

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E  
BIOTECNOLOGIA

PROPRIEDADES ELETRÔNICAS, ÓPTICAS E VIBRACIONAIS DA  
REGIÃO C-TERMINAL DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> LYS 49

CÉSAR AUGUSTO SILVA DOS SANTOS

CUITÉ/PB

2016

PROPRIEDADES ELETRÔNICAS, ÓPTICAS E VIBRACIONAIS DA  
REGIÃO C-TERMINAL DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> LYS 49

CÉSAR AUGUSTO SILVA DOS SANTOS

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S237p Santos, César Augusto Silva dos.

Propriedades eletrônicas, ópticas e vibracionais da região C-Terminal da fosfolipase Lys49. / César Augusto Silva dos Santos. – Cuité: CES, 2016.

105 fl.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientador: José de Miranda Henriques Neto.

Coorientador: Nilton Ferreira Frazão.

1. Fosfolipases A2. 2. DFT. 3. C - Terminal. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 37.02:60

# PROPRIEDADES ELETRÔNICAS, ÓPTICAS E VIBRACIONAIS DA REGIÃO C-TERMINAL DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> LYS 49

Dissertação desenvolvida sob orientação do Prof. Dr. José de Miranda Henriques Neto e Coorientação do Prof. Dr. Nilton Ferreira Frazão, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande em complementação aos requisitos à obtenção do título de mestre.

CUITÉ/PB

2016

PROPRIEDADES ELETRÔNICAS, ÓPTICAS E  
VIBRACIONAIS DA REGIÃO C-TERMINAL DA  
FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> LYS 49

CÉSAR AUGUSTO SILVA DOS SANTOS

Aprovada em \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José de Miranda Henriques Neto – PPGCNB/CES/UFCG

Orientador

---

Prof. Dr. Nilton Ferreira Frazão – CES/UFCG

Coorientador

---

Prof. Dr. Renner de Souza Leite – PPGCNB/CES/UFCG

Examinador Interno

---

Prof. Dr. Manoel Silva de Vasconcelos - ECT/UFRN

Examinador Externo

*À minha família  
e amigos.*

*"Tudo é possível ao que crê"*

*(Marcos 9:23 )*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de nascer numa família que me proporcionou crescer com dignidade. Com satisfação, manifesto minha gratidão aos meus queridos pais, *Augusto Galdino dos Santos* e *Maria Célia Pereira da Silva Santos* por quem fui ensinado a agir com honestidade e perseguir os meus objetivos.

A minha amada esposa *Claudicely Sabino Lima* a quem também sou agradecido por seu companheirismo e paciência durante os últimos anos. Agradeço também aos meus sogros *José Carlito de Lima* e *Selma Aderita Sabino*, pelo carinho e incentivos.

Grato também aos meus irmãos *Daniel da Silva Santos*, *Adalberto Pereira Galdino dos Santos* e *Raquel da Silva Santos*, e também a minha cunhada *Antônia Iraní Rocha dos Santos (Branca)*. Ao meu grande amigo *Adriano Campelo Ferreira* e sua esposa *Valdenilda da Silva Santos Campelo*.

Ao Professor *José de Miranda Henriques Neto* pela orientação, dedicação, incentivo e conhecimentos compartilhados. Ao professor, amigo e companheiro *Nilton Ferreira Frazão*, pela coorientação, dedicação e ensinamentos repassados. Ao amigo e companheiro *Samuel Andrade do Nascimento* por estar sempre disposto a ajudar-me.

Ao Professor da UFPI, *Ricardo Gondim Sarmiento* pela colaboração nos cálculos da curva corrente-voltagem usados neste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, na pessoa da Coordenadora *Magnólia de Araújo Campos* pela dedicação e atenção dispensadas. Ao quadro docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais.



## Resumo

Neste trabalho, apresentamos um estudo das propriedades eletrônicas, ópticas, vibracionais e termodinâmicas da região C-Terminal de Fosfolipases A<sub>2</sub> Lisina 49 (PLA<sub>2s</sub> Lys 49). Este foi realizado por meio de cálculos quânticos através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), utilizando a aproximação da densidade local (*Local Density Approximation* - LDA) e a aproximação do gradiente generalizado (*Generalized Gradient Approximation* - GGA). Também foram realizados cálculos baseados no modelo *tight binding*.

As PLA<sub>2</sub> Lys 49 compõe um grupo de miotoxinas que apresentam pouca ou nenhuma atividade catalítica e ainda assim são capazes de atuarem na membrana celular por meio de um mecanismo alternativo propiciando a morte da célula. A região C-terminal destas proteínas, em particular a região compreendida entre os aminoácidos 115-129, é apontada como responsável pelo dano as membranas. Pouco se sabe sobre as características que propiciam a esta região tal capacidade e como acontece a sua interação com a membrana celular. Este trabalho realizou uma caracterização das propriedades físicas desta região. Buscando, portanto, estabelecer uma relação entre as propriedades físicas expressas por essa região e seu potencial de dano celular.

Um resultado inicial obtido por este estudo foram as curvas corrente-voltagem (I-V ) para nove diferentes peptídeos que correspondem as regiões 115-129 de PLA<sub>2</sub> de diferentes espécies de serpentes. As curvas I-V foram obtidas por meio do modelo *tight binding*. Elas demonstraram que os peptídeos estudados apresentam características de semicondutores. Também apresentam semelhança com resultados experimentais obtidos por LOMONTE et al, 2003. Usando a DFT, foram realizados os cálculos da área acessível ao solvente, da densidade eletrônica, análise populacional

de cargas, orbitais de fronteira, densidade de estados. Também foram realizados cálculos de propriedades vibracionais como espectro infravermelho, de propriedades ópticas e das propriedades termodinâmicas como capacidade térmica, entropia, entalpia e energia livre.

As propriedades eletrônicas demonstram que há a possibilidade de que a interação da região C-Terminal com a membrana seja predominantemente eletrostática. A análise populacional de carga demonstrou que o aminoácido Lisina 122 possui carga igual a zero. Este fato indica que ele pode não possuir papel importante como é descrito na literatura. Os resultados obtidos para a área acessível ao solvente indicam que um peptídeo com maior área disponível para interagir com a membrana não causará maior dano. Os resultados ópticos apresentaram picos de absorção dentro da região visível. Estes resultados juntamente com os resultados vibracionais servem como uma "digital" para a identificação dos peptídeos estudados. Os resultados termodinâmicos apresentados neste trabalho podem ser utilizados em futuras pesquisas envolvendo PLA<sub>2</sub>s Lisina 49.

**Palavras-chave:** Fosfolipases A<sub>2</sub>, DFT, C-terminal.

## Abstract

In this work, we present a study of the electrical properties, optical, vibrational and thermodynamic of the C-terminal Phospholipase A<sub>2</sub> Lysine region 49 (PLA<sub>2</sub> Lys 49). This was done by means of quantum calculations by Density Functional Theory (DFT), using the approach of *Local Density Approximation* (LDA) and the approach of the *Generalized Gradient Approximation* (GGA). They were also made calculations based on the model *tight binding*.

The PLA<sub>2</sub> Lys 49 composes myotoxins group that presents a little or no catalytic activity and still are able to act on the cell membrane by providing an alternative mechanism of cell's death. The C-terminal region of these proteins, in particular the region between amino acids 115-129 is identified as responsible for the damage the membranes. Little is known about the characteristics that propitiate to this region such capacity and how are their interaction with the cell membrane. This work constitutes a characterization of the physical properties of this region. Searching, therefore, establish a relationship between the physical properties expressed by this region and its potential for cell damage.

An initial results obtained in this study were current-voltage curves (I-V) for nine different peptides corresponding to regions 115-129 PLA<sub>2</sub> from different snake species. The (I-V) curves were obtained by the model *tight binding*. They demonstrate that the peptides studied have semiconductor characteristics. They also have similarity with experimental results obtained by LOMONTE et al., 2003. Using the DFT were performed the calculations of the area accessible to the solvent, the electron density, population analysis of load, orbital border, and density of states. They were also carried out calculations of vibrational properties as infrared spectrum,

optical properties and thermodynamic properties such as heat capacity, entropy, enthalpy and free energy.

The electronic properties show that there is a possibility the interaction of the C-terminal region with the membrane it's predominantly electrostatic. The load population analysis showed that the amino acid Lysine 122 has load zero. This indicates that it may not have important role as described in the literature. The consequences obtained for the solvent accessible area indicates that a peptide with the largest area available to interact with the membrane not cause greater damage. The optical results presented absorption peaks in the visible region. These results together with the results vibrational serve like a "digital" to identify the studied peptides. The Thermodynamic results presented in this work can be used in future research involving PLA<sub>2</sub> Lysine 49.

**Keywords:** Phospholipase A<sub>2</sub>, DFT, C-terminal.

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução as Peçonhas Ofídicas</b>	<b>13</b>
1.1	Fosfolipases . . . . .	14
1.2	Fosfolipases $A_2$ . . . . .	14
1.3	Estrutura . . . . .	16
1.4	Fosfolipases $A_2$ Lisina 49 . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Fundamentação Teórica e Metodológica</b>	<b>25</b>
2.1	Teoria do Funcional da Densidade . . . . .	26
2.2	Densidade Eletrônica . . . . .	27
2.3	Aproximação de Born-Oppenheimer . . . . .	28
2.4	Teoremas de Hohenberg-Kohn . . . . .	29
2.5	Formalismo de Kohn-Sham . . . . .	34
2.5.1	Tratamento de Kohn-Sham . . . . .	34
2.5.2	Suposições . . . . .	35
2.5.3	Método de Kohn-Sham . . . . .	37
2.5.4	Equações de Kohn-Sham . . . . .	40
2.6	Aproximações . . . . .	43

2.6.1	Aproximação da Densidade Local . . . . .	43
2.6.2	Aproximação do Gradiente Generalizado . . . . .	44
2.6.3	Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) . . . . .	46
2.7	Simulação computacional . . . . .	47
2.7.1	Softwares . . . . .	48
2.7.2	Drug Bank . . . . .	50
<b>3</b>	<b>Propriedades Eletrônicas</b>	<b>51</b>
3.1	Curva Corrente versus Voltagem . . . . .	52
3.2	Otimização de Geometria . . . . .	57
3.3	Distribuição de Cargas . . . . .	60
3.3.1	Densidade Eletrônica e Área Acessível ao Solvente . . . . .	60
3.3.2	Análise Populacional . . . . .	61
3.4	Estudos dos Orbitais Moleculares . . . . .	66
3.4.1	Orbitais . . . . .	67
3.4.2	Densidade Total e Parcial de Estados . . . . .	71
<b>4</b>	<b>Propriedades Ópticas, Vibracionais e Termodinâmicas</b>	<b>74</b>
4.1	Absorção Óptica . . . . .	74
4.2	Espectro Infravermelho . . . . .	78
4.3	Propriedades Termodinâmicas . . . . .	86
4.3.1	Capacidade Térmica . . . . .	87
4.3.2	Entropia . . . . .	88

4.3.3	Entalpia . . . . .	89
4.3.4	Energia Livre . . . . .	91
4.3.5	Resultados Termodinâmicos . . . . .	92
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>97</b>

# Lista de Figuras

1.1	Estrutura de um fosfolípido e as respectivas ligações onde atuam as Fosfolipases . . .	14
1.2	Ilustração da estrutura das PLA <sub>2</sub> s do grupo I A e II A. Elementos da estrutura secundária: três hélices- $\alpha$ , a asa- $\beta$ , o loop de ligação de $Ca^{2+}$ (presente nas Asp49-PLA <sub>2</sub> ) e o <i>loop</i> C-terminal (Ambrosio 2003) . . . . .	17
1.3	Ilustração da perturbação da membrana pela PLA <sub>2</sub> s Lys 49. A) A proteína se aproxima da membrana celular com a região N-terminal, B) são estabelecidas as interações eletrostáticas, C) desorganização dos fosfolípidos de membrana. Adaptado Ref.[20]. . . . .	22
3.1	Curva corrente-voltagem obtida por cálculos baseados no modelo <i>tight-binding</i> para os nove peptídeos inicialmente estudados. . . . .	55
3.2	Representação esquemática do Pep.I em blocos de três aminoácidos. . . . .	58
3.4	Representação esquemática do Pep.II em blocos de três aminoácidos. . . . .	58
3.3	Estruturas obtidas após a otimização para o Pep.I a) pela aproximação GGA/PBE e b) pela aproximação LDA/PWC. . . . .	59
3.5	Estruturas obtidas após a otimização para o Pep.II a) pela aproximação GGA/PBE e b) pela aproximação LDA/PWC. . . . .	59
3.6	Representação esquemática do Pep.III em blocos de três aminoácidos. . . . .	60



3.7	Estruturas obtidas após a otimização para o Pep. III a) pela aproximação GGA/PBE e b) pela aproximação LDA/PWC. . . . .	60
3.8	Mapa de densidade eletrônica de carga para as sequências analisadas a) Pep.I GGA, b) Pep.I LDA, c) Pep.II GGA, d) Pep.II LDA, e) Pep.III GGA e f) Pep.III LDA. As regiões em azul apresentam carga positiva e as regiões em vermelho apresentam carga negativa. . . . .	62
3.9	Análise populacional de cargas obtida pela aproximação GGA/PBE para os peptídeos estudados. Em azul ESP em vermelho MPA e em preto HPA. . . . .	64
3.10	Análise populacional de cargas obtida pela aproximação LDA/PWC para os peptídeos estudados. Em azul ESP em vermelho MPA e em preto HPA. . . . .	65
3.11	Orbitais HOMO e LUMO das sequência máxima, média e mínima calculados na aproximação GGA/PBE. . . . .	69
3.12	Orbitais HOMO e LUMO das sequência máxima, média e mínima calculados na aproximação LD/PWC. . . . .	70
3.13	Diagramas DOS (Direita) e PDOS (Esquerda) obtidos pela aproximação GGA/PBE para os peptídeos estudados. A linha tracejada representa a energia de Fermi. . . .	72
3.14	Diagramas DOS (Direita) e PDOS (Esquerda) obtidos pela aproximação LDA/PWC para os peptídeos estudados. A linha tracejada representa a energia de Fermi. . . .	73
4.1	Espectro de absorção óptica obtido para o Pep.I, aproximação LDA/PWC (preto) e aproximação GGA/PBE (vermelho). . . . .	75
4.2	Espectro de absorção óptica obtido para o Pep.II, aproximação LDA/PWC (preto) e aproximação GGA/PBE (vermelho). . . . .	76
4.3	Espectro de absorção óptica obtido para o Pep.III, aproximação LDA/PWC (preto) e aproximação GGA/PBE (vermelho). . . . .	77

4.4	Espectro infravermelho calculado para o Pep.I através das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC. . . . .	80
4.5	Espectro infravermelho calculado para o Pep.II através das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC. . . . .	83
4.6	Espectro infravermelho calculado para o Pep.III através das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC. . . . .	86
4.7	Capacidade Térmica obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior). . . . .	93
4.8	Entropia obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior). . . . .	94
4.9	Entalpia obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior). . . . .	95
4.10	Energia Livre obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior). . . . .	96

# Lista de Tabelas

1.1	Os peptídeos correspondentes a sequência 115-129 da região de PLA <sub>2s</sub> Lys 49 de serpentes distintas. Cada aminoácido é representado por uma letra. Adaptado Ref.[20]. . . . .	23
2.1	Aminoácidos usados na pesquisa e seus respectivos dados do Drag Bank. . . . .	50
3.1	Energia de ionização dos aminoácidos. . . . .	54
3.2	Parâmetros de otimização. . . . .	57
3.3	Energias obtidas para os orbitais HOMO e LUMO e o gap de energia $\Delta E_{H-L}$ entre ambos nas aproximações GGA e LDA para a três sequências estudadas. . . . .	67
4.1	Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação LDA/PWC para o Pep.I. . . . .	78
4.2	Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação GGA/PBE para o Pep.I. . . . .	79
4.3	Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação LDA/PWC para o Pep.II. . . . .	81
4.4	Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação GGA/PBE para o Pep.II. . . . .	82

4.5	Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação LDA/PWC para o Pep.III. . . . .	84
4.6	Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação GGA/PBE para o Pep.III. . . . .	85

# Capítulo 1

## Introdução as Peçonhas Ofídicas

As peçonhas ófidicas possuem na sua constituição substâncias distintas que apresentam diferentes atividades biológicas. Cerca de 90% do peso seco destas peçonhas é constituído por proteínas, incluindo as enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas (fosfolipases, hialuronidasas, proteases de diversas especificidades, fosfatases, collagenases, nucleases, laminoácido-oxidases, nucleotidasas, etc). Por ser essa mistura diversificada de agentes biologicamente ativos, podem interagir com uma diversidade de estruturas nos seres vivos (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, substância fundamental amorfa e membranas celulares) [1, 2, 3].

As substâncias presentes nas peçonhas de serpentes podem ser classificadas como neurotoxinas, cardiotoxinas (citotoxinas), miotoxinas e fatores que alteram a hemostase (incluindo as hemorragias), de acordo com o tipo de célula alvo [2, 4, 5]. Algumas das toxinas podem atuar em mais de um tipo de célula.

As miotoxinas formam um grupo diversificado de toxinas que atuam preferencialmente causando lesão no tecido muscular. As miotoxinas presentes na peçonha das serpentes podem ainda ser divididas em 3 grupos principais, constituídos por famílias de proteínas com estruturas diferentes: peptídeos miotóxicos, cardiotoxinas e fosfolipases  $A_2$  miotóxicas [6].

## 1.1 Fosfolipases

As fosfolipases são enzimas que realizam a hidrólise de fosfolípidios. Diversos produtos são obtidos devido a atividade das fosfolipases e dependendo da posição do substrato no qual ocorre a hidrólise as fosfolipases são classificadas em  $A_1$ ,  $A_2$ , C e D. Fig. 1.1.

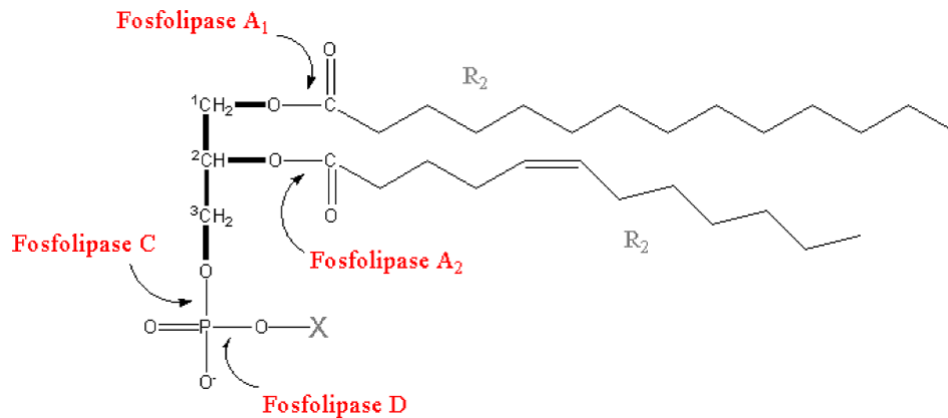


Figura 1.1: Estrutura de um fosfolípido e as respectivas ligações onde atuam as Fosfolipases

## 1.2 Fosfolipases $A_2$

As Fosfolipases  $A_2$  são enzimas abundantes na natureza. Elas são encontradas no reino animal em diversos organismos, tais como no pâncreas de mamíferos e peçonhas ofídicas, estando presentes nos meios intra e extracelular [6]. Possuem diversas funções nos organismos vivos as quais dependem do tipo de  $PLA_2$ , sendo capazes de participar como mediadoras em vários processos inflamatórios. Algumas  $PLA_2$  mesmo apresentando um alto grau de similaridade estrutural possuem funções distintas. As  $PLA_2$ s intracelulares possuem alta massa molecular (85 kDa)<sup>1</sup> e têm a necessidade de um íon cálcio para a realização da sua atividade enzimática. Estando associadas as membranas no metabolismo de fosfolípidios (perturbações das membranas), na sinalização celular e no remodelamento de fosfolípidios [7, 8].

<sup>1</sup>1 kDa corresponde a 1/12 da massa do carbono C-12, ou ainda  $1,660538921 \times 10^{-24}$  kg.

As PLA<sub>2</sub>s extracelulares são enzimas pequenas (119 a 123 aminoácidos) com baixo peso molecular (12 a 15 kDa) e assim como as intracelulares, na sua grande maioria, necessitam da presença de íons de cálcio para exercer a atividade enzimática. Elas são encontradas em fluidos biológicos como secreções pancreáticas, exudados inflamatórios e em peçonhas de répteis (serpentes e lagartos) e insetos [8, 9].

As PLA<sub>2</sub>s hidrolisam os fosfolipídios de membrana celular na posição que corresponde a ligação de éster sn-2 Fig. 1.1. Como resultado desse processo são liberados ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos os quais são agentes de diversos processos fisiológicos e patológicos e servem como precursores relacionados com a proliferação, migração e controle da apoptose em vários processos inflamatórios [10]. As PLA<sub>2</sub>s apresentam atividade mais intensa quando atuam em agrupamento de fosfolipídios (membranas ou micelas) do que quando atuam em fosfolipídios isolados, denomina-se esse fenômeno de ativação interfacial [11, 12, 13, 14].

A família das PLA<sub>2</sub>s possui uma variedade de enzimas que variam em peso molecular, homologia sequencial, e cofator catiônico [11]. A classificação das fosfolipases A<sub>2</sub> se dá por critérios estruturais e funcionais. Em 1994, as PLA<sub>2</sub>s foram classificadas sistematicamente de acordo com a sua sequência de aminoácidos em três grupos [15].

Com a descoberta de novas PLA<sub>2</sub>s essa classificação foi revisada algumas vezes. Atualmente, as PLA<sub>2</sub>s constituem uma superfamília de enzimas com 15 grupos e muitos subgrupos. Esses grupos e subgrupos são formados por cinco tipos de enzimas que são as PLA<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>), as PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), as PLA<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> independentes (iPLA<sub>2</sub>), os fatores de ativação plaquetária do tipo acetilhidrolases (PAFAH) e as PLA<sub>2</sub> lisossomais [15].

As sPLA<sub>2</sub> possuem peso molecular variando de 13 a 18 kDa, interferem nos processos fisiológicos normais da vítima através da destruição da membrana celular [11, 15]. As PLA<sub>2</sub> de peçonhas ofídicas são do tipo secretadas e estão classificadas nos subgrupos I A, II A e II B. Possuem um alto grau de similaridade estrutural, mas apresenta efeitos toxicológicos diversos como: neurotoxicidade,

miotoxicidade, cardiotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, hemorragia interna, dentre outras, porém, nem todas as PLA<sub>2</sub>s induzem todos esses efeitos [16]. As PLA<sub>2</sub> miotóxicas que estão presentes em serpentes podem ser divididas em dois tipos, as neurotóxicas e não neurotóxicas [17]. As PLA<sub>2</sub> presentes no subgrupo I A são altamente neurotóxicas, causando paralisia e morte devido à insuficiência respiratória e são encontradas em venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae*. O subgrupo II induz efeitos locais, tais como hemorragia, necrose e edemas, não causando efeitos neurotóxicos e são encontradas em venenos de serpentes das famílias *Viperidae* e *Crotalidae* [8, 11, 15]. As enzimas que apresentam miotoxicidade atuam na interface da membrana celular com água, na hidrólise dos fosfolipídios da membrana modificando o influxo de cálcio nas células ocasionando assim a mionecrose (morte das células do tecido muscular).

As PLA<sub>2</sub> miotóxicas são classificadas como I A e II A, no entanto as do grupo II A são ainda divididas em dois subgrupos as Fosfolipases A<sub>2</sub> Aspartato 49 (PLA<sub>2</sub>s Asp 49) e as Fosfolipases A<sub>2</sub> Lisina 49 (PLA<sub>2</sub>s Lys 49) ou homologas. AS PLA<sub>2</sub> Asp 49 apresentam atividade catalítica ao interagirem com a membrana celular. Já as PLA<sub>2</sub> Lys 49 apresentam pouca ou nenhuma atividade catalítica ao interagirem com a membrana celular [9, 17, 18, 19]. Já foram isoladas algumas variantes das PLA<sub>2</sub>s Lys 49 em venenos ofídicos como é o caso da Arg 49 e Ser 49, porém com alto grau de similaridade com as Lys 49 [11]. Um outro grupo de proteínas miotóxicas têm sido considerado, estas danificam o músculo esquelético por mecanismo indireto. Como é o caso das toxinas hemorrágicas que causam isquemia e mionecrose secundária de início lento, sendo considerados como fatores miotóxicos indiretos [17, 20].

### 1.3 Estrutura

As seqüências de aminoácidos que formam as PLA<sub>2</sub>s apresentam um alto grau de similaridade estrutural com as seguintes características  $\alpha$ -hélice de doze resíduos na região N terminal, um *loop*



relativamente longo contendo o sítio de ligação do íon cálcio, um par de  $\alpha$ -hélices paralelas, uma dupla fita- $\beta$  antiparalela curta e um *loop* C terminal [11, 21, 22]. Fig. 1.2.

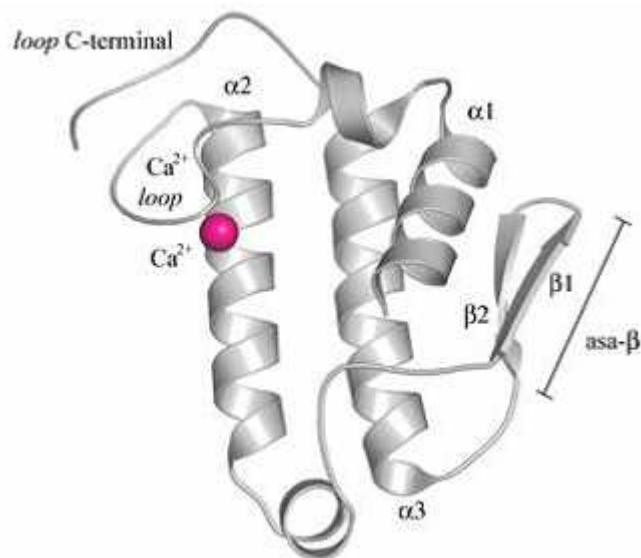


Figura 1.2: Ilustração da estrutura das PLA<sub>2</sub>s do grupo I A e II A. Elementos da estrutura secundária: três hélices- $\alpha$ , a asa- $\beta$ , o loop de ligação de  $Ca^{2+}$  (presente nas Asp49-PLA<sub>2</sub>) e o *loop* C-terminal (Ambrosio 2003)

O mecanismo e o sítio catalítico das miotoxinas PLA<sub>2</sub>s Asp 49 já foram determinados. Esta toxina requer a presença de um cofator para exercer a sua atividade catalítica o qual é íon de cálcio divalente ( $Ca^{2+}$ ), não aceitando outro cofator [11, 23]. Presente no início do sítio catalítico o  $Ca^{2+}$  é responsável pela interação inicial entre a enzima e o substrato. Seu sítio de ligação (“*loop* de ligação do  $Ca^{2+}$ ”) também é conservado e compreende os resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, que em combinação com o resíduo de Asp49 liga o íon cálcio necessário para catálise. A presença do aminoácido aspartato na posição 49 é de fundamental importância para a permanência do íon de cálcio na molécula, uma vez que apresenta carga negativa e leva ao equilíbrio eletrostático da região. Três outros aminoácidos são também invariantes dentro desta classe: Histidina 48, Tirosina 73 e o Aspartato 99. A Histidina 48 e o Aspartato 99 estão envolvidos no mecanismo catalítico das mesmas. O substrato dessas enzimas é levado ao sítio catalítico por meio de um canal hidrofóbico constituído por hélices com aminoácidos apolares (alaninas, valinas, leucinas,

isoleucinas e fenilalaninas) expostos a contatos dentro dessa cavidade. O hidrogênio do resíduo de His48 se liga à molécula de água usada para a hidrólise, enquanto que o resíduo de Asp49 coordena e posiciona o íon cálcio, o qual se liga e polariza tanto os grupos fosfato e sn-2 carbonil da molécula de fosfolipídio durante a hidrólise [24].

## 1.4 Fosfolipases A<sub>2</sub> Lisina 49

Devido à importância do aminoácido ácido aspártico (Aspartato) na posição 49 para atividade enzimática das PLA<sub>2</sub>s, e em particular para as PLA<sub>2</sub>s miotóxicas a sua substituição pelo aminoácido Lisina impossibilita a ligação do íon  $Ca^{2+}$ , o qual tem o sítio de ligação ocupado pelo grupo  $\epsilon$ -amino da cadeia lateral da Lys49. Alguns trabalhos têm mostrado que, com exceção do Asp 49, as variantes PLA<sub>2</sub>s Lys 49 mantém conservado todos os demais resíduos importantes para a maquinaria catalítica [11].

As PLA<sub>2</sub>s homólogas apresentam mecanismo catalítico comprometido, este fato tem sido associado a ausência do aminoácido aspartato na posição 49. No entanto, ainda sim apresentam a capacidade de causar danos nas células. As PLA<sub>2</sub> Lys 49 ao contrário das Asp 49 ao exercerem suas atividades biológicas apresentam pouca ou nenhuma atividade catalítica [11].

Uma hipótese, considerada inicialmente, baseava-se em análises estruturais e explicava que a ausência de atividade catalítica se dava pela inversão da ligação peptídica Cys29-Gly30 e sua incapacidade de se ligar ao íon de cálcio [11]. No entanto, alguns trabalhos mostraram que possivelmente as PLA<sub>2</sub>s, embora não apresentem atividade catalítica em substratos artificiais *in vitro*, hidrolisam determinados substratos naturais específicos presentes apenas em sistemas biológicos [19, 20, 25].

Porém, os experimentos que demonstram esse comportamento associado a Lys 49 não são suficientes para afirmar que as mesmas possuem atividade catalítica, uma vez que a presença dos ácidos graxos que são produtos associados a ação das PLA<sub>2</sub>s pode estar associada a ativação

indireta de lipases celulares endógenos, sendo essa hipótese altamente provável [20].

Há quem defenda que as PLA<sub>2</sub>s Lys 49 não apresentem nenhuma atividade catalítica, logo a baixa atividade apresentada em experimentos estariam associadas a presença de resíduos Asp 49, uma vez que em grande parte dos experimentos utilizam-se de venenos extraídos diretamente de serpentes. Na contramão desta linha de pensamento existe a hipótese que tem sido sustentada por alguns pesquisadores, que a baixa atividade catalítica apresentada esteja realmente associada a ação das PLA<sub>2</sub>s Lys 49 [11].

O argumento que tem sustentado esta hipótese é que após catalisar a primeira reação de hidrólise o produto da mesma não conseguiria se desprender do sítio catalítico impossibilitando assim a continuidade no ciclo catalítico [11]. Estudos com difração de raio X realizados em PLA<sub>2</sub>s miotóxicas extraídas do veneno da serpente *A. contortrix laticinctus*, indicam a presença de resíduos não proteicos na região do sítio catalítico da Lys 49 o que indica que o produto da primeira catálise realmente ficaria preso no sítio ativo impossibilitando uma nova reação [11].

Mesmo sendo contestada a sua ação catalítica, as PLA<sub>2</sub>s Lys 49 são objeto de pesquisa em diversas áreas em particular na área de toxicologia, pois seu caráter miotóxico danifica as células musculares através de um mecanismo alternativo. Embora existam muitos trabalhos que indicam uma possível descrição para tal mecanismo, ele ainda não está bem determinado. Sabe-se que há uma preferência por células musculares levando a mionecrose (necrose da célula muscular) que é uma importante complicação médica dos acidentes ofídicos. Em casos graves, a mionecrose local pode levar a sequelas drásticas, como a perda de tecidos permanentemente, invalidez ou amputação.

A exposição das células a PLA<sub>2</sub>s Lys 49 induz a uma mudança na permeabilidade da membrana celular, que altera o influxo de cálcio levando a danos irreversíveis. Com os níveis intracelulares de cálcio elevados, as células musculares são levadas a necrose [26]. A região C-terminal destas proteínas, em particular a região compreendida entre os aminoácidos 115-129, que inclui uma combinação variável de catiônico e resíduos hidrófobos / aromáticos, é indicada como principal

determinante da toxicidade das PLA<sub>2</sub>s Lys 49 [19, 27, 28].

A descoberta desta região se deu pelo fato da atividade das PLA<sub>2</sub>s Lys 49 ser inibida pela Heparina, a qual tem seu sítio de ligação na região que engloba os aminoácidos 115-129 [28]. Baseado nesse fato, surge a hipótese da existência de uma proteína de membrana que agiria como receptor para as PLA<sub>2</sub>s Lys 49. Investigações foram realizadas com objetivo de averiguar a atuação do sulfato de heparano, um componente comum em superfícies celulares, no processo de ação das PLA<sub>2</sub>s Lys 49. No entanto, esta possibilidade foi eliminada uma vez que a miotoxina ainda assim causou danos em células as quais tiveram o heparano eliminado por tratamento quer enzimático, por inibição da síntese, ou por meio de uma mutação específica celular [17, 29]. A descoberta da existência de uma proteína de membrana receptora das PLA<sub>2</sub>s endógenos em células de mamíferos, tem sugerido que esta proteína esteja associada ao mecanismo de ação das PLA<sub>2</sub>s Lys 49. No entanto não há ainda nenhuma evidência que comprove tal hipótese [17].

Na contramão da comprovação da hipótese da existência de uma proteína de membrana receptora para as PLA<sub>2</sub>s Lys 49 há evidências que levam a crer na impossibilidade da mesma. São elas o fato das PLA<sub>2</sub>s Lys 49 perturbarem estruturas exclusivamente de fosfolipídios com preferência para os tipos negativos, atuarem em várias células diferentes, não apresentando assim uma alta seletividade, o enriquecimento de membranas com fosfolipídios carregados negativamente aumenta a atuação das PLA<sub>2</sub>s Lys 49 e estudos com a sequência dextrógiro dos aminoácidos indicados como responsáveis pela ação das Lys 49 causa efeito semelhante a sequência levógiro [17]

Com a possível ausência de uma proteína de membrana receptora para essas PLA<sub>2</sub>s, o seu mecanismo de ação passa a ser descrito em uma visão mais eletrostática. É sugerido que as cargas negativas dos fosfolipídios de membrana atuam como receptores de uma região específica destas toxinas, no entanto são necessários trabalhos adicionais para a confirmação desta hipótese.

O mecanismo de ação atualmente descrito e defendido por alguns pesquisadores para as PLA<sub>2</sub>s Lys 49 está associado a combinações de aminoácidos presentes em região específica desta

proteína, os quais possuem a capacidade de alterar a integridade da membrana em diversas células naturais (eucarióticas e procarióticas) e artificiais (isto é, lipossomos), sendo as células musculares mais susceptíveis [19, 28, 29].

Associa-se esta atividade à interação física entre uma combinação sequencial de aminoácidos com característica catiônica e alguns receptores aniônicos que podem consistir de fosfolipídios carregados negativamente. Há uma distribuição densa de cargas positivas na interface de reconhecimento das PLA<sub>2</sub>s Lys 49, segundo o que é descrito na literatura duas regiões desta miotoxina atuam neste mecanismo de ação: a região N-terminal apontada como a região que primeiro entra em contato com a membrana estabelecendo fracas interações eletrostática e a região C-terminal apontada como desestabilizador da membrana [19, 27, 28, 29].

Dentro da região C-terminal a sequência de aminoácidos 115-129 é apontada como o principal elemento do mecanismo de dano celular. Nas diversas PLA<sub>2</sub>s Lys 49 encontradas em diversas espécies de serpente apenas dois aminoácidos nesta sequência se mostram invariantes: a Lys 115 e a Lys 122. Experimentos mostram que a Lys 122 pode desempenhar papel central neste mecanismo [28].

Os efeitos dos danos desta região podem ainda ser amplificados pela contribuição de resíduos hidrófobos e aromáticos presentes na região C-terminal. Estes, ao penetrar na bicamada lipídica da membrana celular levam-na a desordem o que, conseqüentemente, altera a permeabilidade seletiva da célula. Com isso o fluxo de íons na célula que é rigidamente controlado passa a ser desordenado, acarretando danos intracelulares irreversíveis, o que leva morte celular [19, 27, 28, 29]. Fig. 1.3.

Com base na descoberta de que miotúbulos submetidos a ação da PLA<sub>2</sub>s Lys 49 liberam ATP [30], tem sido sugerido que o ATP liberado pelas células que sofrem a ação destas miotoxinas atuam em outras regiões interagindo com receptores purinérgicos do tipo P2x, permitindo fluxo de  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  de acordo com os gradientes de concentração destes íons, o que se torna uma amplificação dos danos causados pelas Lys 49.

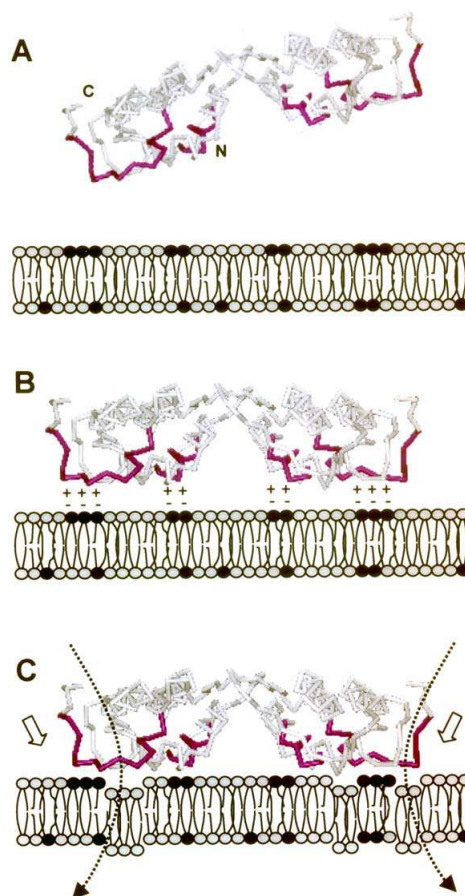


Figura 1.3: Ilustração da perturbação da membrana pela PLA<sub>2</sub>s Lys 49. A) A proteína se aproxima da membrana celular com a região N-terminal, B) são estabelecidas as interações eletrostáticas, C) desorganização dos fosfolípidos de membrana. Adaptado Ref.[20].

Alguns estudos têm se concentrados na região C-terminal tanto *in vivo* como *in vitro*. Em trabalhos realizados por Lamonte e colaboradores tem sido evidenciado a importância da sequência 115-129. O estudo descrito em Lamonte et al. 2003 trata da ação destes peptídeos de 15 aminoácidos independentemente dos demais componentes estruturais da proteína. Foram analisadas 12 sequências 115-129 de PLA<sub>2</sub>s Lys 49 de espécies diferentes, Tabela 1.1. Sendo os aminoácidos representados por: Lisina-K, Alanina-A, Tirosina-Y, Fenilalanina-F, Leucina-L, Cisteína-C, Arginina-R, Prolina-P, Triptofano-W, Asparagina-N, Histidina-H, Isoleucina-I, Valina-V, Glicina-G.

O resultado obtido, de certa forma podia ser esperado, ou seja ação dos peptídeos independentes diferencia-se da ação dos mesmos quando estão junto na proteína, por uma questão estrutural.

Tabela 1.1: Os peptídeos correspondentes a sequência 115-129 da região de PLA<sub>2</sub>s Lys 49 de serpentes distintas. Cada aminoácido é representado por uma letra. Adaptado Ref.[20].

Miotoxina Lys 49 <i>Espécie</i>	Sequência 115-129	Código
K 49 Phospholipase A <sub>2</sub> <i>Agkistrodo piscivorus piscivorus</i>	KKKYKAYKFKLKCKK	AppK
K49 phospholipase A <sub>2</sub> <i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	KLKFKYKKKACKKYK	AppK(scrambled)
K49 phospholipase A <sub>2</sub> <i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	KKKYKAKYFKLKCKK	AppK(all-D)
ACL myotoxin <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	KKKYKAKYFKFKCKK	Acla
Myotoxin II <i>Bothrops asper</i>	KKKYRYKYLKPLCKK	Basp-II
Myotoxin II-alternative form <sup>a</sup> <i>Bothrops asper</i>	KKKYRYKYLKPFCKK	Basp-II-F
Myotoxin II-modified <i>Bothrops asper</i>	KKKWRWKWLKALAKK	Basp-II-pEM-2
Myotoxin II <i>Bothrops moojeni</i>	KKKYRYKNYLKPFCKK	Bmoo-II
Bothropstoxin I and piratoxin II <i>Bothrops jararacussu and B. pirajai</i>	KKKYRYKHLKPFCKK	Bjsu-I/Bpir-II
Myotoxin II <i>Atropoides nummifer and Cerrophidion godmani</i>	KKNYKIKYPKPLCKK	Anum-II/Cgod-II
Myotoxin II-modified <i>Atropoides nummifer</i>	KKKYKIKYPKPLCKK	Anum-II/Cgod-II (mod)
Ammodytin L <sup>b</sup> <i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	KKKYKVKYLRFKCKG	Vamm

Das sequências analisadas no referido trabalho ocorreu uma variação no potencial de dano a célula em relação a proteína inteira. No entanto, o mesmo demonstra que mesmo isolada da PLA<sub>2</sub> Lys 49 a sequência 115-129 é capaz de causar danos as células e em particular as células musculares.

O avanço no conhecimento do mecanismo de ação desta toxinas é de fundamental importância para a sua compreensão. Neste sentido este trabalho buscou fazer uma caracterização das propriedades ópticas e eletrônicas da referida sequência apontada como fundamental para a execução do mecanismo das PLA<sub>2</sub>s Lys 49. A ideia principal é traçar um padrão utilizando as propriedades físicas para facilitar o reconhecimento de regiões com potencial de dano a célula em toxinas distintas. Uma vez estabelecida uma relação direta entre as propriedades físicas expressas por determinada região proteica e seu potencial de dano celular, isso pode levar a uma identificação mais rápida e segura da região responsável pela toxicidade e ainda a possibilidade de contornar mais rapidamente os seus efeitos *in vivo*.

O presente trabalho utilizando-se de meios computacionais e aplicando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), buscou tal caracterização. Inicialmente, procedeu-se com o tratamento computacional dos aminoácidos independentes e, em seguida, desenvolvemos a montagem de todo o peptídeo. As seguintes propriedades eletrônicas foram calculadas, densidade de estados, densidade eletrônica, potencial eletrostático, orbitais HOMO (Orbital Molecular Ocupado mais Alto) e LUMO (Orbital Molecular não Ocupado mais Baixo) e análise populacional de carga, tendo em vista a caracterização da distribuição de cargas na região ativa da miotoxina. Incluímos uma análise da curva corente voltagem e do volume acessível ao sistema. Um estudo da absorção óptica foi contemplado, o qual pode ser usado em futuras investigações físico-químicas e biológicas. Além disso, realizamos o cálculo de propriedades vibracionais e termodinâmicas, com o intuito de caracterizar as sequências de aminoácidos consideradas.



## Capítulo 2

# Fundamentação Teórica e Metodológica

A Mecânica Quântica moderna tem seu início marcado pela proposta apresentada pelo físico austríaco Erwin Schrödinger no ano de 1925. Este propôs a equação que hoje leva seu nome a qual é capaz de descrever sistemas quânticos como átomos, moléculas e partículas subatômicas:

$$i\hbar\frac{\partial\Psi}{\partial t} = \hat{H}\Psi \quad (2.1)$$

onde  $\Psi(r, t)$  é chamada Função de Onda e  $H$  é o hamiltoniano do sistema.

Como solução da equação de Schrödinger obtém-se a Função de Onda (também chamada de função de estado), esta é capaz de descrever o estado quântico de um sistema ou de partículas, contendo todas as informações sobre um sistema considerado isolado. A função de onda é o objeto de estudo fundamental da mecânica quântica de maneira que conhecendo-a tem-se toda informação desejada para determinado sistema.

No entanto, poucos são os sistemas reais que possuem uma solução analítica viável, sendo inúmeras vezes impossível até mesmo uma solução numericamente aproximada, mesmo com o auxílio computacional. A razão deste fato, é que há um aumento notável na complexidade do cálculo da função de onda com o aumento das variáveis envolvidas no problema. Considerando um sistema de  $N$  elétrons, sua função estará em função de  $4N$  variáveis,  $3N$  coordenadas espaciais e

$N$  coordenadas de spin. Logo o cálculo da função de onda e até mesmo a sua compreensão é algo quase sempre impossível [31].

Devido à necessidade de caracterizar os estados quânticos os físicos e químicos passaram anos tentando descobrir formas aproximadas para a resolução da equação de Schrödinger. O tratamento dos mais diversos sistemas só se torna possível com o surgimento de uma nova teoria denominada Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*- DFT).

## 2.1 Teoria do Funcional da Densidade

A DFT surgiu inicialmente quando em 1964 o norte-americano Walter Kohn publicou, juntamente com o seu aluno francês Pierre Hohenberg, um artigo onde apresentavam uma reformulação da mecânica quântica baseada, não em funções de onda, mas na densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  para um sistema de muitos corpos. Uma vez que a densidade eletrônica é em função apenas das três variáveis espaciais, a caracterização de sistemas quânticos torna-se mais fácil e viável em relação ao tratamento baseado nas funções de onda.

Na DFT a densidade  $\rho(\vec{r})$ , mede a probabilidade de que se encontre um elétron em um ponto de determinada região. Outras informações do sistema que são determinadas pela função de onda também são extraídas a partir da densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$ . Outra contribuição de extrema importância para o desenvolvimento inicial da DFT, foi o artigo publicado por Kohn e Lu Sham no ano de 1965. Este tratava sobre a determinação da densidade eletrônica para sistemas reais. Estes dois artigos são os pilares centrais da teoria.

Com precisão notável e sua simplicidade, a DFT se popularizou entre físicos e químicos na resolução de problemas envolvendo sistemas como átomos, moléculas e sólidos contribuindo com as mais diversas áreas, como nanotecnologia, biotecnologia, desenvolvimento de novas matérias e etc. O sucesso da teoria se deve ao equilíbrio entre a sua precisão e o seu custo computacional. O prêmio Nobel de Química em 1998 foi atribuído a Walter Kohn pela criação da DFT e a John

Pople pela implementação da teoria ao sistema computacional.

## 2.2 Densidade Eletrônica

Intende-se a densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  de um dado estado de um sistema como sendo o número de elétrons por unidade de volume. A partir da qual é possível obter a densidade de carga multiplicando-a pela carga elementar. O número de elétrons contido no sistema também pode ser determinado pela integral de  $\rho(\vec{r})$  sobre o volume. Ao confrontar o tratamento de um mesmo sistema via DFT e equação de Schrödinger, a DFT se mostra de fácil resolução, uma vez que a densidade eletrônica diferentemente da função de onda é determinada experimentalmente por meio de difração de raio X.

A densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  é definida em termos da função de onda como sendo a integral múltipla sobre as coordenadas de spin de todos os elétrons e sobre todas as outras coordenadas espaciais:

$$\rho(\vec{r}) = N \int \dots \int |\Psi(\vec{r}, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N, s, s_2, \dots, s_N)|^2 d\vec{r}_2 \dots ds_N \quad (2.2)$$

onde  $\rho(\vec{r})$  representa a probabilidade de se encontrar qualquer um dos N elétrons presentes no elemento de volume  $d\vec{r}$ , mas com spin arbitrário. Percebemos então que  $\rho(\vec{r})$  é função de três variáveis espaciais  $(x, y, z)$  e possui a propriedade de se anular no infinito, além do cálculo do número de elétrons como dito anteriormente:

$$\rho(\vec{r} \rightarrow \infty) = 0 \quad \int \rho(\vec{r}) d\vec{r} = N \quad (2.3)$$

A contribuição de Walter Kohn e Pierre Hohenberg em 1964, está ligada a demonstração que a Eq. 2.2 pode ser invertida, ou seja, para uma densidade eletrônica  $\rho_0$  é possível calcular função de onda  $\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2 \dots \vec{r}_N)$  correspondente. O que quer dizer que  $\Psi_0$  é um funcional da densidade  $\rho(\vec{r})$ .

## 2.3 Aproximação de Born-Oppenheimer

Em um sistema com  $N$  elétrons e  $M$  núcleos no qual são levadas em consideração todas as possíveis interações, o Hamiltoniano do sistema possui termos de interação coulombiana elétron-núcleo, elétron-elétron e núcleo-núcleo.

$$\hat{H} = -\overbrace{\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^{N_e} \nabla_i^2}^1 - \overbrace{\frac{\hbar^2}{2} \sum_{I=1}^{N_n} \frac{\nabla_I^2}{M_I}}^2 - \overbrace{\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^{N_e} \sum_{I=1}^{N_n} \frac{e^2 Z_I}{|r_i - R_I|}}^3 \quad (2.4)$$

$$+ \overbrace{\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^{N_e} \sum_{j=i+1}^{N_e} \frac{e^2}{|r_i - r_j|}}^4 + \overbrace{\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{I=1}^{N_n} \sum_{J=I+1}^{N_n} \frac{e^2 Z_I Z_J}{|R_I - R_J|}}^5 \quad (2.5)$$

onde os elétrons são rotulados com letras minúsculas e os núcleos com letras maiúsculas. O Hamiltoniano é portanto escrito como a soma dos seguintes termos: 1 energia cinética dos elétrons, 2 energia cinética dos núcleos, 3 energia potencial coulombiana de interação elétron-núcleo, 4 elétron-elétron e 5 núcleo-núcleo.

A massa de um núcleo atômico é muito maior que a massa de um elétron, como consequência deste fato a aproximação de Born-Oppenheimer interpreta que a velocidade dos elétrons que compõem determinado sistema é muito maior que a velocidade dos núcleos, de modo que a reação dos elétrons ao movimento nuclear é quase *instantânea*. Com isso o movimento nuclear pode ser desacoplado do eletrônico, considerando que o movimento eletrônico ocorre num campo com núcleos fixos. Desconsiderando então a energia cinética dos núcleos e considerando a energia potencial núcleo-núcleo constante, o Hamiltoniano pode ser reescrito como:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N_e} \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^{N_e} v(\vec{r}_i) + \sum_{i=1}^{N_e} \sum_{j>i}^{N_e} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (2.6)$$

podendo ser escrito também na forma de operadores:

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee} \quad (2.7)$$

Aproximação de Born-Oppenheimer possibilita a redução do problema de muitos corpos proposto inicialmente pelo hamiltoniano da Eq.2.4. Com o novo hamiltoniano Eq.2.6 torna-se mais acessível a solução do problema de muitos corpos. No entanto, não é tarefa fácil resolvê-lo sendo a DFT um dos métodos que facilitam esse processo.

O termo  $v(\vec{r})$  presente na Eq. 2.6 e a energia de repulsão núcleo-núcleo  $\hat{V}_{ee}$  são dados por:

$$v(\vec{r}) = \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\vec{r}_i - \vec{R}_A|} \quad \hat{V}_{ee} = \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{|\vec{R}_B - \vec{R}_A|}$$

a energia total do sistema pode então ser escrita como:

$$W = E + V_{nn} \quad (2.8)$$

Através do método variacional, minimizando o funcional de energia  $E[\Psi]$ , é possível determinar tanto a função de onda quanto a energia do estado fundamental do sistema, ou seja:

$$E[\Psi] = \frac{\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \geq E_0 \quad (2.9)$$

## 2.4 Teoremas de Hohenberg-Kohn

O que foi proposto e demonstrado por Hohenberg & Kohn (1964) através de seus dois teoremas, os quais fundamentam a Teoria do Funcional da Densidade, é que a partir da densidade eletrônica é possível obter toda a informação extraída da função de onda de muitos elétrons, como a energia do estado fundamental e outras propriedades.

A teoria demonstrada através de ambos teoremas é aplicada a sistemas multieletrônicos, sendo aplicada a sistemas que estão sob a ação de um potencial externo  $V_{ext}(\vec{r})$ , com a inclusão de problemas de elétrons e núcleos fixados, onde é possível escrever o Hamiltoniano como:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_i V_{ext}(\vec{r}) + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} \frac{e^2}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (2.10)$$

**Primeiro teorema de Hohenberg-Kohn:** o potencial  $V_{ext}(\vec{r})$  de um sistema de partículas interagentes é determinado unicamente por um funcional da densidade  $\rho_0(\vec{r})$  no estado fundamental do sistema, exceto por uma constante.

**Segundo teorema de Hohenberg-Kohn:** *Um funcional universal para a energia  $E[\rho]$  em termos da densidade  $\rho(\vec{r})$  pode ser definido, valendo para qualquer potencial externo  $V_{ext}(\vec{r})$ . Tanto este  $V_{ext}(\vec{r})$  particular, como a energia exata do estado fundamental, quanto o valor mínimo global desse funcional e também a densidade  $\rho(\vec{r})$  que minimiza o funcional é a densidade exata do estado fundamental.*

Notemos que em um sistema de  $N$  elétrons, o hamiltoniano da Eq. 2.6 é completamente construído pelo potencial externo  $v(\vec{r})$ . Desse modo, todas as propriedades do estado fundamental (não degenerado) são determinadas por  $N$  e  $v(\vec{r})$ . De acordo com o Hohenberg e Kohn, ao invés de  $N$  e  $v(\vec{r})$  a variável básica da DFT seria a densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$ .

O Primeiro teorema nos diz então, que o conhecimento da densidade do estado fundamental de um sistema de muitos elétrons permite deduzir, a menos de uma constante, o potencial externo no qual os elétrons residem. Escrevendo a densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  e a energia do  $E$  em termo da função de onda, temos as seguintes expressões:

$$\rho(\vec{r}) = \frac{\langle \Psi | \hat{\rho}(\vec{r}) | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} = N \frac{\int d^3r_2 \dots d^3r_N \sum_{\sigma_1} |\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots, \vec{r}_N)|^2}{\int d^3r_1, d^3r_2 \dots d^3r_N |\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots, \vec{r}_N)|^2} \quad (2.11)$$

e

$$\rho(\vec{r}) = \frac{\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} = \langle \hat{H} \rangle = \langle \hat{T} \rangle + \langle \hat{V}_{int} \rangle + \int d^3r V_{ext}(\vec{r}) \rho(\vec{r}) + E_{II} \quad (2.12)$$

É possível demonstrar a veracidade do primeiro teorema supondo que dois potenciais externos  $V'_{ext}(\vec{r})$  e  $V''_{ext}(\vec{r})$  levem a uma mesma densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  para o estado fundamental. A partir dos potenciais são obtidos dois hamiltonianos  $\hat{H}'$  e  $\hat{H}''$  que possuem duas funções de ondas para o estado fundamental  $\Psi'$  e  $\Psi''$  e que levam a mesma densidade  $\rho(\vec{r})$  para o estado fundamental. Seja considerado também que,  $\Psi''$  não seja o estado fundamental de  $\hat{H}'$ , segue que:

$$E' = \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle < \langle \Psi'' | \hat{H}' | \Psi'' \rangle, \quad (2.13)$$

esta inequação nos diz que, se o estado fundamental é não-degenerado (pelo Primeiro teorema de Hohenberg-Kohn), não há possibilidade de encontrar uma auto-energia menor que a do estado fundamental, quando utilizamos uma autofunção diferente da pertencente ao estado fundamental de  $\hat{H}$ . Reescrevendo o segundo termo do lado direito da Eq. 2.13, temos:

$$\begin{aligned} \langle \Psi'' | \hat{H}' | \Psi'' \rangle &= \langle \Psi'' | \hat{H}'' | \Psi'' \rangle + \langle \Psi'' | \hat{H}' - \hat{H}'' | \Psi'' \rangle \\ &= E'' + \int d^3r [V'_{ext}(\vec{r}) - V''_{ext}(\vec{r})] \rho_0(\vec{r}), \end{aligned} \quad (2.14)$$

então, temos:

$$E' < E'' + \int d^3r [V'_{ext}(\vec{r}) - V''_{ext}(\vec{r})] \rho_0(\vec{r}), \quad (2.15)$$

caso consideremos  $E''$  do modo análogo ao realizado anteriormente encontraremos a mesma Eq. 2.15, com os índices (') e (") intercalados, ou seja:

$$E'' = \langle \Psi'' | \hat{H}'' | \Psi'' \rangle < \langle \Psi' | \hat{H}'' | \Psi' \rangle, \quad (2.16)$$

temos então:

$$\langle \Psi' | \hat{H}'' | \Psi' \rangle = \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle + \langle \Psi' | \hat{H}'' - \hat{H}' | \Psi' \rangle$$

$$= E' + \int d^3r [V''_{ext}(\vec{r}) - V'_{ext}(\vec{r})] \rho_0(\vec{r}), \quad (2.17)$$

pode-se então reescrever a Eq. 2.16:

$$E'' < E' + \int d^3r [V''_{ext}(\vec{r}) - V'_{ext}(\vec{r})] \rho_0(\vec{r}), \quad (2.18)$$

comparando a Eq. 2.15 com a Eq.2.18 obtém-se a seguinte desigualdade:

$$E' + E'' < E' + E'' \quad (2.19)$$

a incoerência desta inequação demonstra que a suposição que dois potenciais externos levam a uma mesma densidade eletrônica para o estado fundamental não é verdadeira. Fica então, estabelecida uma relação "única" entre o potencial externo  $V_{ext}(\vec{r})$  e a densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  do estado fundamental.

Um outro pilar da DFT é o segundo teorema de Hohenberg-Kohn, este diz que conhecendo a densidade do estado fundamental é possível obter as demais propriedades para esse estado. É possível provarmos este teorema ao definirmos o funcional de energia  $E[\rho]$  em relação a densidade  $\rho(\vec{r})$  e entendermos o seu significado. Cada densidade é capaz de definir um chamado "V-representável" [32, 33].

Se todas as propriedades do sistema (energia cinética, energia potencial, etc.) forem unicamente determinadas por  $\rho(\vec{r})$  especificada, logo cada uma das propriedades representará um funcional de  $\rho(\vec{r})$ , incluindo funcional energia total.

$$\begin{aligned} E_{HK}[\rho] &= T[\rho] + V_{int}[\rho] + \int d^3r V_{ext}(\vec{r}) \rho(\vec{r}) + E_{II} \\ &= F_{HK}[\rho] + \int d^3r V_{ext}(\vec{r}) \rho(\vec{r}) + E_{II}, \end{aligned} \quad (2.20)$$



onde,  $E_{II}$  representa a energia de interação do núcleo. O funcional  $F_{HK}[\rho]$  (Funcional de Hohenberg-Kohn) inclui todas as energias internas, cinética e potencial do sistema de interação do elétron.

$$F_{HK}[\rho] = T[\rho] + V_{int}[\rho], \quad (2.21)$$

construído a partir da soma dos operadores energia cinética  $\hat{T}$  e repulsão interna elétron-elétron  $\hat{V}_{int}$ , o funcional  $F_{HK}$  deve ser universal com a função de onda do estado fundamental  $\Psi$  sendo a única que fornece menor energia:

$$F_{HK}[\rho] = T[\rho] + V_{int}[\rho] = \langle \Psi | \hat{T} - \hat{V}_{int} | \Psi \rangle \quad (2.22)$$

Ainda não há uma aproximação exata para  $F_{HK}[\rho]$ . Uma vez obtida uma forma explícita para esse funcional contendo  $T[\rho]$  e  $V_{int}[\rho]$ , pode-se aplicar a qualquer sistema, já que  $F_{HK}[\rho]$  é um funcional universal de  $\rho(\vec{r})$ . Como resultado poderia-se obter soluções sem aproximações para a equação de Schrödinger [32].

Para um sistema que possui densidade de estado fundamental  $\rho'(\vec{r})$  que corresponde ao potencial  $V_{ext}(\vec{r})$ , o funcional de energia de Hohenberg-Kohn é igual ao valor do hamiltoniano em um único estado fundamental que possui a função de onda  $\Psi'$ , ou seja:

$$E' = E_{HK}[\rho'] = \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle \quad (2.23)$$

Para uma densidade diferente,  $\rho''(\vec{r})$ , correspondente a uma função de onda  $\Psi''$ , é obtida uma energia  $E''$  maior que  $E'$ ,

$$E' = \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle < \langle \Psi'' | \hat{H}'' | \Psi'' \rangle = E''. \quad (2.24)$$

Para qualquer densidade tentativa  $\rho''(\vec{r})$ , a energia total obtida do funcional da Eq.2.20 será sempre maior que energia do estado fundamental. Logo, a energia obtida pelo funcional de

Hohenberg-Kohn com a densidade do estado fundamental é menor energia obtida para qualquer outra densidade.

Pode-se afirmar então, que todas as propriedades de um sistema, definido por um potencial  $V_{ext}(\vec{r})$  são determinadas pela densidade do estado fundamental  $\rho_0(\vec{r})$ . Este método limita-se ao estado fundamental, já que a energia deste estado é explicitamente usada. A Teoria do funcional da Densidade é portanto uma teoria exata apenas para o estado fundamental[32, 33].

## 2.5 Formalismo de Kohn-Sham

A teoria do funcional da densidade tem se mostrado um importante método para a realização de cálculos de estrutura eletrônica. Isso devido a contribuição de Kohn & Sham em 1965, propondo que o tratamento de corpos interagente seja substituído pelo problema de partículas independentes. O método proposto leva a formulações aproximadas com notável sucesso.

### 2.5.1 Tratamento de Kohn-Sham

A aproximação de Kohn-Sham tem o intuito de realizar a substituição de interações de sistema de muitos corpos que obedecem o hamiltoniano

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{i,I} \frac{Z_I e^2}{|\vec{r}_i - \vec{R}_I|} + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} \frac{e^2}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} - \frac{1}{2} \sum_I \frac{\nabla_i^2}{M_I} + \frac{1}{2} \sum_{I \neq J} \frac{Z_I Z_J e^2}{|\vec{R}_I - \vec{R}_J|},$$

para um sistema denominado auxiliar, com resolução mais viável. Para isso é proposto por Kohn & Sham que a densidade do estado fundamental do sistema de partículas interagentes é igual a de um sistema não-interagente. Ainda sim para que o sistema de partículas independentes descreva perfeitamente um sistema real é necessário a introdução de termos de muitos corpos no hamiltoniano. Com isso, estes termos são incluídos no funcional de troca e correlação (exchange-correlation) da densidade, que compõem o hamiltoniano não-interagente. Com a solução da equação são obtidos a

densidade do estado fundamental bem como a energia do sistema interagente original com precisão limitada, isso devido as aproximações no funcional de troca e correlação [33, 32].

### 2.5.2 Suposições

A proposta de Kohm & Sham se basea em duas suposições:

- Pode ser determinada a densidade exata do estado fundamental pela densidade fundamental de um sistema auxiliar de partículas não-interagentes. Isso pode ser chamado de “V-representável-não-interagente” e leva a uma relação entre os sistemas.
- É escolhido o hamiltoniano para ter um operador de energia cinética usual e um potencial efetivo  $V_{eff}^\sigma(\vec{r})$  atuando no elétron de spin  $\sigma$  no ponto  $\vec{r}$ . Até o momento assumimos que o potencial externo  $\hat{V}_{est}$  é independente do spin (interações spin-orbita são desprezadas); porém, o potencial efetivo auxiliar  $V_{eff}^\sigma(\vec{r})$  pode ser dependente do spin, proporcionando uma melhor aproximação para o resultados da densidade de cada spin.

O hamiltoniano para o sistema auxiliar (hamiltoniano auxiliar) fica definido como:

$$\hat{H}_{aux} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + V(\vec{r}) \quad (2.25)$$

onde, usou-se as unidades atômicas Hartree  $\hbar = m_e = e4\pi/\epsilon_0 = 1$ . A densidade do sistema auxiliar é dada pelo somatório do quadrado dos orbitais

$$\rho(\vec{r}) = \sum_i^N |\psi_i(\vec{r})|^2, \quad (2.26)$$

sendo a energia cinética de partículas-independentes dada por

$$T_s = \frac{1}{2} \sum_i^N \langle \psi_i | \nabla^2 | \psi_i \rangle = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N |\nabla \psi_i|^2, \quad (2.27)$$

a energia de interação coulombiana clássica como auto interação da densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  é dada por

$$E_{Hartree} = \frac{1}{2} \int \int d^3r d^3r' \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|}. \quad (2.28)$$

Para descrever a interação do problema de muitos corpos, a expressão de Hohenberg-Kohn para energia do estado fundamental, Eq.2.20, é reescrita (aproximação de Kohn-Sham)

$$E_{KS} = T_s[\rho] + \int d^3r V_{ext}(\vec{r})\rho(\vec{r}) + E_{Hartree}[\rho] + E_{II} + E_{xc}[\rho], \quad (2.29)$$

sendo  $V_{ext}$  o potencial externo devido o núcleo e algum outro potencial externo,  $E_{II}$  como já dito anteriormente representa a interação entre os núcleos e o novo termo que surge ( $E_{xc}$ ) é denominado energia de troca e correlação. A soma de  $V_{ext}$ ,  $E_{Hartree}$  e  $E_{II}$  representa a energia clássica de *Coulomb*. A energia cinética de partículas independentes é expressa como um funcional de orbitais. Porém, deve ser um funcional único da densidade  $\rho(\vec{r})$  pelos argumentos de Hohenberg-Kohn aplicados no hamiltoniano de partículas independentes, Eq.2.25.

O funcional  $E_{xc}$  agrupa todos os efeitos de correlação e troca presentes na interação de muitos corpos, podendo ser escrito em termos do funcional de Hohenberg-Kohn. Comparando a Energia de Hohenberg-Kohn, Eq.2.20, com a energia de Kohn-Sham, Eq.2.29

$$E_{xc}[\rho] = F_{HK}[\rho] - (T_s[\rho] + E_{Hartree}[\rho]), \quad (2.30)$$

ou ainda,

$$E_{xc}[\rho] = \hat{T} - T_s[\rho] + \hat{V}_{int} - E_{Hartree}[\rho]. \quad (2.31)$$

Por esta equação percebe-se que  $E_{xc}$  é um funcional da densidade, e que é justamente a diferença da energia cinética com a energia cinética da verdadeira interação do sistema multi-eletrônico, colocada neste sistema fictício de partículas independentes, sendo a interação elétron-elétron representada pela energia de Hartree. Com o funcional  $E_{xc}$  é possível obter a energia exata

do estado fundamental de um problema de muitos elétrons resolvendo a equação de Kohn-Sham para partículas independentes.

### 2.5.3 Método de Kohn-Sham

Kohn & Sham de introduziram o conceito de um sistema de referência não-interagente, mas com densidade eletrônica total igual a densidade do sistema de muitos elétrons interagentes, o qual é construído a partir através de um conjunto de orbitais. Com essa proposta torna-se possível calcular a maior parte da energia cinética com boa precisão. O restante é somado com as demais contribuições de energias desconhecidas, com as contribuições não clássicas elétron-elétron, sendo todas pequenas. Com isso, o método possibilita o cálculo da energia total do estado fundamental do sistema de muitos elétrons interagentes, e a maior parte dos termos é calculado com exatidão, restando apenas uma pequena parte da energia para ser determinada por um funcional aproximado [33, 32].

A energia total do estado fundamental de um sistema de muitos elétrons pode ser determinada pelo mínimo do funcional de energia,

$$E[\rho] = F_{HK} + \int d^3r V_{ext}(\vec{r})\rho(\vec{r}), \quad (2.32)$$

sendo

$$F_{HK}[\rho] = T[\rho] + E_{Hartree} + E_{ncl}[\rho], \quad (2.33)$$

onde o funcional universal  $F_{HK}$  contém as contribuições individuais da energia cinética,  $T[\rho]$ , a interação coulombiana clássica,  $E_{Hartree}[\rho]$ , e a parte não-clássica  $E_{ncl}[\rho]$ , devido a correção de auto-interação, efeitos de troca e correlação eletrônica. Destes termos, é conhecido apenas  $E_{Hartree}[\rho]$ .

Para o sistema de elétrons não interagem de Kohn-Sham o Hamiltoniano eletrônico dado  $\hat{H}_{aux}$  Eq. 2.25, é escrito para todos os elétrons,

$$\hat{H}_s = \hat{H}_{ux} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^N v_s(\vec{r}a), \quad (2.34)$$

de onde podemos obter o Hamiltoniano de um elétron como

$$\hat{h}_s = \frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\vec{r}). \quad (2.35)$$

Para este sistema, a função de onda exata do estado fundamental será igual a um determinante de Slater (1965)

$$\Psi_S = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{bmatrix} \psi_1^1 & \psi_2^1 & \dots & \psi_N^1 \\ \psi_1^2 & \psi_2^2 & \dots & \psi_N^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \psi_1^N & \psi_2^N & \dots & \psi_N^N \end{bmatrix} \quad (2.36)$$

onde os  $\psi_i^j$  são os N orbitais de Kohn-Sham. Estes são obtidos para um único elétron através da equação de autovalor:

$$\hat{h}_s \psi_i = \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\vec{r}) \right] \psi_i = \varepsilon_i \psi_i \quad (2.37)$$

Para a existência de uma equivalência entre o sistema fictício e o sistema real, é necessário que o potencial efetivo  $v_s$  seja definido de maneira que a densidade resultante da soma do módulo quadrado dos orbitais  $\psi_i^j$  seja igual a densidade fundamental do sistema real,

$$\rho_s(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N \sum_s |\psi_i(\vec{r}, s)|^2 = \rho_0(\vec{r}). \quad (2.38)$$

Com a impossibilidade de expressar a energia cinética através de um funcional explícito, Kohn e Sham concentraram-se no cálculo da maior parte possível da energia cinética real exata, sendo o restante aproximações. Com isso, a energia cinética exata do sistema de referência fictício, com mesma densidade do sistema real, é escrita como:

$$T_s[\rho] = \langle \Psi_s | \sum_{i=1}^N \left( -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right) | \Psi_s \rangle, \quad (2.39)$$

$$T_s[\rho] = \sum_{i=1}^N \langle \psi_s | \left( -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right) | \psi_s \rangle. \quad (2.40)$$

Mesmo os sistemas possuindo densidades iguais as energias cinéticas são diferentes, sabendo disso Kohn e Sham propuseram separar o funcional  $F_{HK}$ , Eq. 2.33:

$$F_{HK}[\rho] = T[\rho] + E_{Hartree} + E_{xc}[\rho], \quad (2.41)$$

onde  $E_{xc}[\rho]$  é a energia de troca e correlação, definida através da Eq. 2.41 como:

$$E_{xc} = (T[\rho] - T_s[\rho]) + (V_{int}[\rho] - E_{Hartree}[\rho]), \quad (2.42)$$

sendo  $V_{int}[\rho] = E_{Hartree} + E_{ncl}[\rho]$ . Logo,

$$E_{xc} = (T[\rho] - T_s[\rho]) + V_{ncl}[\rho], \quad (2.43)$$

ou

$$E_{xc} = T_c[\rho] + V_{ncl}[\rho], \quad (2.44)$$

onde  $T_c[\rho]$  é a parte residual da energia cinética real, e que não está inclusa em  $T_s$  e é adicionada as contribuições não clássicas para formar o termo de troca e correlação. Ou seja, toda a parte que ainda não se sabe expressar explicitamente como um funcional exato da densidade eletrônica está contido em  $E_{xc}$ .

### 2.5.4 Equações de Kohn-Sham

Havia ainda a necessidade de encontrar uma maneira de como determinar unicamente os orbitais no sistema fictício. Logo, para Kohn e Sham era necessário definir o potencial  $v_s$  de maneira que a função de onda  $\Psi_s$  fosse igual a um único determinante de Slater possuindo a mesma densidade eletrônica do sistema real. Foi escrita então uma expressão para a energia do sistema real,

$$E[\rho] = F_{HK}[\rho] + V_{ext}[\rho], \quad (2.45)$$

usando a Eq. 2.41

$$E[\rho] = T_s[\rho] + E_{Hartree}[\rho] + E_{xc}[\rho] + V_{ext}[\rho] \quad (2.46)$$

explicitando os termos e considerando a Eq.2.38 , temos que

$$E[\rho] = T_s[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r}' - \vec{r}|} d^3r d^3r' + E_{xc} + \int \rho(\vec{r})v(\vec{r})d^3r, \quad (2.47)$$

ou ainda

$$\begin{aligned} E[\rho] = & -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \langle \psi_i | \nabla_i^2 | \psi_i \rangle + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \int \int |\psi_i(\vec{r})|^2 \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} |\psi_j(\vec{r}')|^2 d^3r d^3r' + \\ & + E_{xc}[\rho] + \sum_i^N \int v(\vec{r}) |\psi_i(\vec{r})|^2 d^3r. \end{aligned} \quad (2.48)$$

Percebe-se na expressão acima que o único termo que não está explicito é  $E_{xc}$ , uma vez que  $v(\vec{r})$  é conhecido. Para sistemas poliatômicos o potencial externo  $v(\vec{r})$  é igual a atração elétron-núcleo,



$$v(\vec{r}_i) = - \sum_A^M \frac{Z_A}{|\vec{r}_i - \vec{R}_A|}, \quad (2.49)$$

onde o índice  $A$  está associado aos núcleos e o índice  $i$  aos elétrons. A energia para o estado fundamental é portanto determinada pelo método variacional. Logo, quando a densidade de carga sofre pequenas variações  $\delta E[\rho]$  é igual a zero e  $\int \rho(\vec{r}) d\vec{r}$  será igual a  $N$ . Utilizando o método de multiplicadores de Lagrange, o problema passa a ser encontrar os extremos da Lagrangeana  $L[\{\psi_i(\vec{r})\}]$ ,

$$L[\{\psi_i\}] = E[\rho] - \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \varepsilon_{ij} \int \psi_i^*(\vec{r}) \psi_j(\vec{r}) d\vec{r} \quad (2.50)$$

onde  $E[\rho]$  é um funcional de  $\psi_i$  e  $\varepsilon_{ij}$  são os multiplicadores de Lagrange. Para que  $E[\rho]$  ser um mínimo:

$$\frac{\delta L}{\delta \psi_i^*} = 0, \quad (2.51)$$

Usando a Eq. 2.48 na Eq.2.50 e em seguida derivando em relação a  $\psi_i^*$ , obtém-se

$$\left( -\frac{1}{2} \nabla^2 + \left[ v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d^3 r' + \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho} \right] \right) \psi_i = \varepsilon_i \psi_i, \quad (2.52)$$

ou

$$\left( -\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ef}(\vec{r}) \right) \psi_i = \varepsilon_i \psi_i \quad , i = 1, 2, \dots, N. \quad (2.53)$$

Comparando esta expressão com a equação para um elétron do sistema fictício de Kohn-Sham, (Eq.2.37), percebe-se que se o potencial efetivo  $v_{ef}(\vec{r})$  for igual ao potencial de Kohn-Sham  $v_s(\vec{r})$ , as duas expressões são idênticas,

$$v_s(\vec{r}) \equiv v_{ef}(\vec{r}) = v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d^3 r' + v_{xc}(\vec{r}), \quad (2.54)$$

onde

$$v_{xc} = v(\vec{r}) = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho}, \quad (2.55)$$

sendo  $v_{xc}$  o potencial de troca e correlação.

As Eq.2.52 e Eq.2.53, são chamadas de equações de Kohn-Sham, obtidas de maneira exata (sem aproximações), elas demonstram a existência de  $N$  equações de um elétron que devem ser resolvidas de forma auto-consistente.

Substituindo a Eq. 2.52 ou Eq. 2.53 na Eq. 2.48 da energia total, obtemos uma equação em função de  $\varepsilon_i$ ,

$$E[\rho] = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d^3r d^3r' + E_{xc}(\rho(\vec{r})) - \int v_{xc}(\vec{r})\rho(\vec{r})d^3r, \quad (2.56)$$

onde

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^N \varepsilon_i &= \sum_{i=1}^N \left\langle \psi_i \left| -\frac{1}{2}\nabla^2 - i^2 + \left[ v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d^3r' + \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho} \right] \right| \psi_i \right\rangle \\ &= \sum_{i=1}^N \left\langle \psi_i \left| -\frac{1}{2}\nabla^2 - i^2 + \left[ v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d^3r' + \delta v_{xc} \right] \right| \psi_i \right\rangle \\ &= \sum_{i=1}^N \left\langle \psi_i \left| -\frac{1}{2}\nabla_i^2 + v_{ef}(\vec{r}) \right| \psi_i \right\rangle \\ &= T_{KS}[\rho] + \int v_{ef}(\vec{r})\rho(\vec{r})d^3r. \end{aligned} \quad (2.57)$$

Analisando aa Eq. 2.56, percebe-se que a energia não é simplesmente a soma das energia dos orbitais  $\varepsilon_i$ , que surgem da ideia do sistema fictício (sistema auxiliar de partículas não-interagentes). Nas equações de Kohn-Sham apenas a densidade possui significado físico, com isso, os autovalores

da Khon-Sham apresentam apenas uma semelhança semiquantitativa do comportamento da energia real.

Em síntese, o conhecimento do funcional de troca e correlação leva a determinação da densidade eletrônica do sistema e como consequência as soluções da equação de Schrödinger. De modo, que o desafio do método de Kohn-Sham é definir um funcional que determine os termos de troca e correlação. Assim o sucesso da DFT em conjunto com as equações de Kohn-Sham está intrinsecamente ligado a escolha do potencial de troca e correlação  $V_{xc}[\rho(\vec{r})]$ . Existem diversas aproximações  $V_{xc}[\rho(\vec{r})]$ , no entanto há duas com maior destaque: a Aproximação de Densidade Local (LDA) e a Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA).

## 2.6 Aproximações

### 2.6.1 Aproximação da Densidade Local

A Aproximação da Densidade Local (LDA – *Local Density Approximation*) é a aproximação mais simples para funcional de troca e correlação [32]. Baseada na densidade de um gás de elétrons uniforme a LDA é uma aproximação válida para sistema nos quais  $\rho(\vec{r})$  varia lentamente, sendo  $E_{xc}[\rho]$  dada por um funcional local,

$$E_{xc}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{xc}^{hom}(\rho(\vec{r})) d^3r, \quad (2.58)$$

onde  $\varepsilon_{xc}^{hom}(\rho(\vec{r}))$  representa a energia de troca e correlação por elétron de um gás de elétrons homogêneo com densidade  $\rho(\vec{r})$ . Como dito na seção anterior derivando  $E_{xc}[\rho]$  em relação a densidade  $\rho(\vec{r})$  determina-se o potencial troca e correlação, logo derivando a Eq. 2.58 é obtido,

$$V_{xc}^{LDA} = \frac{\delta E_{xc}^{LDA}}{\delta \rho(\vec{r})} = \varepsilon_{xc}^{hom}(\rho(\vec{r})) + \rho(\vec{r}) \frac{\partial \varepsilon_{xc}^{hom}(\rho(\vec{r}))}{\partial \rho(\vec{r})} \quad (2.59)$$

Essa aproximação para  $E_{xc}$  e  $V_{xc}$  é a denominada LDA, na qual a energia  $\varepsilon_{xc}^{hom}(\rho(\vec{r}))$  é a soma de dois termos:  $\varepsilon_x^{hom}$  (troca) e  $\varepsilon_c^{hom}$  (correlação).

$$\varepsilon_{xc}^{hom}(\rho) = \varepsilon_x^{hom}(\rho) + \varepsilon_c^{hom}(\rho) \quad (2.60)$$

O termo de troca é determinado a partir da ideia de um gás de elétrons homogêneo, sendo  $\varepsilon_x^{hom}(\rho) \propto \rho^{1/3}$ . Para o termo de correlação não há uma forma analítica, sendo assim este parametrizado. A parametrização deste funcionais foi realizada inicialmente por Perdew e Zunger (1981). Estes objetivaram traçar um modelo cada vez mais próximo dos resultados experimentais, chegando aos seguintes resultados (em unidades de Hartree):

$$\varepsilon_x^{hom}(\rho) = -\frac{3}{4\pi}(3\pi^2\rho)^{1/3} \quad (2.61)$$

e

$$\varepsilon_c^{hom}(\rho) = \begin{cases} -1432/(1 + 1.9529r_s^{1/2} + 0.3334r_s), & r_s \geq 1 \\ -0.0480 + 0.0311\ln r_s - 0.0116r_s + 0.0020r_s \ln r_s, & r_s < 1 \end{cases} \quad (2.62)$$

sendo  $r_s$  interpretado como a distância média entre dois elétrons do sistema auxiliar (fictício), conhecido como o raio de Wigner-Seitz, é incluído no termo de correlação através de parametrização.

Resultados obtidos via LDA se mostram satisfatórios quando comparados com resultados experimentais para cálculos de estrutura de banda e energia total em sólidos. No entanto sendo a densidade não-uniforme, esta não é uma aproximação ideal para estruturas nas quais a densidade  $\rho(\vec{r})$  varia rapidamente como é o caso das moléculas, proteína e etc.

## 2.6.2 Aproximação do Gradiente Generalizado

Mostrando-se a Aproximação da Densidade Local insuficiente para a descrição de problemas reais um novo elemento foi adicionado, dando origem a Aproximação do Gradiente Generalizado

(GGA – *Generalized Gradient Approximation*). O novo elemento trata-se gradiente de densidade eletrônica  $[\nabla\rho(\vec{r})]$ , que é incluído no integrando da expressão da energia de troca e correlação  $E_{xc}$ . Desta forma, a densidade eletrônica passa não ser constante, sendo representada a sua variação pelo gradiente acrescentado a expressão.

$$E_{xc}^{GGA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int f_{xc}(\rho^\alpha(\vec{r}), \rho^\beta(\vec{r}), \nabla\rho^\alpha(\vec{r}), \nabla\rho^\beta(\vec{r})) d^3r \quad (2.63)$$

Existem várias sugestões para a dependência explícita para o gradiente da densidade e para a densidade que compõe o integrando  $f_{xc}$ . Este procedimento tem sido realizado com a inclusão de funcionais semi-empíricos ajustado em concordância com valores obtidos na literatura ao invés de derivados de primeiros princípios.

A energia de troca e correlação é escrita em dois termos:  $E_x^{GGA}$  (troca) e  $E_c^{GGA}$  (correlação),

$$E_{xc}^{GGA} = E_x^{GGA} + E_c^{GGA}. \quad (2.64)$$

Os dois termos são determinados individualmente, contendo nas suas construções um tratamento matemático complexo, nos quais são levadas em consideração as condições de contorno a serem obedecidas pelos funcionais rendendo dessa maneira resultados satisfatórios.

O termo de troca é escrito como:

$$E_x^{GGA} = E_x^{LDA} - \sum_{\sigma} \int f_{xc}(s_{\sigma}) \rho_{\sigma}^{3/4} d^3r, \quad (2.65)$$

O argumento da função  $f_{xc}$  é o gradiente da densidade reduzida para o spin  $\sigma$

$$s_{\sigma}(\vec{r}) = \frac{|\nabla\rho_{\sigma}(\vec{r})|}{\rho_{\sigma}^{4/3}(\vec{r})} \quad (2.66)$$

o termo  $s_{\sigma}$  é um parâmetro que representa a ausência de homogeneidade do sistema. Este pode assumir valores altos para grandes gradientes e também para regiões de baixa densidade, como é

o caso de pontos distantes do núcleo.

O funcional  $E_{xc}^{GGA}$  tem sofrido várias modificações com objetivo de aperfeiçoá-lo. Essas modificações buscam melhorias comportamentais e ocorrem com o desenvolvimento de novos funcionais, correções no já existentes ou ainda a composição de funcionais. Dentre os mais usados estão os baseados nos trabalhos de Perdew-Wang, de Lee-Yang-Parr-Beck, de Perdew, de Beck e Perdew-Burke-Ernzerhof. Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado o funcional de Perdew-Burke-Ernzerhof. Desta maneira a seguir há sua descrição.

### 2.6.3 Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE)

Em 1996, Perdew, Burke e Ernzerhof apresentaram uma proposta para o funcional de troca e correlação na aproximação GGA, neste os parâmetros da função característica do gradiente são constantes fundamentais [34]. A função numérica semilocal neste caso é não-empírica,  $f_s \equiv f_{xc}^{GGA}(s)$ ,

$$f_x^{PBE}(s) = 1 + \kappa - \frac{\kappa}{1 - \mu s^2 / \kappa} \quad (2.67)$$

onde  $\mu = 0,21951$  e  $\kappa = 0,804$ , com  $s$  dado pela equação  $s = \frac{|\nabla\rho(\vec{r})|}{2\kappa_F\rho(\vec{r})}$  e  $\kappa_F = (3\pi^2\rho(\vec{r}))^{1/3}$ .

A energia de correlação é dada por:

$$E_c^{PBE}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int \rho \{ \varepsilon_c(r_s, \varsigma) + H^{PBE}(r_s, \varsigma, t) \} d^3r, \quad (2.68)$$

onde

$$r_s = (3/4\pi\rho(\vec{r}))^{1/3}, \quad (2.69)$$

$$\varsigma = (\rho^\alpha - \rho^\beta)/\rho, \quad (2.70)$$

$$t = |\nabla\rho(\vec{r})|/2\kappa_s\phi\rho, \quad (2.71)$$

$$\kappa_s = (4\kappa_F/\pi)^{1/2}, \quad (2.72)$$

$$\phi = \frac{1}{2} [(1 + \varsigma)^{2/3} + (1 - \varsigma)^{2/3}], \quad (2.73)$$

$$H^{PBE} = \gamma\phi^3 \ln \left\{ 1 + \frac{\beta}{\gamma} t^2 \left[ \frac{1 + At^2}{1 + At^2 + A^2t^4} \right] \right\} \quad (2.74)$$

sendo,

$$A = \frac{\beta}{\gamma} [\exp\{-\varepsilon_c^{hom}/\gamma\phi^3\} - 1]^{-1} \quad (2.75)$$

onde  $\gamma = 0.031091$ ,  $\beta = 0.066725$  e o gradiente  $s$  e  $t$  são medidas da taxa de variação de  $\rho(\vec{r})$  na escala de comprimento de onda de Fermi local  $2\pi/\kappa_F$  e do comprimento de blindagem de Thomas-Fermi local  $1/\kappa_s$

## 2.7 Simulação computacional

O progresso computacional abriu novos caminhos para o desenvolvimento da Física, Química, Biologia e outras ciências. O uso da computação possibilitou e possibilita novas abordagens a problemas antes com soluções inviáveis. Como exemplo podemos citar novamente a resolução da equação de Schrödinger para muitos corpos.

Chama-se de modelagem molecular o conjunto métodos e técnicas computacionais para modelar e simular o comportamento de moléculas. A modelagem molecular tem como objetivo reproduzir uma situação real de uma molécula ou sistemas compostos por moléculas. As simulações

computacionais têm se estabelecido também como um caminho alternativo no desenvolvimento de fármacos. Uma vez que seu planejamento racional baseado no seu mecanismo de ação e estrutura tem se mostrado uma maneira eficaz de otimizar o processo produtivo, desde a elaboração de um protótipo até uma possível aplicação [33].

A junção de conceitos básicos da Mecânica Quântica com a Teoria do Funcional da Densidade, tem contribuído para o desenvolvimento de softwares cada vez mais precisos para a modelagem molecular. No entanto a determinação da técnica e o método para que se obtenha resultados realistas depende do problema a ser analisado. É fato notável que alguns problemas necessitam de aproximações baseadas em parametrizações semi-empíricas ou empíricas do modelo utilizado, em princípios físicos de interações atômicas ou similaridade de dados estruturais e químicos já conhecidos.

### 2.7.1 Softwares

Para o desenvolvimento do nosso trabalho foram utilizados o DMol<sup>3</sup> e o Forcite, softwares destinados ao uso em modelagem computacional desenvolvido e distribuído pela *Accelrys*, uma empresa especializada em desenvolvimento softwares destinados a pesquisadores nas áreas de química, materiais, biociência para as indústrias farmacêutica, de biotecnologia, bens de consumo embalados, aeroespacial, energia e produtos químicos.

A escolha dos softwares é justificada pela diversidade de possibilidades de trabalho que podem ser desenvolvidos com seu uso, além da precisão ofertada em seus cálculos. A seguir faremos a descrição dos softwares de acordo com a página da empresa na internet(<http://accelrys.com/products/materials-studio/index.html>).



### **DMol<sup>3</sup>**

Um ambiente de modelagem e simulação completo, o DMol<sup>3</sup> é concebido para permitir a possibilidade de prever e entender as relações de estrutura atômica e molecular com as suas propriedades e comportamento. É utilizado para modelar a estrutura eletrônica e propriedades de moléculas orgânicas e inorgânicas, cristais moleculares, sólidos covalentes, sólidos metálicos, bem como superfícies infinitas através de DFT [35].

Utiliza a Teoria do Funcional da Densidade para simular processos químicos e prever propriedades com rapidez e precisão. Prever os processos em fase gasosa, solução e ambientes sólidos. O Dmol<sup>3</sup> é amplamente aplicado para pesquisar problemas Farmacêuticos, problemas em Química, Ciência dos Materiais e Engenharia Química, bem como Física do Estado Sólido [35].

Atinge sua velocidade e precisão usando funções numéricas em uma rede centrada no átomo como sua base. As funções de base atômica são obtidas a partir da resolução de equações da DFT para átomos individuais e são, portanto, bastante precisas. A alta qualidade dos conjuntos de base minimiza efeitos de superposição e permite uma descrição melhorada da polarizabilidade molecular [35].

### **Forcite**

O Forcite é um conjunto de ferramentas para a realização de simulações clássicas usando tanto mecânica molecular ou dinâmica molecular. Este software possibilita a realização de cálculos de energias, otimização de estruturas e ainda o estudo da evolução temporal de determinada estrutura. É uma ferramenta que possibilita a análise e previsão de propriedades mecânicas, tais como módulo de Young, prever parâmetros de densidade energia e de solubilidade coesas, e sonda estruturais [35].

Tabela 2.1: Aminoácidos usados na pesquisa e seus respectivos dados do Drug Bank.

<b>Aminoácido</b>	<b>Número de Acesso</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Massa</b>
Alanina	DB00160 (NUTR00013)	$C_3H_7NO_2$	89.08 g mol <sup>-1</sup>
Arginina	DB00125 (NUTR00014)	$C_6H_{14}N_4O_2$	174.19 g mol <sup>-1</sup>
Asparagina	DB00174 (NUTR00015)	$C_4H_8N_2O_3$	132.1 g mol <sup>-1</sup>
Cisteína	DB00151 (DB04443, NUTR00018)	$C_3H_7NO_2S$	121.15 g mol <sup>-1</sup>
Fenilalanina	DB00120 (NUTR00044)	$C_9H_{11}NO_2$	165.18 g mol <sup>-1</sup>
Glicina	DB00145 (NUTR00028)	$C_2H_5NO_2$	75.06 g mol <sup>-1</sup>
Histidina	DB00117 (NUTR00030)	$C_6H_9N_3O_2$	155.14 g mol <sup>-1</sup>
Isoleucina	DB00167 (NUTR00031)	$C_6H_{13}NO_2$	131.16 g mol <sup>-1</sup>
Lisina	DB00123 (NUTR00037)	$C_6H_{14}N_2O_2$	146.18 g mol <sup>-1</sup>
Leucina	DB00149 (NUTR00033)	$C_6H_{13}NO_2$	131.16 g mol <sup>-1</sup>
Prolina	DB00172 (NUTR00047)	$C_5H_9NO_2$	115.12 g mol <sup>-1</sup>
Valina	DB00161 (NUTR00060)	$C_5H_{11}NO_2$	117.14 g mol <sup>-1</sup>
Triptofano	DB00150 (EXPT02064, NUTR00058)	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204.21 g mol <sup>-1</sup>
Tirozina	DB00135 (NUTR00059)	$C_9H_{11}NO_3$	181.17 g mol <sup>-1</sup>

### 2.7.2 Drug Bank

Os arquivos de entrada utilizados tanto no DMol<sup>3</sup> como no Forcite (arquivos extensão .mol) para a montagem das sequências proteicas foram extraídos do Drug Bank (<http://www.drugbank.ca>). Este constitui-se de uma base de dados que contém informações detalhadas (seja ela química, farmacêutica ou farmacológica) de diversas drogas utilizadas mundialmente [36].

Este banco de dados possui 7.759 drogas catalogadas. Cada entrada de dados no Drug Bank contém mais de 200 campos de dados a serem editados, com metade da informação dedicada a dados de drogas/química e a outra metade dedicada a droga alvo ou dados de proteína [36].

Neste trabalho foram utilizados 14 aminoácidos os quais estão dispostos na Tabela 2.1.

# Capítulo 3

## Propriedades Eletrônicas

Com o desenvolvimento científico e tecnológico a descrição estrutural e funcional das biomoléculas avança a passos largos. Junto a isso soma-se o grande desenvolvimento da nanotecnologia, a qual caminha na direção da miniaturização e eficiência dos dispositivos eletrônicos [37]. Enquanto a nanotecnologia vem buscando ansiosamente o controle e a manipulação de estruturas nanométricas, a natureza realiza esta tarefa com altíssima precisão e eficiência através de suas biomoléculas. Tal fato, tem despertado o interesse no conhecimento das suas propriedades físicas e químicas para possíveis aplicações eletrônicas e ópticas. Isso tem levado ao desenvolvimento do que tem sido chamado de Eletrônica Molecular [38, 39, 40].

A proposta que vem sendo abraçada por pesquisadores é que as biomoléculas sejam usadas como componentes eletrônicos. No entanto, não é uma ideia nova pois já em 1974 Aviram e Ratner sugeriram o uso de uma molécula orgânica simples na construção de um retificador [40]. Desde então, trabalhos são direcionados para o estudo das propriedades eletrônicas de biomoléculas.

As propriedades eletrônicas neste trabalho são apresentadas pela análise populacional de cargas, utilizando a análise de Mulliken (MPA); a análise de Hirshfeld (HPA) e uma montagem eletrostática de cargas elétricas (ESP), assim como os orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO). A densidade eletrônica de estados foi calculada considerando a densidade total (DOS)

e a densidade parcial (PDOS) para reforçar a descrição dos orbitais de fronteira. Para melhor compreensão do problema estudado também foi calculada a curva corrente-voltagem (I-V) e a área acessível ao solvente.

### 3.1 Curva Corrente versus Voltagem

Segundo trabalhos publicados por Albuquerque, Sarmiento e alguns outros pesquisadores (ver Ref. [38, 39, 40, 41, 42, 43]) é possível calcular o transporte de carga em biomoléculas através de uma junção eletrodo-molécula-eletrodo. Para abordar tal problema é usada a técnica de matriz de transferência para resolver uma equação de Schrödinger independente do tempo. Sendo o Hamiltoniano dado por:

$$H_{total} = H_{proteína} + H_{eletrodo} + H_{contato} \quad (3.1)$$

O primeiro termo da Eq. 3.1 descreve o transporte de carga por meio da cadeia de proteína, e pode ser escrito como

$$\begin{aligned} H_{proteína} &= \sum_{i=1}^N [\varepsilon_{\alpha}^n |n, 1\rangle \langle n, 1| + \varepsilon_{\beta}^n |n, 2\rangle \langle n, 2|] \\ &+ \sum_{n=1}^N w [|n, 1\rangle \langle n, \pm 1, 1| + |n, 2\rangle \langle n, \pm 1, 2|] \\ &+ \sum_{n=1}^N t [|n, 1\rangle \langle n, 2| + |n, 2\rangle \langle n, 1| + |n, 2\rangle \langle n \pm 1, 1| \\ &+ |n, 1\rangle \langle n \pm 1, 2|], \end{aligned} \quad (3.2)$$

onde  $\varepsilon_{\alpha, \beta}^n$  representa a energia de ionização de cada aminoácido na n-ésima posição, Tabela 3.1. A determinação da energia de ionização para os aminoácidos se dá através de uma média aritmética das energias de ionização dos seus respectivos códons. As quais são compostas por média geomé-

trica das energias de ionização dos nucleotídeos correspondentes que são:  $\varepsilon_G = 7,77$  eV,  $\varepsilon_C = 8,68$  eV,  $\varepsilon_A = 8,26$  eV e  $\varepsilon_U = 9.32$  eV.

O segundo termo é associado aos dois eletrodos envolvidos no processo,

$$\begin{aligned}
 H_{eletrodo} = & \sum_{i=-\infty}^0 \sum_{m=1}^2 [\varepsilon_s^n |n, m\rangle \langle n, m| + t_s |n, m\rangle \langle n \pm 1, m|] \\
 & + \sum_{n=N+1}^{\infty} \sum_{m=1}^2 [\varepsilon_s^n |n, m\rangle \langle n, m| + t_s |n, m\rangle \langle n \pm 1, m|],
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

onde  $\varepsilon_s^n$  e  $t_s$  representam a energia de ionização do eletrodo. Considerando um eletrodo de platina cuja a energia de ionização é  $\varepsilon_s^n = 5.36$  eV a qual está relacionada com a função trabalho deste metal e  $t_s = 12.0$  eV [39, 40, 41].

O terceiro termo da Eq. 3.1 decreve o contato entre a proteína e os eletrodos,

$$H_{contato} = \sum_{m=1}^2 t_c [|0, m\rangle \langle 1, m| + |N, m\rangle \langle N \pm 1, m|], \tag{3.4}$$

onde  $t_c = 0,317$  eV representa a amplitude de salto entre os eletrodos e as extremidades da proteína, sendo  $N$  o número de resíduos de aminoácidos.

Com o hamiltoniano de ligação forte dado pela Eq.3.1 pode-se caracterizar o transporte de carga através da curva corrente versus voltagem (I-V). Esta é dada por:

$$I(V) = \frac{2e}{h} \int_{-\infty}^{+\infty} T_N(E) [f_L(E) - f_R(E)] dE, \tag{3.5}$$

sendo a distribuição de Fermi-Dirac,

$$f_{L(R)} = \left[ \exp \left[ \frac{E - \mu_{L(R)}}{k_B T} \right] + 1 \right]^{-1} \tag{3.6}$$

onde  $\mu_{L(R)}$  representa o potencial eletroquímico nos eletrodos. O termo  $T_N(E)$  corresponde a transmitância. O aparecimento de corrente depende crucialmente dos potenciais eletroquímicos

Tabela 3.1: Energia de ionização dos aminoácidos.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Símbolos</b>	<b>Energia de Ionização (eV)</b>
Alanina	(A)	8.84
Cisteína	(C)	8,68
Aspartato	(D)	8.34
Ácido Glutâmico	(E)	7.99
Fenilalanina	(F)	9.24
Glicina	(G)	8.00
Histidina	(H)	8.72
Isoleucina	(I)	8.77
Lisina	(K)	8.15
Leucina	(L)	8.88
Metionina	(M)	8.41
Asparagina	(N)	8.51
Prolina	(P)	8.75
Glutamina	(Q)	8.35
Arginina	(R)	8.17
Serina	(S)	8.34
Treonina	(T)	8.54
Valina	(V)	8.51
Triptofano	(W)	8.32
Tirosina	(Y)	8.87

[40]. A curva corrente - voltagem (I-V) é um importante resultado uma vez que nos indica a possibilidade de transporte de carga através de certa estrutura. Esta dissertação como dito no Capítulo 1, buscou a caracterização das propriedades físicas de sequências proteicas que correspondem a região C-terminal de miotoxinas Fosfolipases Lisinas 49. A região alvo desta caracterização corresponde a uma sequência de 15 aminoácidos (115-129). Este trabalho teve como objeto de estudo 9 peptídeos distintos os quais são descritos na Tabela 1.1. As curvas I-V (Fig. 3.1), foram obtidas por meio da metodologia *tight-binding* e revela um comportamento semelhante entre grupos de peptídeos. Podemos dividir os peptídeos por meio da curva I-V em três grupos distintos de acordo com a corrente máxima: grupo I, que está entre 4000 nA e 8000 nA, o grupo II que se encontra entre 1500 nA e 3000 nA e o grupo III que está entre 0 nA e 1500 nA.

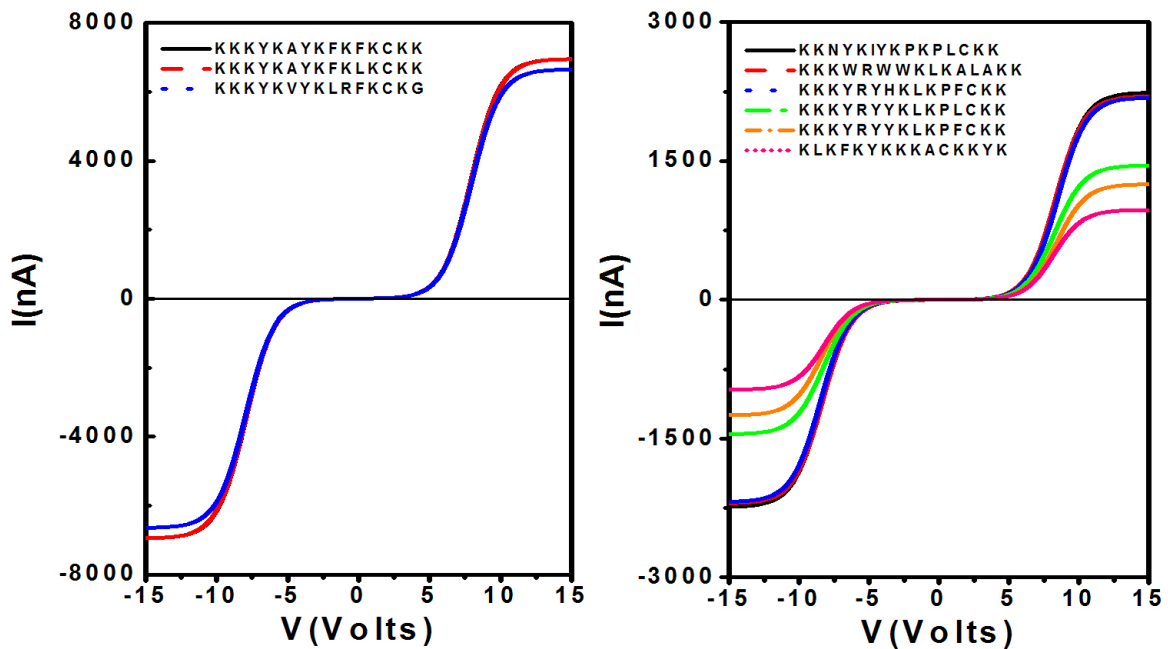


Figura 3.1: Curva corrente-voltagem obtida por cálculos baseados no modelo *tight-binding* para os nove peptídeos inicialmente estudados.

Cada grupo é composto por três peptídeos que apresentam segundo o resultado obtido, propriedades semelhantes. Partindo desta primícia e com objetivo de reduzir o custo computacional foi escolhida uma sequência para representar cada grupo: grupo I, peptídeo I (Pep.I) (KKKYKAYKF-

KLKCKK) presente em Fosfolipase A<sub>2</sub> Lisina 49 encontrada em serpentes *Agkistrodo piscivorus piscivorus*, grupo II, peptídeo II (Pep.II) (KKKYRYHKLKPFCKK) presente em Fosfolipase A<sub>2</sub> Lisina 49 encontrada em serpentes *Bothrops jararacussu and B. pirajai* e grupo III, peptídeo III (Pep.III) (KKKYRYYKLPFCKK) presentes em Fosfolipase A<sub>2</sub> Lisina 49 encontrada em serpentes *Bothrops asper*. Analisando as curvas I-V percebemos que a região  $-5V < V < 5V$ , demonstra caráter isolante enquanto as regiões não-lineares  $V < -5$  e  $V > 5$  indicando transições em direção a uma corrente de saturação.

O comportamento apresentado nas curvas I-V assemelha-se a resultados experimentais encontrados por Lomonte et al. 2003. Ao expor tais sequências a presença de células musculares e não musculares, Lomonte e colaboradores observaram a presença danos na membrana celular. Constatou-se também que a intensidade dos danos causados variavam de acordo com as respectivas sequências analisadas. Em particular, as os peptídeos I, II e III aqui estabelecidos a partir da curva I-V, apresentaram nos experimentos de Lomonte, máxima, média e mínima intensidade no dano as membranas.

Ao todo, as sequências analisadas são compostas por 14 tipos aminoácidos, dentre os quais 9 são apolares, 3 são polares básicos e 2 são polares neutros. As sequências (KKK-YKA-YKF-KLK-CKK) e (KLK-FKY-KKK-ACK-KYK) possuem ambos 9 aminoácidos polares básicos, 2 polares neutros e 4 apolares sendo 9 Lisinas, 2 Tirosinas, 1 Alanina, 1 Fenilalanina, 1 Cisteína e 1 Leucina. A diferença entre ambas sequências é unicamente a posição dos aminoácidos. No entanto, apresentam comportamentos extremamente distintos na curva I-V estando nos grupos máximo e mínimo respectivamente. As sequências (KKK-YRY- HKL-KPF-CKK) e (KKK-YRY-YKL-KPF-CKK) são semelhantes com exceção da substituição do Histidina (H) que é polar básico pelo aminoácido Tirosina (Y) que é polar neutro. Entretanto, apresentaram comportamentos distintos ocupando respectivamente os grupos médio e mínimo. A seguir apresentaremos as propriedades eletrônicas para os peptídeos I, II e III.



## 3.2 Otimização de Geometria

A qualidade dos resultados obtidos por métodos de modelagem molecular está relacionada com a qualidade dos dados de entrada. De maneira que para métodos baseados em DFT faz-se necessário garantir que a estrutura a ser analisada se encontre em estado de menor energia. A otimização de geometria é um processo de refinamento no qual as coordenadas dos átomos são ajustadas para que a energia da molécula atinja um ponto estacionário e sua estrutura apresente estreita semelhança com a estrutura real.

A otimização da geometria das estruturas em estudo foi realizada através dois programas Forcite responsável pela pré-otimização (métodos clássicos) e o DMol<sup>3</sup> responsável pela finalização das otimizações (métodos quânticos). Para essa segunda etapa foram utilizadas tanto a aproximação do gradiente generalizado (GGA) funcional PBE (GGA/PBE) como a da aproximação de densidade local (LDA) funcional PWC (LDA/PWC), levando em conta todos os elétrons dos aminoácidos envolvidos. Alguns parâmetros são definidos antes da otimização, estes definem os limites de convergência da otimização de geometria para o cálculo de energia, força máxima e deslocamento máximo entre os ciclos de otimização. O processo de otimização finaliza quando a convergência de energia é satisfeita em correspondência aos parâmetros alocados. Para o Dmol<sup>3</sup> há três conjuntos de parâmetros: COARSE, MEDIUM e FINE.

Tabela 3.2: Parâmetros de otimização.

<b>Grandeza</b>	<b>COARSE</b>	<b>MEDIUM</b>	<b>FINE</b>
Energia (Hartree)	$1 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-5}$
Força Máxima (Hartree/Å)	0,02	0,004	0,002
Deslocamento máximo (Å)	0,05	0,005	0,005

As estruturas analisadas em nosso trabalho são sequências extensas de aminoácidos possuindo em média 300 átomos cada, de maneira que a otimização imediata das estruturas completas era inviável devido aos recursos computacionais. Desta maneira realizou-se inicialmente a otimização

de todos os aminoácidos envolvidos (Tabela 2.1) com a finalidade de facilitar a realização dos processos com as estruturas completas. Após a otimização dos aminoácidos, a etapa seguinte foi o agrupamento e otimização em blocos de três aminoácidos, Fig. (3.2, 3.4 e 3.6). Após esta etapa, realizou-se a junção e otimização destes blocos até a obtenção das estruturas completas, estas passaram por novo processo de otimização de geometria. No entanto, devido ao grande número de átomos as estruturas com os 15 aminoácidos foram otimizadas somente no nível COARSE. As estruturas finais apresentaram pela aproximação LDA/PWC as seguintes energias -180983,482216 eV para o Pep.I, -187410,428271 eV para o Pep.II e -189609,577072 eV para o Pep.III. E pela aproximação GGA/PBE -182255,727430 eV para o Pep.I -188727,678711 eV para o Pep.II e -190951,917601 eV para o Pep. III. As estruturas são apresentadas nas Fig. (3.3, 3.5 e 3.7).

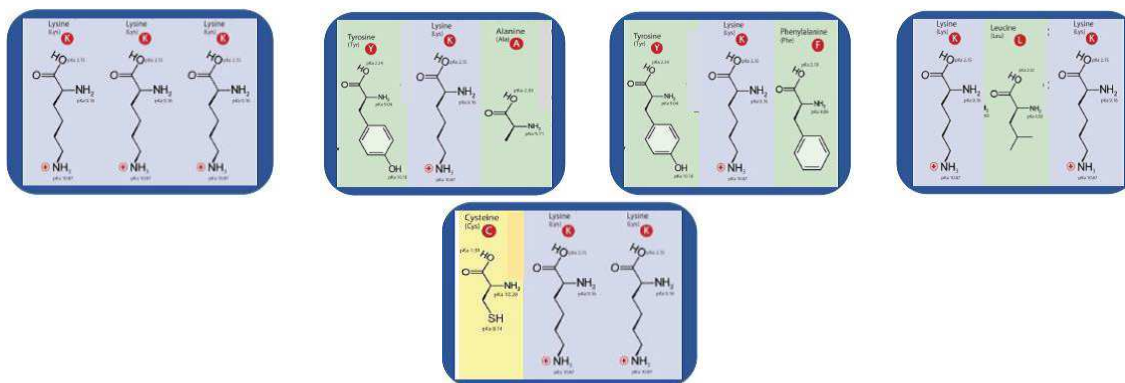


Figura 3.2: Representação esquemática do Pep.I em blocos de três aminoácidos.

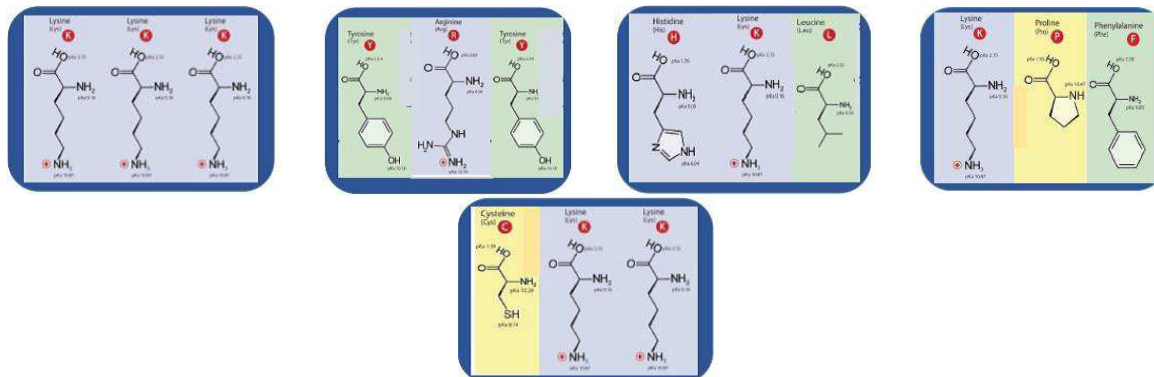


Figura 3.4: Representação esquemática do Pep.II em blocos de três aminoácidos.

## OTIMIZAÇÃO:Pep.I

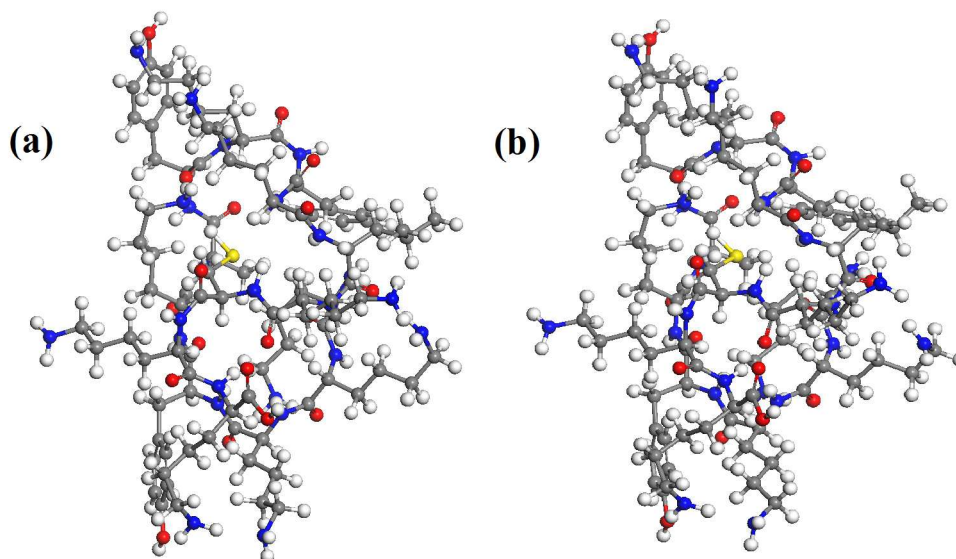


Figura 3.3: Estruturas obtidas após a otimização para o Pep.I a) pela aproximação GGA/PBE e b) pela aproximação LDA/PWC.

## OTIMIZAÇÃO:Pep.II

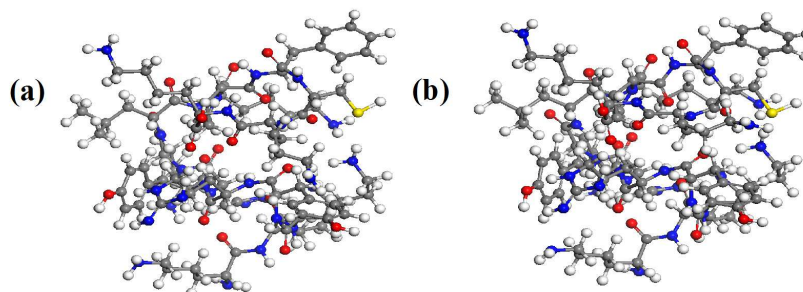


Figura 3.5: Estruturas obtidas após a otimização para o Pep.II a) pela aproximação GGA/PBE e b) pela aproximação LDA/PWC.

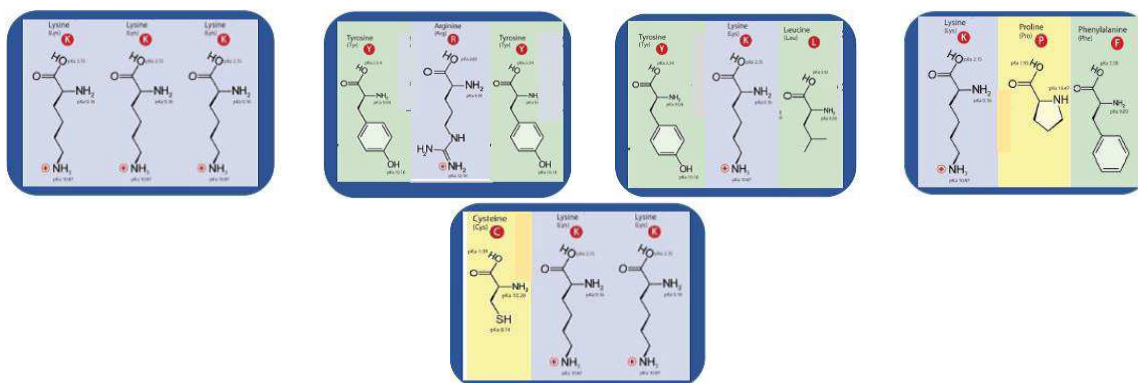


Figura 3.6: Representação esquemática do Pep.III em blocos de três aminoácidos.

## OTIMIZAÇÃO:Pep.III

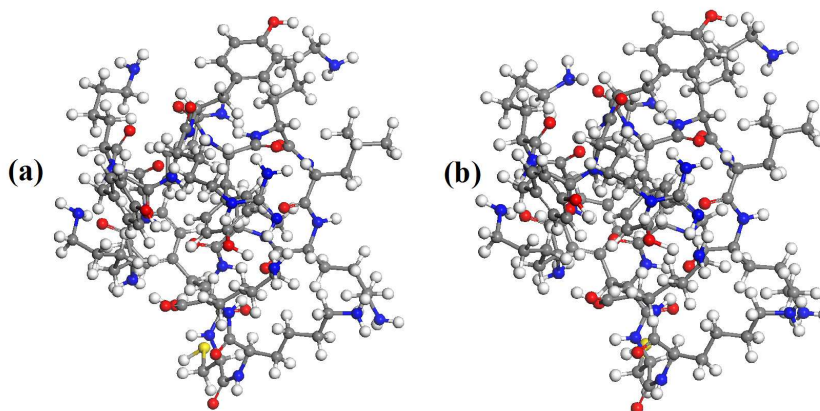


Figura 3.7: Estruturas obtidas após a otimização para o Pep. III a) pela aproximação GGA/PBE e b) pela aproximação LDA/PWC.

## 3.3 Distribuição de Cargas

### 3.3.1 Densidade Eletrônica e Área Acessível ao Solvente

Segundo o que é defendido em alguns trabalhos encontrados na literatura a região da miotoxina Fosfolipases Lisina 49 responsável pelo dano celular é a sequência de aminoácidos 115 - 129.

Lomonte e colaboradores defendem que regiões eletricamente positivas dentro dessa sequência interagem com fosfolipídios de membrana eletricamente negativos ocasionando a ruptura da mesma. Para estudar a distribuição de cargas sobre os peptídeos I, II e III mapas de densidade eletrônica de carga foram obtidas através da densidade eletrônica plotada sobre uma superfície de potencial eletrostático. Com tais mapas é possível ter uma ideia de quais regiões estariam segundo Lomonte envolvidas no processo de dano da membrana, Fig.3.8.

A área sobre o peptídeo disponível para a interação com o seu alvo (membrana celular), pode ser um fator determinante para a sua atuação. Como mostrado nos mapas de densidade eletrônica há concentração maior de carga em pontos específicos, de maneira que uma maior área disponível aumenta a possibilidade de interação entre tais pontos e a membrana. No entanto, os resultados obtidos não seguem este raciocínio, uma vez que as estruturas otimizadas pela aproximação GGA/PBE apresentaram área acessível ao solvente (sistema) de 1821,568 Å<sup>2</sup> para o Pep. I, 2033,169 Å<sup>2</sup> para o Pep. II e 1826,302 Å<sup>2</sup> para o Pep.III. As estruturas otimizadas pela aproximação LDA/PWC apresentaram área acessível ao solvente de 1734,353 Å<sup>2</sup> para o Pep. I, 1884,813 Å<sup>2</sup> para o Pep. II e 1691,332 Å<sup>2</sup> para o Pep. III.

### 3.3.2 Análise Populacional

A análise populacional de carga complementa em números os mapas de densidade eletrônica. A carga elétrica foi calculada para as diversas regiões das moléculas através da análise populacional de Mulliken (*Mulliken population analysis* - MPA), análise populacional de Hirshfeld (*Hirshfeld population analysis* - HPA) e pelo ajuste eletrostático de cargas (*Electrostatic fitting of electric charges*-ESP). A análise populacional de Mulliken é a mais tradicional e usada metodologia de cálculo de cargas atômicas tendo como base os orbitais moléculares. No entanto a MPA é limitada, devido a divisão arbitrária da superposição na população de elétrons. A análise populacional de Hirshfeld tem como base a topologia da densidade de elétrons. Ela tende a ser mais precisa apresentando uma concordância mais realista com a previsão de tendências de reatividade dentro da molécula

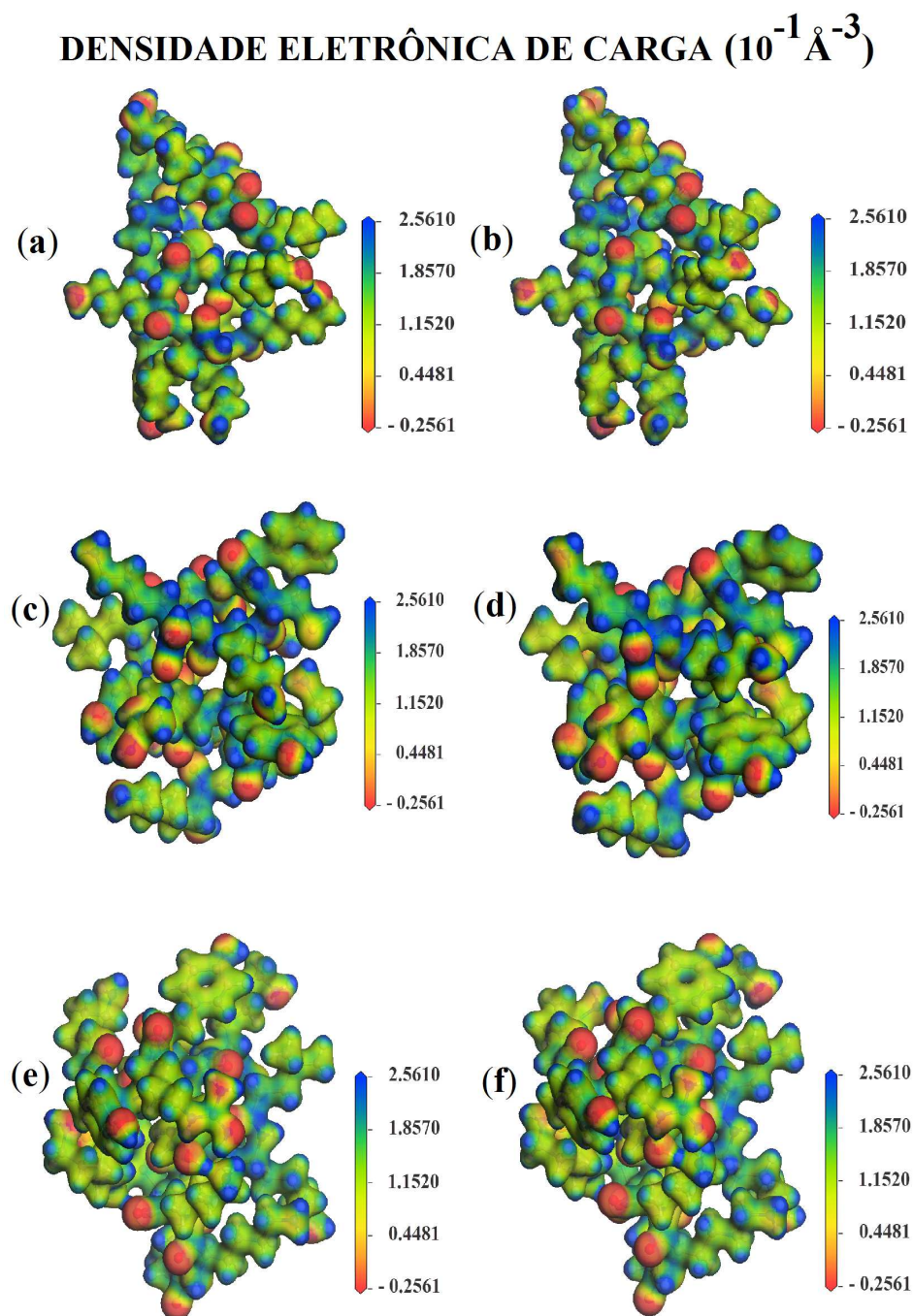


Figura 3.8: Mapa de densidade eletrônica de carga para as sequências analisadas a) Pep.I GGA, b) Pep.I LDA, c) Pep.II GGA, d) Pep.II LDA, e) Pep.III GGA e f) Pep.III LDA. As regiões em azul apresentam carga positiva e as regiões em vermelho apresentam carga negativa.

em comparação com a MPA. E ainda minimiza a perda de informação devido a união de átomos para formar a molécula [44, 32]. Por isso, a discussão nesse trabalho dará mais atenção às cargas obtidas pela aproximação HPA, a MPA e ESP são para efeito de comparação.

Como mostrado anteriormente nos mapas de densidade eletrônica, há regiões sobre os peptídeos que apresentam maior e menor concentração de carga. Os diagramas apresentados nas Fig. 3.9 e 3.10 em consonância com os mapas apresentados na Fig. 3.8, mostram por meio das análises populacionais HPA, MPA e ESP a distribuição da carga elétrica sob os aminoácidos que constituem os peptídeos estudados. Os cálculos foram realizados por meio das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC, sendo a carga para cada aminoácido obtida pelo somatório das cargas de seus átomos. Pela aproximação GGA/PBE os aminoácidos que apresentam maior e menor carga são respectivamente: Pep. I, Lisina (K) na posição 5,  $q = +0,3256$  e Cisteína (C)  $q = -0,253$  para o Pep. II, Lisina (K) na posição 15 com  $q = +0,207$  e Arginina (R) com carga  $q = -0,140$  e para o Pep. III, as Lisinas 1 e 15 apresentam  $q = +0,0771$  e a Tirosina (Y) na posição 7 com carga  $q = -0,1321$ . Os demais aminoácidos possuem cargas distribuídas entre os dois extremos, sendo que os Pep. II e III apresentam um comportamento mais uniforme entorno de  $q = 0$  quando comparados ao Pep. I.

Pela aproximação LDA/PWC os peptídeos apresentam carga máxima e mínima respectivamente em, Pep. I na Lisina 5 com  $q = +0,2736$  e Lisina 1 com  $q = -0,3504$ , Pep. II na Lisina 2 com  $q = +0,251$  e Arginina com  $q = -0,281$  e o Pep. III na Lisina 1 com  $q = 0,197$  e Arginina com  $q = -0,1006$ . Os demais aminoácidos possuem cargas distribuídas entre os dois extremos, assim como obtido na aproximação GGA/PBE os Pep. II e III apresentam um comportamento mais uniforme entorno de  $q = 0$  quando comparados ao Pep. I.

Com dito no Capítulo 1, o modelo proposto por Lomonte e colaboradores relaciona a interação de cargas positivas na região 115-129 da PLA<sub>2</sub> Lys 49 com fosfolipídios de carga negativa como fator desestabilizador da membrana celular na atuação da miotoxina. É esperado portanto, que o aumento na densidade carga positiva na região apontada como responsável pelo mecanismo de

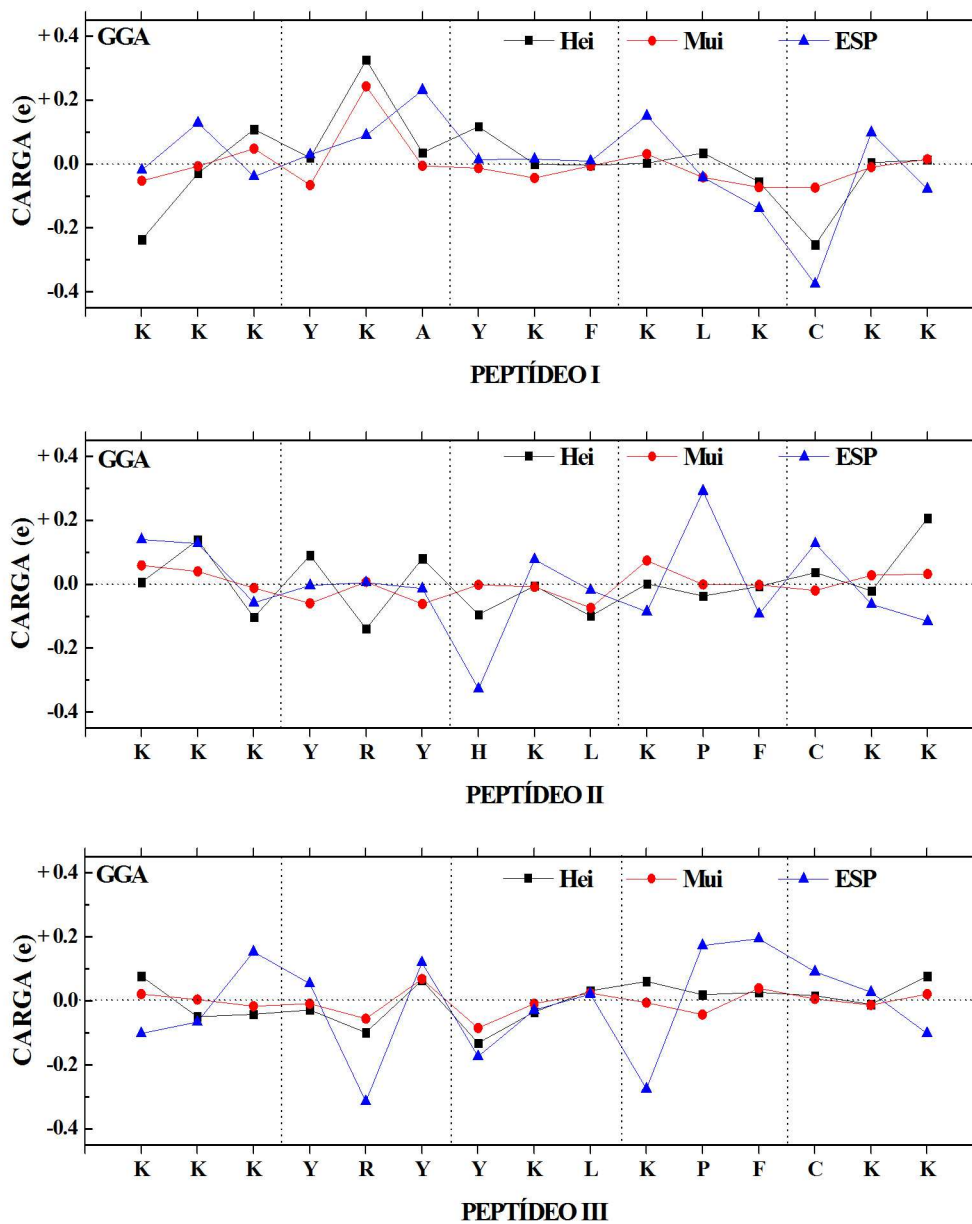


Figura 3.9: Análise populacional de cargas obtida pela aproximação GGA/PBE para os peptídeos estudados. Em azul ESP em vermelho MPA e em preto HPA.



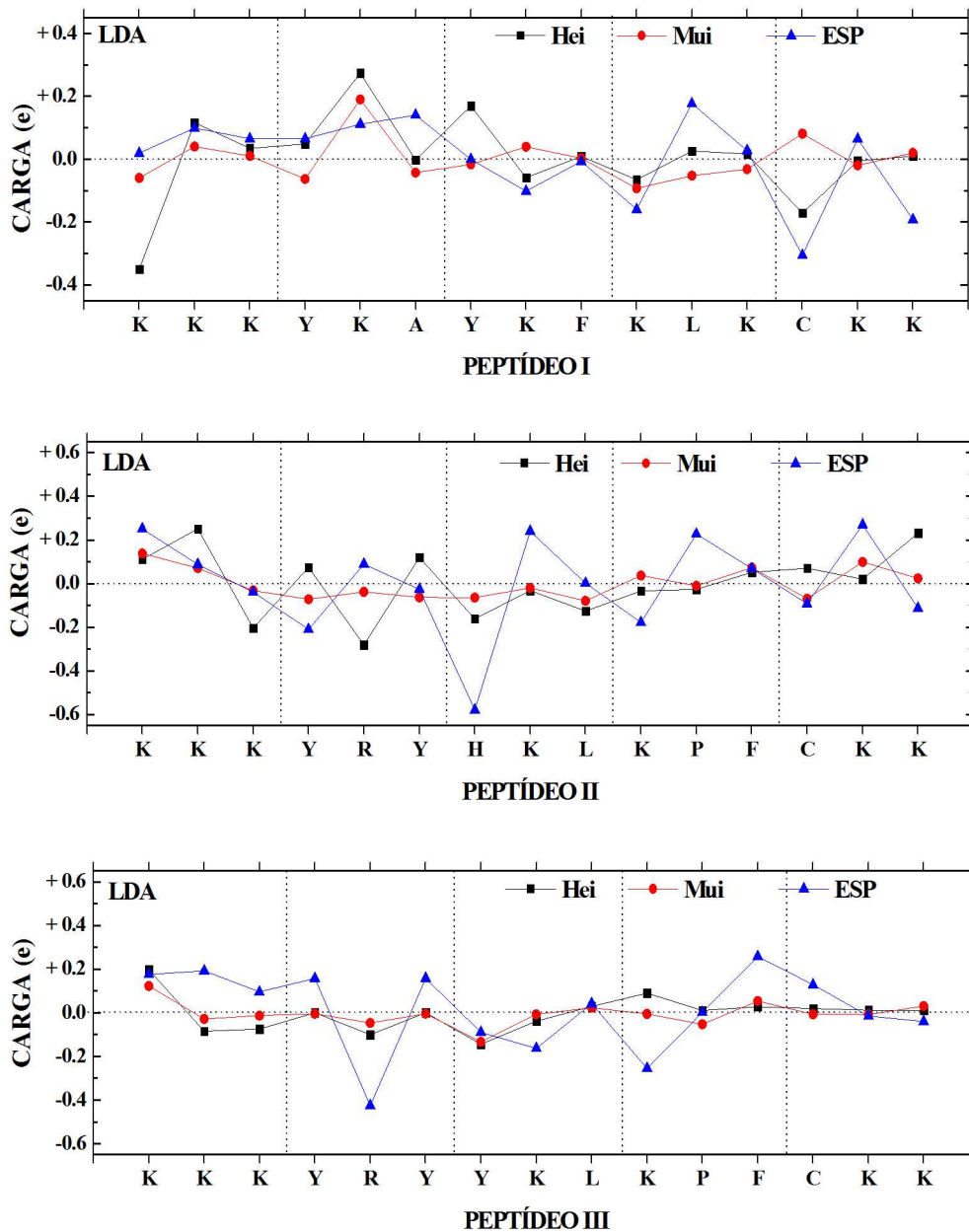


Figura 3.10: Análise populacional de cargas obtida pela aproximação LDA/PWC para os peptídeos estudados. Em azul ESP em vermelho MPA e em preto HPA.

dano celular das PLA<sub>2</sub>s acarrete em um aumento no seu potencial de dano. A análise populacional de carga mostra que alguns aminoácidos presente nos peptídeos apresentam maior carga positiva que os demais. Estes podem ser fundamentais no processo de desestabilização da membrana celular. Comparando os três peptídeos estudados, percebemos que em relação aos aminoácidos mais eletricamente positivo temos,  $q_{\text{Pep.I}} > q_{\text{Pep.II}} > q_{\text{Pep.III}}$ . A Lisina na posição 122 é conservada em todas as PLA<sub>2</sub>s Lys 49 estudadas, de modo que, artigos sugerem que ela pode desempenhar papel central no mecanismo tóxico desenvolvido pela região C-terminal. No entanto, como é possível observar por meio da análise populacional de carga, tal aminoácido apresenta carga próxima de zero o que nos leva a sugerir que se este realmente desempenha papel central no mecanismo em questão, sua contribuição pode não estar relacionada com sua interação eletrostática com a membrana celular.

### 3.4 Estudos dos Orbitais Moleculares

O conceito de Orbital Molecular é de grande importância para o estudo comportamental de moléculas. A Teoria do Orbital Molecular (TOM) é empregada extensivamente para descrever comportamentos químicos, tais como reatividade e cinética molecular. Contribuem de maneira indispensável para a descrição do comportamento eletrônico molecular, como os processos de transferência de carga e fotoexcitação. O estudo dos orbitais moleculares de fronteira HOMO (*highest occupied molecular orbital*), orbital molecular mais alto ocupado, e LUMO (*lowest un-occupied molecular orbital*), orbital mais baixo desocupado é importante pois são neles que efetivamente ocorrem as reações químicas. Os métodos que utilizam orbitais moleculares têm sido utilizados nos cálculos de diversos parâmetros de interesse químico e farmacológico.

### 3.4.1 Orbitais

As energias dos orbitais HOMO (banda de valência) e LUMO (banda de condução) são usadas como índices de reatividade química, sendo correlacionadas com índices como afinidade eletrônica e potencial de ionização. A energia do HOMO aponta o caráter elétron-doador de uma molécula, enquanto que a energia do LUMO aponta o caráter elétron-aceitador. De maneira que uma maior energia HOMO indica uma maior facilidade em doar elétrons e uma maior energia LUMO indica uma maior resistência para aceitar elétrons. O gap (diferença de energia) de energia HOMO-LUMO determina o comportamento apresentado quando na presença de um campo elétrico. Ele é um importante indicador de estabilidade química da molécula. Um gap alto significa que a molécula tem alta estabilidade e possivelmente baixa reatividade em reações químicas. O conhecimento desta diferença de energia torna possível uma aproximação a primeira excitação molecular [45, 46, 47].

Os orbitais HOMO e LUMO foram obtidos por meio das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC, Fig. (3.11, 3.12). A Tabela 2.2 apresenta as energias HOMO e LUMO e o gap HOMO-LUMO ( $\Delta E_{H-L}$ ).

Tabela 3.3: Energias obtidas para os orbitais HOMO e LUMO e o gap de energia  $\Delta E_{H-L}$  entre ambos nas aproximações GGA e LDA para a três sequências estudadas.

Peptídeos	GGA			LDA		
	$E_{HOMO}$	$E_{LUMO}$	$\Delta E_{H-L}$	$E_{HOMO}$	$E_{LUMO}$	$\Delta E_{H-L}$
<b>Pep. I</b>	-3,740eV	-2,028eV	1,712eV	-3,695eV	-2,140eV	1,555eV
<b>Pep. II</b>	-3.985eV	-2.448eV	1,537eV	-3.746eV	-2.576eV	1,170eV
<b>Pep. III</b>	-4,166eV	-1,867eV	2,299eV	-4,034eV	-2,163eV	1,871eV

Confrontando os resultados obtidos pela aproximação GGA/PBE verificamos que,  $\Delta E_{H-L_{Pep.II}} < \Delta E_{H-L_{Pep.I}} < \Delta E_{H-L_{Pep.III}}$ , o que indica que o Pep.II é mais susceptível a interagir por meios de ligações químicas em um possível interação com a membrana celular. O Pep. III é o mais estável, sendo Pep. I 25,6 % menos estável e o Pep. II 33,2 %. Para a aproximação LDA/PWC temos

$\Delta E_{H-L_{\text{Pep.II}}} < \Delta E_{H-L_{\text{Pep.I}}} < \Delta E_{H-L_{\text{Pep.III}}}$ , semelhante ao obtido pela aproximação GGA/PBE, o Pep.III é o mais estável seguido do Pep.I 16,9% menos estável e do Pep. II 37,5% . Em valores absolutos os  $\Delta E_{H-L}$  obtidos pela aproximação GGA são maiores 0,157 (9,2%), 0,367 (23,8 %) e 0,428 (18,7 %) em relação aos obtidos pela aproximação LDA para os Pep. I, Pep.II e Pep.III.

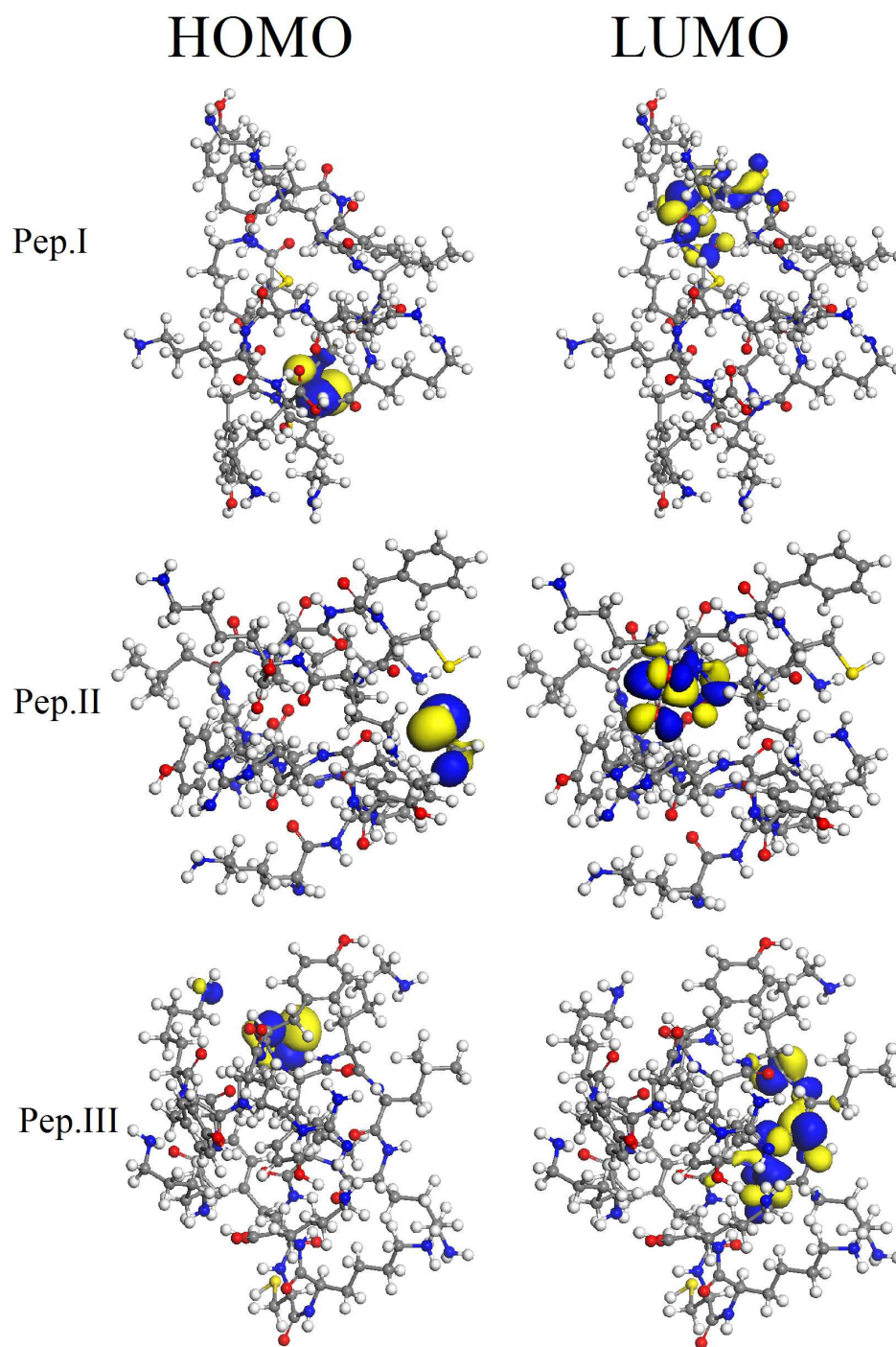


Figura 3.11: Orbitais HOMO e LUMO das sequência máxima, média e mínima calculados na aproximação GGA/PBE.

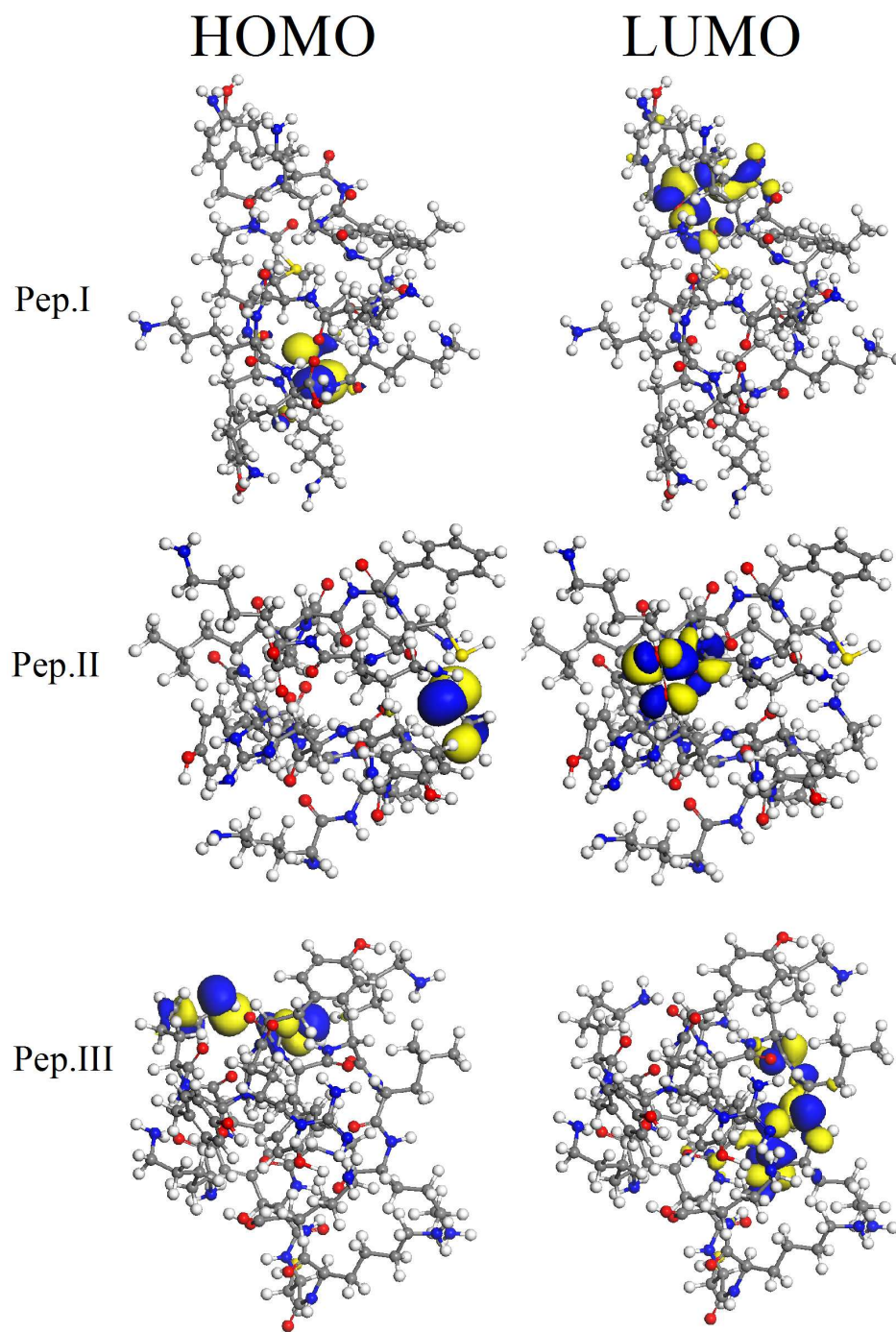


Figura 3.12: Orbitais HOMO e LUMO das sequência máxima, média e mínima calculados na aproximação LD/PWC.

### 3.4.2 Densidade Total e Parcial de Estados

A Densidade de Estados (*Density of States*- DOS) é a propriedade que quantifica a proximidade dos níveis de energia de um sistema quântico. A DOS é portanto um elemento complementar ao entendimento dos orbitais moleculares, pela qual pode-se analisar a possibilidade de uma futura transição eletrônica. Tendo em vista a constatação da disponibilidade de níveis de energia para a ocupação. É fundamentada na interpolação linear do conjunto de pontos Monkhorst-Pack. A densidade parcial de estados (*Density Partial of States*-PDOS) demonstra a contribuição de cada banda de energia para um dado orbital atômico e tem como base para os seus cálculos a análise populacional de Mulliken.

As Fig. 3.13 e 3.14 apresentam os resultados obtidos para DOS e PDOS nas aproximações GGA/PBE e LDA/PWC para os peptídeos estudados. Os gráficos apresentados a direita das respectivas figuras são diagramas DOS demonstrando a disponibilidade de estados eletrônicos. Ao lado esquerdo das figuras são apresentados os diagramas PDOS, que mostram, principalmente, a composição dos orbitais fragmentados que contribuem para os orbitais moleculares. É notável a contribuição dos orbitais p e a pouca contribuição dos orbitais s.

A energia de Fermi (energia do último nível energético ocupado) é um dado importante para a caracterização eletrônica tanto em Física do Estado Sólido como também no estudo de macromoléculas. A energia de Fermi obtida pela aproximação GGA/PBE para os peptídeos estudados é,  $-3.740\text{eV}$  (Pep.I),  $-3,985\text{eV}$  (Pep.II) e  $-4.166\text{eV}$  (Pep.III). Pela aproximação LDA/PWC a energia de Fermi é  $-3.695\text{eV}$  (Pep. I),  $-3.746\text{eV}$  (Pep. II) e  $-4.034\text{eV}$  (Pep. III).

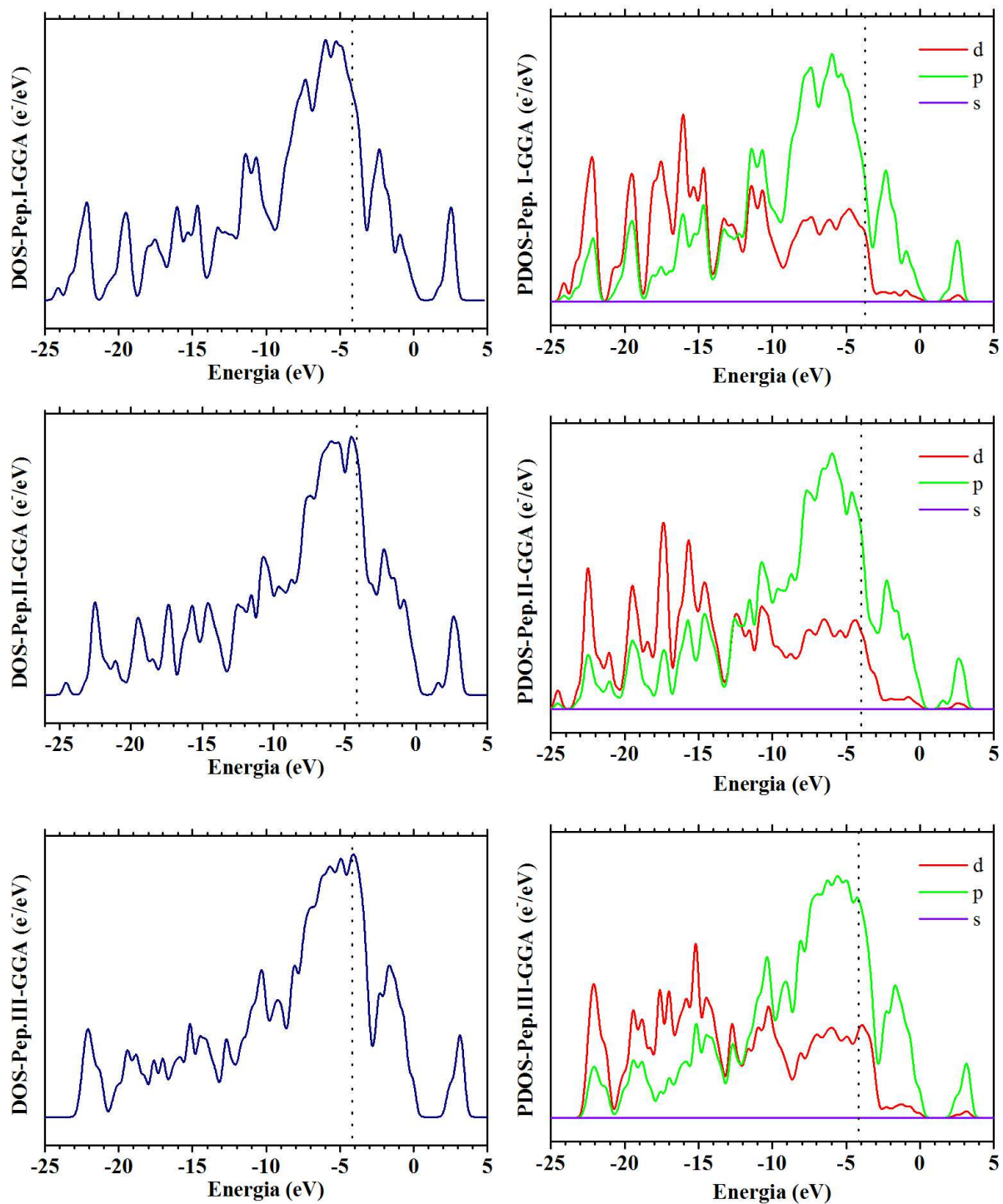


Figura 3.13: Diagramas DOS (Direita) e PDOS (Esquerda) obtidos pela aproximação GGA/PBE para os peptídeos estudados. A linha tracejada representa a energia de Fermi.



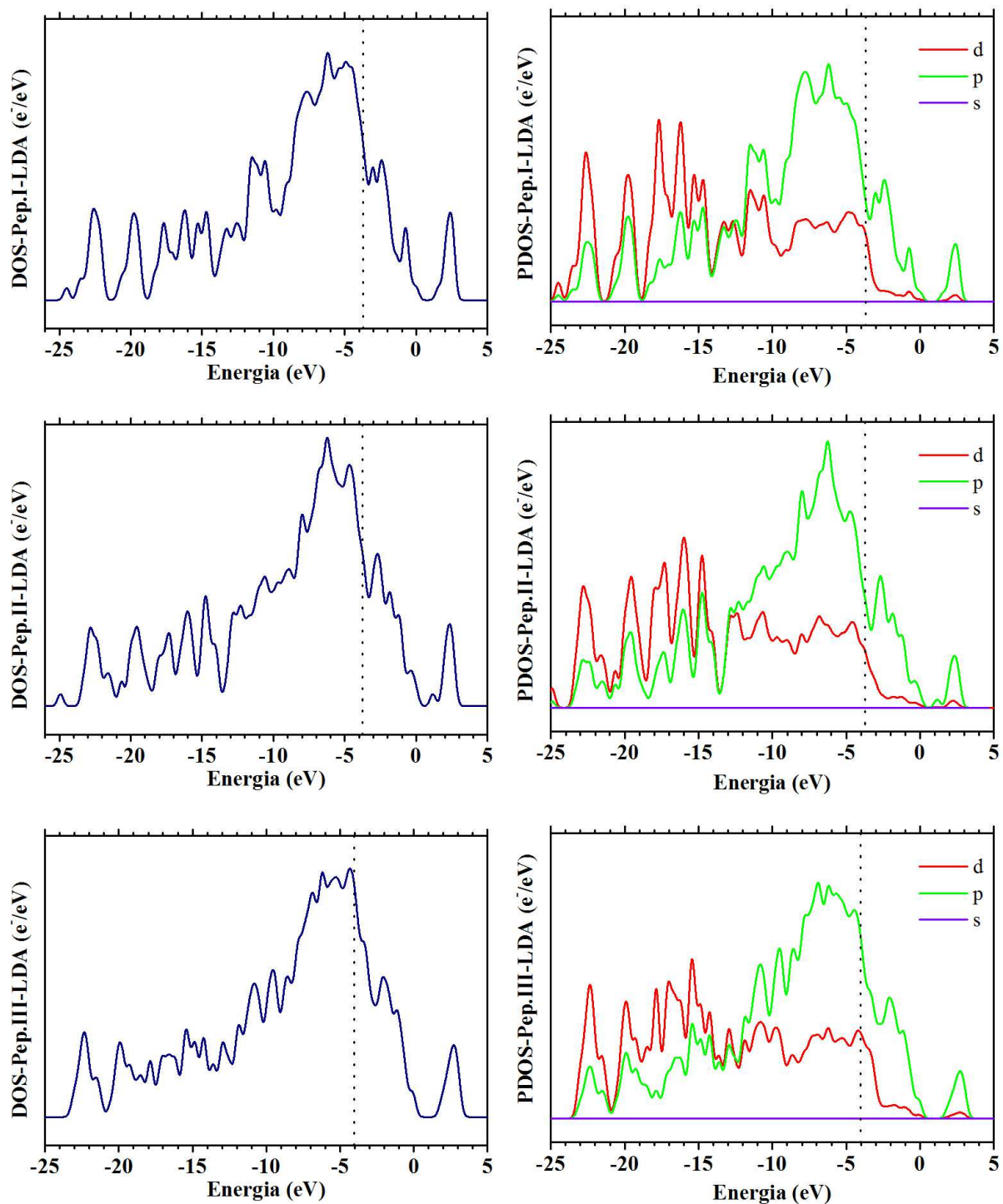


Figura 3.14: Diagramas DOS (Direita) e PDOS (Esquerda) obtidos pela aproximação LDA/PWC para os peptídeos estudados. A linha tracejada representa a energia de Fermi.

# Capítulo 4

## Propriedades Ópticas, Vibracionais e Termodinâmicas

As propriedades ópticas e vibracionais são características de cada composto químico, de modo que o conhecimento de tais propriedades pode ser usado em sua identificação. Em nossa pesquisa calculamos por meio das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC os espectros de absorção Óptica e Infravermelho. Calculamos ainda, propriedades termodinâmicas como Capacidade Térmica, Entropia, Entalpia e Energia Livre em ambas aproximações.

### 4.1 Absorção Óptica

A absorção óptica pode ser utilizada nas investigações físico-químicas e biológicas. Os espectros de absorção óptica permitem comparar a radiação absorvida por uma solução ou molécula, e desse modo podemos detectar a presença destas substâncias, seja no corpo humano ou em outro lugar. Tal absorção depende da estrutura das moléculas, e é característica para cada substância química. Calculamos os espectros de absorção óptica dos peptídeos I, II e III usando as aproximações GGA/PBE e LDA/PWC.

Para o Pep.I, a aproximação LDA/PWC revelou dois picos de absorção sendo o de maior

intensidade em 2,29 eV e o outro em 2,13 eV. O espectro de absorção obtido pela aproximação GGA/PBE apresenta três picos de absorção, em 2,28 eV, 2,45 eV e 2,57 eV sendo este último o de maior intensidade, Fig 4.1.

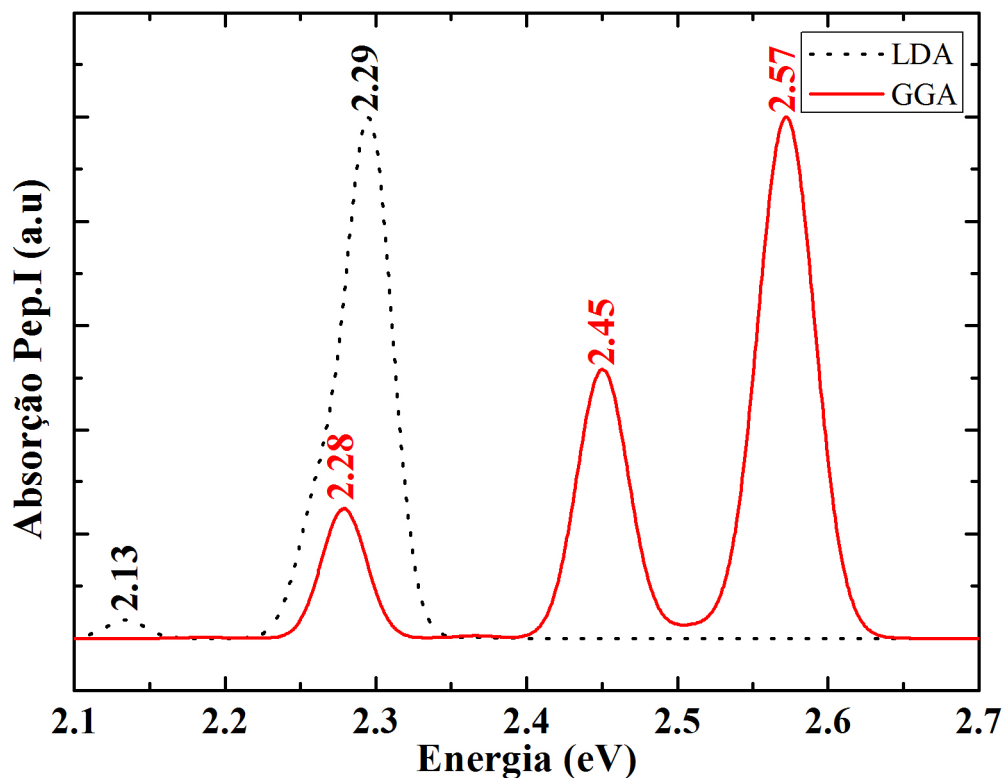


Figura 4.1: Espectro de absorção óptica obtido para o Pep.I, aproximação LDA/PWC (preto) e aproximação GGA/PBE (vermelho).

Para o Pep.II, a aproximação LDA/PWC revelou picos de absorção em 1,37 eV, 1,90 eV, 1,99 eV e 2,22 eV sendo este último o de maior intensidade. O espectro de absorção obtido através da aproximação GGA/PBE apresenta picos em 1,69 eV, 1,89 eV, 2,27 eV (maior intensidade) e 2,42 eV, Fig 4.2.

Para o Pep.III, a aproximação LDA/PWC revelou picos de absorção em 2,27 eV, 2,34 eV (maior intensidade), 2,43 eV, 2,49 eV e 2,57 eV. O espectro de absorção obtido pela aproximação GGA/PBE apresenta picos em 2,30 eV, 2,45 eV, 2,76 eV (maior intensidade) 2,84 eV, 4.3.

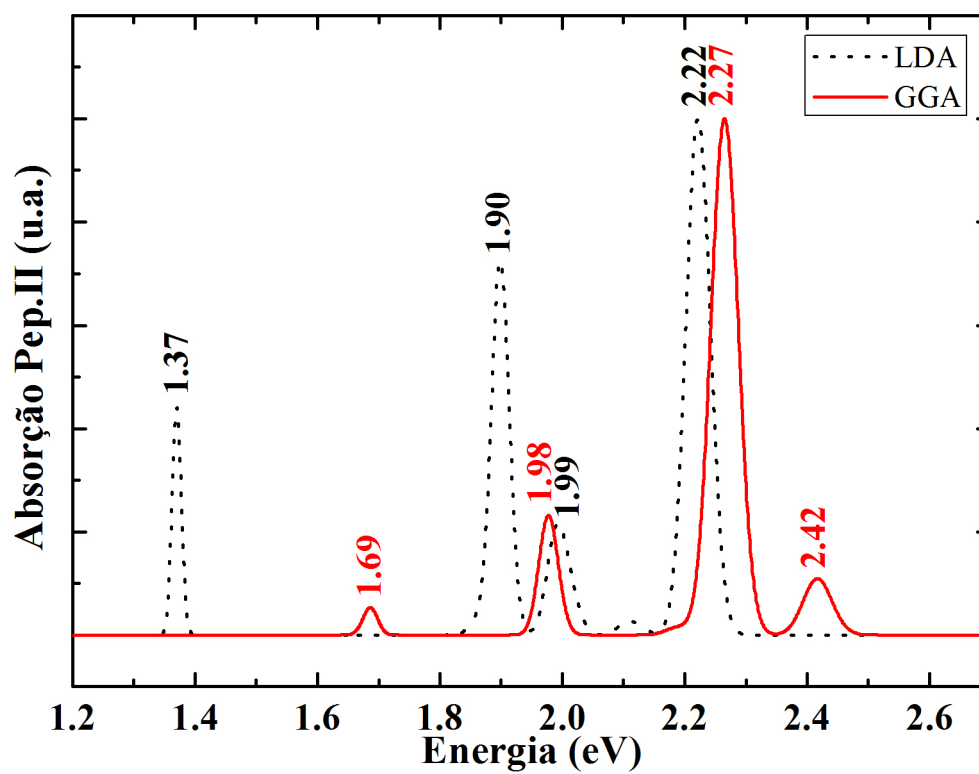


Figura 4.2: Espectro de absorção óptica obtido para o Pep.II, aproximação LDA/PWC (preto) e aproximação GGA/PBE (vermelho).

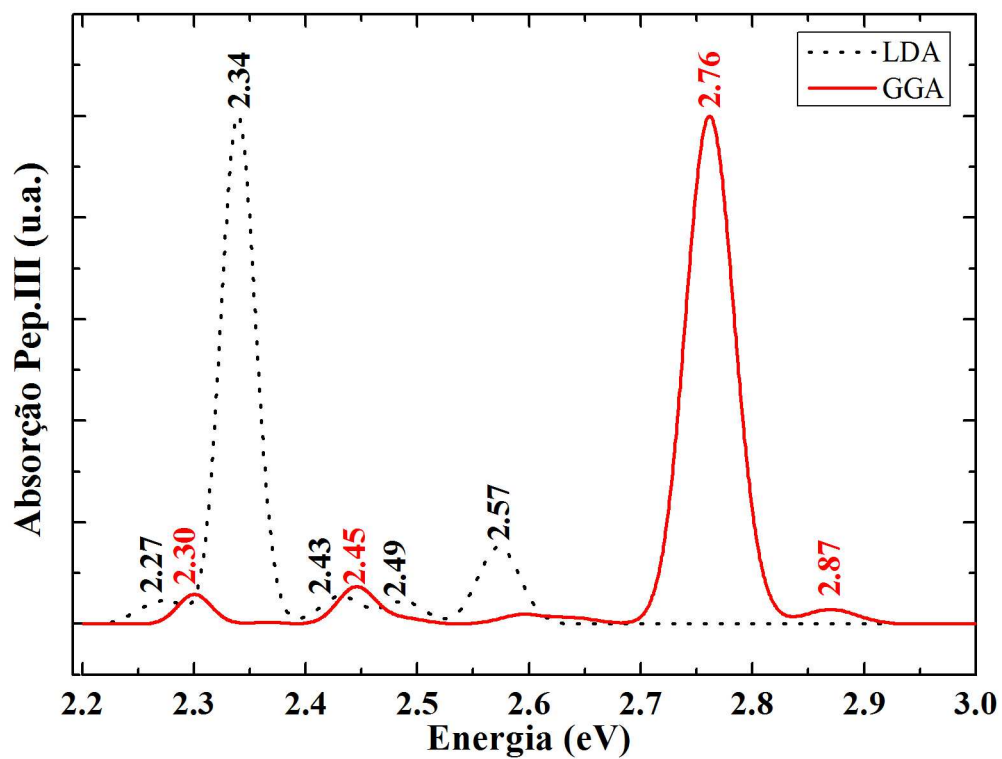


Figura 4.3: Espectro de absorção óptica obtido para o Pep.III, aproximação LDA/PWC (preto) e aproximação GGA/PBE (vermelho).

## 4.2 Espectro Infravermelho

A espectroscopia de Infravermelho (IR) se baseia nas vibrações apresentadas por moléculas quando estas são submetidas a radiação nesta região do espectro eletromagnético, levando assim à mudanças em seus momentos de dipolo elétrico [32]. Como resultado da interação da matéria com a radiação IR são obtidos os espectros de infravermelho que são característicos de cada composto químico, de modo que podem ser usados para a identificar o composto ou investigar a composição de uma amostra. Em nosso trabalho calculamos os modos normais de vibração correspondentes aos espectros IR para os peptídeos I, II e III pelas aproximações GGA/PBE e LDA/PWC.

Para o Pep.I, composto de 294 átomos e fórmula química  $C_{93}H_{158}N_{24}O_{18}S$ , foram obtidos 876 modos normais de vibração calculados pela aproximação LDA/PWC. As atribuições vibracionais dos 10 modos normais de maior intensidade são apresentadas na Tabela 4.1 e o espectro de intensidade IR é apresentado na Fig. 4.4.

Tabela 4.1: Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação LDA/PWC para o Pep.I.

Modo normal	N de onda ( $cm^{-1}$ )	Intensidade IR	Atribuição vibracional
719	2522,5	1917,66	SH-NH/Twisting
723	2761,0	1550,80	SH-NH/Twisting
843	3113,9	731,88	NH/Rocking
720	2656,0	591,80	SH-NH/Rocking
176	353,82	588,570	CH <sub>3</sub> /Rocking
702	1631,2	558,76	CO-NH/Folding
670	1499,33	501,83	NH/Stretching
829	3035,2	490,88	NH/Rocking
708	1647,1	392,32	NH <sub>2</sub> /Folding
844	3181,8	344,3	NH <sub>2</sub> /Stretching

Pela aproximação GGA/PBE foram obtidos 876 modos normais de vibração. As atribuições

vibracionais dos 10 primeiros modos normais são apresentadas na Tabela 4.2 e o espectro de intensidade IR é apresentado na Fig. 4.4.

Tabela 4.2: Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação GGA/PBE para o Pep.I.

Modo normal	N de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidade IR	Atribuição vibracional
719	2330,47	1656,46	SH/Twisting
794	3021,56	1125,93	NH-CH/Twisting
724	2866,28	812,02	NH- <sub>2</sub> /Twisting-Stretching
694	1606,14	421,05	NH - CH- CO (Twisting)
249	605,68	384,95	OH - NH <sub>2</sub> - NH/Twisting
843	3279,57	358,07	NH/Stretching
696	1609,14	333,08	CH-2 -NH <sub>2</sub> - NH - CO/Twisting-Stretching
201	423,320	303,72	NH <sub>2</sub> /Folding
842	3220,54	299,77	NH <sub>2</sub> /Rocking
301	774,56	299,52	NH <sub>2</sub> /Folding

Para o Pep.II, composto de 296 átomos e fórmula química  $\text{C}_{95}\text{H}_{155}\text{N}_{27}\text{O}_{18}\text{S}$ , foram obtidos 882 modos normais de vibração calculados pela aproximação LDA/PWC. As atribuições vibracionais dos 10 modos normais de maior intensidade são apresentadas na Tabela 4.3 e o espectro de intensidade IR é apresentado na Fig. 4.5.

Pela aproximação GGA/PBE foram obtidos 882 modos normais de vibração. As atribuições vibracionais dos 10 primeiros modos normais são apresentadas na Tabela 4.4 e o espectro de intensidade IR é apresentado na Fig. 4.5.

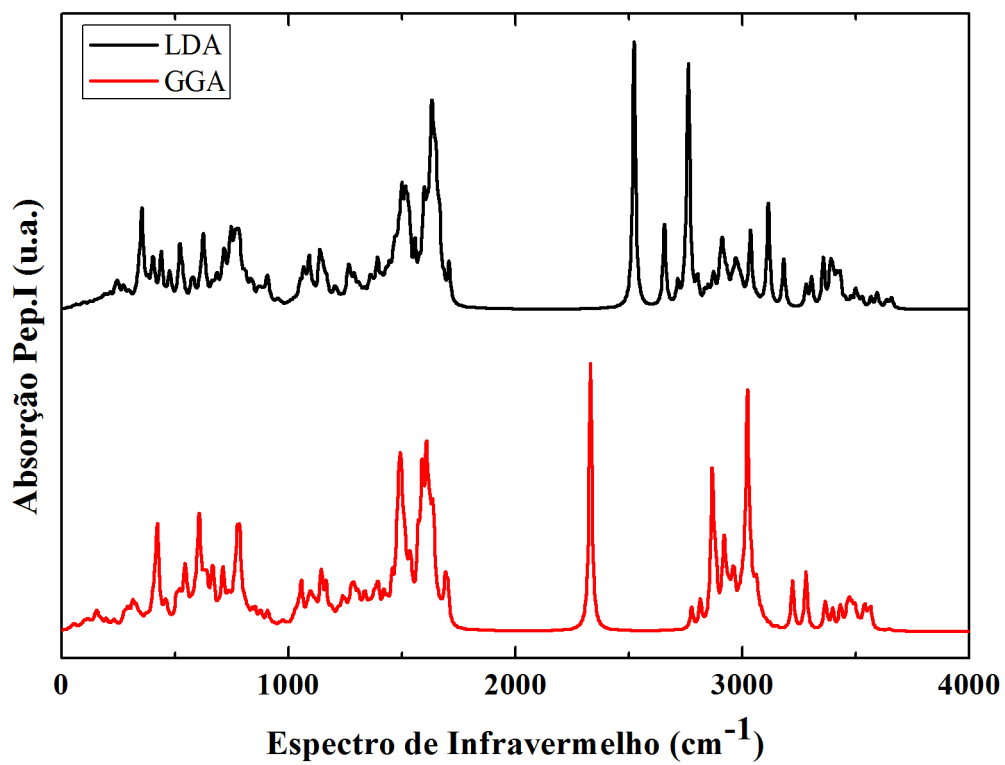


Figura 4.4: Espectro infravermelho calculado para o Pep.I através das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC.



Tabela 4.3: Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação LDA/PWC para o Pep.II.

<b>Modo normal</b>	<b>N de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intensidade IR</b>	<b>Atribuição vibracional</b>
806	2950,85	6806,54	CH(Anel Tiro- sina)/Stretching
848	3137,66	5808,28	NH/Stretching
730	2579,94	5801,04	NH/Stretching
823	2986,51	4647,74	CH (Anel Tiro- sina)/Stretching
792	2927,20	3682,01	CH (Anel Tiro- sina)/Stretching
738	2736,61	2761,36	CH/Stretching
756	2777,54	2204,69	CH-NH/Stretching
857	3316,60	2203,91	NH/Stretching
846	3073,92	2007,25	CH/Stretching
832	2995,08	1978,03	CH- CH <sub>2</sub> /Stretching

Tabela 4.4: Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação GGA/PBE para o Pep.II.

Modo normal	N de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidade IR	Atribuição vibracional
801	2978,06	5944,12	CH-NH/Stretching
828	3044,79	5801,10	CH (Anel Fenilalana- nina)/Stretching
826	3040,99	4230,19	CH (Anel Tiro- sina)/Stretching
817	3026,28	4219,26	CH (Anel da Tiro- sina)/Stretching
837	3068,84	2661,14	NH-CH (Anel Pro- lina)/Stretching
810	3011,29	2445,55	CH /Stretching
841	3084,33	2175,89	CH (Anel Tiro- sina)/Stretching
859	3403,03	2023,70	NH/Stretching
249	573,100	1885,29	NH-OH/Twisting
771	2885,53	1599,64	NH-CH (Anel Tirosina) /Stretching

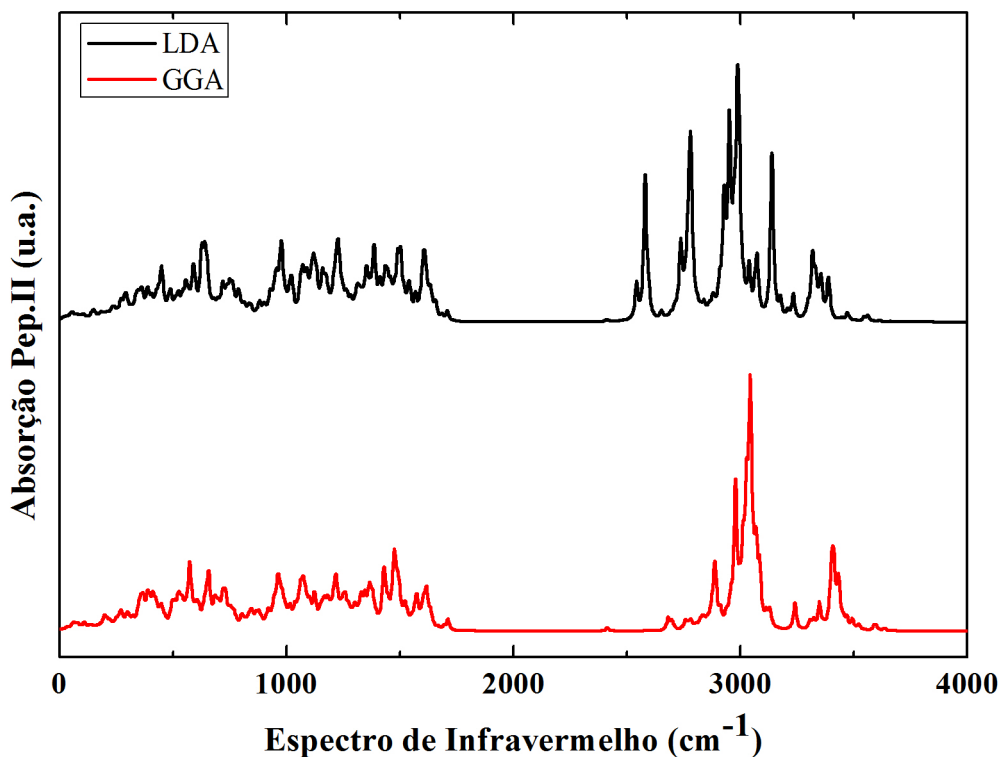


Figura 4.5: Espectro infravermelho calculado para o Pep.II através das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC.

Para o Pep.III, composto de 300 átomos de fórmula química  $C_{98}H_{157}N_{25}O_{19}S$ , foram obtidos 894 modos normais de vibração calculados pela aproximação LDA/PWC. As atribuições vibracionais dos 10 modos normais de maior intensidade são apresentadas na Tabela 4.5 e o espectro de intensidade IR é apresentado na Fig. 4.6.

Pela aproximação GGA/PBE foram obtidos 894 modos normais de vibração. As atribuições vibracionais dos 10 primeiros modos normais são apresentadas na Tabela 4.6 e o espectro de intensidade IR é apresentado na Fig. 4.5.

Tabela 4.5: Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação LDA/PWC para o Pep.III.

Modo normal	N de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidade IR	Atribuição vibracional
866	3104,16	13919,00	NH/Stretching
740	2182,69	10755,50	NH/Stretching
826	2963,59	8321,33	CH (Anel Tiro-sina)/Stretching
823	2958,26	7972,18	CH (Anel Fenilalanina)-CH/Stretching
867	3107,11	7442,61	NH/Stretching
834	2976,66	5123,78	CH(Anel Tirosina)-CH-CH <sub>2</sub> /Stretching
795	2870,44	3836,75	NH/Stretching
833	2974,33	2310,33	CH (Anel Fenilalanina)-CH/Stretching
810	2924,84	2274,20	NH (Stretching)
684	1491,56	2201,15	CH (Anel Tirosina)/Folding

Tabela 4.6: Modos normais e as respectivas atribuições vibracionais obtidos através da aproximação GGA/PBE para o Pep.III.

<b>Modo normal</b>	<b>N de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intensidade IR</b>	<b>Atribuição vibracional</b>
739	2021,19	2124,36	OH(Tirosina)-NH- CH/Stretching -Twisting
738	1802,67	1503,23	OH/Twisting
861	3250,53	663,14	NH/Stretching
745	2848,78	592,86	NH-CH/Stretching
743	2816,70	463,53	NH-CH/Stretching
722	1626,63	409,51	NH-CH-OC/Twisting- Stretching
725	1633,60	374,33	NH-CH-OC/Twisting- Stretching
712	1606,51	328,74	NH-2- NH-OH/Folding- Twisting
723	1629,94	328,57	NH-OH-CH/Twisting
706	1590,68	302,80	NH-CH-CO/Twisting- Stretching

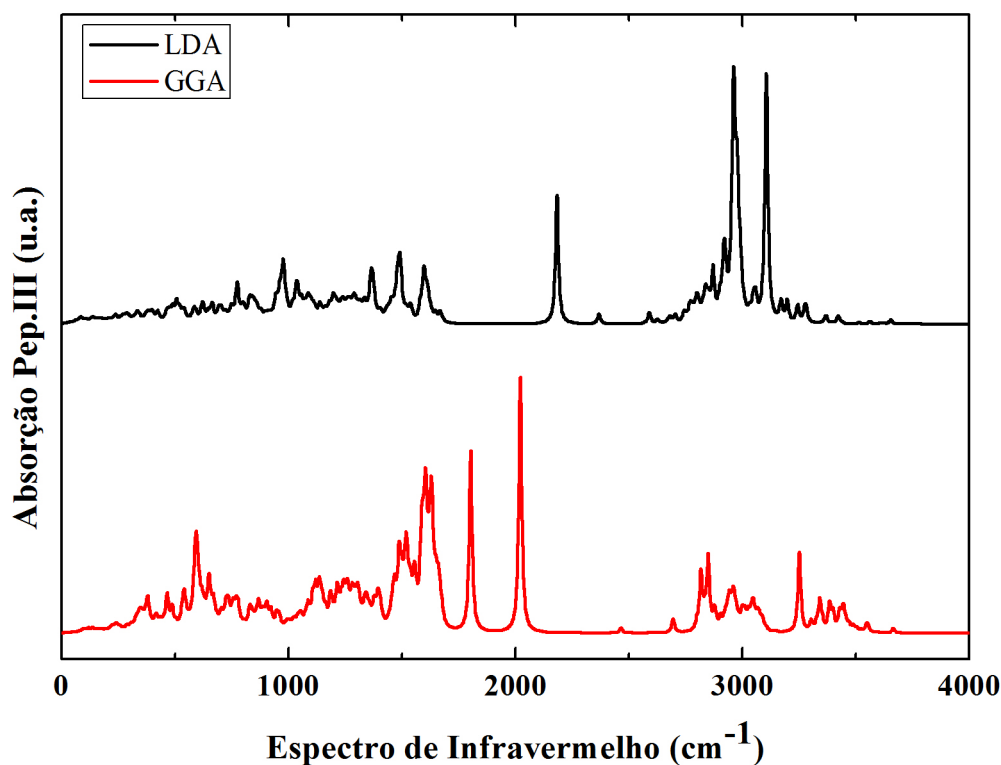


Figura 4.6: Espectro infravermelho calculado para o Pep.III através das aproximações GGA/PBE e LDA/PWC.

### 4.3 Propriedades Termodinâmicas

As propriedades termodinâmicas apresentadas nesse trabalho foram calculadas segundo o "Help" do do MS modeling a partir dos resultados obtidos pela análise vibracional. Sendo elas, a entalpia ( $H$ ), a entropia ( $S$ ), a energia livre ( $G$ ), e capacidade térmica a uma pressão constante ( $C_p$ ) na forma de funções de temperatura. Os diferentes elementos de translação, rotação, e vibracionais são usados para calcular  $H$ ,  $S$ ,  $G$  e  $C_p$  a temperaturas finitas. Os cálculos foram realizados nas aproximações GGA/PBE e LDA/PWC, a seguir apresentamos uma breve introdução a cada uma das propriedades termodinâmicas mencionadas e em seguida os resultados obtidos.

### 4.3.1 Capacidade Térmica

A capacidade térmica é uma grandeza física que expressa a relação entre quantidade de calor recebida por determinado corpo e a variação de temperatura observada. Sendo portanto definida como a razão entre quantidade de calor ( $Q$ ) e a variação de temperatura ( $\Delta T$ ) Eq.4.1. No entanto, a capacidade térmica é uma grandeza dependente da massa sendo assim uma característica do corpo e não da substância. O calor específico que é definido como capacidade térmica por unidade de massa, Eq.4.2, é uma característica da substância.

$$C = \frac{Q}{\Delta T} \quad (4.1)$$

$$c = \frac{C}{m} \quad (4.2)$$

O tratamento matemático usado pelo Dmol<sup>3</sup> segundo o "Help" do do MS modeling para as propriedades termodinâmicas, é baseado no trabalho de Hirano, de 1993. Em cada caso, são fornecidas expressões para as contribuições vibracionais, translacionais e duas expressões para as contribuições rotacionais: uma para sistemas lineares e uma para sistemas não-lineares.

Para capacidade térmica estas contribuições são:

$$C_{tra} = \frac{5}{2}R \quad (4.3)$$

$$C_{rot}(\text{linear}) = R \quad (4.4)$$

$$C_{rot}(\text{não-linear}) = \frac{3}{2}R \quad (4.5)$$

$$C_{vib} = R \sum_i \frac{(h\nu_i/kT)^2 e^{-h\nu_i/kT}}{(1 - e^{-h\nu_i/kT})^2} \quad (4.6)$$

os subscritos indicam as contribuições vibracionais, rotacionais, e de translação; R é a constante dos gases, k é constante de Boltzmann, h é a constante de Planck, e  $\nu_i$  são as frequências vibracionais individuais.

### 4.3.2 Entropia

A entropia é uma grandeza física de grande importância para diversas áreas do conhecimento, no entanto seu conceito é de difícil interpretação. Segundo a termodinâmica clássica a entropia (S) é uma função de estado a qual representa o grau de desordem de um sistema. Do ponto de vista da termodinâmica estatística, a qual tem por base o conceito de microestado que é a caracterização do sistema com base nos estados de suas partículas elementares. A entropia está associada com o número de microestados distintos compatíveis com o seu macroestado. De modo que a variação da entropia está relacionada com a variação relativa no número de microestados de um sistema.

De acordo com a segunda lei da termodinâmica em transformações irreversíveis para sistema isolados a entropia sempre aumenta e em transformações reversíveis a entropia permanece a mesma. Considerando um sistema que passa de um estado para outro muito próximo, absorvendo ou perdendo uma pequena quantidade de energia  $\Delta Q$  por calor, de modo que sua entropia tenha uma pequena variação  $\Delta S$ , temos:

$$\Delta S \geq \frac{\Delta Q}{T}, \quad (4.7)$$

onde a igualdade é válida para os processos e reversíveis e a desigualdade para os processos e irreversíveis.

Segundo o "Help" do do MS modeling o tratamento matemático para a entropia se da por meio das contribuições:



$$S_{tra} = \frac{5}{2}R \ln T + \frac{3}{2}R \ln \omega - R \ln p - 2.31482 \quad (4.8)$$

$$S_{rot}(\text{linear}) = R \ln \left[ \frac{8\pi I k T}{\sigma h^2} \right] + R \quad (4.9)$$

$$S_{rot}(\text{n\~{a}o-linear}) = \frac{R}{2} \ln \left[ \frac{\pi}{\sqrt{\sigma}} \frac{8\pi^2 c I_A}{h} \frac{8\pi^2 c I_B}{h} \frac{8\pi^2 c I_C}{h} \left( \frac{kT}{hc} \right)^3 \right] + \frac{3}{2}R \quad (4.10)$$

$$S_{vib} = R \sum_i \frac{h\nu_i/kT e^{-h\nu_i/kT}}{1 - e^{-h\nu_i/kT}} - R \sum_i \ln[1 - e^{-h\nu_i/kT}] \quad (4.11)$$

onde  $\omega$  é a massa molecular,  $I_x$  é o momento de inércia em torno do eixo x,  $\sigma$  é o número de simetria.

### 4.3.3 Entalpia

Um conceito de grande importância para a termodinâmica é o de energia interna (U) que é a energia total de um sistema. Esta energia é compreendida pela soma das energias cinética e potencial de todas as moléculas que compõem o sistema. A variação da energia interna de um sistema, entre dois estados é dada por:

$$\Delta U = U_f - U_i, \quad (4.12)$$

sendo U uma função de estado qualquer variação nas variáveis de estado (volume, pressão e temperatura) acarretará uma variação da mesma. É possível variar a energia interna de um sistema pela realização de trabalho ou trocas de calor, o que é expresso na primeira lei da termodinâmica:

$$\Delta U = Q + W, \quad (4.13)$$

onde Q representa o calor trocado com o sistema e W o trabalho realizado.

Entalpia (H) por sua vez é a energia máxima de um sistema termodinâmico que pode ser removida na forma de calor. A entalpia engloba a energia interna mais a energia armazenada no conjunto sistema-vizinhança. Quando o volume não é constante, a variação da energia interna expressa na primeira lei da termodinâmica é diferente da energia transferida na forma de calor, pois parte dessa energia transferida transforma-se em trabalho. Quando a pressão é constante a energia fornecida na forma de calor é igual a variação da Entalpia.

Matematicamente a entalpia é definida como:

$$H = U + pV, \quad (4.14)$$

sendo U uma função de estado, percebemos que a entalpia também é um função de estado uma vez que é escrita em função da variáveis p,V e T.

Segundo o "Help"do do MS modeling o tratamento matemático para a entalpia se da por meio das contribuições:

$$E_{tra} = \frac{3}{2}RT \quad (4.15)$$

$$E_{rot}(\text{linear}) = RT \quad (4.16)$$

$$E_{rot}(\text{não-linear}) = \frac{3}{2}RT \quad (4.17)$$

$$E_{vib} = \frac{R}{k} \frac{1}{2} \sum_i h\nu_i + \frac{R}{k} \sum_i \frac{h\nu_i e^{-h\nu_i/kT}}{1 - e^{-h\nu_i/kT}} \quad (4.18)$$

### 4.3.4 Energia Livre

Do enunciado de Kelvin para a segunda lei da termodinâmica sabemos que é impossível a conversão integral da energia de um sistema em trabalho. A parcela da energia contida em um sistema que pode ser convertida em trabalho é dita *energia livre* e é definida como a diferença entre a energia total do sistema e o produto da entropia (S) pela temperatura (T). Ao falarmos em energia "total" é possível associarmos à energia interna do sistema (U) ou à entalpia (H) de modo que é possível obter duas energias livre para o sistema: energia livre de Helmholtz (F) e a energia livre de Gibbs (G).

Quando é considerada como energia total do sistema a energia interna, a energia livre em questão será a de Helmholtz, dado por:

$$F = U - TS \quad (4.19)$$

Quando é levada em consideração a entalpia como energia total do sistema a energia livre em questão será a de Gibbs, dada por:

$$G = H - TS \quad (4.20)$$

O conhecimento da energia livre de um sistema nos dá indícios da espontaneidade da transformação. Uma transformação a temperatura e o volume constantes é espontânea se houver uma diminuição na energia livre de Helmholtz, ou seja,  $dF_{T,V} \leq 0$ . Se isso não se observa o sistema tende a evoluir no sentido inverso. A condição de equilíbrio é dado por  $dF_{T,V} \leq 0$ . Transformações a T e p constantes, a condição de espontaneidade é a diminuição da energia de Gibbs, ou seja,  $dG_{T,p} \leq 0$ . Se isso não é observado o sistema tende a evoluir no sentido inverso tendo a condição de equilíbrio dada por  $dG_{T,p} \leq 0$ .

### 4.3.5 Resultados Termodinâmicos

Os peptídeos analisados possuem massas semelhantes 1931,50 g/mol (Pep.I), 1995,52 g/mol (Pep.II) e 2021,55 g/mol (Pep.III). Sendo a capacidade térmica uma grandeza extensiva, é esperado que  $\text{Pep.I} < \text{Pep.II} < \text{Pep.III}$ . A variação da capacidade térmica obtida pela aproximação LDA/PWC é de 1227,654 cal/molK para o Pep.I, 1232,003 cal/molK para o Pep.II e de 1265,111 cal/mol K. Pela aproximação GGA/PBE a variação da capacidade térmica é 1214,778 cal/molK para o Pep.I, 1215,598 cal/molK para o Pep.II e de 1278,151 cal/mol K para o Pep.III. Este resultados são apresentados na Fig.4.7.

Analisando os resultados obtidos para a variação da entropia é notável que em ambas as aproximações LDA/PWC e GGA/PBE os peptídeos apresentam comportamento semelhantes. No entanto, a diferença entre as variações da entropia na aproximação LDA/PWC se mostra menor do que na aproximação GGA/PBE. Pela aproximação LDA/PWC a variação da entropia foi de 1650,117 cal/molK para o Pep.I, 1643,857 cal/molK para o Pep.II e de 1650,422 cal/molK. Para aproximação GGA/PBE a variação da entropia foi 1639,466 cal/molK para o Pep.I, 1611,881 cal/molK para o Pep.II e 1749,976 cal/molK para o Pep.III. Estes resultados são apresentados na Fig.4.8.

A variação de entalpia calculada pela aproximação LDA/PWC ocorre em todos os peptídeos de forma semelhante, sendo 776,412 kcal/mol para o Pep.I, 777,857 kcal/mol para o Pep.II e 788,776 kcal/mol para o Pep.III. A variação da entalpia obtida pela aproximação GGA/PBE é de 769,955 kcal/mol para o Pep.I, 764,935 kcal/mol para o Pep.II e 817,336 kcal/mol para o Pep.III. Estes resultados são apresentados na Fig.4.9.

A variação da energia livre, assim como as demais propriedades estudadas apresenta comportamento semelhante em todos os peptídeos, sendo em valores absolutos para a aproximação LDA/PWC 971,204 kcal/mol para o Pep.I, 968,186 kcal/mol para o Pep.II e de 952,614 kcal/mol. A variação obtida por meio da aproximação GGA/PBE é em valores absolutos 968,415 kcal/mol

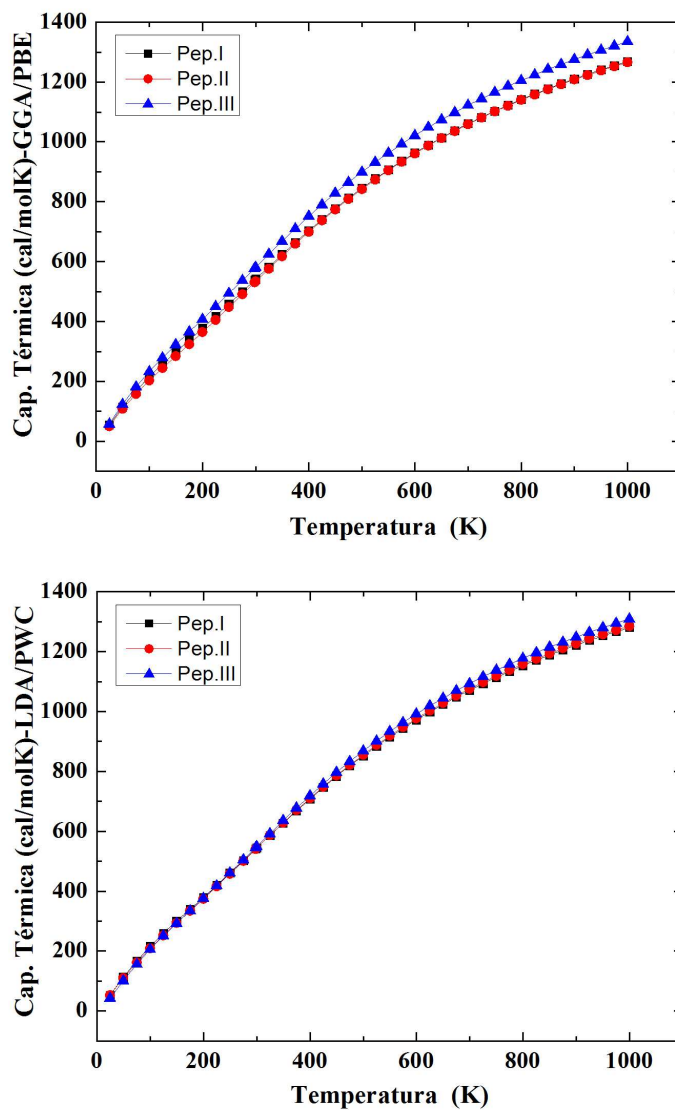


Figura 4.7: Capacidade Térmica obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior).

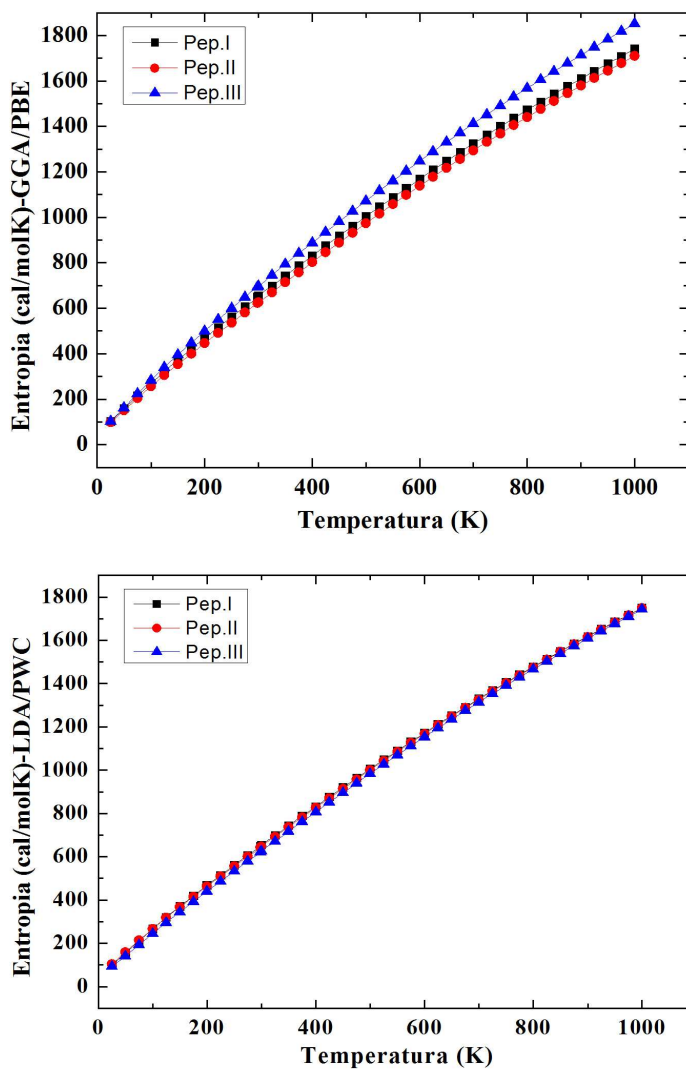


Figura 4.8: Entropia obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior).

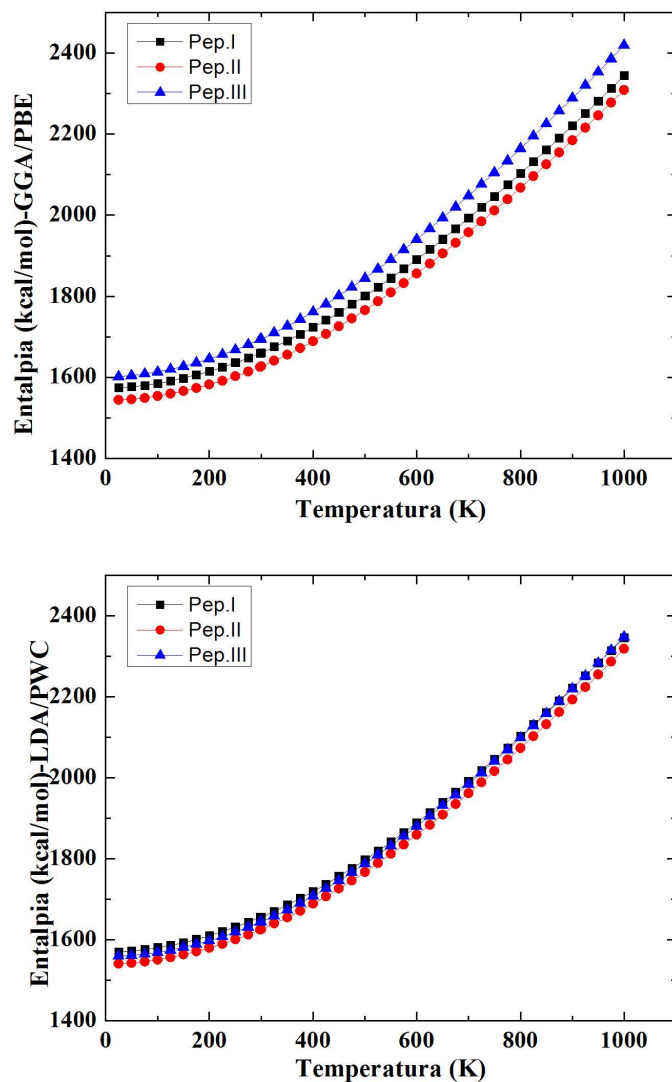


Figura 4.9: Entalpia obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior).

para o Pep.I, 942,415 kcal/mol para o Pep.II e 1032,272 kcal/mol para o Pep.III. Este resultados são apresentados na Fig. 4.10.

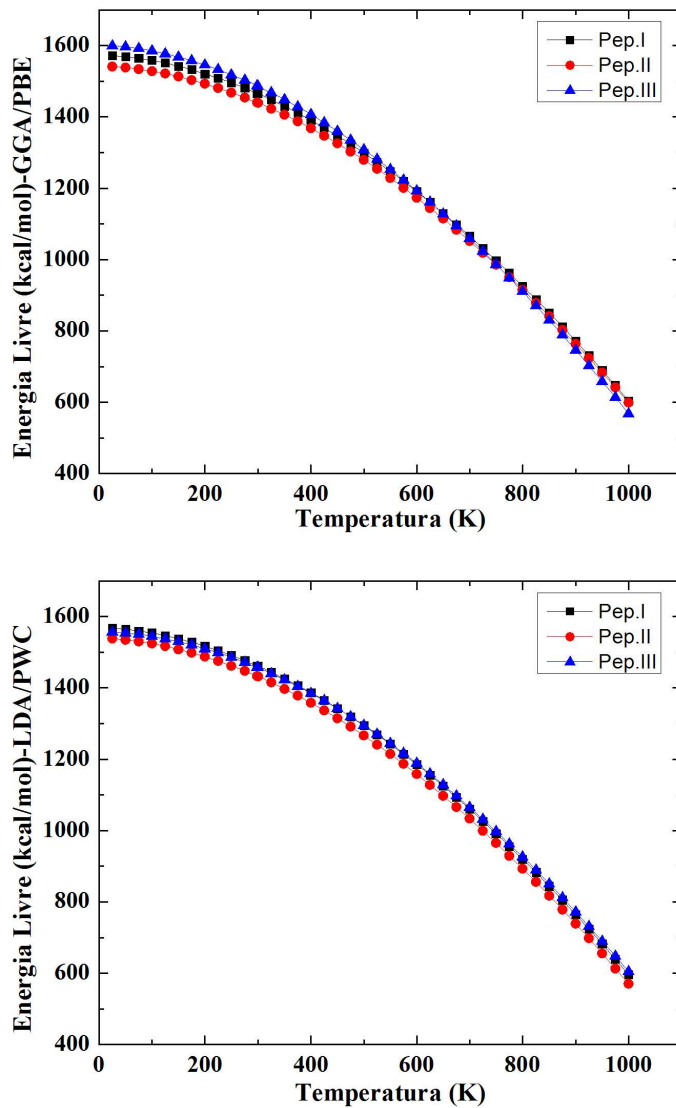


Figura 4.10: Energia Livre obtida para os peptídeos I, II e III por meio das aproximações GGA/PBE (Superior) e LDA/PWC (Inferior).



# Capítulo 5

## Conclusões

Os propriedades eletrônicas apresentadas neste capítulo indicam que a interação C-terminal com a membrana celular pode ser predominantemente eletrostática. A curva corrente voltagem demonstra comportamento semicondutor para os peptídeos. Por meio da análise populacional de carga demonstramos que o aminoácido Lisina 122 possui carga elétrica zero. Fato que indica que tal aminoácido pode não possuir papel fundamental no mecanismo da PLA<sub>2</sub> Lisina 49, como é descrito na literatura. O estudo dos orbitais de fronteira mostraram que o peptídeo mais estável é o III seguido do I e do II. Comparando a área acessível ao solvente com os resultados obtidos por Lomonte et al, 2003 observa-se que não é possível estabelecer uma relação direta com a intensidade de dano a membrana. Dentre os três peptídeos simulados o que causa maior dano a membrana não possui maior área acessível ao solvente. Este fato indica que o processo de dano a membrana celular tender a ser mais energético do que estrutural. As propriedades ópticas e vibracionais são características particulares de cada composto químico. De modo que os dados obtidos servem como uma "digital" dos peptídeos estudados, podendo ser usados em futuras identificações. Os picos de absorção óptica para os três peptídeos se encontram dentro da região do visível, como é esperado para moléculas biológicas. As propriedades termodinâmicas apresentadas demonstram similaridade. Fato esperado devido aos peptídeos possuírem em suas composições os mesmos aminoácidos, com poucas exceções. Esses dados termodinâmicos servem como base para futuras investigações.

# Perspectivas

As principais perspectivas para futuro desenvolvimento do trabalho apresentado aqui incluem:

1. Realizar novas simulações com o intuito de caracterizar as interações entre os peptídeos estudados e a membrana celular.
2. Simular o comportamento da região C-terminal envolvida em água.
3. Realizar estudo similar com outras espécies e confrontar os dados obtidos.
4. Caracterizar de modo análogo a este trabalho regiões proteicas responsáveis pela toxicidade em outras toxinas.

# Referências Bibliográficas

- [1] Dalton Luiz Ferreira Alves. Estudos e proposições sobre a padronização de venenos e antivenenos ofídicos de interesse médico para o brasil. 1999.
- [2] E Cunha and O Martins. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros bothrops e crotalus—uma revisão. *Revista Eletrônica de Educação e Ciência*, 2(2):21–26, 2012.
- [3] Karla Graziella Moreira. Estudo dos componentes protéicos da peçonha da serpente micrurus frontalis (serpentes: elapidae). 2011.
- [4] Priscila L Hess and Carla C Squaiella-Baptistão. Toxinas animais: Serpentes da família colubridae e seus venenos.
- [5] JOSÉ VITELIO RUIZ RIVERO. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno de bothrops jararacussu em células mononucleares do sangue periférico.
- [6] Renner de Souza Leite. Efeito de uma fosfolipase A<sub>2</sub> lisina 49, ACL miotoxina, do veneno da serpente *agkistrodon contortrix laticinctus* sobre o transpote de água em bexiga urinária isolada de sapo. 2010.
- [7] David A Six and Edward A Dennis. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1):1–19, 2000.

- [8] RK Arni and RJ Ward. Phospholipase A<sub>2</sub>—a structural review. *Toxicon*, 34(8):827–841, 1996.
- [9] Charlotte L Ownby, Heloisa S Selistre de Araujo, Steven P White, and Jeffrey E Fletcher. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon*, 37(3):411–445, 1999.
- [10] Carlos Alexandre Henrique Fernandes. Estudos estruturais com fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas de venenos de serpentes dos gêneros bothrops e crotalus. 2013.
- [11] Andre Luis Berteli Ambrosio. Estudo da interação entre ácidos graxos e Lys49-fosfolipases A<sub>2</sub> por difração de raios X e ressonância magnética nuclear. Master's thesis, Universidade de São Paulo, 2003.
- [12] Paul N Barlow, MD Lister, PB Sigler, and EA Dennis. Probing the role of substrate conformation in phospholipase A<sub>2</sub> action on aggregated phospholipids using constrained phosphatidylcholine analogues. *Journal of Biological Chemistry*, 263(26):12954–12958, 1988.
- [13] Sarah Glover, Timothy Bayburt, Mechthild Jonas, Emil Chi, and Michael H Gelb. Translocation of the 85-kDa phospholipase A<sub>2</sub> from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or ige/antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 270(25):15359–15367, 1995.
- [14] Mahendra Kumar Jain, Bao-Zhu Yu, and Arek Kozubek. Binding of phospholipase a<sub>2</sub> to zwitterionic bilayers is promoted by lateral segregation of anionic amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 980(1):23–32, 1989.
- [15] Ralph H Schaloske and Edward A Dennis. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(11):1246–1259, 2006.
- [16] Ivo MB Francischetti, Helena C Castro, Russolina B Zingali, Célia R Carlini, and Jorge A Guimarães. Bothrops sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical

- properties and interference in platelet functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 119(1):21–29, 1998.
- [17] Bruno Lomonte, Yamileth Angulo, and Leonel Calderón. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42(8):885–901, 2003.
- [18] José María Gutiérrez and Bruno Lomonte. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from bothrops snake venoms. *Toxicon*, 33(11):1405–1424, 1995.
- [19] Bruno Lomonte, Yamileth Angulo, Stefano Rufini, Wonhwa Cho, José Roberto Giglio, Moto-nori Ohno, José Julián Daniele, Patricia Geoghegan, and José Maria Gutiérrez. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) cells *in vitro*. *Toxicon*, 37(1):145–158, 1999.
- [20] Carlos Santamaría Bruno Lomonte, Yamileth Angulo. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. *Elsevier*, 2003.
- [21] M Perbandt, JC Wilson, S Eschenburg, I Mancheva, B Aleksiev, N Genov, P Willingmann, W Weber, TP Singh, and Ch Betzel. Crystal structure of vipoxin at 2.0 Å: an example of regulation of a toxic function generated by molecular evolution. *FEBS letters*, 412(3):573–577, 1997.
- [22] Roland Renetseder, Simone Brunie, Bauke W Dijkstra, Jan Drenth, and Paul B Sigler. A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and crotalus atrox venom. *Journal of Biological Chemistry*, 260(21):11627–11634, 1985.
- [23] Andre LB Ambrosio, M Cristina Nonato, Heloísa S Selistre de Araújo, Raghuvir Arni, Richard J Ward, Charlotte L Ownby, Dulce HF de Souza, and Richard C Garratt. A molecu-

- lar mechanism for Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> activity based on ligand-induced conformational change. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8):7326–7335, 2005.
- [24] Cicilia de Carvalho. Ação do extrato bruto da tabernaemontana catharinensis e de seu alcalóide isolado sobre as atividades de fosfolipases A<sub>2</sub> ofídicas em preparação neuromuscular de camundongos. 2011.
- [25] Jeffrey E Fletcher and Ming-shi Jiang. Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. *Toxicon*, 36(11):1549–1555, 1998.
- [26] Mariana Cintra-Francischinelli, Paola Pizzo, Yamileth Angulo, José M Gutiérrez, Cesare Montecucco, and Bruno Lomonte. The c-terminal region of a lys 49 myotoxin mediates ca<sup>2+</sup> influx in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes. *Toxicon*, 55(2):590–596, 2010.
- [27] Lucimara Chioato, Arthur HC De Oliveira, Roberto Ruller, et al. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemical Journal*, 366(3):971–976, 2002.
- [28] Bruno Lomonte, Yamileth Angulo, and Carlos Santamaría. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. *Toxicon*, 42(3):307–312, 2003.
- [29] Bruno Lomonte, Andrej Tarkowski, Ulf Bagge, and Lars Å Hanson. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A<sub>2</sub> from bothrops asper snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochemical pharmacology*, 47(9):1509–1518, 1994.
- [30] Mariana Cintra-Francischinelli, Paola Caccin, Angela Chiavegato, Paola Pizzo, Giorgio Carmignoto, Yamileth Angulo, Bruno Lomonte, José María Gutiérrez, and Cesare Montecucco. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell

- damage and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32):14140–14145, 2010.
- [31] José de Miranda Henriques Neto. *Cálculos ab initio de propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas de compostos  $\text{CaXO}_3$* . PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.
- [32] Nilton Ferreira Frazão. *Bioquímica Quântica de Fármacos Anti-Parkinsonianos*. PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.
- [33] Samuel Andrade do Nascimento. Caracterização vibracional, termodinâmica e optoeletrônica de inibidores de acetilcolinesterase. Master's thesis, Universidade Federal de Campina Grande, 2014.
- [34] John P Perdew, Kieron Burke, and Matthias Ernzerhof. Generalized gradient approximation made simple. *Physical review letters*, 77(18):3865, 1996.
- [35] Accelrys. <http://accelrys.com/products/materials-studio/index.html>, 2016. Access date: 29 mar. 2016.
- [36] Drug Bank. <http://www.drugbank.ca>, 2016. Access date: 29 mar. 2016.
- [37] Leila Figueiredo de Miranda. A necessidade dos sólidos conceitos fundamentais para o desenvolvimento das fronteiras tecnológicas.
- [38] Eudenilson L Albuquerque, UL Fulco, VN Freire, EWS Caetano, ML Lyra, and FABF de Moura. DNA-based nanobiostructured devices: The role of quasiperiodicity and correlation effects. *Physics Reports*, 535(4):139–209, 2014.
- [39] JIN Oliveira, EL Albuquerque, UL Fulco, PW Mauriz, and RG Sarmiento. Electronic transport through oligopeptide chains: An artificial prototype of a molecular diode. *Chemical Physics Letters*, 612:14–19, 2014.

- [40] Ricardo Gondim Sarmiento. Condução eletrônica e propriedades termodinâmicas da molécula de DNA. 2012.
- [41] JIN Oliveira, EL Albuquerque, UL Fulco, PW Mauriz, RG Sarmiento, EWS Caetano, and VN Freire. Conductance of single micrnas chains related to the autism spectrum disorder. *EPL (Europhysics Letters)*, 107(6):68006, 2014.
- [42] RG Sarmiento, UL Fulco, EL Albuquerque, EWS Caetano, and VN Freire. A renormalization approach to describe charge transport in quasiperiodic dangling backbone ladder (dbl)-dna molecules. *Physics Letters A*, 375(45):3993–3996, 2011.
- [43] RG Sarmiento, GA Mendes, EL Albuquerque, UL Fulco, MS Vasconcelos, O Ujsághy, VN Freire, and EWS Caetano. The dna electronic specific heat at low temperature: The role of aperiodicity. *Physics Letters A*, 376(35):2413–2417, 2012.
- [44] Célia Fonseca Guerra, Jan-Willem Handgraaf, Evert Jan Baerends, and F Matthias Bickelhaupt. Voronoi deformation density (vdd) charges: Assessment of the mulliken, bader, hirshfeld, weinhold, and vdd methods for charge analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(2):189–210, 2004.
- [45] Valdemar Lacerda Júnior, Kleber Thiago de Oliveira, Rodrigo Costa Silva, Mauricio Gomes Constantino, and Gil Valdo José da Silva. Reactivity in diels-alder reactions: a computational experiment. *Química Nova*, 30(3):727–730, 2007.
- [46] Cleydson BR Santos, Cleison C Lobato, Francinaldo S Braga, Sílvia SS Morais, Cesar F Santos, Caio P Fernandes, Davi SB Brasil, Lorane IS Hage-Melim, Williams JC Macêdo, and José CT Carvalho. Application of hartree-fock method for modeling of bioactive molecules using sar and qspr. *Computational Molecular Bioscience*, 2014, 2014.
- [47] Gang Zhang and Charles B Musgrave. Comparison of dft methods for molecular orbital eigenvalue calculations. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(8):1554–1561, 2007.