



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Um Estudo Teórico da Doxorrubicina: Espectroscopia no
UV/Vis e Reatividade.

Edvonaldo Florêncio e Silva

São Cristóvão/SE
Março de 2013

Um Estudo Teórico da Doxorrubicina: Espectroscopia no UV/Vis e Reatividade.

Edvonaldo Florêncio e Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade
Federal de Sergipe, como
requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Jr.

São Cristóvão/SE
Março de 2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586e Silva, Edvonaldo Florêncio e
Um estudo teórico da doxorubicina; espectroscopia no UV/Vis e reatividade / Edvonaldo Florêncio e Silva; orientador Nivan Bezerra da Costa Jr. – São Cristóvão, 2013.
59 f.; il.

Dissertação (mestrado em Química)–Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Tautomerismo. 2. Isomerismo dinâmico. 3. Química computacional. 4. Doxorubicina. I. Costa Junior, Nivan Bezerra. II. Título.

CDU 544.127:004.4

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Edvonaldo Florêncio e Silva apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 08/03/2013.



Prof. Dr. Nivaldo Bezerra da Costa Júnior
DQI, UFS



Prof. Dr. Marcelo Leite dos Santos
DQCI, UFS



Prof. Dr. Jorge Luiz Neves
DQF, UFPE

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashik

A **Deus**, por sempre me iluminar e guiar, por me mostrar o caminho certo, pelo dom do discernimento e por me fazer acreditar em mim.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Júnior**, na posição de orientador, pelos tantos e inesquecíveis ensinamentos, paciência e as preciosas broncas construtivas. Pessoa capaz de entender a minha falta de tempo e sempre conseguir dar uma solução. Sou inteiramente grato por essa orientação que vai além desta dissertação, amizade e principalmente pelo bom convívio e sempre por acreditar que tudo seria possível.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Leite dos Santos (DQCI/UFS)**, por suas colocações construtivas em avaliar e sugerir sempre acreditando que tudo seria possível, com muito carinho e dedicação. Fica o meu eterno agradecimento.

À **Prof^a. Dr^a. Iara de Fátima Gimenez (DQI/UFS)**, agradeço de coração todo apoio e colocações construtivas nos momentos difíceis.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Oliveira Freire (DQI/UFS)**, sempre disponível com palavras de incentivo no momento mais difícil desta caminhada.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Química, **Prof^a. Dr^a. Luciane Pimenta Cruz Romão (DQI/UFS)** e **Prof. Dr. Ricardo Freire**, por seus desempenhos visando à melhoria do curso de mestrado.

À **Prof^a. Dr^a. Viviane Costa Felicíssimo (DQI/UFS)**, por toda sua alegria, educação e dedicação em seus ensinamentos.

Ao mestrando **José Diogo de Lisboa Dutra**, um agradecimento mais que especial ao amigo, colega, e meu braço direito em toda essa minha caminhada. Agradeço eternamente toda sua dedicação, compreensão e ensinamentos, que abraçou esta causa sempre acreditando e incentivando que tudo seria possível. Agradeço a sua humildade, simplicidade, força e risos, desde os momentos mais difíceis, onde tudo parecia perdido até a conclusão do trabalho. Indiscutivelmente sem sua força, eu não teria chegado ao final. Fica meu eterno agradecimento.

Agradecimento mais que importante aos amigos e pessoas fundamentais para realização deste trabalho, sobretudo pelo clima de descontração propiciado, toda a turma do laboratório de química computacional, em especial, **Danylo, Manoel, Aloísio e Nailton**.

A todos os(as) amigos(as) pessoais pelo incentivo, sempre acreditando que seria possível: **Anastácia Soares (namorada), Júnior (irmão que não tive), Cecília, Thiago, Antônio (pai e filho), Marcelo (professor do IFS), Cósmea, Paulo Mesquita, Renir Damasceno, Bosco, Paulo César, Wilson Montalvão** e todos aqueles não citados.

Em especial, um agradecimento a todos meus familiares: **Suely (mãe), Edvaneide (irmã), Edvanessa (irmã), Thales (sobrinho), Úrsula (sobrinha), Aryel (filha) e Nythaelle (filha)** pela paciência e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis.

CURRICULUM VITAE(resumo)

DADOS PESSOAIS

Nome: Edvonaldo Florêncio e Silva

Nome em citações bibliográficas : Silva, Edvonaldo Florêncio e

e-mail : edvonaldo@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- **Mestrado em Química** pela Universidade Federal de Sergipe.

Título: Um Estudo Teórico da Doxorrubicina: Espectroscopia no UV/Vis e Reatividade, sob orientação do Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Jr.

Palavras-chave: **DOXORRUBICINA, TAUTOMERISMO, QUÍMICA COMPUTACIONAL.**

- **Graduação em Licenciatura em Química** pela Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão / SE, 2004.

- **Graduação em Química Industrial** pela Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão / SE, 1992.

- EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL :

- Estação de fluidos – Carmópolis – Sergipe - Petrobrás - 1992

Função: Estágio curricular

-1990 – 2013 – Professor de química do ensino médio : Colégio Arquidiocesano Sagrado Coração de Jesus.

- 2000 – 2013 – Professor de química do ensino médio : Centro de Excelência Master.

- 2000 – 2013 – Professor de química do ensino médio : Colégio Módulo.

Sumário

Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Símbolos e Abreviações	v
Resumo	vii
Abstract	viii
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Apresentação	1
1.2. Sobre a Doxorrubicina	3
1.3. Sobre os Métodos Computacionais	7
1.3.1. Sobre os Métodos Semiempíricos	8
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. METODOLOGIA	
3.1. Estudo Tautomérico	12
3.1.1. Processo de Otimização das Geometrias das Espécies Tautoméricas Aplicando as Metodologias Semiempíricas	13
3.1.2. Cálculo do Estado de Transição	13
3.1.3. Estudo Termodinâmico e Cinético das Conversões Tautoméricas	14
3.1.4. Otimização das Geometrias dos Tautômeros com o Método <i>DFT</i>	15
3.1.5. Cálculo dos Espectros de Absorção	15
3.2. Estudo Tautomérico da Doxorrubicina Desprotonada	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Estudo Tautomérico: Estabilidades Relativas	18
4.2. Estudo Tautomérico: Estudo Termodinâmico e Cinético	23
4.3. Estudo Espectroscópico	27
5. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estabilidade relativa entre os diferentes tautômeros calculados a partir dos diferentes métodos utilizados. Para todos os métodos, a DOX1, por ser a mais estável, foi tomada como referência.	18
Tabela 2. Estabilidade relativa entre os diferentes tautômeros desprotonados calculados a partir dos diferentes métodos semiempíricos. Para cada método foi tomada como referência o calor de formação do tautômero desprotonado mais estável.	22
Tabela 3. Energia de ativação (E_a) e energia dos estados de transição (E_{ts}) dada em kcal mol^{-1} calculados para os métodos AM1, PM3, RM1 E PM6 para cada uma das conversões consideradas entre os tautômeros.	23
Tabela 4. Constantes de equilíbrio (K_{eq}) e de velocidades (k_1 e k_{-1}) calculados a 298K com os diferentes métodos semiempíricos para as conversões tautoméricas da doxorrubicina.	26
Tabela 5. Valores de RMSD calculados para a DOX1 otimizadas com os diferentes métodos tomando a geometria da DOX1 otimizada com o método <i>DFT</i> [B3LYP/6-311++G (d,p)] como referência.	28
Tabela A1. Variação de entalpia, de entropia e de energia livre de Gibbs (kcal mol^{-1} , $\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ e kcal mol^{-1} , respectivamente) calculados com os diferentes métodos semiempíricos para as conversões tautoméricas em 298 K.	45

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular da doxorubicina.	1
Figura 2. Grupos constituintes da doxorubicina.	3
Figura 3. Possíveis equilíbrios tautoméricos apresentados pela doxorubicina.	4
Figura 4. Espécies tautoméricas consideradas da doxorubicina.	12
Figura 5. Estrutura molecular das espécies desprotonadas da doxorubicina. Além da desprotonação do grupo amônio, também foi removido um hidrogênio do grupamento hidroquinona, o que resultou em quatro diferentes tautômeros desprotonados.	17
Figura 6. DOX1 e DOX4 otimizadas com o método <i>DFT</i> utilizando o funcional B3LYP/6-311G++(d,p), sendo evidenciada as possíveis ligações de hidrogênio intramolecular, as quais conferem uma estabilidade adicional.	19
Figura 7. Representação gráfica das distribuições populacionais de cada espécie tautomérica.	20
Figura 8. Conversão ceto-enólica no grupamento hidroxiacetil da DOX1, este tipo de equilíbrio não foi considerado no presente trabalho.	21
Figura 9. Representação gráfica das distribuições populacionais de cada espécie desprotonada segundo os métodos utilizados.	22
Figura 10. Diagramas de energia calculados pelos métodos AM1, PM3, PM6 e RM1 para as espécies químicas envolvidas em cada reação considerada de transferência de próton.	24
Figura 11. Espectros de absorção da DOX1 utilizando as geometrias otimizadas a partir dos métodos semiempíricos AM1, PM3, RM1, PM6 e também do método <i>DFT</i> . Um ajuste Lorentziano cuja largura de banda foi de 15 nm foi utilizado.	27
Figura 12. Espectros obtidos com o modelo INDO/S-CI a partir das geometrias otimizadas com método <i>DFT</i> . Um ajuste Lorentziano cuja largura de banda foi de 15 nm foi utilizado.	29
Figura 13. Orbitais moleculares HOMO (cores verde/azul) e LUMO (cores amarelo/vermelho) responsáveis pelas transições referentes às absorções na região do	30

visível apresentados sobre duas perspectivas.	
Figura 14. Espectros obtidos com o modelo INDO/S-CI a partir das geometrias otimizadas com o método <i>DFT</i> . Foi utilizado um ajuste Lorentziano cuja largura de banda foi de 15 nm para as espécies de doxorubicina desprotonadas.	31
Figura 15. Espectros de absorção no UV/Vis experimentais da doxorubicina em solução aquosa obtidos em diferentes pH, no intervalo de comprimento de onda que compreende a absorção no visível.	32
Figura 16. Geometrias das doxorubicinonas (DOXONA) otimizadas com o método semiempírico PM6. As entalpias de formação obtidas encontram-se apresentadas entre parênteses.	34
Figura 17. Espectros de absorção resultante da contribuição de todos os tautômeros da DOXONA otimizados com o método PM6 e dos tautômeros da DOX otimizados com o método PM6 e <i>DFT</i> . As barras vermelhas e verdes indicam a intensidade das forças dos osciladores versus posição de absorção para as DOX otimizadas com o método PM6 e <i>DFT</i> , respectivamente.	35
Figura 18. Espectro de absorção experimental obtido a pH 8 e espectros de absorção teóricos obtidos através do método INDO/S, considerando a contribuição de todos os tautômeros desprotonados tanto com o método <i>DFT</i> como PM6. As barras azuis e vermelhas indicam a intensidade das forças dos osciladores versus posição de absorção para as DOX otimizadas com o método PM6 e <i>DFT</i> , respectivamente.	37
Figura 19. Espectros de absorção experimental obtido a pH 7 e espectros teóricos obtidos considerando a contribuição das espécies protonadas e desprotonadas: a) geometrias otimizadas utilizando o método PM6, e b) utilizando o método <i>DFT</i> .	38

Lista de Símbolos e Abreviações

ΔG – variação da energia livre de Gibbs.

ΔH – variação de entalpia.

ΔS – variação de entropia.

Å – angström.

ab initio – método *ab initio*.

AM1 – (do inglês: *Austin Model 1*).

AMBER – (do inglês: *Assisted Model Building with Energy Refinement*).

B3LYP – funcional híbrido *DFT*.

Ceto – função orgânica cetona.

DFT – teoria do funcional de densidade.

DNA – ácido desoxirribonucleico.

DNR – daunorrubicina.

DOX – doxorrubicina.

E_a – energia de ativação.

EDTA – ácido etilenediamina tetracético.

E_i – energia de cada tautômero.

Enol – função orgânica enol.

E_{ts} – energia dos estados de transição.

h – constante de Planck.

HOMO – orbital molecular ocupado de mais alta energia.

INDO/S – (do inglês: *Intermediate Neglect of Differential Overlap/Spectroscopy*).

IV – infravermelho.

k – a constante de Boltzman.

K_{eq} – constante de equilíbrio.

K – kelvin (temperatura).

k_1 e k_2 – constantes de velocidades.

LUMO – orbital molecular desocupado de menor energia.

MNDO – (do inglês: *Modified Neglect of Diatomic Overlap*).

MOF – (do inglês: *Metal Organic Frameworks*).

N – constante de Avogadro.

PEG – polietilenoglicol.

PM3 – (do inglês: *Parametric Method 3*).

PM6 – (do inglês: *Parametric Method 6*).

R – constante dos gases ideais.

RM1 – (do inglês: *Recife Model 1*).

RMSD – raiz da soma dos quadrados dos desvios.

SQ – métodos semiempíricos quânticos.

T – temperatura em kelvin.

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco.

UV/Vis – ultravioleta/visível.

$\Delta_f H$ – entalpia de formação.

RESUMO

Dentre os fármacos largamente aplicados na prática oncológica humana, a doxorubicina (DOX) assume uma posição de destaque. Apesar de este quimioterápico apresentar eficiência na regressão de várias neoplasias, reações adversas podem surgir. Em decorrência disso várias estratégias vêm sendo desenvolvidas para reduzir os efeitos adversos provocados pelo uso contínuo da DOX. Uma dessas estratégias consiste na incorporação da doxorubicina em MOF's (*Metal Organic Framework*), uma vez que estes materiais podem atuar como excelentes carreadores de fármacos. A mudança de coloração exibida pela doxorubicina como função do pH, ou até mesmo quando possivelmente adsorvida na MOF, motivou a realização do presente trabalho, o qual consiste na busca dos possíveis fatores que culminam na mudança de coloração apresentada pela DOX. Diante disso, cálculos envolvendo a reatividade, assim como, a espectroscopia UV/Vis das possíveis espécies tautoméricas da doxorubicina foram realizados. Para tanto, foram aplicados os métodos semiempíricos, AM1, PM3, PM6 e RM1, e também *DFT*. Para realização dos cálculos espectroscópicos das geometrias no estado fundamental dos diferentes tautômeros da doxorubicina, foi utilizado o método INDO/S-CIS. Para as espécies protonadas, todos os cálculos revelaram a DOX1 como sendo a espécie tautomérica mais estável e a DOX2 como sendo a mais instável. O método PM6 foi o método que se mostrou mais similar ao *DFT*, comparando os espectros de absorção da DOX1, assim como as estabilidades relativas entre os tautômeros. As energias relativas entre os tautômeros desprotonados calculadas pelos diferentes métodos aplicados foram menores para os protonados, pois os tautômeros desprotonados denotam maiores similaridades estruturais entre si. O estudo de reatividade mostrou que os métodos PM3 e AM1 apresentam o mesmo comportamento qualitativo quanto à predição da estrutura do estado de transição envolvido em cada reação de transferência de próton em fase gasosa. O método PM6 assemelhou-se mais ao RM1, divergindo apenas na conversão DOX1 → DOX4. Cada espectro de absorção calculado a partir das geometrias otimizadas com o método *DFT* para as diferentes espécies tautoméricas apresentou simplesmente uma banda na região de comprimentos de onda maiores (por volta de 400 nm), as quais equivalem à região do visível. Diferentemente, o espectro de absorção obtido experimentalmente em meio ácido apresentou três bandas na região compreendida entre 400 nm a 650 nm, dessa forma não se pode atribuir a predominância de um único tautômero no sistema, mas sim, a contribuição simultânea de todos os tautômeros. O estudo espectroscópico dos tautômeros desprotonados visando simular o efeito do pH básico sugere a presença, também, dos quatro tautômeros desprotonados no sistema, explicando dessa forma o aparecimento das várias bandas de absorção. A atipicidade apresentada pelo espectro obtido a pH 7 pode ser explicado a partir da presença tanto de espécies de doxorubicina protonadas como desprotonadas. Dessa forma, a aplicação das ferramentas computacionais mostrou-se capaz de elucidar alguns eventos associados a espectroscopia e a reatividade da doxorubicina.

ABSTRACT

The doxorubicin (DOX) assumes a prominent position among the drugs widely applied in treatment human cancer. This chemotherapeutic presents efficiency in the regression of various neoplasms, although adverse reactions may occur. As a result several strategies have been developed to reduce the adverse effects caused by the continued use of DOX. One of these strategy is the incorporation of doxorubicin into MOF (Metal Organic Framework), since these materials can act as excellent carriers of drugs. The color change exhibited by doxorubicin as a function of pH, or even possibly when adsorbed in MOF, motivated the present work. This work consists in finding the possible factors that culminate in color change presented by DOX. This way, calculations involving the reactivity, and the UV/Vis spectroscopy of the possible tautomeric species of doxorubicin were performed. Thus, we applied the semiempirical methods, AM1, PM3, PM6 and RM1, and also DFT. We used the method INDO/S-CIS to calculate the spectroscopic of ground state geometries of various tautomer. All calculations revealed DOX1 as the most stable and DOX2 as the most unstable for protonated species. The method PM6 method was the more similar to the DFT by comparing the absorption spectra of DOX1 as well as the relative stabilities of the tautomers. The relative energies between deprotonated tautomers calculated by applied methods were smaller than protonated species, because the deprotonated tautomers denote considerable structural similarities between them. The reactivity study showed that the methods AM1 and PM3 exhibit the same qualitative behavior about the prediction of the transition state structure involved in each proton transfer reaction in the gas phase. The method PM6 resembled more to RM1, being the only exception was the conversion DOX1 \rightarrow DOX4. Each absorption spectrum calculated from the optimized geometries with the DFT method to the different tautomeric species showed simply a band in the region of longer wavelengths (around 400 nm), which correspond to the visible region. In contrast, the absorption spectra obtained experimentally in acidic showed three bands in the region between 400 to 650 nm, thus cannot be attributed to a single predominant tautomer system, but the simultaneous contributing of all tautomers. The spectroscopic study of deprotonated tautomers, in order to simulate the effect of basic pH, suggests the presence also of the four tautomers deprotonated in the system, thus explaining the appearance of several absorption bands. The spectrum obtained at pH 7 can be explained from the presence of both doxorubicin protonated as deprotonated species. Thus, the application of computational tools proved to be able to elucidate some events associated with spectroscopy and reactivity of doxorubicin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apresentação

A doxorubicina {(7S, 9S)-7-[(2S, 4S, 5S, 6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-6, 9, 11-trihidroxi-9-(2-hidroxicetil)-4-metoxi-8, 10-dihidro-7H-tetraceno-5, 12-diono}, cuja estrutura molecular encontra-se apresentada na Figura 1, é um fármaco citotóxico potente, isolado pela primeira vez em 1960 a partir da cultura do fungo *Streptomyces peucetius* [1]. A partir de agora, no decorrer do presente texto, a doxorubicina será referenciada simplesmente por DOX.

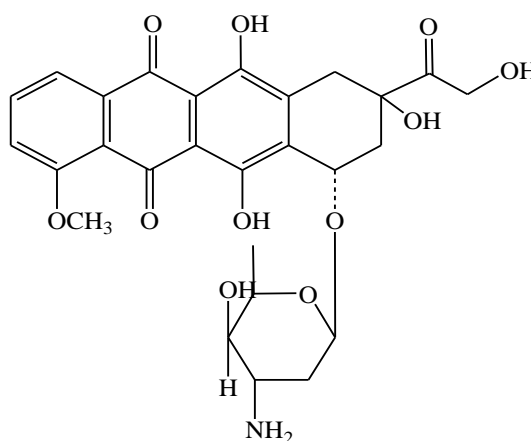


Figura 1. Estrutura molecular da doxorubicina.

Desde o final dos anos 60, a DOX vem sendo amplamente utilizada na prática oncológica humana. Este quimioterápico é pertencente a classe das antraciclinas e apresenta grande êxito na regressão de várias neoplasias como carcinomas de mama, pulmões, bexiga, tireoide, ovarianos, sarcomas ósseos dentre outros. Entretanto, seu uso clínico é limitado, devido ao aparecimento de reações adversas tais como cardiotoxicidade e mielossupressão, recentemente vários trabalhos vêm destacando, também, danos hepáticos [2].

Apesar da ampla utilização para o tratamento de câncer há várias décadas, os mecanismos de ação da DOX, tanto associados ao efeito antitumoral quanto aos efeitos adversos, ainda não estão bem estabelecidos. Vários mecanismos são propostos para explicar a ação citotóxica da DOX, incluindo-se, entre eles, a formação de um complexo com o DNA,

a inibição da enzima topoisomerase II, e a indução de apoptose, além do estresse oxidativo causado pela geração de espécies reativas de oxigênio a partir de reação redox deste fármaco [3].

Nos últimos anos, várias estratégias foram desenvolvidas para reduzir ou eliminar os efeitos adversos provocados pelo uso contínuo da DOX. Uma delas foi o desenvolvimento de um agente citoprotetor, a dexrazoxane, comercialmente conhecido como Cardioxane®. Este composto é um análogo cíclico do ácido etilenediamina tetracético (EDTA). Vários casos clínicos têm demonstrado que este agente citoprotetor reduz a incidência e a gravidade da cardiomiopatia associada à DOX sem afetar a sua eficácia antitumoral [4]. Contudo, reação adversa como a mielossupressão, caracterizada pela depressão da função da medula óssea, surge quando a terapêutica combinada da DOX com dexrazoxane é aplicada em pacientes pediátricos [5].

Outra estratégia de minimização dos efeitos adversos provocados pela DOX consiste no encapsulamento do fármaco em lipossomas. A incorporação da DOX em lipossomas de diâmetros da ordem de 100 nm ou maiores, com a superfície polimérica constituída por etilenoglicol (PEG) modificada, causa uma presença prolongada da substância no organismo e a distribui principalmente na área tumoral [6]. O encapsulamento da DOX em lipossomas com a superfície modificada com anticorpos monoclonais, capazes de reconhecer apenas antígenos da superfície do tumor, tem aumentado a citotoxicidade em células tumorais [7]. Por outro lado, estas terapias não fornecem um controle satisfatório do tempo de liberação do fármaco. Em decorrência disso, muitos esforços têm sido feitos para modificar o processo de liberação do fármaco de uma forma que possa aumentar o perfil de segurança da terapia. Formulações com nanopartículas e com nanocápsulas têm sido testadas, apresentando sucesso. De fato, o grande número de nanopartículas medicamentosas conjugadas com diferentes estágios de desenvolvimento clínico é uma prova do grande sucesso deste tipo de terapia [8].

Mais recentemente, foi lançada a ideia de usar MOFs (*Metal Organic Frameworks*) como carreadores de fármacos, na expectativa de que este material orgânico-inorgânico híbrido concilie a grande facilidade de encapsulamento apresentada pelos materiais orgânicos com o bom controle de liberação dos materiais inorgânicos [10]. Fundamentado neste contexto, Severino Alves e colaboradores [11] realizaram um estudo de adsorção da DOX com uma MOF denominada ZIF-8, visando estudar a citotoxicidade e a liberação do fármaco. A adsorção foi evidenciada pela mudança de cor da DOX, a qual

apresentou coloração laranja quando em solução ($\text{pH} = 7,4$) e após a adsorção na ZIF-8 assinalou uma coloração púrpura.

Tal fato despertou a curiosidade de entender o que levou a essa mudança de coloração do sistema. As soluções de dois possíveis questionamentos podem guiar a busca da elucidação de tal problemática:

- i) Será a adsorção da DOX com a MOF a responsável pelo favorecimento de uma forma tautomérica diferente da forma encontrada em solução, resultando no surgimento de uma nova coloração?
- ii) Ou, será a interação DOX–metal da MOF que provocou tal mudança de cor?

O estudo teórico da espectroscopia no UV/Vis e de reatividade da doxorubicina desenvolvido aqui buscará algumas soluções para essa problemática levantada.

1.2. Sobre a Doxorubicina

A molécula da DOX tem atraído muita atenção não apenas pela sua importância farmacológica, mas também, pela sua reatividade sob uma variedade de condições. Esta molécula é constituída de um núcleo denominado doxorubicinona, a qual consiste em uma porção aglicona composta por uma estrutura tetracíclica que contém um anel quinona (B) e outro hidroquinona (C). Os três primeiros anéis são aromáticos e o quarto não aromático (D) é ligado por uma ponte glicosídica a um aminossacarídeo, a daunosamina, uma hidroxila e um grupo hidoxiacetil, conforme ilustrado na Figura 2.

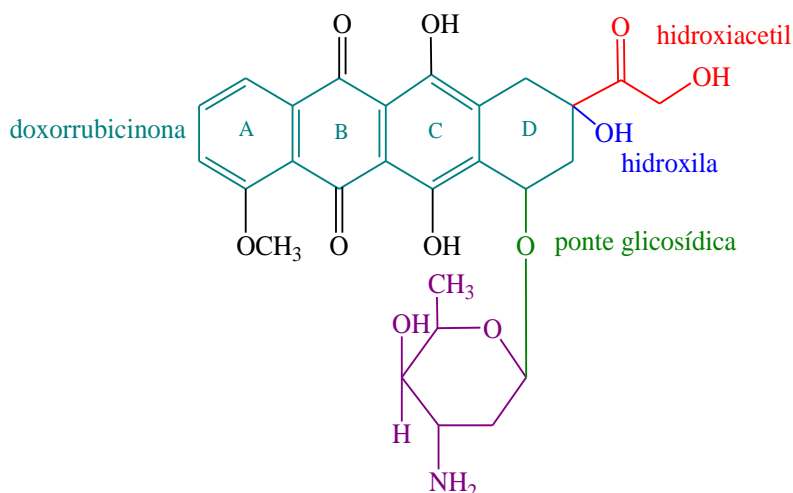


Figura 2. Grupos constituintes da doxorubicina.

Conforme apresentado na Figura 3, o deslocamento dos dois hidrogênios do anel da hidroquinona em direção aos oxigênios do anel da quinona e vice-versa (i, ii, iii, iv) dão origem a quatro tautômeros. O equilíbrio ceto-enol do grupo hidroxiacetil (v, vi, vii, viii) concede mais outro tautômero para cada estrutura oriunda do equilíbrio quinona-hidroquinona, perfazendo assim um total de oito tautômeros.

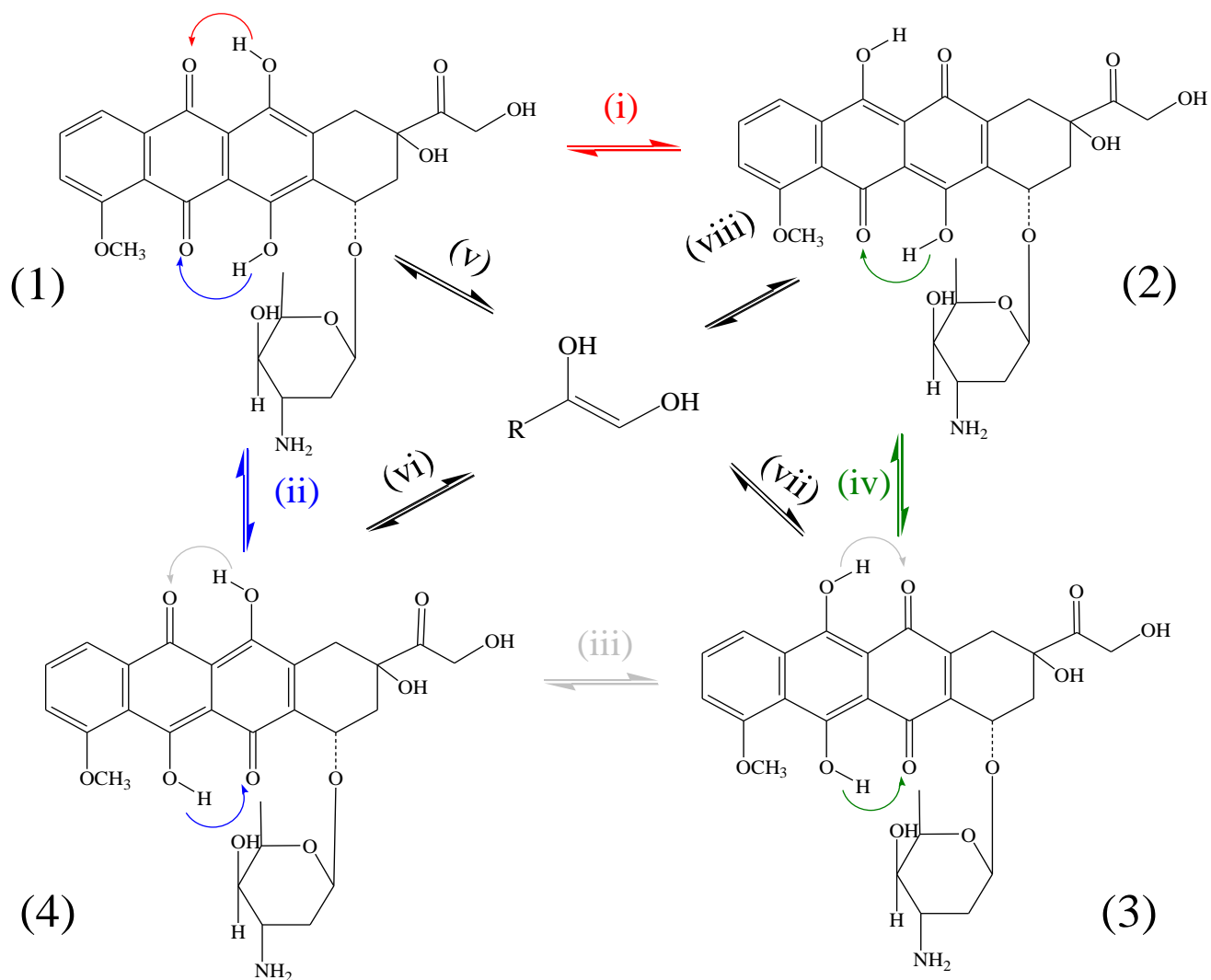


Figura 3. Possíveis equilíbrios tautoméricos apresentados pela doxorubicina. R = toda a molécula da doxorubicina com exceção do grupo hidroxiacetil.

Na década de 80, Wassermann e colaboradores [12] estudaram a cinética da degradação da doxorubicina em solução de ácido clorídrico em valores de pH variando de 0,4 a 2,1, a partir da técnica de cromatografia líquida de alta resolução (CLAE), a qual evidenciou os produtos da degradação. A doxorubicina, semelhantemente a outros

glicosídeos, também é susceptível a sofrer degradação hidrolítica em solução ácida, levando a formação da doxorubicinona e do amino açúcar, daunosamina. A reação de degradação mostrou uma dependência de primeira ordem com a concentração de doxorubicina e de prótons H^+ . Segundo Wassermann e colaboradores [12] em pH igual a 2, a degradação catalítica da droga não foi evidenciada pelo processo cromatográfico. Entretanto Beijem e colaboradores [13], estudaram a cinética da degradação da doxorubicina no intervalo de pH de 1 a 11, também aplicando a técnica CLAE, evidenciando uma cinética de primeira ordem. Seus resultados indicaram uma estabilidade máxima para a doxorubicina a cerca de um pH igual a 4 e não a 2 como assinalado por Wassermann e colaboradores [12]. Os dados obtidos por Janssen e colaboradores [14] revelaram que em pH 7,4 a doxorubicinona não foi detectada via análise de CLAE, entretanto compostos não identificados frutos da degradação da doxorubicina foram registrados. De modo geral, esses trabalhos buscaram o estabelecimento de condições que provocassem o mínimo possível de taxas de decomposição da doxorubicina em meio aquoso.

Com relação ao estudo teórico de diferentes espécies tautoméricas de antraciclinas, Turker [15] realizou recentemente um estudo químico quântico das formas tautoméricas da espécie química 11-hidroxi-clavina, a qual possui o mesmo grupo cromóforo do tipo antraquinona presente na daunomicina. A 11-hidroxi-clavina apresenta seis possíveis tautômeros relacionados com a transferência de próton dos anéis hidroquinonas para as quinonas, pois ela possui um grupo hidroxila ligado ao anel A da antraquinona ao invés de um grupo metóxido, diferentemente da DOX. As geometrias dos tautômeros estudados foram otimizadas a partir de cálculos *DFT*, tanto no vácuo como em solução aquosa, utilizando o funcional híbrido RB3LYP e os conjuntos de bases 6-31G (d) e 6-31G(d,p). Das várias formas tautoméricas de 11-hidroxi-clavina consideradas, aquela que apresentou a hidroxila no anel A, e os grupos hidroxila e cetona nos anéis B e C (ver tautômero (4) da Figura 3), foi a mais estável em termos da energia livre de formação a partir de seus elementos. Já em meio aquoso, o tautômero que apresentou o grupo cetona no anel A, duas hidroxilas no anel B, e os grupos hidroxila e cetona no anel C, foi mais estável do que a anterior. A energia calculada para os diferentes tautômeros não divergiram significativamente entre si.

Cálculos semiempíricos quânticos (SQ), usando o hamiltoniano AM1, foram utilizados para estudar a estrutura eletrônica da DOX e da daunorubicina (DNR), buscando explicar o porquê da pequena diferença estrutural entre essas duas antraciclinas levarem a um comportamento farmacológico tão diferenciado [16]. Os cálculos revelaram que todas estas

estruturas estudadas foram estáveis e de natureza exotérmica. Neste trabalho foram estudadas apenas as formas tautoméricas (1) e (3) da doxorubicina assinalada na Figura 3 e cálculos utilizando o hamiltoniano AM1 indicou a espécie química (1) como sendo mais estável.

Recentemente, Lei e colaboradores [17] estudaram a cinética de intercalação DOX-DNA usando dinâmica molecular clássica, aplicando o campo de força AMBER. Neste estudo buscou-se elucidar os modos de intercalações entre a doxorubicina e dois fragmentos de DNA com seis pares de bases ($d(\text{CGATCG})_2$ e $d(\text{CGTACG})_2$). O campo de força utilizado foi validado, assim como a natureza estrutural e energética do processo de ligação da DOX com o DNA foi investigada através de simulações mantendo dependência espacial e temporal. Os resultados obtidos assinalaram a abertura e contorção do par de bases A3-T10 para a sequência $d(\text{CGATCG})_2$ e C1-G12 para a sequência $d(\text{CGTACG})_2$ na intercalação da drogas.

Com a relação a estudos teóricos envolvendo a doxorubicina, desde o início da década de 80, a comunidade teórica tem depositado esforços buscando entender quais as espécies conformacionais da DOX são as mais estáveis tanto em solução como em fase gasosa, e com isso tentar elucidar como se dá a formação do complexo DOX-DNA [18]. Zhu e colaboradores [19] realizaram um estudo teórico sobre os quatro tautômeros produzidos no equilíbrio quinona-hidroquinona, tal como apresentado na Figura 3. Esses pesquisadores também estudaram as diversas conformações possíveis assumidas pela doxorubicina. No estudo de Zhu e colaboradores foi usada a teoria do funcional densidade (DFT) com o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base 6-31G(d,p), objetivando classificar as conformações encontradas do fármaco intercaladas na estrutura do DNA reportados na literatura. Através deste estudo foi constatado que as diversas conformações das antraciclina estudadas são flexíveis, favorecendo a intercalação do fármaco com o DNA acceptor. Segundo os autores, as antraciclina intercalam-se preferencialmente entre o par de bases guanina-citosina em decorrência das interações $\pi - \pi$, uma vez que a guanina e a citosina são mais aromáticas que a adenina e timina.

Pretende-se realizar no presente trabalho um estudo das formas tautoméricas mais estáveis examinadas por Zhu e colaboradores, entretanto, aplicando um conjunto de bases de dimensão maior do que a utilizada por tais pesquisadores. Além disso, é objetivada a aplicação de diferentes métodos químico-quânticos semiempíricos para o estudo dessas espécies tautoméricas da doxorubicina. Um dos grandes diferenciais do presente estudo é a determinação das energias envolvidas nas interconversões entre os tautômeros, assim como a estimativa da constante de equilíbrio referente a cada reação de transferência de próton. Estendendo-se toda essa abordagem teórica envolvendo a DOX, pretende-se também, a

realização de um estudo detalhado de espectroscopia na região do UV/Vis envolvendo os diferentes tautômeros da doxorrubicina bem como seus diferentes tautômeros desprotonados, tentando assim, representar condições em diferentes pH.

1.3. Sobre os Métodos Computacionais

A química teórica descende do início do século XX, mas o seu aparelhamento é recente e depende do avanço simbiótico entre as técnicas numéricas e os computadores. A crescente paralelização, o processamento em placas gráficas permite vislumbrar à simulação cada vez mais exata, de sistemas cada vez maiores e de fenômenos temporais cada vez mais longos [20].

As aplicações da química teórica se dividem basicamente em dois grandes grupos de métodos: os clássicos e os quânticos. Os métodos clássicos utilizam a mecânica clássica para modelar os sistemas. Estes métodos não resolvem a equação de Schroedinger, uma vez que os elétrons do sistema são ignorados, daí apresentarem custo computacional tão baixo. A energia é calculada em função das posições nucleares, as moléculas são vistas como um conjunto de núcleos conectados entre si por forças descritas por um ou mais campos de força [20]. A maior desvantagem deste método é a sua incapacidade de descrever propriedades que dependem da distribuição eletrônica. Mas, em compensação, produz uma enorme redução do custo computacional, o que permite a manipulação de grandes sistemas moleculares, como sistemas biológicos, e possibilita resolver problemas onde é necessário fazer um grande número de cálculos para o mesmo sistema, por exemplo, em estudos de dinâmica molecular.

Os métodos quânticos, por sua vez, se dividem em *ab initio* [21,22] e semiempíricos [23,24]. Os métodos semiempíricos procuram resolver a equação de Schrodinger de forma bem simplificada e, em geral, usam parâmetros para reproduzir dados experimentais. A utilização destes parâmetros ajustados resolve vários problemas ocasionados pela enorme simplificação dos métodos além de reduzirem bastante o custo computacional.

Os métodos *ab initio* são divididos em duas classes, os que resolvem a equação de Schroedinger (Hartree-Fock (HF) e todos os pós-HF derivados) e os que usam a equação de Schroedinger não para obter a função de onda, mas sim a densidade eletrônica - os métodos baseados na teoria do funcional da densidade (DFT) [25,26]. Entre os métodos *ab initio*, o método HF é o mais simples, na sua simplificação transforma uma equação de N elétrons em N equações de um elétron. Como consequência da aproximação, os elétrons não sentem mais o efeito direto dos outros elétrons, ou seja, os elétrons perdem a correlação entre eles e a

energia exata HF, não é a energia exata do sistema de N elétrons. A diferença entre a energia exata HF e a energia exata do sistema é chamada energia de correlação. A introdução da energia de correlação aumenta a exatidão dos métodos *ab initio*, aumentando o tempo computacional e este é tanto maior quanto maior for a exatidão do método pós-HF [22].

Os métodos *DFT* são uma maneira alternativa de introduzir correlação eletrônica. O seu grande impacto na química teórica tem origem no fato desta teoria produzir resultados superiores aos obtidos com o método de HF, a um custo computacional muito menor. A aplicação da *DFT* tem focado problemas relevantes, por exemplo, a descoberta de materiais para a liberação controlada de fármaco e o planejamento racional de novos fármacos.

1.3.1. Métodos Semiempíricos

Os métodos semiempíricos quânticos (SQ) surgiram nos anos 60 como uma alternativa aos métodos *ab initio*, barateando enormemente o custo computacional (tempo de processamento), introduzindo aproximação e parâmetros empíricos ajustados a dados experimentais e teóricos no intuito de melhorar a exatidão dos cálculos, com base mínima (normalmente a STO-3G), para aplicações em problemas de interesse químico. Com o aumento da capacidade computacional nos anos 70, iniciou-se uma disputa acirrada entre os métodos semiempíricos e os *ab initio*. O lado *ab initio* colocava em dúvida a exatidão dos métodos semiempíricos e apontavam problemas no formalismo matemático. O lado semiempírico mostrava que apesar do aumento do poder computacional, a qualidade dos resultados HF obtidos eram insatisfatórios para descrever problemas de interesse químico.

Já na década seguinte chegou-se a uma coexistência pacífica, métodos *ab initio* geravam resultados, em princípio mais exatos, mas eram restritos ainda a moléculas pequenas e de porte médio, enquanto que os métodos semiempíricos forneciam dados qualitativamente corretos para esse conjunto e apresentavam boa exatidão para moléculas grandes inacessíveis aos métodos *ab initio*.

Nos anos 90, métodos baseados na teoria do funcional densidade (DFT) entraram no mundo da química teórica, em paralelo a um aumento assustador da capacidade computacional, apresentando um custo computacional bem inferior aos *ab initio* mais exatos, deslocaram os métodos semiempíricos de sua região de conforto, a química orgânica, para regiões de moléculas maiores, a bioquímica, este deslocamento foi auxiliado com o surgimento de métodos com escalonamento linear [27].

O custo computacional dos métodos semiempíricos ainda é bem inferior aos métodos DFT, por isso são usados para resolver problemas onde se necessita calcular um grande número de moléculas tais como em aplicações de QSPR/QSAR. Os métodos semiempíricos possibilitam a aplicação da química quântica na solução de problemas que fazem uso da dinâmica molecular e de métodos Monte Carlo.

O deslocamento para essa nova região e a concorrência com os métodos DFT evidenciou a necessidade de melhorar a exatidão dos métodos SQ desencadeando novas parametrizações. As parametrizações consistem em procedimentos de ajustes de parâmetros do modelo durante seu processo de desenvolvimento, tomando normalmente como referência dados experimentais. Exemplos de método semiempíricos desenvolvidos recentemente são o RM1 [28], OM-x [29] e PM6 [30]. As parametrizações mais recentes foram ainda desenvolvidas, principalmente, para reproduzirem as propriedades mais tradicionais: geometrias, momento de dipolos e calor de formação. Pouca ou nenhuma atenção era dada para descrição de interações fracas como interações de van der Waals. No entanto, os métodos SQ são, dentre os métodos que descrevem estrutura eletrônica, os que apresentam o menor custo computacional. Isso lhes fornece várias vantagens sobre os métodos clássicos para resolver problemas de interesse químico, nos quais os fenômenos temporais não são importantes ou são muito curtos. Por outro lado, métodos SQ não descrevem de maneira satisfatória forças de dispersão e ligações de hidrogênio, dois tipos de interações fundamentais para a descrição de sistemas biológicos. As forças de London só são descritas explicitamente por métodos que descrevem a correlação eletrônica. Os métodos SQ incluem parte desta interação através dos parâmetros do potencial caroço-caroço. Isto tem sido solucionado com a inclusão de funções empíricas para corrigir erros intrínsecos aos métodos. Tem-se como exemplo o AM1-D [31], PM6-DH+ [32], RM1-D3H4 [33] entre outros. Estes métodos têm mostrado resultados muito promissores.

O processo de parametrização de fato, assim como a qualidade do banco de dados, são os principais fatores relacionados com a qualidade de um dado método semiempírico [22]. A associação destes dois fatores levou ao desenvolvimento dos diferentes métodos semiempíricos: AM1 [34], PM3 [36], RM1 [28] e PM6 [30], dentre outros. Todos esses métodos são parametrizados em termos de variáveis atômicas, que dependem da natureza dos átomos individuais, e diferenciam-se entre si na repulsão caroço-caroço. Esses métodos assinalados são baseados no método MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*) [34], o qual apresenta limitação em avaliar ligações de hidrogênio e altas energias de ativação, no entanto, consegue boas estimativas no cálculo de propriedades termodinâmicas e mecanismo

de reação. Seu sucessor, o método AM1 [34], apresenta a capacidade em descrever ligações de hidrogênio de maneira mais exata, bem como as energias de ativação. No entanto o método AM1 costuma assinalar grande instabilidade para compostos com grupo nitro, diferente de compostos com grupos alquil, os quais são bem descritos pelo AM1.

O PM3 [36] apresenta o mesmo formalismo do método AM1, porém contém muitos mais átomos parametrizados, denotando, portanto, uma aplicabilidade maior. Além do PM3 conter parâmetros para os elementos H, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Br, e I, novos parâmetros foram incluídos para os seguintes átomos: Li, Be, Na, Mg, Ca, Zn, Ga, Ge, As, Se, Cd, In, Sn, Sb, Te, Hg, Tl, Pb, Bi [20].

O método *Recife Model 1* (RM1) [28], consiste em uma reparametrização do método AM1. O RM1 é normalmente mais exato do que os demais métodos semiempíricos com relação ao calor de formação, momentos de dipolo, distância de ligação e potenciais de ionização. Entretanto, a sua principal desvantagem é que o método apresenta parâmetros apenas para 10 átomos da tabela periódica, mesmo sendo os elementos mais abundantes dos sistemas biológicos.

Dentre os métodos semiempíricos apresentados aqui, o PM6 [30] é o método que apresenta uma maior aplicabilidade, pois o mesmo apresenta parâmetros para 70 átomos.

Diante de toda essa problemática, neste trabalho foi realizado um estudo espectroscópico e de reatividade da doxorubicina. Dessa forma, cálculos envolvendo a cinética assim como a termodinâmica das diversas conversões de uma espécie tautomérica em outra foram procedidos, utilizando para tanto, métodos semiempíricos (AM1, PM3, PM6 e RM1) bem como *DFT*. Cálculos espectroscópicos das geometrias no estado fundamental dos diferentes tautômeros da doxorubicina utilizando o método semiempírico INDO/S-CI também foram realizados. Um estudo conformacional assim como espectroscópico das espécies tautoméricas desprotonadas da doxorubicina foram realizados de modo a verificar como os espectros de absorção teóricos sofrem influência do efeito do pH simulado.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Realizar um estudo espectroscópico de absorção no UV/Vis e de reatividade da doxorrubicina, buscando entender quais fatores são responsáveis pela mudança de coloração decorrente do pH.

2.2. Específicos:

- Fazer comparações entre os métodos semiempíricos mais utilizados pela comunidade científica, AM1, PM3, PM6 e RM1 quanto ao estudo de modelagem, usando como referência cálculos *DFT*;
- Fazer comparações entre os métodos semiempíricos supracitados quanto ao estudo termodinâmico e cinético;
- Buscar explicar os espectros de absorção no UV/Vis da doxorrubicina protonada e desprotonada;
- Analisar se há evidências da existência de mais de um tautômero no meio reacional;
- Entender como a presença de mais de um tautômero influencia os espectros da doxorrubicina;
- Realizar um estudo de estabilidade relativa e espectroscópico das espécies de doxorrubicina desprotonadas.

3. METODOLOGIA

3.1. Estudo Tautomérico

Inicialmente planejou-se calcular oito espécies tautoméricas, quatro oriundas do tautomerismo provocado pelos dois hidrogênios ligados aos anéis hidroquinonas e quatro oriundas do equilíbrio ceto-enólico. Apenas as quatro estruturas do equilíbrio hidroquinona-quinona foram consideradas, pois esses tautômeros são mais estáveis do que os originados do equilíbrio ceto-enólico. As razões serão explicadas mais adiante. Os tautômeros da doxorubicina estão apresentados na Figura 4 e foram construídas usando o programa Hyperchem 8.0 [37].

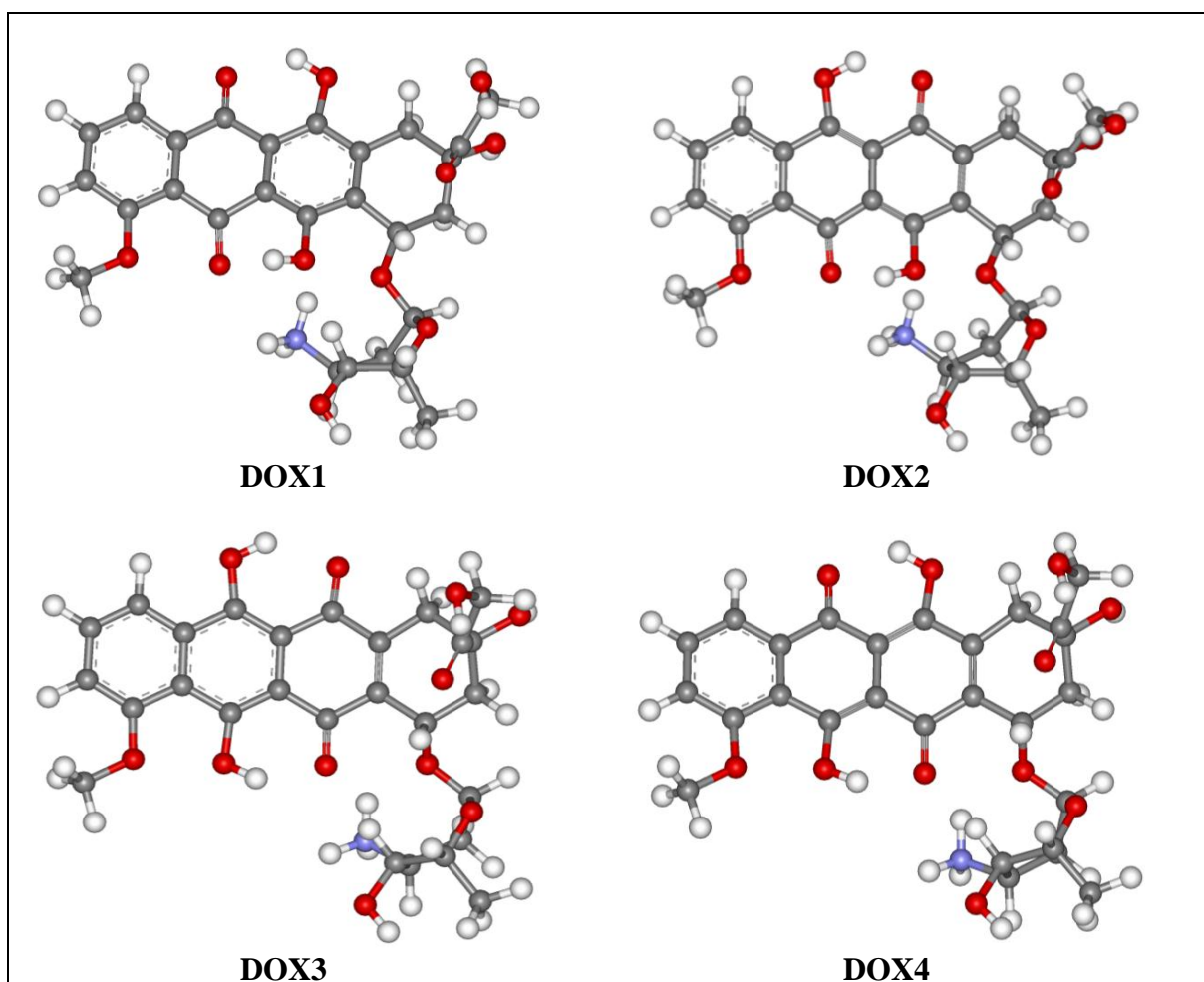


Figura 4. Espécies tautoméricas consideradas da doxorubicina.

3.1.1. Processo de Otimização das Geometrias das Espécies Tautoméricas Aplicando as Metodologias Semiempíricas.

O estudo espectroscópico da doxorubicina foi realizado em diferentes pH. Com isso, as estruturas foram construídas considerando o nitrogênio do grupo funcional amina protonado, visando simular um ambiente químico ácido. Dessa forma, as estruturas apresentaram uma carga líquida igual a +1. Para realização dos cálculos de otimização de geometria do estado fundamental foi utilizado o pacote computacional MOPAC2009 [38]. A fim de comparar as estabilidades relativas entre diferentes métodos semiempíricos, foram feitas otimizações utilizando os métodos: AM1 [34], PM3 [36], RM1 [28] e PM6 [30]. Para efetivação desses cálculos, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: AM1 (PM3, PM6 ou RM1) PRECISE GNORM=0.01 CHARGE=1 XYZ. Cálculos de frequência vibracional foram realizados, simplesmente a fim de checar se as espécies tautoméricas otimizadas encontravam-se em um mínimo de energia.

A partir dos valores de calor de formação de cada tautômero, E_i , a população de cada estado segundo a distribuição de Boltzmann foi calculada, utilizando a seguinte equação:

$$P_i = \frac{e^{-\beta E_i}}{\sum_i e^{-\beta E_i}}$$

onde $\beta = 1/NkT$, sendo k a constante de Boltzmann ($1,3806503 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), N a constante de Avogadro e T a temperatura. A temperatura considerada nos cálculos foi igual a 298 K.

3.1.2. Cálculo do Estado de Transição

De modo a verificar a reatividade envolvida entre cada conversão de um tautômero em outro, foram executados cálculos de estado de transição usando o programa MOPAC2009. As conversões consideradas foram: DOX1 \rightarrow DOX2, DOX1 \rightarrow DOX4, DOX2 \rightarrow DOX3 e DOX3 \rightarrow DOX4. O procedimento adotado foi o seguinte:

- i. Inicialmente no arquivo de entrada do reagente foi utilizada a palavra-chave GEO_REF, tomando como a geometria do produto como referência. Este procedimento é usado para mover a geometria do reagente na direção do produto;
- ii. A partir da geometria obtida, foi realizado outro cálculo usando a palavra-chave GEO_REF e TS, com o objetivo de obter uma geometria média que

correspondesse ao estado de transição;

- iii. Em seguida, a palavra-chave TS foi utilizada para otimizar a geometria média; com esta palavra-chave a otimização leva a geometria da estrutura para um ponto crítico da superfície de potencial. Posteriormente, foram executados cálculos de frequências vibracionais, de modo a verificar se a estrutura obtida após a otimização do estado de transição encontrava-se em um ponto de sela. O ponto de sela é caracterizado por apresentar uma frequência imaginária. A frequência imaginária é definida por uma constante de força negativa, a qual define que o modo vibracional encontra-se em um ponto de máximo na superfície de potencial.

Fazendo a diferença entre o calor de formação do estado de transição de cada conversão pelo calor de formação das espécies consideradas reagentes, os valores da energia de transição foram obtidos.

3.1.3. Estudo Termodinâmico e Cinético das Conversões Tautoméricas

Encontrados os estados de transição pertinentes a cada conversão pôde-se então proceder com o estudo termodinâmico e cinético. Para determinação das propriedades termodinâmicas, tais como variações de entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°), foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: AM1 (PM3, PM6 ou RM1) THERMO PRECISE CHARGE=1 XYZ LET FORCE. A variação de energia livre de Gibbs (ΔG°) foi calculada a partir da equação $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$.

Fazendo a diferença entre os valores de ΔH° , ΔS° e ΔG° do estado de transição pelo do reagente, foram determinadas as propriedades termodinâmicas da transição (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger e ΔG^\ddagger) no sentido direto. Através da diferença entre as propriedades termodinâmicas do estado de transição pelas do produto, foram determinadas as propriedades termodinâmicas da transição no sentido inverso.

Os valores de ΔG^\ddagger foram utilizados para calcular as constantes de velocidade da reação direta (k_i) e inversa (k_{-i}) usando a equação de Eyring [39], dada abaixo:

$$k = \frac{kT}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

onde k é a constante de Boltzman, h é a constante de Planck e R a constante dos gases ideais.

Fazendo-se a razão entre os valores de constante de velocidade no sentido direto pelo inverso, foi possível determinar a constante de equilíbrio (K_{eq}) de cada reação de transferência de próton em fase gasosa.

3.1.4. Otimização das Geometrias com o Método *DFT*

Utilizando metodologia *DFT* também foram realizados cálculos de otimização da geometria dos tautômeros considerados. Para efetivação desses cálculos fez-se uso do funcional híbrido B3LYP [40,41] implementado no software Gaussian 03 [42]. O conjunto de base utilizado foi o 6-311++G(d,p).

Assim que as geometrias foram otimizadas, foram realizados cálculos de frequências vibracionais, visando confirmar simplesmente se as geometrias obtidas após a otimização encontravam-se em um mínimo de energia.

3.1.5. Cálculo dos Espectros de Absorção

As geometrias dos estados fundamentais dos quatro tautômeros obtidos pelo método *DFT* foram usadas para calcular os espectros de absorção teóricos. Também foram obtidos espectros de absorção a partir das estruturas geradas pelo método PM6, a fim de realizar comparações com os obtidos utilizando as geometrias otimizadas com o método *DFT*. Para efetivação desses cálculos espectroscópicos, foram usadas as interações de configurações simples (CIS) baseadas no método INDO/S [43,44] implementado no programa Orca, versão 2.8.0.2 [45]. O conjunto de palavras-chaves utilizado encontra-se apresentado no quadro abaixo:

```
!RHF ZINDO/S TightSCF DIIS
%cis
  nroots 50
  maxdim 150
end
```

Quadro 1 – Conjunto de palavras-chaves utilizado para efetivação dos cálculos de estados excitados com o programa Orca.

A palavra-chave “RHF” indica que foi utilizado um cálculo do tipo Hartree-Fock restrito, indicando que a multiplicidade do composto tem que ser necessariamente igual a 1. O termo “ZINDO/S” indica a aplicação do modelo INDO/S-CIS. A palavra-chave

“TightSCF” é utilizada para aumentar o critério de convergência do procedimento SCF (do inglês - *Self-Consistent Fiel*). O termo “DIIS” indica o tipo de algoritmo utilizado na realização do procedimento SCF. Por fim, “nroots” indica o número de estados singletos para serem calculados. Para o tamanho do espaço das interações de configurações foi utilizada a janela de excitação estabelecida pelo programa Orca, que no caso da DOX consiste na utilização de todos os orbitais ocupados e dos próximos 81 orbitais virtuais para realização das interações de configurações simples. Cabe ressaltar que se trata de uma janela de excitação razoavelmente grande, entretanto, mesmo assim, os cálculos são razoavelmente rápidos de serem realizados.

Para visualização dos orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica de interesse foi utilizado o programa CacheWorkSystem [46].

Os espectros de absorção teóricos foram obtidos através de ajustes Lorentziano utilizando as frequências calculadas para os níveis de energia singlete, juntamente com as forças do oscilador, utilizando para tanto, o programa Gabedit, versão 2.4.5 [47].

3.2. Estudo Tautomérico da Doxorrubicina Desprotonada

A fim de estudar as diferentes desprotonações suscetíveis de ocorrerem nas hidroquinonas quando se considera a DOX em pH elevado, foram geradas quatro novas estruturas com diferentes tipos de desprotonação. Além das desprotonações do grupo amônio dos tautômeros, que haviam sido protonados para a simulação de condições de pH ácido, os tautômeros também tiveram um hidrogênio removido dos grupos hidroquinonas. As geometrias das quatro possíveis espécies de doxorrubicina desprotonadas encontram-se apresentadas na Figura 5 e também foram criadas utilizando o programa HyperChem 8.0.

Assim que geradas as estruturas, todas elas foram otimizadas utilizando os métodos semiempíricos AM1, PM3, PM6 e RM1, e também DFT, de modo a conhecer as estabilidades relativas entre as espécies desprotonadas. Em seguida, procedeu-se com o cálculo dos espectros de absorção teóricos utilizando o método INDO/S-CIS implementado no programa Orca, conforme procedimento descrito na seção 3.1.5.

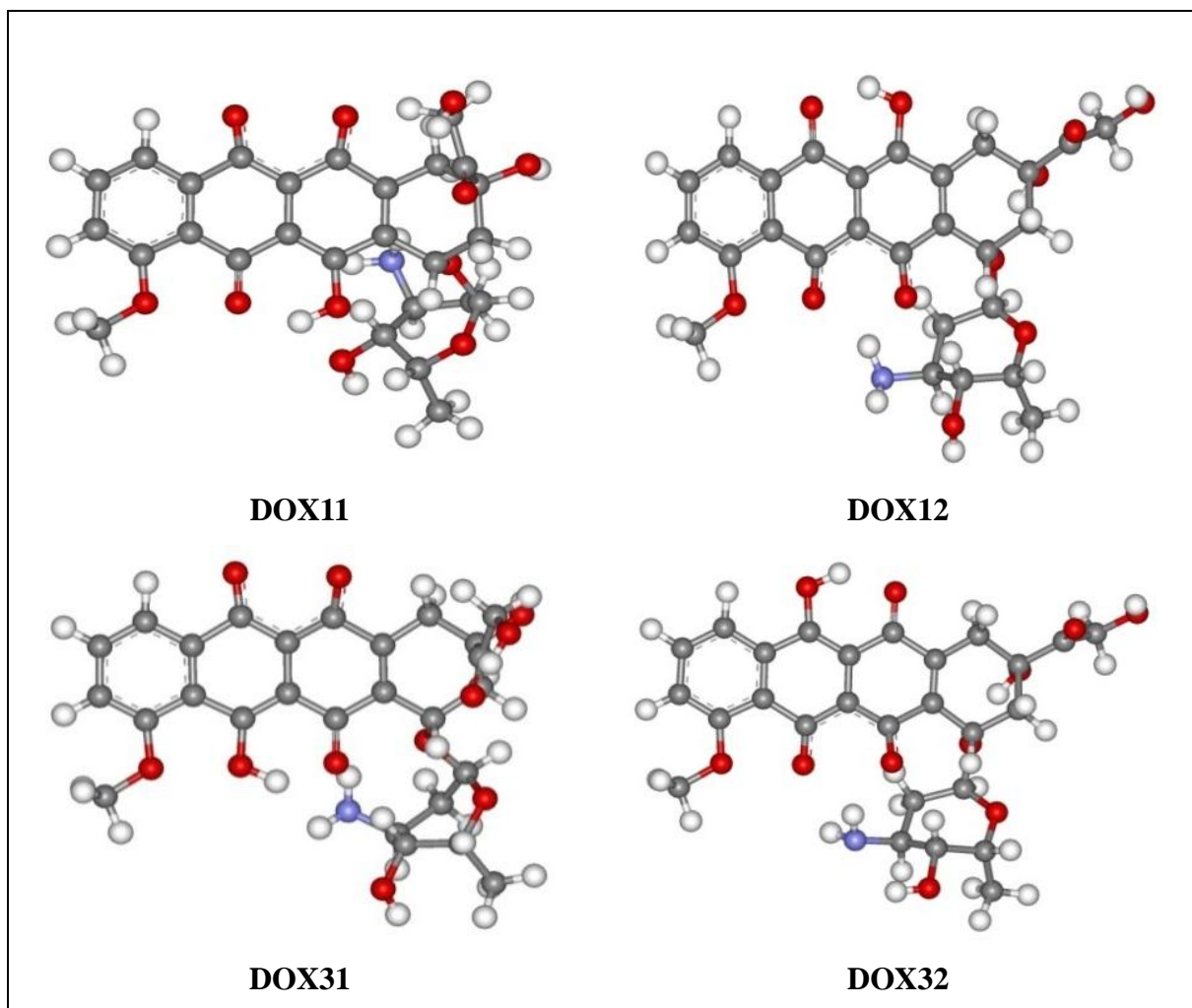


Figura 5. Estrutura molecular das espécies desprotonadas da doxorubicina. Além da desprotonação do grupo amônio, também foi removido um hidrogênio do grupamento hidroquinona, o que resultou em quatro diferentes tautômeros desprotonados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo Tautomérico: Estabilidades Relativas

As estabilidades relativas tomando como referência o calor de formação ($\Delta_f H$) do tautômero mais estável, calculado a partir dos quatro métodos semiempíricos assim como as estabilidades relativas calculadas a partir da energia total utilizando o método *DFT*, encontram-se apresentados na Tabela 1. As frequências vibracionais (não mostradas) de todos os modos de ligações apresentaram valores positivos, indicando que as geometrias obtidas pelos diferentes métodos encontravam-se em um mínimo de energia. Todos os métodos utilizados revelaram a DOX1 como a espécie tautomérica que apresentou menor valor de $\Delta_f H$, sugerindo-a como a forma tautomérica mais estável em fase gasosa e a DOX2 como sendo àquela que apresentou maior energia. Os valores de $\Delta_f H$ calculados para a DOX1 pelos métodos AM1, PM3, RM1 e PM6 foram respectivamente, -267,34, -249,63, -299,24 e -291,04 kcal mol⁻¹. O cálculo *DFT* apresentou o valor de energia total igual a 12,11 Gcal mol⁻¹ para a DOX1. Na Tabela 1 também estão apresentadas as estabilidades relativas para as espécies tautoméricas calculadas por Zhu e colaboradores [19] usando o funcional B3LYP com o conjunto de base 6-31G(d,p).

Tabela 1. Estabilidade relativa entre os diferentes tautômeros calculados a partir dos diferentes métodos utilizados. Para todos os métodos, a DOX1, por ser a mais estável, foi tomada como referência.

Tautômeros	AM1 (kcal mol ⁻¹)	PM3 (kcal mol ⁻¹)	RM1 (kcal mol ⁻¹)	PM6 (kcal mol ⁻¹)	<i>DFT</i> (kcal mol ⁻¹)	<i>DFT</i> * (kcal mol ⁻¹)
DOX1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DOX2	10,84	13,22	8,08	5,86	5,86	5,07
DOX3	7,37	4,95	4,57	1,88	2,23	3,43
DOX4	8,86	5,36	3,58	0,34	0,46	2,33

* Estabilidades relativas calculadas por Suhua Zhu e colaboradores [19].

A ordem decrescente de estabilidade dos diferentes tautômeros calculados pelos

métodos AM1 e PM3 foi a seguinte: DOX1 > DOX3 > DOX4 > DOX2. Enquanto que para os métodos RM1, PM6 e DFT a ordem decrescente de estabilidade dos tautômeros foi, DOX1 > DOX4 > DOX3 > DOX2, em acordo com os resultados obtidos por Zhu.

Como assinalado na Tabela 1 e considerando os métodos *DFT* como referência, nota-se que o PM6 apresenta os resultados mais concordantes quanto às estabilidades relativas para os tautômeros. Tal fato sugere o PM6 como sendo o método semiempírico mais exato dentre os utilizados no presente estudo tautomérico. Esta concordância qualitativa e de certo modo quantitativa assinalada entre o método PM6 e os cálculos *DFT* deve-se provavelmente ao fato do processo de desenvolvimento do PM6 ter feito uso de valores de calor de formação derivados da energia total de cálculos *DFT* [30].

A estabilidade relativa entre a DOX1 e DOX4 calculada no presente trabalho foi menor do que a prevista por Zhu e colaboradores. Na Figura 6, está apresentada a estrutura molecular da DOX1 e DOX4 otimizada utilizando o método *DFT* [B3LYP/6311G++(d,p)]. Provavelmente, essa menor estabilidade relativa deve-se ao maior número de ligações de hidrogênio intramoleculares formadas, conferindo uma estabilidade adicional ao respectivo tautômero, não prevista por Zhu e colaboradores. De fato, a distância assinalada na Figura 6, entre o nitrogênio do monossacarídeo e o oxigênio da quinona foram por volta de 4,20 Å, enquanto que a menor distância encontrada nas diversas estruturas estudadas por Zhu foi de 5,57 Å, sugerindo que os hidrogênios do agrupamento amina ficam bem separados dos oxigênios dos anéis, inviabilizando dessa forma a formação de ligações de hidrogênio.

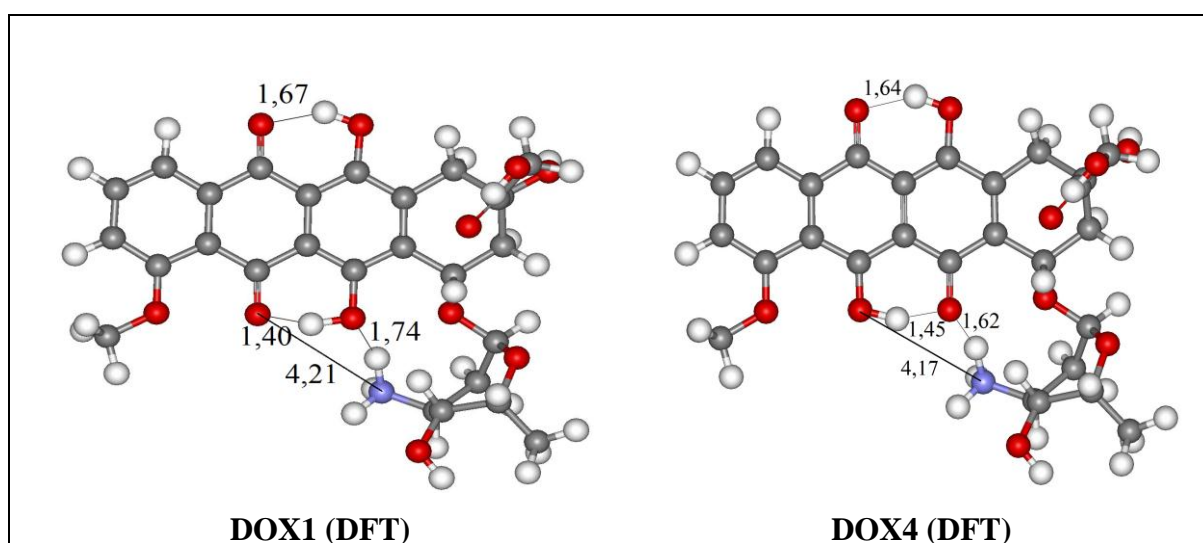


Figura 6. DOX1 e DOX4 otimizadas com o método *DFT* utilizando o funcional B3LYP/6-311G++(d,p), sendo evidenciada as possíveis ligações de hidrogênio intramoleculares, as quais conferem uma estabilidade adicional.

A Figura 7 mostra uma representação gráfica da distribuição populacional apresentada para os diferentes métodos. A distribuição de Boltzman assume grande importância quando se busca a determinação da distribuição populacional dos tautômeros, tomando como referência os seus valores de energia. Os métodos AM1 e PM3 revelaram valores de distribuição populacional iguais a 100% para a DOX1. Isso indica que a diferença de energia de $4,95 \text{ kcal mol}^{-1}$ entre a DOX1 e a DOX3, já se mostrou suficientemente capaz de favorecer unicamente a predominância da DOX1. No caso do RM1, a diferença energética da ordem de $3,58 \text{ kcal mol}^{-1}$ entre a DOX1 e a DOX4, levou a distribuição populacional a valores de 99,7% e 0,3%, respectivamente. Para o PM6, a pequena diferença de energia entre a DOX1 e a DOX4 da ordem de $0,34 \text{ kcal mol}^{-1}$, resultou em valores de distribuição de 62,3% e 35,1% para a DOX1 e DOX4 respectivamente, também foi observada uma distribuição populacional de 2,6% para a DOX3. É notório que apenas o PM6 e *DFT* atribuem mais de um tautômero presente no meio.

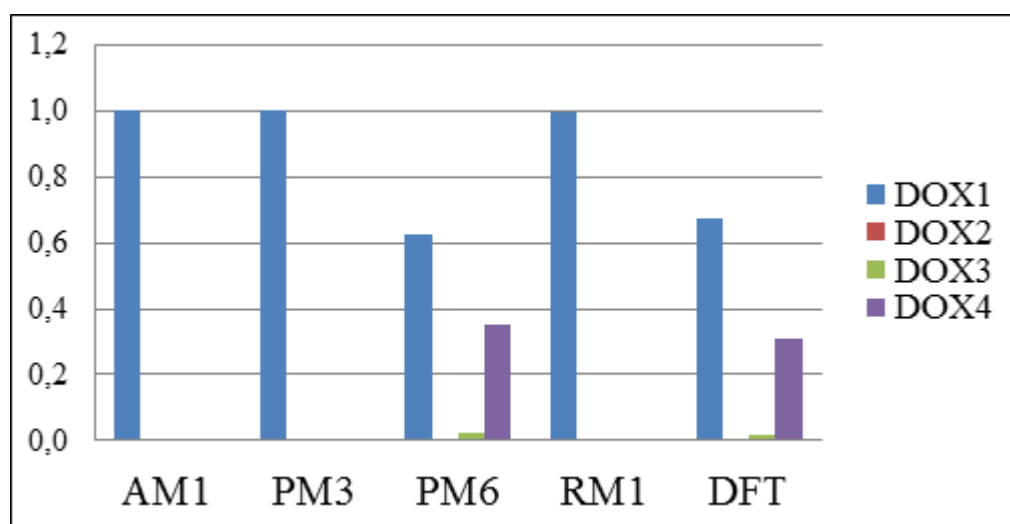


Figura 7. Representação gráfica das distribuições populacionais de cada espécie tautomérica.

Além do tautomerismo dessas quatro espécies estudadas, envolvido na transferência de prótons entre os grupos cetona e hidroxilas ligados aos anéis quinona e hidroquinona, existe outro possível tipo de tautomerismo. Este consiste na transferência de próton do carbono ligado à hidroxila para o oxigênio do grupo cetona do grupo hidroxiacetil, levando à formação de um dienol. Na Figura 8 está apresentada a conversão ceto-enólica referente à DOX1. Dessa forma, ainda são constatados mais três equilíbrios desse tipo apresentado pelas outras espécies tautoméricas (DOX2, DOX3 e DOX4). No caso especial do

PM6, que foi o método que apresentou as menores estabilidades relativas entre os diferentes tautômeros, cálculos mostraram que os tautômeros enólicos da DOX1, DOX2, DOX3 e DOX4 apresentaram os seguintes valores de $\Delta_f H$: -287,07 (DOX1'), -281,35 (DOX2'), -285,22 (DOX3') e -286,64 (DOX4') kcal mol⁻¹. Desses tautômeros, a DOX1' foi aquela que apresentou menor valor energético, sendo, portanto a mais estável. Entretanto, esse valor de energia, considerando ainda o PM6, é maior que da DOX3 (-289,16 kcal mol⁻¹) e menor que da DOX2 (-285,15 kcal mol⁻¹). Mesmo a DOX3 sendo a terceira espécie na ordem de estabilidade, sua contribuição populacional foi de 2,6%, assim, uma espécie química que venha a ter conteúdo energético maior, é de se esperar que sua contribuição populacional seja ainda menor. De fato, cálculo realizado utilizando a distribuição populacional de Boltzman revelou que a contribuição populacional da DOX1' para o sistema é menor que 0,1%. Diante disso, todos esses tautômeros enólicos foram desconsiderados nos cálculos que seguem.

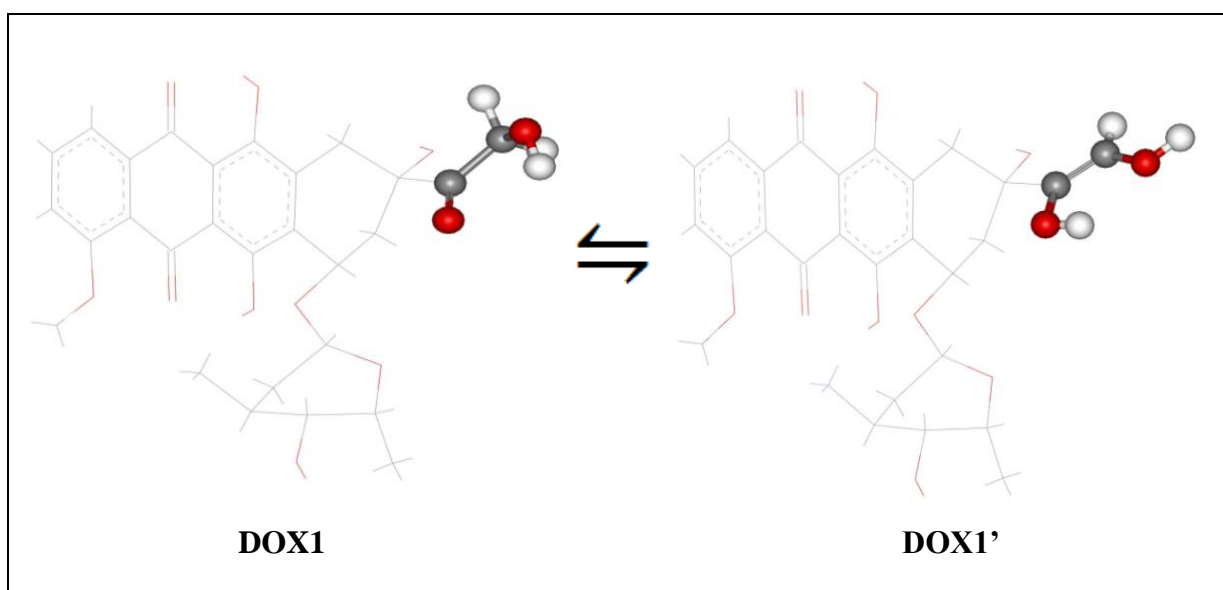


Figura 8. Conversão ceto-enólica no grupamento hidroxiacetil da DOX1, este tipo de equilíbrio não foi considerado no presente trabalho.

Os calores de formação calculados para os diferentes tautômeros da doxorubicina desprotonados utilizando os métodos semiempíricos, assim como o método *DFT* que vem sendo utilizado, encontram-se apresentados na Tabela 2. Diferentemente da modelagem dos tautômeros da doxorubicina protonados, onde todos os métodos utilizados assinalaram a DOX1 como sendo a espécie tautomérica mais estável, a modelagem das espécies desprotonadas não apresentou a mesma tendência. Enquanto o RM1 e o PM3 apontaram a

DOX12 como sendo a de menor conteúdo energético, o método PM6 apontou a DOX32. O método AM1 e *DFT*, por sua vez, indicaram a DOX11 como sendo a mais estável, diferentemente dos demais métodos.

Tabela 2. Estabilidade relativa entre os diferentes tautômeros desprotonados calculados a partir dos diferentes métodos semiempíricos. Para cada método foi tomada como referência o calor de formação do tautômero desprotonado mais estável.

Tautômeros	AM1 (kcal mol ⁻¹)	PM3 (kcal mol ⁻¹)	PM6 (kcal mol ⁻¹)	RM1 (kcal mol ⁻¹)	<i>DFT</i> (kcal mol ⁻¹)
DOX11	0,00	0,33	9,78	1,20	0,00
DOX12	0,67	0,00	1,30	0,00	3,25
DOX31	3,39	3,53	13,19	2,56	1,77
DOX32	4,32	4,66	0,00	3,24	5,26

As distribuições de Boltzmann calculadas para cada método utilizado encontram-se apresentadas na Figura 9. Conforme assinalada na Tabela 2, a diferença energética entre as diferentes espécies desprotonadas é menor do que a apresentada pelas doxorrubicina protonadas. Por isso, todos os métodos indicaram a presença de mais de uma espécie química no sistema em fase gasosa.

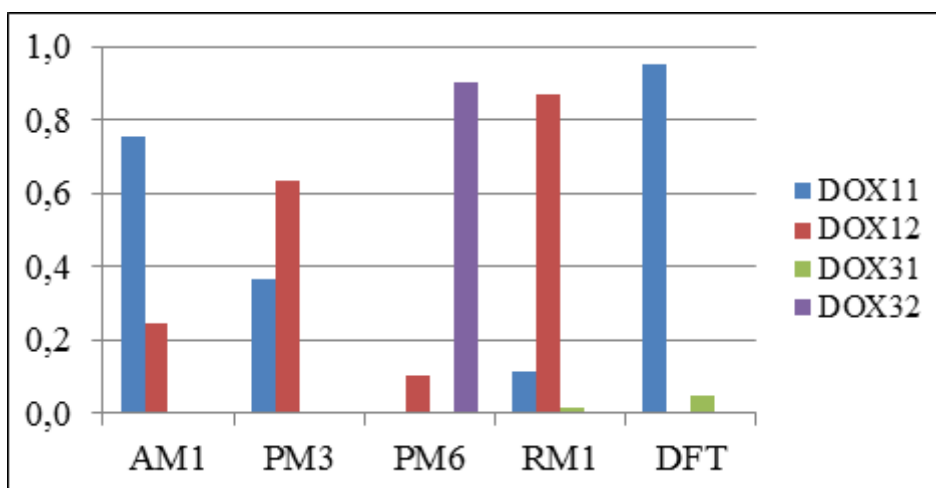


Figura 9. Representação gráfica das distribuições populacionais de cada espécie desprotonada segundo os métodos utilizados.

A remoção do próton de uma das hidroquinonas resulta na deslocalização eletrônica entre os dois oxigênios adjacentes do cromóforo antraquinona, com isso os diferentes tautômeros desprotonados tornam-se mais semelhantes entre si do que os tautômeros protonados. Possivelmente, essa característica foi responsável pelas pequenas

diferenças de energia relativa entre os tautômeros desprotonados e também pela irregularidade apresentada pelos diferentes métodos, pois os tratamentos eletrônicos dos diferentes métodos utilizados não conseguiram fazer uma distinção precisa dos diferentes tautômeros.

Tomando os resultados *DFT* como referência, pode-se concluir que os métodos semiempíricos utilizados, de modo geral, não apresentaram a mesma tendência quanto a estabilidade. Entretanto, o método AM1 foi o único semiempírico a apontar a DOX11 como a espécie química desprotonada mais estável, tal como revelou o cálculo realizado usando o método B3LYP/6-311G++(d,p).

4.2. Estudo Tautomérico: Estudo Termodinâmico e Cinético

Na Tabela 3 está apresentada a energia de ativação assim como a energia da geometria do estado de transição obtida para cada método semiempírico estudado. Na Figura 9 estão apresentados os perfis energéticos exibidos em cada reação de transferência de próton calculados pelos métodos AM1, PM3, PM6 e RM1.

Tabela 3. Energia de ativação (E_a) e energia dos estados de transição (E_{ts}) dada em kcal mol⁻¹ calculados para os métodos AM1, PM3, RM1 E PM6 para cada uma das conversões consideradas entre os tautômeros.

Conversão	AM1 (kcal mol ⁻¹)		PM3 (kcal mol ⁻¹)		RM1 (kcal mol ⁻¹)		PM6 (kcal mol ⁻¹)	
	E_{ts}	E_a	E_{ts}	E_a	E_{ts}	E_a	E_{ts}	E_a
DOX1 → DOX2	-241,12	26,22	-219,45	30,18	-289,00	10,24	-284,93	6,10
DOX1 → DOX4	-245,18	22,17	-226,48	23,15	-293,55	5,67	-224,25	66,79
DOX2 → DOX3	-238,49	18,02	-218,82	17,60	-285,28	5,88	-282,55	2,63
DOX3 → DOX4	-238,83	21,14	-218,96	25,72	-287,64	7,02	-286,89	2,26

Para a conversão DOX1 → DOX2, conforme assinalado na Tabela 3 e na Figura 10, os métodos AM1 e PM3 apresentaram o mesmo comportamento qualitativo quanto aos valores de calor de formação do reagente, do estado de transição e do produto, sendo os valores do PM3 sempre maiores. Como o AM1 estabiliza menos o reagente do que o estado de transição, em comparação com PM3, a energia de ativação (E_a) da reação calculada usando AM1 (26,22 kcal mol⁻¹) ficou mais baixa do que o calculado com o PM3 (30,18 kcal mol⁻¹). Por sua vez, o RM1 e o PM6 apresentaram barreiras de ativação bem inferiores que as

fornechas pelo AM1 e PM3, a altura das barreiras foram respectivamente, 10,24 e 6,10 kcal mol⁻¹. Ambos os métodos estabilizam mais fortemente o estado de transição que seus antecessores. É conhecido que as barreiras de ativação do AM1 e PM3 são, em geral, superestimadas [47].

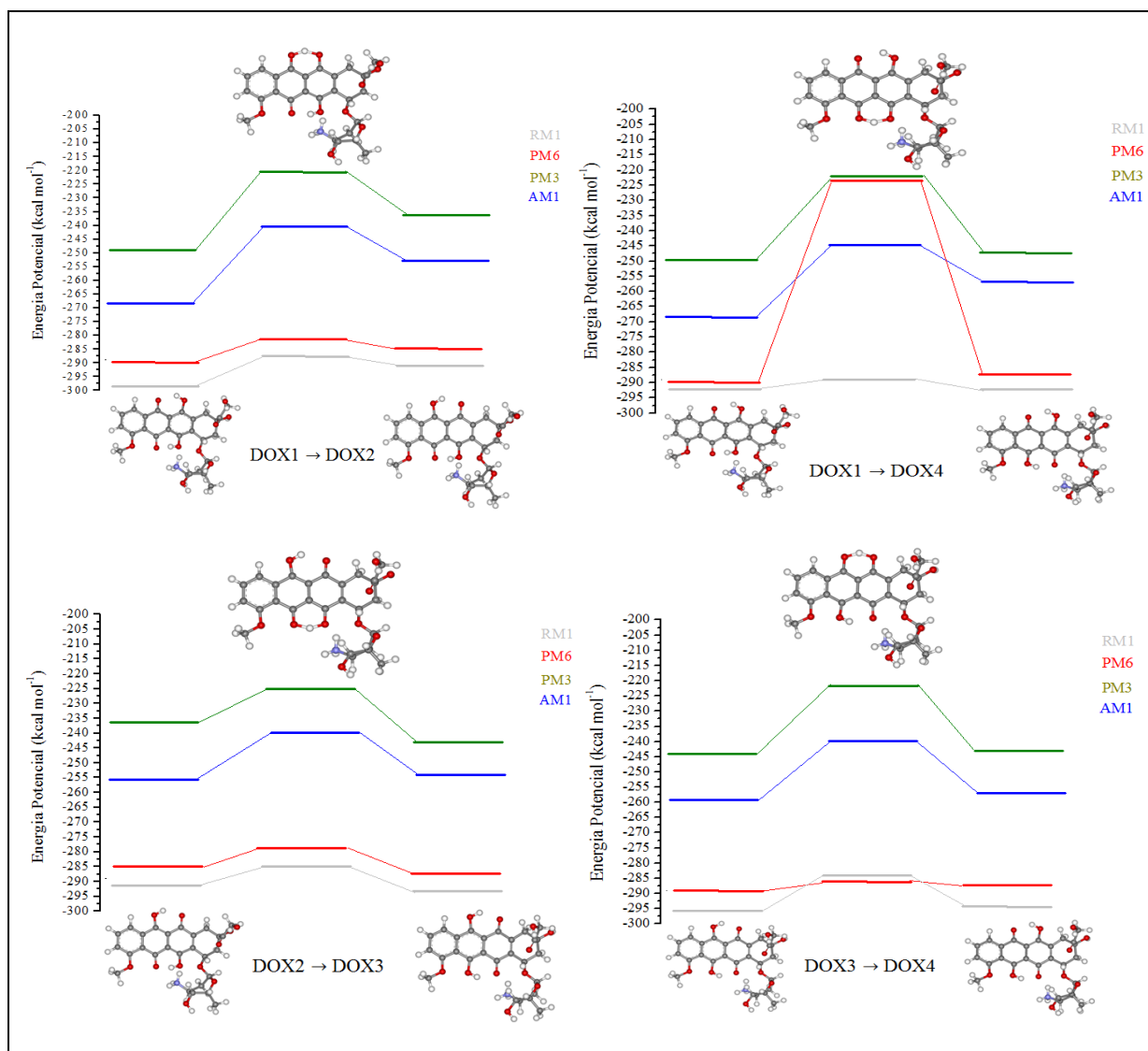


Figura 10. Diagramas de energia calculados pelos métodos AM1, PM3, PM6 e RM1 para as espécies químicas envolvidas em cada reação considerada de transferência de próton.

No caso da conversão DOX1 → DOX4, o fator mais relevante a ser assinalado consiste no alto valor da energia de ativação calculado pelo PM6, 66,79 kcal mol⁻¹, em nenhum outro cálculo, a E_a foi tão elevada (ver Tabela 3). Estes cálculos sugerem que a barreira energética a ser superada tanto no sentido direto quanto no sentido inverso da conversão, é tão elevada que a reação seria cineticamente inviável de acontecer nos dois

sentidos de acordo com o mecanismo estudado em fase gasosa. A energia de ativação para os métodos SQ AM1 e PM3, foi de 23,11 e 28,07 kcal mol⁻¹, respectivamente, apresentando o RM1 um valor de 6,90 kcal mol⁻¹. Neste caso, o PM6, diferentemente dos casos anteriores, desestabilizou muito o estado de transição.

Qualitativamente, a conversão DOX2 → DOX3 assemelha-se à conversão DOX1 → DOX4, apresentando-se o AM1 (18,02 kcal mol⁻¹) e o PM3 (17,60 kcal mol⁻¹) valores de E_a parecidos, enquanto que os valores de E_a para o RM1 e PM6 foram respectivamente, 5,88 e 2,63 kcal mol⁻¹. Para a conversão DOX3 → DOX4, novamente o AM1 (21,14 kcal mol⁻¹) e o PM3 (25,72 kcal mol⁻¹) apresentaram mesmo comportamento qualitativo, à medida que o PM6 (2,26 kcal mol⁻¹) e o RM1 (7,02 kcal mol⁻¹) apresentaram o mesmo comportamento quantitativo. Seria de esperar que os resultados obtidos com o RM1 assemelhassem mais ao do AM1, pois esses dois métodos apresentam a mesma formulação matemática, divergindo apenas nos conjuntos de parâmetros que compõem cada um dos modelos. Entretanto, esses resultados asseguram a importância que os parâmetros que compõem um dado modelo podem assumir.

Os dados termodinâmicos das espécies tautoméricas, tais como ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger , necessários para realização do estudo cinético, calculados a 298 K, encontram-se apresentados na Tabela A1 em anexo. Utilizando esses dados foi possível calcular as constantes de equilíbrio e de velocidade de cada conversão tautomérica, estando os dados apresentados na Tabela 4.

Todas as constantes de velocidades calculadas pelos diferentes métodos semiempíricos relacionadas à conversão DOX1 → DOX2 (k₁), assim como à conversão DOX1 → DOX4 (k₂) apresentaram valores menores do que as suas constantes de velocidade de suas reações no sentido inverso (k₋₁ e k₋₂). De fato, isso é consequência da maior estabilidade apresentada pela DOX1 em comparação com as demais espécies, gerando barreiras sempre maiores na direção direta da reação. Os valores pequenos de k₁ e k₂, para o AM1 e o PM3, sugerem uma pequena tendência para conversão da DOX1 nas formas tautoméricas DOX2 e DOX4, na reação em fase gasosa, já o RM1 sugere que a velocidade de conversão é bem mais rápida. Os valores pequenos da constante de equilíbrio K₁, para a conversão DOX1 em DOX2 e DOX4 é um reflexo da grande estabilidade da DOX1 sugerida pela maioria dos métodos SQ como podem ser observados na Tabela 3. De fato, como a energia relativa entre as espécies DOX1 e DOX2 calculada pelo PM6 é menor do que para os

outros três métodos, ver Tabela 1, já era de se esperar que a sua constante de equilíbrio fosse realmente maior do que a apresentada pelos outros métodos.

Tabela 4. Constantes de equilíbrio (K_{eq}) e de velocidades (k_1 e k_{-1}) calculados a 298K com os diferentes métodos semiempíricos para as conversões tautoméricas da doxorubicina.

Métodos	$K_1 (1 \rightarrow 2)$	k_1/s^{-1}	
		DOX1 \rightarrow DOX2	DOX2 \rightarrow DOX1
AM1	$1,71 \times 10^{-8}$	$1,48 \times 10^{-7}$	$8,66 \times 10^0$
PM3	$5,98 \times 10^{-10}$	$5,33 \times 10^{-11}$	$8,92 \times 10^{-2}$
PM6	$4,68 \times 10^{-5}$	$8,14 \times 10^7$	$1,74 \times 10^{12}$
RM1	$5,99 \times 10^{-7}$	$6,95 \times 10^3$	$1,16 \times 10^{10}$
Métodos	$K_2 (1 \rightarrow 4)$	k_2/s^{-1}	
		DOX1 \rightarrow DOX4	DOX4 \rightarrow DOX1
AM1	$8,41 \times 10^{-7}$	$2,57 \times 10^{-5}$	$3,06 \times 10^1$
PM3	$7,94 \times 10^{-5}$	$3,12 \times 10^{-6}$	$3,93 \times 10^{-2}$
PM6	$1,11 \times 10^0$	$5,64 \times 10^{-36}$	$5,09 \times 10^{-36}$
RM1	$1,77 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^7$	$7,84 \times 10^9$
Métodos	$K_3 (2 \rightarrow 3)$	k_3/s^{-1}	
		DOX2 \rightarrow DOX3	DOX3 \rightarrow DOX2
AM1	$1,09 \times 10^3$	$2,21 \times 10^{-1}$	$2,03 \times 10^{-4}$
PM3	$8,49 \times 10^5$	$1,82 \times 10^{-2}$	$2,15 \times 10^{-8}$
PM6	$9,03 \times 10^3$	$6,83 \times 10^{10}$	$6,56 \times 10^6$
RM1	$1,39 \times 10^3$	$3,08 \times 10^7$	$2,22 \times 10^4$
Métodos	$K_4 (3 \rightarrow 4)$	k_4/s^{-1}	
		DOX3 \rightarrow DOX4	DOX4 \rightarrow DOX3
AM1	$4,50 \times 10^{-2}$	$2,23 \times 10^{-5}$	$4,94 \times 10^{-4}$
PM3	$1,56 \times 10^{-1}$	$4,18 \times 10^{-8}$	$2,67 \times 10^{-7}$
PM6	$2,62 \times 10^0$	$9,66 \times 10^9$	$3,69 \times 10^9$
RM1	$2,13 \times 10^0$	$1,23 \times 10^6$	$5,75 \times 10^5$

No caso da conversão DOX2 \rightarrow DOX3 e DOX3 \rightarrow DOX4, como os reagentes apresentam maior conteúdo energético em comparação aos seus respectivos produtos, foram obtidos valores de constante de equilíbrio relativamente maiores quando comparadas as duas primeiras conversões já discutidas. O maior valor de K_3 determinado pelo método PM3, em comparação aos outros métodos, foi reflexo da maior diferença de estabilidade relativa entre a DOX3 e a DOX2, 8,27 kcal mol⁻¹, conforme já apresentado na Tabela 1.

No geral, todos os métodos semiempíricos apresentam-se qualitativamente e até mesmo quantitativamente parecidos, com exceção da conversão DOX1 \rightarrow DOX4,

especialmente para o método PM6, em decorrência das diferenças de estabilidades apresentadas pelas espécies tautoméricas otimizadas com o PM6, em relação aos outros métodos.

4.3. Estudo Espectroscópico

A Figura 11 apresenta os espectros de absorção da DOX1, na região de 300 a 450 nm, calculados com o método INDO/S-CIS, utilizando as geometrias obtidas pelos métodos SQ supracitados e pelo método *DFT* [B3LYP/6-311++G(d,p)]. Nota-se que todos os espectros apresentam, no geral, o mesmo perfil, entretanto as bandas de absorção ficaram em diferentes posições. Considerando ainda as geometrias obtidas com o método *DFT* como referência, fica evidente que todos os métodos SQ deslocaram a posição das bandas para regiões de menores comprimentos de onda (deslocamento para o azul). A banda do espectro da DOX1 obtida a partir da geometria otimizada com o método PM3 foi a que mais se afastou da banda da referência, enquanto a obtida através da geometria PM6 foi aquela mais próxima ao da referência dentre as geometrias otimizadas com os métodos SQ utilizados, apresentando uma diferença de aproximadamente 20 nm na direção dos menores comprimentos de onda.

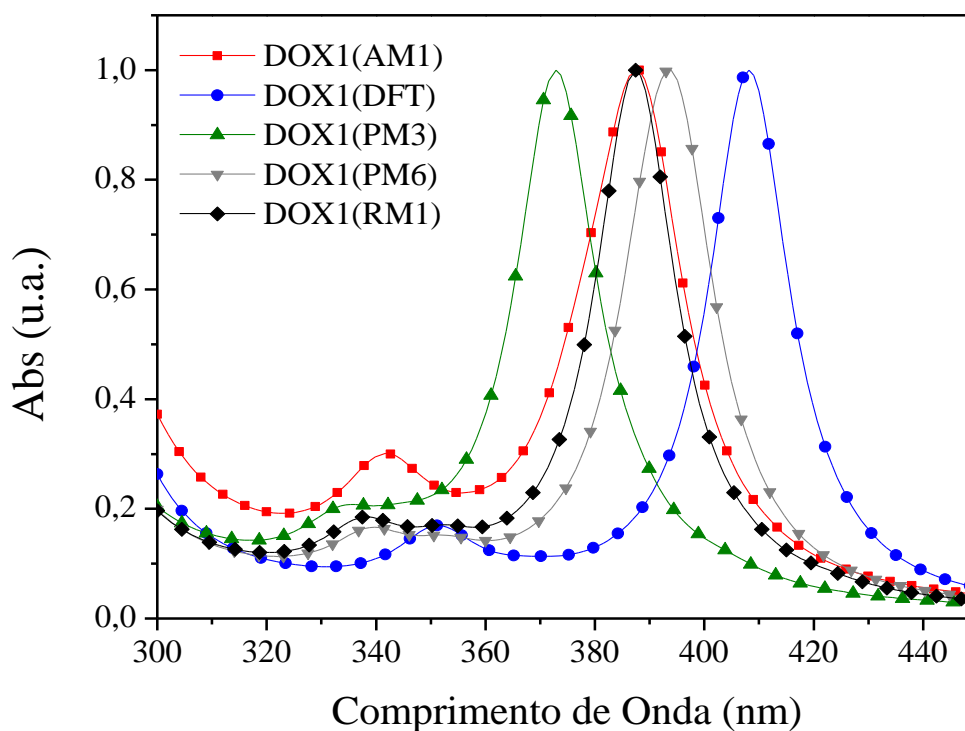


Figura 11. Espectros de absorção da DOX1 utilizando as geometrias otimizadas a partir dos métodos semiempíricos AM1, PM3, RM1, PM6 e também do método *DFT*. Um ajuste Lorentziano cuja largura de banda foi de 15 nm foi utilizado.

Como os espectros de absorção calculados são dependentes da geometria, a maior

concordância assinalada entre os espectros obtidos através da geometria otimizada com o método PM6 e com o *DFT* corrobora também com a concordância das geometrias otimizadas por esses dois métodos. De fato, o menor valor de RMSD (raiz da soma dos quadrados dos desvios) apresentados na Tabela 5 confirma que a geometria DOX1 (PM6) é a mais similar com a geometria DOX1 (*DFT*). O maior valor de RMSD apresentado pelo PM3 reflete no maior deslocamento das bandas no espectro.

Tabela 5. Valores de RMSD calculados para a DOX1 otimizadas com os diferentes métodos tomando a geometria da DOX1 otimizada com o método *DFT* [B3LYP/6-311++G (d,p)] como referência.

Métodos	AM1	PM3	PM6	RM1
RMSD	0,4726	0,5588	0,2614	0,3142

Outro aspecto importante a ser analisado na Figura 11, é que a banda do espectro da DOX1 (AM1) e da DOX1 (RM1) apresentaram o mesmo comprimento de onda referente ao máximo de absorção. Embora a ordem relativa de estabilidade entre os seus tautômeros assim como as tendências assinaladas no estudo termodinâmico e cinético entre esses dois métodos tenham sido diferentes, a semelhança denotada por seus espectros revela certa similaridade estrutural entre a DOX1(AM1) e a DOX1(RM1). Esses dados evidenciam que os diferentes parâmetros desses modelos refletem em diferenças mais significativas nos valores de energia calculados do que propriamente na geometria otimizada.

Os espectros de absorção calculados para cada tautômero otimizado com o método *DFT* encontram-se apresentados na Figura 12. Tais espectros foram obtidos utilizando a mesma janela de excitação, que corresponde ao número de orbitais ocupados e desocupados utilizados para as interações de configurações, assim como todos os outros parâmetros de cálculo.

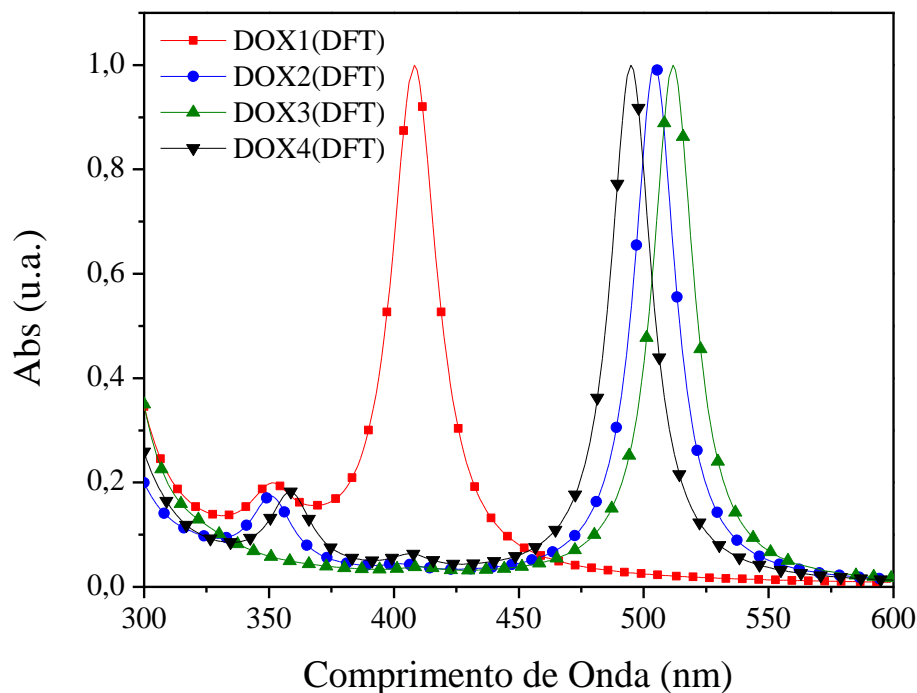


Figura 12. Espectros obtidos com o modelo INDO/S-CI a partir das geometrias otimizadas com método *DFT*. Um ajuste Lorentziano cuja largura de banda foi de 15 nm foi utilizado.

A Figura 13 mostra a presença de um plano nodal entre os orbitais moleculares HOMO e LUMO responsáveis pelas transições na região de maior comprimento de onda. Esta característica assinala que esses orbitais são do tipo π . Assim, em todos os tautômeros apresentados, as transições responsáveis pela absorção são $\pi \rightarrow \pi^*$. A atribuição teórica ratifica a atribuição experimental para esta banda. Os orbitais em azul/verde representam os orbitais ocupados, enquanto os orbitais vermelho/amarelo representam os orbitais desocupados. Observando a figura, nota-se que a transição na DOX1 é principalmente representada por uma transferência de carga do anel C para o B, ou seja, a transição é caracterizada pela migração da densidade eletrônica do anel hidroquinona para o anel quinona. Na DOX3 a migração de densidade eletrônica ocorre do anel quinona para o anel hidroquinona e também para o anel aromático conjugado (anel A). No caso da DOX2 e DOX4, as transições eletrônicas redistribuem a densidade de carga entre os anéis semiquinonas e o anel aromático conjugado.

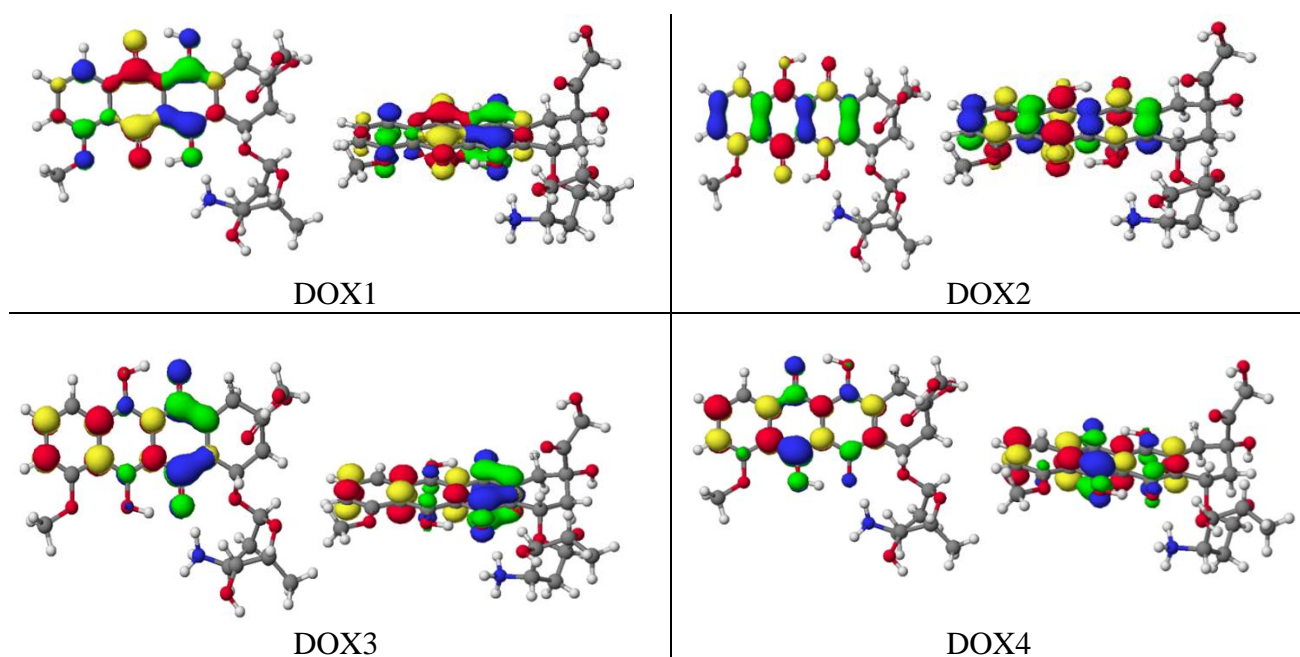


Figura 13. Orbitais moleculares HOMO (cores verde/azul) e LUMO (cores amarelo/vermelho) responsáveis pelas transições referentes às absorções na região do visível apresentados sobre duas perspectivas.

Segundo Pavia [49], o maior deslocamento para o vermelho apresentado por algumas espécies aromáticas está diretamente relacionado ao maior grau de conjugação entre os anéis, com isso é justificado o maior deslocamento para o vermelho que hidrocarbonetos aromáticos com número grande de anéis apresentam quando comparados àqueles com um menor número. Dessa forma, o maior deslocamento para o vermelho da DOX3, é explicado através da maior conjugação entre os seus anéis A e B (aromáticos), conseqüentemente a transição eletrônica migra do anel C, não apenas para o B, como ocorre com a DOX1, mais também para o anel aromático A.

Os espectros de absorção calculados para os tautômeros desprotonados otimizados pelo método B3LYP/6-311G++(d,p) encontram-se apresentados na Figura 14. Assim como os espectros das espécies química protonadas, os espectros teóricos das espécies químicas desprotonadas também revelaram a presença de uma única banda na região de absorção no visível para cada tautômero desprotonado. Um aspecto relevante a ser destacado é o grande deslocamento para regiões de maiores comprimentos de onda, apresentando-se no intervalo de 500 a 650 nm. Comparando com os espectros das espécies protonadas, não existe mais uma banda muito deslocada das outras três. Isso sugere que dentre as espécies protonadas, a DOX1 foi aquela que sofreu o maior deslocamento ao perder um dos dois prótons hidroquinolínicos.

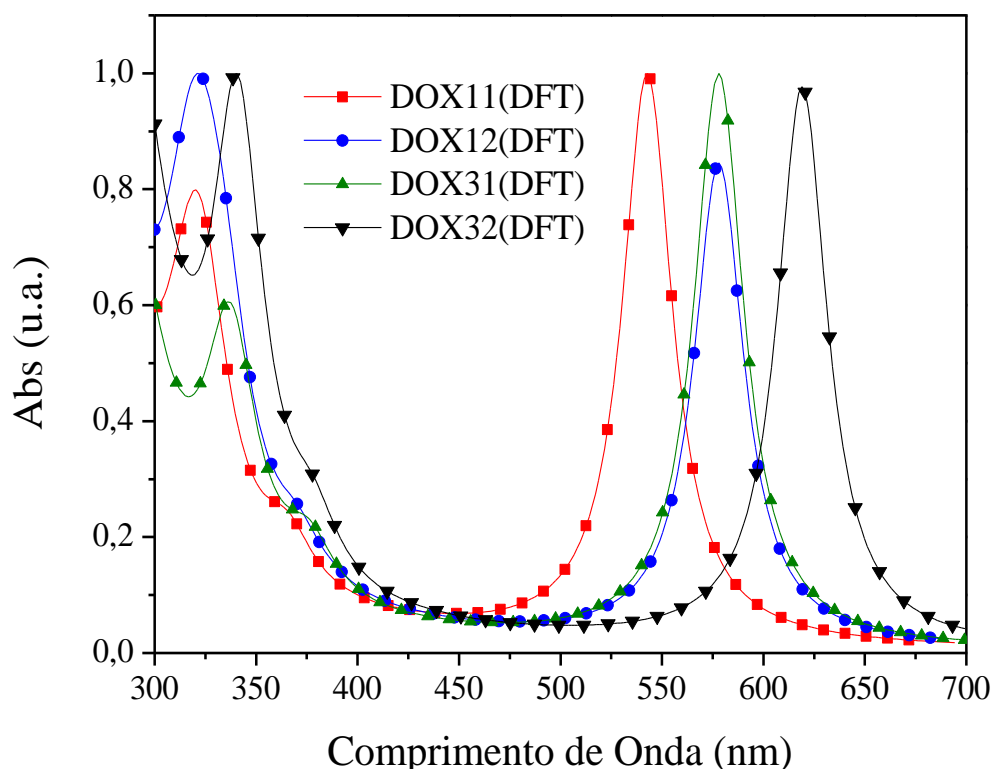


Figura 14. Espectros obtidos com o modelo INDO/S-CI a partir das geometrias otimizadas com o método *DFT*. Foi utilizado um ajuste Lorentziano cuja largura de banda foi de 15 nm para as espécies de doxorrubicina desprotonadas.

Observando a Figura 14, nota-se que as bandas de absorção da DOX12 e DOX3, no intervalo de 500 a 650 nm, estão completamente sobrepostas, por isso, no intervalo de 400 a 750 nm aparecem apenas três bandas. Estas bandas apresentaram maior separação em relação às três das espécies protonadas que aparecem no intervalo de 450 a 550 nm.

Na Figura 15 estão apresentados os espectros de absorção no UV/Vis experimentais da doxorrubicina medidos em solução aquosa em diferentes pH. Na figura está assinalada apenas a região espectral referentes às absorções no visível. Esses espectros de absorção foram gentilmente fornecidos pela doutoranda Iane Bezerra, aluna do grupo de pesquisa coordenado pelo prof. Severino Alves Júnior da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Analisando os espectros experimentais, é possível constatar basicamente três perfis de espectros: i) pH 5 e 6, ii) pH 7 e iii) pH 8, 9 e 12.

Segundo os espectros experimentais, o pH é um parâmetro químico importante, pois influencia diretamente a cor que se observa da doxorrubicina. Em pH ácido, a doxorrubicina exibe coloração alaranjada (absorção em torno de 460 nm), à medida que em pH básico sua coloração é violeta (absorção em torno de 550 nm), conforme pode ser

constatado analisando a Figura 15.

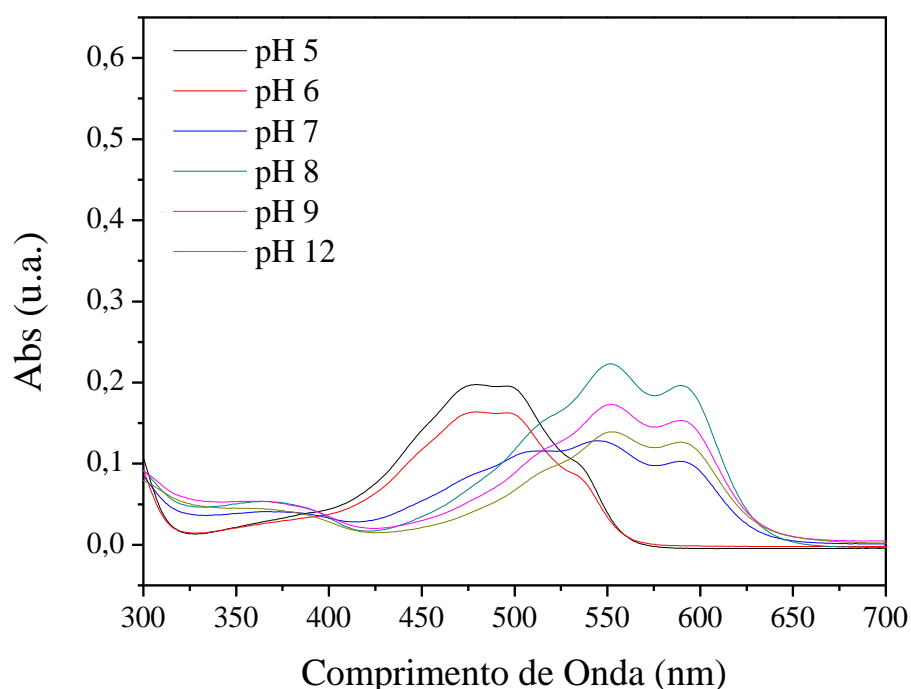


Figura 15. Espectros de absorção no UV/Vis experimentais da doxorubicina em solução aquosa obtidos em diferentes pH, no intervalo de comprimento de onda que compreende a absorção no visível.

Em pH ácido está sendo considerado predominantemente a presença dos tautômeros protonados. Através do estudo de desprotonação, busca-se explicações acerca dos espectros registrados em pH básico.

Considerando os espectros obtidos a pH ácido, na faixa de comprimentos de onda de 400 a 650 nm, é possível inferir a existência de mais de uma banda, diferentemente de cada um dos espectros teóricos apresentados na Figura 12. Nota-se claramente um acentuado deslocamento para regiões de maiores comprimento de onda quando o pH do sistema foi aumentado. O espectro de absorção obtido a pH 7 apresenta bandas de absorção estendendo-se de 450 a 650 nm, assinalando possivelmente a coexistência das espécies químicas que se encontram presentes em pH ácido em conjunto com aquelas existentes em pH básico. Como as bandas de absorção mais intensas, ocorre na região de 500 a 600 nm, isso leva a crer que as espécies predominantes em pH básico são mais abundantes do que aquelas presentes em meio ácido.

Os cálculos teóricos de maneira geral asseguram, através das distribuições de

Boltzman, a existência predominantemente da DOX1 no sistema. Além do mais, a banda de absorção da DOX1 foi a mais deslocada para a região de comprimento de onda menores (por volta de 400 nm), justamente a região onde se observa uma redução da absorção da DOX em pH ácido. Segundo as distribuições populacionais determinadas, seria esperado que o perfil do espectro experimental fosse semelhante ao perfil do espectro calculado da DOX1. Nota-se claramente que isso não é observado uma vez que os espectros experimentais obtidos em pH ácido apresentam mais de uma banda no intervalo de 400 a 570 nm.

Segundo a Figura 12, nota-se que cada forma tautomérica de DOX está relacionada a uma única banda de absorção na região do visível. Observa-se que o máximo de absorção das formas DOX2 (510 nm), DOX3 (520 nm) e DOX4 (480 nm) estão compreendidos relativamente em um curto intervalo de comprimentos de onda. Conseqüentemente, caso o espectro de absorção experimental apresentasse uma única banda de absorção na região de 480 a 510 nm, seria bastante difícil fazer inferências sobre a existência das diferentes formas tautoméricas da DOX, pois tal banda de absorção poderia estar relacionada a qualquer uma das formas tautoméricas, com exceção, é claro, da DOX1, a qual apresenta máximo de absorção bastante deslocado. Entretanto, isso não ocorre, pois como se observa no espectro experimental (ver Figura 15). Dessa forma, pode-se inferir que muito provavelmente coexistem no meio reacional mais de uma forma tautomérica. Apontando assim, para uma direção oposta a indicada pelos cálculos de distribuição de população.

Apesar de ser controverso em que faixa de pH o derivado aglicona resultante da degradação da doxorubicina (abreviada simplesmente por DOXONA) deixa de ser formado, foi feito um estudo espectroscópico acerca dos seus espectros. As estruturas moleculares das diferentes formas tautoméricas da DOXONA encontram-se apresentadas na Figura 16. Estas geometrias foram otimizadas com o método PM6, conforme procedimento descrito na seção 3.1.1. O método PM6 foi utilizado em decorrência de seu baixo custo computacional frente os métodos *DFT*. Para obtenção dos espectros de absorção foi aplicado o mesmo procedimento computacional descrito na seção 3.1.5. Apesar das entalpias de formação dos tautômeros da DOXONA estarem apresentadas na Figura 16, elas não serão utilizadas na discussão que segue, pois não é objetivada uma abordagem bastante pormenorizada.

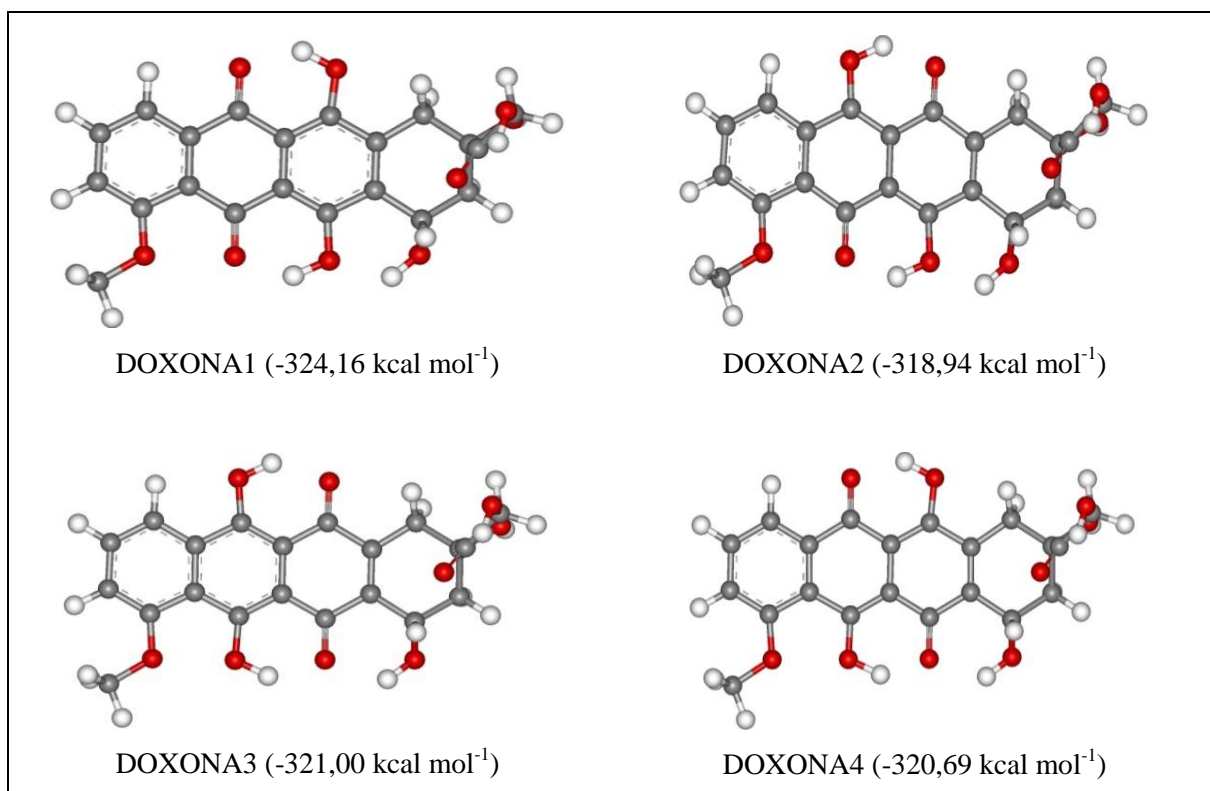


Figura 16. Geometrias das doxorubicinonas (DOXONA) otimizadas com o método semiempírico PM6. As entalpias de formação obtidas encontram-se apresentadas entre parênteses.

De acordo com Nawara e colaboradores [50] o espectro de uma solução de DOX depois de uma fotodegradação por irradiação de laser não revela qualquer banda que seja obviamente o resultado dos subprodutos da fotodegradação da doxorubicina. Esses pesquisadores observaram a formação de dois possíveis subprodutos estáveis através da reação induzida por fótons de luz, sendo um deles a diidroquinona, a qual se assemelha a DOXONA, diferindo apenas na presença de dois anéis hidroquinonas. Dessa forma, o estudo espectroscópico da DOXONA, visou constatar se existe alguma diferença entre os espectros de absorção resultante dos tautômeros da DOXONA quando comparados com os tautômeros da DOX.

Como o perfil do espectro de apenas um dos tautômeros não reproduz o perfil experimental, de agora em diante os espectros teóricos serão construídos considerando a contribuição de todos os tautômeros, conforme apresentado na Figura 17. Analisando esses espectros, constatam-se as semelhanças tanto no perfil dos espectros assim como nas posições de absorção da DOXONA em comparação aos espectros obtidos para os tautômeros da DOX otimizados com o método PM6, sendo a diferença nas posições de máximo de absorção na

ordem de 10 nm, corroborando assim com o proposto por Nawara e colaboradores [50]. Como podem ser observadas na Figura 13, as transições eletrônicas responsáveis pela absorção na região dos comprimentos de onda do visível dão-se nos anéis quinonas e hidroquinonas. Dessa forma, caso não haja alguma alteração na estrutura da molécula de modo a modificar a densidade eletrônica de tais orbitais, os espectros de absorção das DOX e de suas espécies degradadas serão muito semelhantes, isso explica o porquê dos espectros não apresentarem diferenças pronunciadas. De fato, a daunosamina encontrava-se ligada ao anel não aromático da doxorubicina, o qual não contribui para as transições aqui estudadas.

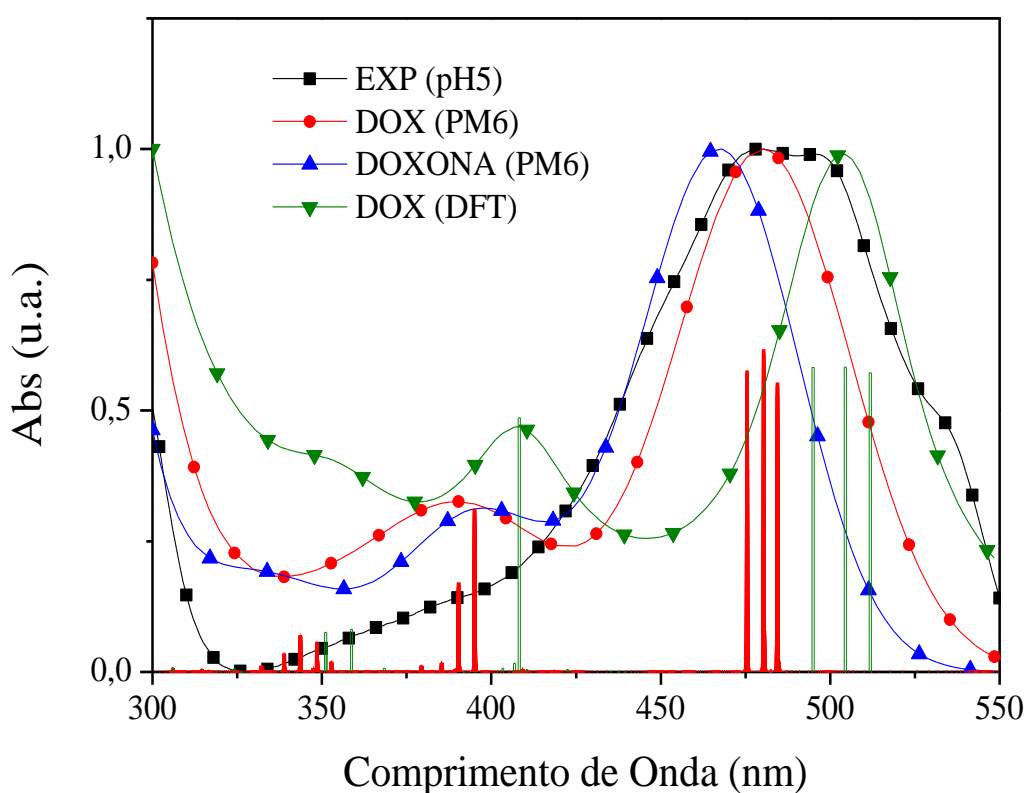


Figura 17. Espectros de absorção resultante da contribuição de todos os tautômeros da DOXONA otimizados com o método PM6 e dos tautômeros da DOX otimizados com o método PM6 e *DFT*. As barras vermelhas e verdes indicam a intensidade das forças dos osciladores versus posição de absorção para as DOX otimizadas com o método PM6 e *DFT*, respectivamente.

Comparando os espectros de absorção resultante da contribuição de todos os tautômeros da DOX otimizados com o método PM6 e *DFT*, através da Figura 17, observa-se a importância que as geometrias assumem para o cálculo dessa propriedade espectroscópica. Enquanto o máximo de absorção da DOX (PM6) deu-se por volta de 475 nm, o valor do comprimento de onda referente à absorção da DOX (*DFT*) foi em torno de 515 nm.

Consequentemente o espectro de absorção da DOX (*DFT*) deslocou-se 40 nm para regiões de maiores comprimentos de onda em comparação ao espectro da DOX (PM6). Nesse caso, a utilização das geometrias otimizadas com o método PM6 resultou em espectros cujas bandas de absorção denotaram maior similaridade com o espectro experimental, quando comparados com os espectros obtidos a partir das geometrias otimizadas com o método *DFT*. Provavelmente, esse deslocamento é bem mais acentuado do que o obtido caso estivesse sendo feitas comparações entre dois espectros levando em consideração o efeito do solvente.

Apesar do ajuste Lorentziano aplicado para obtenção dos espectros de absorção teóricos ter levado a presença de uma única banda de absorção quando é considerada a contribuição de todas as espécies tautoméricas da DOX, os gráficos de barras presentes na Figura 15 mostram a presença de três forças do oscilador tanto no cálculo DOX (PM6) como no DOX (*DFT*). Dessa forma, as bandas intensas que aparecem em 475, 500 e 530 nm, no espectro experimental obtido em meio ácido, podem ser associadas, mediante comparação com os espectros teóricos individuais das DOX protonadas (ver Figura 12), com os respectivos tautômeros: DOX4, DOX2 e DOX3.

Observa-se nos espectros de absorção experimental da doxorrubicina em meio básico a presença de três bandas: em 530 nm, 560 nm e uma terceira por volta de 600 nm. Tais comprimentos de onda estão condizentes com as posições das bandas de absorção calculadas para os diferentes tautômeros desprotonados, ver Figura 14. Essas informações levam a crer, que a presença das três bandas no espectro de absorção experimental da doxorrubicina em meio básico deve-se a contribuição simultânea dos quatro possíveis tautômeros desprotonados. Semelhantemente a discussão já apresentada para os tautômeros protonados, a consideração das distribuições de população de Boltzman para explicar o aparecimento das diversas bandas de absorção que aparecem no espectro de absorção em pH básico não é apropriada, pois tal distribuição indica simplesmente a presença de dois tautômeros predominantemente no sistema. Dessa forma, seria elucidado o aparecimento apenas de duas bandas, e não três como são assinaladas pelo espectro experimental.

A estratégia empregada para justificar a presença das três bandas de absorção que aparecem no espectro experimental consiste em considerar a contribuição de todas as formas tautoméricas, conforme ilustrado na Figura 18. Além dos espectros obtidos através da contribuição de todos os tautômeros otimizadas com o método *DFT*, também está apresentado na Figura 18, o espectro obtido utilizando as geometrias otimizadas com o método PM6, a fim de realizar comparações. Percebe-se claramente um deslocamento bastante acentuado para

regiões de maiores comprimentos de onda pelo espectro das estruturas *DFT*, mesmo sendo mais deslocado, o perfil do espectro foi mais concordante com o obtido experimentalmente, embora o espectro das estruturas PM6 também tenha denotado boa correlação com o experimental. Através da comparação dos espectros, sejam obtidos com as estruturas *DFT* assim como com as estruturas PM6, nota-se que é bastante conveniente a consideração de todas as espécies tautoméricas desprotonadas como sendo responsáveis pelo aparecimento das diversas bandas de absorção que aparecem nos espectros experimentais na região de absorção no visível.

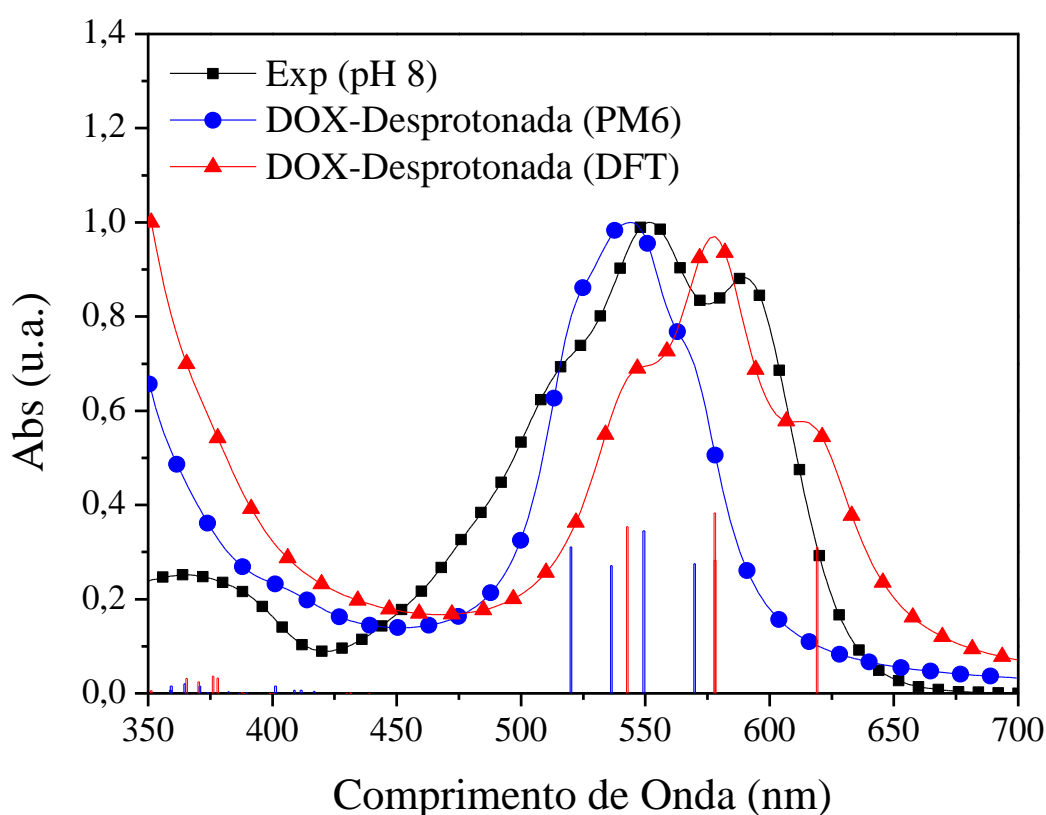


Figura 18. Espectro de absorção experimental obtido a pH 8 e espectros de absorção teóricos obtidos através do método INDO/S, considerando a contribuição de todos os tautômeros desprotonados tanto com o método *DFT* como PM6. As barras azuis e vermelhas indicam a intensidade das forças dos osciladores versus posição de absorção para as DOX otimizadas com o método PM6 e *DFT*, respectivamente.

Através dos espectros ilustrados na Figura 19, busca-se entender como se dá a atipicidade apresentada pelo espectro experimental obtido a pH 7. Nota-se mediante comparação dos espectros das estruturas tanto otimizadas com o método PM6 (Figura 19.a) como *DFT* (Figura 19.b) que é bastante razoável atribuir o perfil do espectro experimental a coexistência tanto de tautômeros protonados como desprotonados. A sutileza assinalada pelos

espectros teóricos, é que não foi feito levando em consideração o quão contribuem as espécies protonadas e desprotonadas. Entretanto, o perfil apresentado pelo espectro experimental leva a crer que existe uma contribuição mais acentuada das espécies desprotonadas do que das espécies protonadas, assegurando que o pH 7 já seja suficientemente capaz de promover a desprotonação da doxorubicina em quantidades apreciáveis.

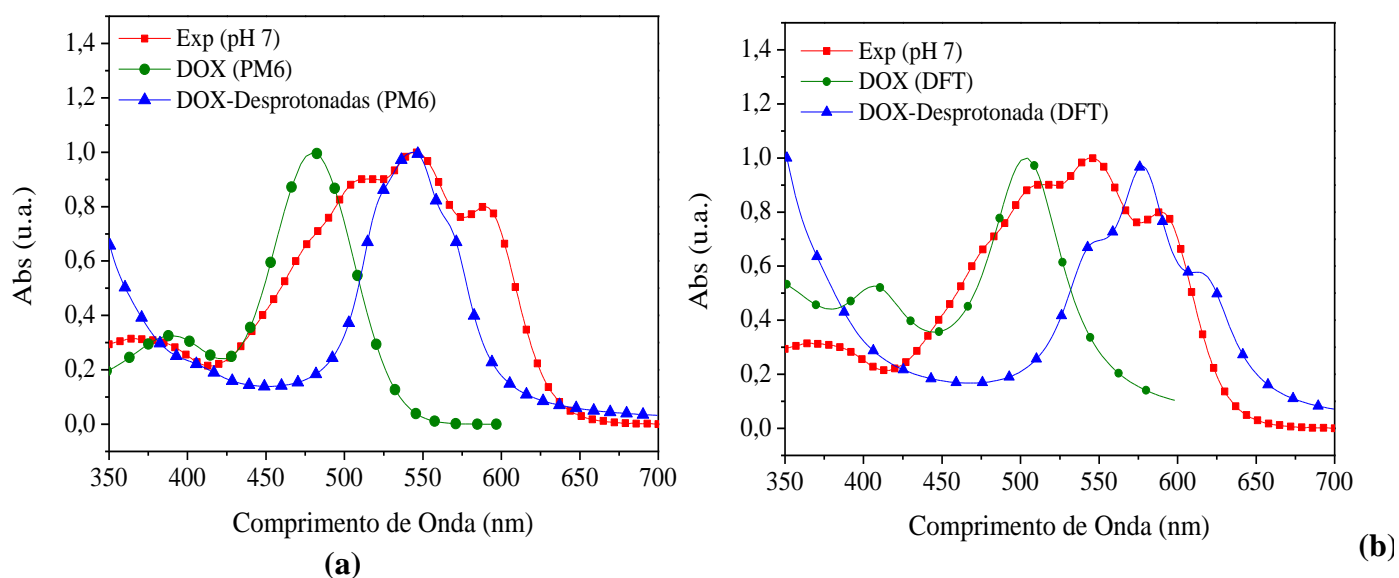


Figura 19. Espectros de absorção experimental obtido a pH 7 e espectros teóricos obtidos considerando a contribuição das espécies protonadas e desprotonadas: a) geometrias otimizadas utilizando o método PM6, e b) utilizando o método DFT.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES

- Tomando os valores de estabilidade relativa e as geometrias otimizadas do método *DFT* como referência, o método PM6 foi o mais concordante;
- Os cálculos espectroscópicos realizados mostraram que cada espécie tautomérica apresenta uma única banda de absorção na região dos maiores comprimentos de onda, diferentemente dos espectros experimentais que apresentaram três bandas. Isso corrobora com a possível existência de mais de uma espécie tautomérica no sistema real;
- Através do estudo cinético e termodinâmico foi compreendido as possíveis reações de transferência de próton em fase gasosa entre as diferentes espécies de doxorubicina;
- As energias relativas entre os tautômeros desprotonados calculadas pelos diferentes métodos aplicados foram menores do que para os protonados, pois as semelhanças estruturais dos tautômeros desprotonados são mais acentuadas do que as dos tautômeros protonados;
- O estudo espectroscópico dos tautômeros desprotonados visando simular o efeito dos altos valores de pH sugere a presença dos quatro tautômeros desprotonados no sistema, explicando dessa forma o aparecimento das várias bandas de absorção;
- A atipicidade apresentada pelo espectro obtido a pH 7 pode ser explicado a partir da presença tanto de espécies de doxorubicina protonadas assim como desprotonadas.

PERSPECTIVAS

- Estender todo o estudo do equilíbrio tautomérico, bem como da espectroscopia de absorção considerando o efeito da solvatação. Através desse estudo será objetivado o

entendimento das principais influências que as camadas de solvatação acarretam nos cálculos dos espectros de absorção em comparação aos cálculos já realizados no vácuo;

- Aplicar o mesmo estudo do efeito de solvatação utilizando o método PCM (em português: “*modelo polarizável contínuo*”);
- Realizar o estudo da interação DOX-ZIF8, buscando entender como esta interação pode afetar a mudança de coloração da doxorubicina.

Referências Bibliográficas

- 1 ARCAMONE, F.; FRANCESCHI, G.; PENCO, S.; A. Selva. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *13*, 1007-1010.
- 2 KING, P. D.; PERRY, M. C. *Oncologist.*, **2001**, *6*, 162-176.
- 3 AROLA, O. J.; SARASTE, A.; PULKKI, K.; KALLAJOKI, M.; PARVINEN, M.; ACUTE, -M. -P. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1789-1792;
- 4 POUILLART, P. *Cancer Treat. Ver.* **2004**, *30*, 643-650.
- 5 ROTI ROTI, E. C. & SALIH, S. M. *Biol. Reproduction*, **2012**, *86*, 1–11.
- 6 SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, **2001**, *4*, 138-158.
- 7 SADZUKA, Y.; SUGIYAMA, I.; TSURUDA, T.; SONOBE, T. *Int. J. Pharm.* **2006**, *312*, 83-89.
- 8 DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. *Nat. Ver. Drug. Discov.* **2008**, *7*, 771.
- 9 FERRARI, M. *Nat Rev Cancer*, **2005**, *5*, 161.
- 10 HORCAJADA, P.; CHALATI, T.; SERRE, C.; GILLET, B.; SEBRIE, C.; BAATI, T.; EUBANK, J. F.; HEURTAUX, D.; CLAYETTE, P.; KREUZ, C.; CHANG, J. S.; HWANG, Y. K.; MARSAUD, V.; BORIES, P. N.; CYNOBER, L.; GIL, S.; FERREY, G.; COUVREUR, P.; GREF, R. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 172-178.
- 11 VASCONCELOS, I. B.; DA SILVA, T. G.; MILITAO, G. C. G.; SOARES, T. A.; RODRIGUES, N. M.; RODRIGUES, M. O.; da COSTA Jr., N. B.; FREIRE, R. O.; JÚNIOR, S. A. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 9437-9442.
- 12 WASSERMANN, K.; BUNDGAARD, H. *Int. J. Pharm.* **1983**, *14*, 73-78.
- 13 BEIJNEN, J. H.; van der HOUWEN, O. A. G. J.; UNDERBERG, W. J. M. *Int. J. Pharm.* **1986**, *32*, 123-131.
- 14 JANSSEN, M. J. H.; CROMMELIN, D. J. A.; STORM, G.; HULSHOFF, A. *Int. J. Pharm.* **1985**, *23*, 1-11.
- 15 TURKER, L. *The Scientific World Journal*, **2012**, *2012*. 7.
- 16 TURKER, L. *J. Mol. Struct. - THEOCHEM*, **2002**, *951*, 81-87.
- 17 LEI, H.; WANG, X.; WUC, C. *J. Mol. Graphics Modell.* **2012**, *38*, 279-289.
- 18 NAKATA, Y.; HOPFINGER, A. J. *FEBS Letters*, **1980**, 117.
- 19 ZHU, S.; YAN, L.; JI, X.; LU, W. *J. Mol. Struct. – THEOCHEM*, **2010**, *951*, 60-68.

- 20 CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry Theories and Models**. Second Edition, John Wiley & Sons Ltd, 2004, New York, EUA.
- 21 SZABO, A; OSTLUND, N. S. **Modern quantum chemistry**, Dover Publications, New York, EUA. 1996;
- 22 JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**, John Wiley & Sons Ltd, New York, EUA.
- 23 STEWART, J. J. P. *Reviews In Computational Chemistry*, **1990**, 1, 45;
- 24 POPLE & BEVERIDGE, D. *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, 1970.
- 25 PARR, R. G.; YANG, W. **Density-Functional Theory of Atoms and Molecules**, Oxford, New York, EUA, 1989;
- 26 DREIZER, R. M., GROSS, E. K. **Density-Functional**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemanha, 1990.
- 27 J. J. P. Stewart. *Int. J. Quant. Chem.* **1996**, 58, 133-146.
- 28 ROCHA, G. B.; FREIRE, R. O.; SIMAS, A. M.; STEWART, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **2006**, 27, 1101-1111.
- 29 TUTTLE, T.; THIEL, W. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10, 2159-2166.
- 30 STEWART, J. J. P., *J. Mol. Model.*, **2007**, 13, 1173.
- 31 JONATHAN P. & HILLIER, I. H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 2362-2370.
- 32 KORTH, M. *J. Chem. Theory Comput.*, **2010**, 6, 3808-3816.
- 33 REZAC, J. & HOBZA, P. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 141-151.
- 34 DEWAR, M. J. S.; THIEL, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 4899-4907.
- 35 DEWAR, M. J. S.; ZOEBISH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3902.
- 36 STEWART, J. J. P. *J. Comp. Chem.*, **1989**, 10, 209-220.
- 37 *HyperChem(TM) Professional*, version 8; Hypercube Inc., Gainesville, Florida, USA, 2008.
- 38 STEWART, J. J. P. MOPAC2009, 10.060W; Stewart Computational Chemistry: Colorado Springs, USA, 2009.
- 39 STEINFELD, J. I.; FRANCISCO, J. S.; HASE, W. L. **Chemical kinetics and dynamics**. 2nd ed. New Jersey, Estados Unidos: Prentice Hall, 1999. p.518.
- 40 LEE, C. W.; YANG, R. G. Par, *Phys. Rev. B*, **1988**, 37, 785-789.
- 41 BECKE, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652;

- 42 FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.; VREVEN JR., T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C. *et al.*, GAUSSIAN 03, Revision C.2, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2003.
- 43 RIDLEY, J. E.; ZERNER, M. C. *Theor. Chim. Acta*, **1976**, *42*, 223-236.
- 44 ZERNER, M. C.; LOEW, G. H.; KIRCHNER, R. F.; MUELLER-WESTERHOFF, U. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 589-599.
- 45 NEESE, F. *WIREs Comput Mol Sci*, **2012**, *2*: 73-78.
- 46 Cache WorkSystem Pro Version 6.01. University of Toronto, Copyright 200-2003 Fujitsu Limited.
- 47 ALLOUCHE, A.-R. *J. Comput. Chem.*, **2011**, *32*, 174-182.
- 48 da COSTA, N. B.; RAMOS, M. N. ; SIMAS, A. M.; FAUSTO, R.; DIAS, J. T. *Quim. Nova*, **1994**, *17*, 104-110.
- 49 PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; Kriz, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. Editora: Brooks/Cole (Cengage Learning), Belmont, USA. 4ed, 2009.
- 50 NAWARA, K.; KRYSINSKI, P.; BLANCHARD, G. J. *J. Phys. Chem. A*, **2012**, *116*, 4330-4337.

ANEXO – Material Suplementar

TABELA A1 – Variação de entalpia, de entropia e de energia livre de Gibbs (kcal mol⁻¹, cal K⁻¹ mol⁻¹ e kcal mol⁻¹, respectivamente) calculados com os diferentes métodos semiempíricos para as conversões tautoméricas em 298 K.

Conversões	Métodos	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger	ΔG^\ddagger
DOX1 → DOX2	AM1	26,22	-1,79	26,76
	PM3	30,18	-4,26	31,45
	PM6	6,10	-1,85	6,66
	RM1	10,24	-6,59	12,20
DOX2 → DOX1	AM1	15,38	-2,62	16,17
	PM3	16,97	-6,41	18,87
	PM6	0,25	-1,71	0,75
	RM1	2,16	-5,22	3,72
DOX1 → DOX4	AM1	22,17	-5,15	23,70
	PM3	23,15	-6,03	24,95
	PM6	66,79	4,32	65,50
	RM1	5,69	-6,77	7,70
DOX4 → DOX1	AM1	13,31	-7,09	15,42
	PM3	17,80	-5,25	19,36
	PM6	66,45	2,97	65,56
	RM1	2,11	-6,19	3,95
DOX2 → DOX3	AM1	18,02	-1,05	18,34
	PM3	17,60	-7,42	19,81
	PM6	2,63	-0,14	2,67
	RM1	5,88	-4,54	7,23
DOX3 → DOX2	AM1	21,49	-3,31	22,48
	PM3	25,87	-6,82	27,90
	PM6	6,61	-4,89	8,06
	RM1	9,38	-7,15	11,52
DOX3 → DOX4	AM1	21,15	-8,86	23,79
	PM3	25,72	-5,98	27,50
	PM6	2,26	-5,25	3,83
	RM1	7,02	-7,11	9,14
DOX4 → DOX3	AM1	19,65	-7,72	21,95

PM3	25,32	-3,64	26,41
PM6	3,81	-1,99	4,40
RM1	8,01	-5,28	9,59
