjo atômico para a formação do estado de transição e posteriormente acoplamento dos spins eletrônicos e formação do produto de configuração $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+]$. O fato da reação ser energeticamente favorável pode indicar ser essa uma possível via antimetástica do NAMI-A, pois, a concentração de NO livre está diretamente ligada com a progressão do tumor através da formação de novos vasos sanguíneos. Sendo o NAMI-A capaz de abstrair o NO, sua concentração é diminuída e como consequência a progressão do tumor maligno é afetada.

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, nota-se que muito ainda pode ser feito no sentido de se obter maior compreensão e maiores detalhes químicos relevantes aos sistemas promissores estudados. Dentre essas ações destaca-se a necessidade de investigar o mecanismo de redução dos complexos aqui estudados, bem como seu modo de interação com outros agentes redutores biológicos, tais como NADH, glutatona e ácido ascórbico. Essa é uma etapa importante para auxiliar no desenho de novos fármacos com atividades antitumorais específicos e também para prevenir reações paralelas no caminho da troca até o alvo.

Foi mostrado na introdução deste trabalho que compostos de Rutênio, se ligam prontamente a nitrogênios imidazólicos de resíduos histidil acessíveis na superfície de algumas proteínas. Acredita-se, portanto, que proteínas como a transferrina e albumina são importantes para o transporte destes fármacos para o interior das células. No entanto, o papel geral e a importância das interações dos medicamentos a base rutênio com proteínas séricas não foram validados e permanecem altamente controversos. Desta forma o estudo da interação destes fármacos com tais proteínas, avaliando as constantes de associação/dissociação em solução se torna indispensável.

Produção Científica no Período:

2/2014 - 1/2019

Pereira, E. S., Da Silva, J. C., Brandão, T. A., & Rocha, W. R. (2016). Phosphorane lifetime and stereo-electronic effects along the alkaline hydrolysis of phosphate esters. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(27), 18255-18267.

De Freitas, L. V., Dos Santos, A. L. D. S., Da Costa, F. C., Calixto, J. B., Miranda, P. V. P., Silva, T. J., ... & Freitas, M. C. (2018). Synthesis and structural characterization of a 8-hydroxyquinoline derivative coordinated to Zn (II). *Journal of Molecular Structure*, 1169, 119-129.

Chagas, M. A., Pereira, E. S., Godinho, M. P., Da Silva, J. C. S., & Rocha, W. R. (2018). Base Mechanism to the Hydrolysis of Phosphate Triester Promoted by the Cd²⁺/Cd²⁺ Active site of Phosphotriesterase: A Computational Study. *Inorganic chemistry*, 57(10), 5888-5902.

Norte, T. H. O., Marcelino, R. B. P., Moreira, R. P. L., Binatti, I., Starling, M. C. V. M., Amorim, C. C., ... & Lago, R. M. (2018). ESI-MS, UV-Vis, and theoretical investigation of Fe³⁺-amoxicillin complexation during coagulation. *Journal of Environmental Engineering*, 144(3), 04018001.

Chagas, M. A., Pereira, E. S., Da Silva, J. C. S., & Rocha, W. R. (2018). Theoretical investigation of the neutral hydrolysis of diethyl 4-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in aqueous solution. *Journal of molecular modeling*, 24(9), 259.

Pereira, E. S., Chagas, M. A., & Rocha, W. R. (2019). Reduction Potential of Ru^{III}-Based Complexes with Potential Antitumor Activity and Thermodynamics of their Hydrolysis Reactions and Interactions with Possible Biological Targets: a Theoretical Investigation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(3), 571-584.