



**DAIANA TEIXEIRA MANCINI**

**FENILBENZOTIAZÓIS COMO SONDA  
ESPECTROSCÓPICA PARA BIOMOLÉCULAS:  
CÁLCULO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E  
ELETRÔNICAS**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**DAIANA TEIXEIRA MANCINI**

**FENILBENZOTIAZÓIS COMO SONDA ESPECTROSCÓPICA PARA  
BIOMOLÉCULAS: CÁLCULO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E  
ELETRÔNICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Teodorico de Castro Ramalho

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Mancini, Daiana Teixeira.

Fenilbenzotiazóis como sonda espectroscópica para  
biomoléculas : cálculo de propriedades estruturais e eletrônicas /  
Daiana Teixeira Mancini. – Lavras : UFLA, 2013.

157 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Câncer de mama. 2. Fenilbenzotiazóis. 3. Radiofármacos. 4.  
Espectroscopia de fluorescência. 5. Espectroscopia de RMN. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 615.19

**DAIANA TEIXEIRA MANCINI**

**FENILBENZOTIAZÓIS COMO SONDA ESPECTROSCÓPICA PARA  
BIOMOLÉCULAS: CÁLCULO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E  
ELETRÔNICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de dezembro de 2013.

Dr. Hélio Ferreira dos Santos	UFJF
Dra. Kathia Maria Honorio	USP
Dra. Kátia Júlia de Almeida	UFLA
Dr. Matheus Puggina de Freitas	UFLA

Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2013**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por iluminar o meu caminho e me dar forças nas horas difíceis. Sem Ele, com certeza, eu não teria chegado até aqui. “É DELE a vitória alcançada em minha vida”.

Aos meus pais, Heliodalvo e Salete, pelo amor incondicional, confiança e dedicação.

À minha irmã, Luana, pelo carinho, paciência e pelos conselhos nos momentos em que mais precisei.

Ao meu noivo, Ramon, principalmente pela paciência, companheirismo, amor e por sempre me animar nas horas mais difíceis.

A toda a minha família, pela credibilidade e amizade.

Ao professor Teodorico de Castro Ramalho, pelos grandes ensinamentos, orientação e, principalmente, pela amizade construída durante esses anos. Com certeza, foi um privilégio tê-lo como orientador. Agradeço muito a Deus por tê-lo colocado em meu caminho.

À professora Elaine e ao professor Matheus, pela amizade e as colaborações nos trabalhos.

Aos professores Mario Barbatti e Walter Thiel, e também a Dr. Kakali Sem, do Instituto Max Planck, em Mülheim an der Ruhr (Alemanha), pelo suporte computacional e pelas contribuições ao trabalho.

A todos os colegas do grupo de Química Computacional, pelo convívio e por tornarem tudo mais divertido.

À Universidade Federal de Lavras e ao Instituto Max Planck, pela oportunidade de realizar este trabalho e também à FAPEMIG e DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), pelo financiamento dos recursos necessários.

## RESUMO GERAL

Os casos de câncer têm aumentado significativamente em todo o mundo. Entre os vários tipos de câncer, o de mama tem se destacado, pelos altos índices de ocorrência em mulheres com idades entre 40 e 59 anos. Atualmente, apesar da disponibilidade de quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia, algumas enzimas da classe quinase têm sido exploradas como alvos terapêuticos contra o câncer de mama, como, por exemplo, tirosina quinase e fosfatidilinositol 3-quinase. Derivados de benzotiazóis são potentes inibidores das enzimas quinases. Além disso, alguns desses derivados, os compostos fenilbenzotiazóis, são altamente seletivos e têm atividade atitumoral *in vitro* e *in vivo*, destacando-se o composto 2-(4'-aminofenil)benzotiazol (ABT), que exibe atividade nanomolar *in vitro* contra algumas células do câncer de mama em humanos. Outro membro da classe fenilbenzotiazóis, 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol (HBT), também tem sido bastante explorado, devido às suas características fluorescentes em determinados ambientes. Além dessa característica fluorescente, alguns derivados benzotiazóis também podem se coordenar com radioisótopos (por exemplo  $^{99}\text{Tc}$ ) e atuar como radiofármacos, que são medicamentos que contêm um radionuclídeo, e são usados, frequentemente, na medicina nuclear para o diagnóstico ou tratamento de várias doenças, incluindo o câncer. Assim, neste trabalho, foram obtidos, teoricamente, os parâmetros espectroscópicos de fluorescência e RMN, a fim de investigar as propriedades estruturais e eletrônicas dos compostos fenilbenzotiazóis. Os resultados indicam que esses compostos podem ser utilizados como sondas espectroscópicas para biomoléculas. Nesse sentido, sugere-se que a aplicação desses compostos na medicina nuclear diagnóstica contra o câncer de mama pode ser promissora.

Palavras-chave: Câncer de mama. Fenilbenzotiazóis. Radiofármacos. Espectroscopia de fluorescência. Espectroscopia de RMN

## GENERAL ABSTRACT

The cases of cancer have significantly increased worldwide. Among the various types of cancer, breast cancer has been highlighted by the high rates in the women aged 40-59 years. Currently, despite the availability of chemotherapy, radiotherapy and hormonotherapy, some enzymes of the kinase class have been exploited as therapeutic targets against breast cancer, for example, the Tyrosine kinase and Phosphatidylinositol 3- kinase enzymes. Benzothiazoles derivatives are potent inhibitors of kinases enzymes, in addition, some of these derivatives, the phenylbenzothiazoles compounds, are highly selective and have antitumoral activity in vitro and in vivo, highlighting the 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole (ABT) compound, that displays in vitro nanomolar activity against some breast cancer cells in humans. Another member of the class phenylbenzothiazoles, the 2-(2'-hydroxyphenyl) benzothiazole (HBT), also has been extensively explored due to its fluorescent characteristics in certain environments. Besides this fluorescent characteristic, some benzothiazole derivatives can also coordinate with radioisotopes (e.g.  $^{99}\text{Tc}$ ) and act as radiopharmaceuticals, which are drugs containing a radionuclide, and are often used in nuclear medicine for the diagnosis or treatment of various diseases, including cancer. Thus, in this work we have theoretically obtained the spectroscopic parameters of fluorescence and NMR in order to investigate the structural and electronic properties of phenylbenzothiazoles. The results indicate that these compounds can be used as spectroscopic probes for biomolecules. In this sense, it is suggested that the application of these compounds in the nuclear medicine diagnosis of breast cancer can be promising.

Keywords: Breast cancer. Phenylbenzothiazoles. Radiopharmaceuticals. Fluorescence spectroscopy. NMR spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Reação catalisada pela enzima tirosina quinase (TK) (SILVA et al., 2009).....	22
Figura 2	Reação catalisada pela enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (STEIN, 2001).....	24
Figura 3	Estruturas cristalográficas: (A) EGFR tirosina quinase complexada com o composto 4-anilinoquinazolina (Código PDB: 1M17) (B) PI3K complexada com o composto <i>N</i> -{6-[2-(metilsulfanil)pirimidin-4-il]-1,3 - benzotiazol-2-il}-acetamida (Código PDB: 3QJZ). Os ligantes estão representados em lilás e as cavidades, em verde .....	25
Figura 4	Compostos do tipo fenilbenzazólicos, em que X= O, NH ou S (A); estrutura do composto ABT (B).....	27
Figura 5	Esquema da transferência de prótons no estado excitado (ESIPT) do composto HBT (ZHAO et al., 2012).....	28
Figura 6	<sup>99m</sup> Tc (CO) <sub>3</sub> -(NNO) conjugado com o composto ABT .....	31
Figura 7	Diagrama de Jablonski simplificado.....	39
Figura 8	Particionamento do sistema total (S) em dois sbsistemas: interior (I) e exterior (Q). O anel escuro representa a região de fronteira (entre as regiões QM e MM) (SENN; THIEL, 2009).....	65

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Figure 1	Structure of the 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole compound.....	91
Figure 2	Excited-state proton transfer and two-color fluorescent scheme for HBT .....	92
Figure 3	Rmsd from the MD simulation for the entire system .....	96
Figure 4	Hydrogen bond distances between amino acids and HABT along the MD simulation .....	97
Figure 5	Illustration of various QM regions (solid bonds, thick atoms represent the QM region and thin atoms the MM region) for the HABT enol form in the TK enzyme active site.....	98
Figure 6	QM/MM excited state optimized structures. The MM region as well as some residues of the QM region were omitted for a better visualization.....	101



Figure 7	Perspective for fluorescence in the TK active site for the QM-1 (A) and QM-2 (B).....	106
Figure 8	Perspective for fluorescence in the TK active site for the QM-3 (C) and QM-4 (D) .....	106

## ARTIGO 2

Figure 1	2-(4'-aminophenyl)benzothiazole with the chelator metal (N-(2-pyridylmethyl)- aminoacetic acid (1a); ( <sup>99m</sup> Tc)(CO) <sub>3</sub> (NNO) conjugated with 2-(4'- aminophenyl) benzothiazole (1b) .....	122
Figure 2	Geometry for compound 1a, (A) structure in vacuum and (B) structure in solution .....	131
Figure 3	Geometry of compound 1a with explicit solven.....	134
Figure 4	Geometry for Complex 1b, (A) structure in vacuum and (B) more stable structure in solution.....	138
Figure 5	Complex 1b (red) docked in the active site of PI3K, the active ligand shown in yellow.....	141
Figure 6	Complex <b>1b</b> (A, C) and crystal (B) docked in PI3K active site ...	142

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1	Electron density ( $\rho$ ) and Laplacian ( $\nabla^2$ ) for the intermolecular hydrogen bonds between Thr766 and HABT as well as water and HABT in all QM regions .....	100
Table 2	Selected bond lengths ( $\text{\AA}$ ), bond angles ( $^\circ$ ) of the HABT intermolecular hydrogen bonds with Thr766 and the water molecule for all conditions in the excited state .....	101
Table 3	Singlet (S), triplet (T) and transition state (TS) energies relative to the minimum of the enol form in the ground-state (gr) geometry $\Delta E$ (eV). Energy barriers $\Delta E^\ddagger$ (eV) for different QM regions of the enol and keto forms in the ground-state and excited-state (ex) geometry within of the active site.....	103
Table 4	Transitions state (TS <sup>a</sup> and TS <sup>b</sup> ) energies ( $\Delta E^\ddagger$ ) and rate constants (k) relative to the minimum for Condition <b>1</b> .....	104
Table S1	QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.) for QM-1 region.....	114
Table S2	QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.) for QM-2 region.....	115
Table S3	QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.) for QM-3 region.....	116
Table S4	QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.) for QM-4 region.....	117

### ARTIGO 2

Table 1	Absolute $^{13}\text{C}$ shielding (ppm) for benzene .....	128
Table 2	$^{13}\text{C}$ chemical shifts (ppm) for compound 1a, computed at the GIAO-BPW91/II .....	129
Table 3	Absolute $^{99}\text{Tc}$ shielding (ppm) for $\text{TcO}_4^-$ .....	135
Table 4	$^{99}\text{Tc}$ NMR chemical shifts (ppm) for benzothiazole Complex (1b), computed at the GIAO-BPW91/aug-cc-pVTZ .....	136
Table 5	Optimized geometrical parameters and binding energy for Tc complex in solution, bond lengths and energy values with BSSE correction.....	139

## LISTA DE SIGLAS

PBT	Fenilbenzotiazol
ABT	2-(4'-aminofenil)benzotiazol
HBT	2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol
HABT	2-(2'-hidroxi-4'-aminofenil)benzotiazol
TK	Tirosina quinase
RTKs	Tirosinas quinases receptoras
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
Glu	Glutamato
Lys	Lisina
Thr	Tirosina
ATP	Adenosina trifosfato
PDB	Banco de dados de proteína
ESIPT	Transferência de prótons intramolecular no estado excitado
IC	Cruzamento entre sistemas (do inglês <i>internal conversion</i> )
ISC	Conversão intersistemas (do inglês <i>intersystem crossing</i> )
ADF	Amsterdam density functional
B3LYP	Método DFT de Becke, usando correlação de Lee, Yang e Parr
BP86	Método DFT de Becke-Perdew 86
BPW91	Método DFT de Becke e Perdewe Wang
GIAO	Incluindo orbitais atômicos-gauge
IGLO	Individual gauge para orbitais localizados
ZORA	Aproximação de ordem regular zero
SO	Spin-órbita
TZP	Função polarizada do tipo triple-zeta
STO	Função de base do tipo Slater
BSSE	Erro de sobreposição de bases
RMSD	Variação do desvio médio quadrático
DFT	Teoria do funcional de densidade
TDDFT	<i>Time-dependent density functional theory</i>
HF	Hartree-fock
RMN	<i>Ressonância magnética nuclear</i>
MM	Mecânica molecular
QM	Mecânica quântica
QM/MM	Mecânica molecular/mecânica quântica
DM	Dinâmica molecular
DMQ	Dinâmica molecular quântica

ADMP	Densidade do átomo centrado em uma matriz de propagação
PCM	Modelo de polarização contínua
QTAIM	Teoria quântica de átomos em moléculas
CP	Ponto crítico
BCP	Ponto crítico da ligação
BP	Caminho de ligação
MVD	Molegro virtual Docker
NVT	Número de partículas, volume e temperatura constantes
NPT	Número de partículas, pressão e temperatura constantes

## LISTA DE SÍMBOLOS

Tc	Tecnécio
<sup>99</sup> Tc	Tecnécio-99
<sup>99m</sup> Tc	Tecnécio-99 (metaestável)
<sup>13</sup> C	Carbono-13
<sup>188</sup> Re	Rênio-188
<sup>186</sup> Re	Rênio-186
<sup>99</sup> Ru	Rutênio-99
<sup>99</sup> Mo	Molibdênio-99
O	Oxigênio
H	Hidrogênio
<i>I</i>	Spin nuclear
S	Singleto
Γ	Tripleto
S <sub>0</sub>	Estado fundamental
S <sub>1</sub>	Primeiro estado excitado
S <sub>2</sub>	Segundo estado excitado
T <sub>1</sub>	Primeiro estado tripleto
TS	Estado de transição
<i>k</i>	Constante de velocidade
gs	Estado fundamental (do inglês <i>ground-state</i> )
ex	Estado excitado
δ	Deslocamento químico
σ	Constante de blindagem
ρ(r)	Densidade eletrônica molecular
∇ <sup>2</sup> ρ	Laplaciano da densidade eletrônica
Å	Ångstrom
ppm	Partes por milhão

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	15
	<b>INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Câncer</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Câncer de mama</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Alvos moleculares: enzimas quinases</b> .....	21
<b>2.4</b>	<b>Derivados benzotiazóis</b> .....	26
<b>2.4.1</b>	<b>Benzotiazol: dupla fluorescência</b> .....	27
<b>2.5</b>	<b>Radiofármacos de derivados benzotiazóis</b> .....	29
<b>2.5.1</b>	<b>Radioatividade (radionuclídeos)</b> .....	30
<b>2.5.2</b>	<b>Tecnécio: propriedades espectroscópicas</b> .....	31
<b>2.6</b>	<b>Técnicas espectroscópicas</b> .....	33
<b>2.6.1</b>	<b>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</b> .....	33
<b>2.6.2.1</b>	<b>Fatores que influenciam a constante de blindagem</b> .....	35
<b>2.6.2</b>	<b>Espectroscopia de fluorescência</b> .....	37
<b>3</b>	<b>QUÍMICA COMPUTACIONAL</b> .....	42
<b>3.1</b>	<b>Métodos de mecânica molecular</b> .....	43
<b>3.1.1</b>	<b>Ancoramento molecular (<i>docking</i>)</b> .....	44
<b>3.1.2</b>	<b>Dinâmica molecular (clássica)</b> .....	46
<b>3.1.2.1</b>	<b>Método do máximo declive</b> .....	48
<b>3.1.2.2</b>	<b>Método dos gradientes conjugados</b> .....	49
<b>3.1.2.3</b>	<b>Método quasi Newton-Raphson</b> .....	49
<b>3.2</b>	<b>Métodos de mecânica quântica</b> .....	49
<b>3.2.1</b>	<b>Métodos DFT e TD-DFT</b> .....	54
<b>3.2.1.1</b>	<b>Teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT)</b> .....	57
<b>3.2.2</b>	<b>Métodos quânticos relativísticos</b> .....	59
<b>3.2.3</b>	<b>O modelo contínuo polarizável</b> .....	60
<b>3.2.4</b>	<b>Teoria quântica de átomos em moléculas</b> .....	62
<b>3.2.5</b>	<b>Método híbrido: mecânica quântica e mecânica molecular</b> .....	64
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	90
	<b>ARTIGO 1 Spectroscopic properties of a prototypical breast cancer drug: exploring dual fluorescence in phenylbenzothiazole derivatives for imaging markers</b> .....	90

**ARTIGO 2  $^{99}\text{Tc}$  NMR as a promising technique for structural investigation of biomolecules: theoretical studies on the solvent and thermal effects of phenylbenzothiazole complex ..... 118**

## **PRIMEIRA PARTE**

### **INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, sendo um dos mais graves e antigos problemas enfrentados pela humanidade (DUNN, 2012). Nesse contexto, o câncer da mama é um dos principais problemas de saúde do mundo ocidental, onde mais de 1 milhão de novos casos ocorrem a cada ano, principalmente em mulheres com idade entre 40 e 59 anos (JEMAL et al., 2010; GALVÃO et al., 2011).

Os tratamentos já conhecidos contra o câncer de mama incluem intervenções cirúrgicas e/ou quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia (MALZYNER; CAPONERO; DONATO, 2000; SILVA, 2008). Atualmente, um dos potenciais alvos terapêuticos no combate ao câncer de mama é a classe das enzimas quinases. De fato, devido ao grande envolvimento em um conjunto diversificado de funções celulares, atualmente essas enzimas têm sido estudadas como alvos terapêuticos contra várias doenças (por exemplo, asma, doenças do sistema nervoso central e diabetes, entre outras) (SILVA et al., 2009), inclusive o câncer de mama, destacando-se as enzimas tirosina quinase (TK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (BISCARDI et al., 2000; FRY, 2001; AGRAWAL et al., 2005; BHUVA; KINI, 2010; ZHANG et al., 2010; ANGELO et al., 2011; HINOHARA et al., 2012).

Recentemente, em estudos de Bhuva e Kini (2010) e Angelo et al. (2011), foi demonstrado que derivados de benzotiazóis são potentes inibidores das enzimas quinases (BHUVA; KINI, 2010; ANGELO et al., 2011). Além disso, é amplamente conhecido na literatura que alguns derivados benzotiazóis,



como, por exemplo, os compostos fenilbenzotiazóis, são altamente seletivos e têm atividade atitumoral *in vitro* e *in vivo* (TZANOPOULOU et al., 2010). O composto líder dessa série, 2-(4'-aminofenil)benzotiazol (ABT, Figura 4B), exibe atividade nanomolar *in vitro* contra algumas células do câncer de mama em humanos (SHI et al., 1996; TZANOPOULOU et al., 2010).

É importante comentar que outro membro da classe fenilbenzotiazol, o 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol (HBT), tem sido bastante explorado em estudos de espectroscopia de fluorescência (BARBATTI et al., 2009; KUNGWAN et al., 2012), devido às suas características físico-químicas. Esse composto pode sofrer, em determinados ambientes, transferência intramolecular de prótons no estado excitado (ESIPT) (BARBATTI et al., 2009; KUNGWAN et al., 2012).

Além desta característica fluorescente, é conhecido, de acordo com a literatura, que alguns derivados benzotiazóis também podem se coordenar com radioisótopos e atuar como radiofármacos (TZANOPOULOU et al., 2010). Segundo Tzanopoulou et al. (2010), o composto ABT pode ser utilizado para transportar o radioisótopo de escolha para o tecido doente, facilitando as aplicações diagnósticas e terapêuticas do câncer de mama (TZANOPOULOU et al., 2010).

Os radiofármacos são medicamentos que contêm um radionuclídeo e são utilizados, frequentemente, na medicina nuclear, para o diagnóstico ou o tratamento de várias doenças, incluindo o câncer (BANERJEE; PILLAI; RAMAMOORTHY, 2001; LIU, 2007; LIU, 2008). Um dos radiofármacos mais comumente utilizados são aqueles baseados em complexos metálicos de tecnécio (Tc) (TZANOPOULOU et al., 2006), destacando-se os núcleos  $^{99}\text{Tc}$  (BÜHL; GOLUBNYCHIY, 2008) e seu isômero nuclear metaestável  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (TZANOPOULOU et al., 2006). De acordo com dados encontrados na literatura, alguns radioisótopos de Tc podem ser núcleos promissores para o estudo de

ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância magnética de imagens (MRI) (BÜHL; GOLUBNYCHIY, 2008).

Nesse sentido, as abordagens teóricas para calcular os parâmetros espectroscópicos de fluorescência e RMN vêm sendo exploradas de forma muito eficiente (BÜHL; GOLUBNYCHIY, 2008; BARBATTI et al., 2009). Os cálculos baseados na teoria do funcional de densidade (DFT) são capazes de fornecer valores precisos para muitas propriedades espectroscópicas (ZILM; DUCHAMP, 1993; KAUPP; BÜHL; MALKIN, 2004; RAMALHO; BÜHL, 2005). Além disso, o método DFT pode ser utilizado para moléculas maiores, tais como sistemas biológicos, uma vez que é uma técnica de baixa demanda computacional (HELGAKER; JSZUNSKI; RUUD, 1999; RAMALHO; BÜHL, 2005) e é capaz de descrever uma grande parte da correlação eletrônica (HELGAKER; JSZUNSKI; RUUD, 1999; BÜHL, 2002; HELGAKER; PECUL, 2004). Porém, é preciso manter em mente que, para estudos em que são descritas transições eletrônicas em estados excitados, torna-se necessário utilizar recursos adicionais, como a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) (BARBATTI et al., 2009).

Com base nesse contexto, e visando possíveis aplicações diagnósticas e terapêuticas contra o câncer de mama, objetivou-se, neste trabalho, investigar a transferência de prótons no estado excitado do composto 2-(2'-hidroxi-4'-aminofenil)benzotiazol (HABT) no sítio ativo da enzima tirosina quinase e seus efeitos na fluorescência. Além disso, buscou-se prever o deslocamento químico do núcleo  $^{99}\text{Tc}$  para o composto 2-(4'-aminofenil)benzotiazol complexado com  $^{99}\text{Tc}$  e investigar suas modificações estruturais em diferentes ambientes.

No intuito de alcançar os objetivos propostos, este trabalho está dividido em duas partes. Na primeira, verificam-se uma abordagem geral sobre o tema e estudos já descritos na literatura; na segunda, são descritos os resultados deste trabalho, em dois artigos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Câncer

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, sendo um dos mais graves e antigos problemas enfrentados pela humanidade (DUNN, 2012). Essa doença constitui a segunda maior causa de morte, depois das doenças cardiovasculares (MARTÍN; LI, 2011), representando cerca de 13% de todas as causas de mortes no mundo. Segundo a Sociedade Americana do Câncer, 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer, no mundo, em 2007 (BHUVA; KINI, 2010).

O câncer é um grupo de doenças em que as células podem ser agressivas (crescem e se dividem sem respeitar os limites normais), invasivas (invadem e destroem tecidos adjacentes) e/ou metastáticas (disseminação para outros locais no corpo) (BHUVA; KINI, 2010).

A formação de tumores, sejam eles benignos ou malignos, é denominada de neoplasia, do latim “novo crescimento” (CHANDRASOMA; TAYLOR, 1999). O termo câncer faz referência a tumores malignos e, provavelmente, deriva do termo em latim para caranguejo, devido à forma como os tumores atingem os tecidos, com extensões semelhantes a garras (KUMAR et al., 2005).

Um tumor se constitui a partir de alterações genéticas no DNA de uma célula isolada, seguida por proliferação celular excessiva e de forma autônoma não regulada. Em âmbito molecular, há quatro classes de genes normais reguladores que são alvos dessa lesão genética. Uma das classes envolve genes responsáveis pela proliferação de células normais, os proto-oncogenes (gene normal que se torna um oncogene devido a uma mutação ou ao aumento de expressão gênica). Há também genes que inibem o crescimento dos supressores de tumor, genes envolvidos no reparo do DNA e genes responsáveis pela

regulação da morte celular programada (apoptose) (CHAVES et al., 1999; KUMAR et al., 2005).

Uma vez que o câncer está relacionado a um distúrbio de crescimento e comportamento celular, suas causas devem ser analisadas em níveis celulares e subcelulares. A incidência do câncer pode ser influenciada por fatores geográficos, ambientais, idade e predisposições genéticas (KUMAR et al., 2005; OLIVEIRA, 2009).

Um dos tipos de câncer mais frequentes no mundo, e o mais comum entre as mulheres, é o câncer de mama. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, isso porque, na maioria dos casos, a doença é diagnosticada em estágios avançados. Sendo assim, ele representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013).

## **2.2 Câncer de mama**

Nos últimos anos, o câncer de mama foi o tipo de neoplasia maligna de maior incidência entre as mulheres brasileiras (MOURA et al., 2006; FREITAS-JUNIOR et al., 2010). Mais de 1 milhão de novos casos ocorrem a cada ano em todo o mundo, sendo a primeira causa de morte em mulheres com idade entre 40 e 59 anos (JEMAL et al., 2010; GALVÃO et al., 2011).

No ano de 2006, foi estimado em 48.930 o número de novos casos de câncer de mama no Brasil, correspondendo a 51,66 casos por 100 mil mulheres. Já em 2010, a estimativa foi de 49.400 novos casos no Brasil, com risco estimado de 49/100 mil mulheres (MATOS; PELLOSO; CARVALHO, 2011). No último ano (2012), essa taxa aumentou ainda mais, tendo sido estimados 52.680 novos casos, que representam uma taxa de incidência de 52,5 casos por 100.000 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2012).

O câncer de mama é uma doença adquirida ou hereditária e pode ser influenciada por vários fatores, como os ambientais, os emocionais, os alimentares e os fatores reprodutivos (GALVÃO et al., 2011).

A partir do momento em que a mulher descobre que tem um nódulo na mama, dá-se início a um processo interno de dúvidas e incertezas que podem ou não ser "amenizadas" por meio do exame físico e de exames radiológicos (MALUF; MORI; BARROS, 2005).

A maioria dos tumores malignos de mama é classificada como carcinoma ductalinfiltrante (FARIAS; SOUZA; AARESTRUP, 2005; RAMOS; LUSTOSA, 2009). Esse tipo de câncer de mama se desenvolve nos ductos (canais) de leite. O câncer de mama não é uma doença exclusiva de mulheres, podendo apresentar-se em homens, mesmo que seja raro. Calcula-se de 6 a 8 anos o período para que um nódulo atinja 1 cm de diâmetro, na mama. Essa lenta evolução possibilita a descoberta ainda cedo dessas células, uma vez que as mamas sejam periodicamente examinadas (RAMOS; LUSTOSA, 2009).

Os nódulos podem ser palpáveis ou não, podendo o câncer de mama ser detectado precocemente por meio de diferentes estratégias, tais como o autoexame das mamas, realizado mensalmente pela própria mulher, viabilizando a descoberta de alterações existentes e o exame clínico anual, em que o mastologista analisa o histórico familiar e realiza o exame da mama (palpação). Com isso, se o mastologista perceber a presença de qualquer anormalidade, poderá solicitar alguns exames, como, por exemplo, a mamografia (RAMOS; LUSTOSA, 2009), que é considerada o principal método diagnóstico do câncer em estágio inicial (SCLOWITZ et. al., 2005; RAMOS; LUSTOSA, 2009).

O tratamento primário do câncer de mama é a mastectomia, intervenção cirúrgica que pode ser restrita ao tumor; se atingir tecidos circundantes pode ocorrer a retirada da mama, dos linfonodos da região axilar e de ambos os músculos peitorais. A intervenção mais frequente, realizada em torno de 57%

dos casos, é a mastectomia radical modificada, aquela que remove toda a mama juntamente com os linfonodos axilares. Além disso, geralmente, são necessários tratamentos complementares, como a radioterapia, A quimioterapia e/ou a hormonioterapia (MALZYNER; CAPONERO; DONATO, 2000; SILVA, 2008).

Dentre as várias estratégias que, atualmente, estão em desenvolvimento para o tratamento do câncer de mama, a inibição de algumas enzimas quinases apresenta resultados promissores (BISCARDI et al., 2000; FRY, 2001; AGRAWAL et al., 2005; BHUVA; KINI, 2010; ZHANG et al., 2010; ANGELO et al., 2011; HINOHARA et al., 2012).

### **2.3 Alvos moleculares: enzimas quinases**

As proteínas quinases são a maior família de proteínas em eucariotos e também são a chave central da comunicação no controle intracelular, na regulação e na transdução de sinais. O mecanismo regulador das quinases inclui fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína até o controle transcricional (SILVA et al., 2009). Por isso, um entendimento detalhado do mecanismo de controle dessas proteínas tem sido foco de interesse de muitas pesquisas, principalmente como alvos terapêuticos contra várias doenças, como, por exemplo, asma, doenças do sistema nervoso central, diabetes (SILVA et al., 2009) e, inclusive, o câncer de mama (BISCARDI et al., 2000; FRY, 2001; AGRAWAL et al., 2005; BHUVA; KINI, 2010; ZHANG et al., 2010; ANGELO et al., 2011; HINOHARA et al., 2012).

As tirosinas quinases (TKs) são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP (adenosina trifosfato) para resíduos de tirosina (Figura 1) (SILVA et al., 2009; AVILA; ROMEIRO, 2010). O domínio tirosina quinase consiste de um *loop* N-terminal

formado por cinco folhas  $\beta$  e uma  $\alpha$  hélice, enquanto o domínio C-terminal é formado, principalmente, por  $\alpha$  hélices. O ATP se liga na cavidade entre os dois *loops* (AVILA; ROMEIRO, 2010).

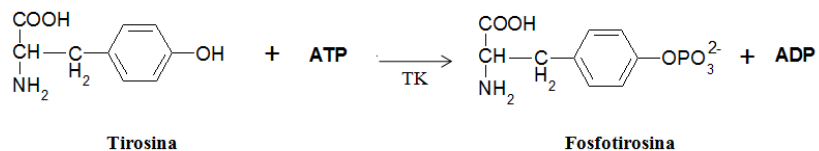


Figura 1 Reação catalisada pela enzima tirosina quinase (TK) (SILVA et al., 2009)

O genoma humano contém cerca de 90 TK (KRAUSE; VAN ETTEN, 2005). Essas enzimas estão diretamente relacionadas com a regulação da proliferação celular (BHUVA; KINI, 2010). Uma desregulação das TKs pode causar alterações significativas em muitos processos celulares, tais como proliferação de transcrição, a angiogênese e a inibição da apoptose, contribuindo, assim, para uma variedade de doenças, incluindo o câncer e doenças do sistema nervoso central (HICKS et al., 2010).

Estas enzimas, usualmente, atravessam a membrana plasmática das células e têm domínios extracelulares capazes de se ligarem a moléculas do meio extracelular e um domínio intracelular que, quando ativado, catalisa a reação enzimática envolvida. Também podem ter um receptor no citoplasma ou, ainda, na membrana nuclear (ISMAEL; SEGALLA; ROSA, 2007).

As TKs podem ser subdivididas em receptoras (EC 2.7.10.2) e não receptoras (EC 2.7.10.1). As TKs receptoras (RTKs) são proteínas transmembrânicas, ativadas por um ligante extracelular. Por outro lado, as TKs não receptoras são semelhantes à sequência de um domínio de proteína conhecida como Src e podem ser reguladas por diferentes mecanismos (SILVA et al., 2009).

Um exemplo de receptor da enzima TK é o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico). O EGFR é membro da família ErbB, cuja expressão é frequentemente observada em tumores de mama, de bexiga e colorretal (BHUVA; KINI, 2010). Nos seres humanos existem quatro membros da família ErbB: EGFR (ou ErbB-1), ErbB-2 (ou HER2), ErbB-3 (ou HER3) e ErbB-4 (ou HER4) (MILLER; BALKO; ARTEAGA, 2011). Além de regular a TK, esses receptores também têm a função de ativar outra enzima da família quinase, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K - classe I) (MILLER; BALKO; ARTEAGA, 2011).

As enzimas PI3Ks (EC 2.7.1.137) pertencem à família das quinases intracelulares e são responsáveis pela fosforilação do grupo 3' hidroxila do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (Figura 2) (KIM et al., 2011). Elas são divididas em três classes (I, II e III), sendo a classe I dividida em duas subclasses, A e B. Essa divisão é realizada de acordo com as diferenças estruturais e as especificidades com os substratos lipídicos (ANGELO et al., 2011). As PI3Ks classe I têm sido estudadas mais extensivamente por constituírem uma das principais vias de transdução de sinais ativadas por receptores da superfície celular, incluindo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), bem como receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (FRY, 2001). As PI3Ks classe I, geralmente, apresentam duas subunidades, uma catalítica e outra reguladora. Todas as subunidades catalíticas da classe I apresentam um peso molecular de, aproximadamente, 110 kDa, com isso, são classificadas como p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  (classe IA) e p110 $\gamma$  (Classe IB) (HIRSCH; COSTA; CIRAOLO, 2007).

O domínio catalítico é composto por dois *loops*: *loops* N-terminal e C-terminal. O menor *loop*, N-terminal, é constituído de cinco folhas  $\beta$  e três  $\alpha$  hélices. Já o *loop* C-terminal é constituído somente de  $\alpha$  hélices. Entre os dois *loops* está o sítio ativo, o qual liga substrato e ATP (BURGER et al., 2011).



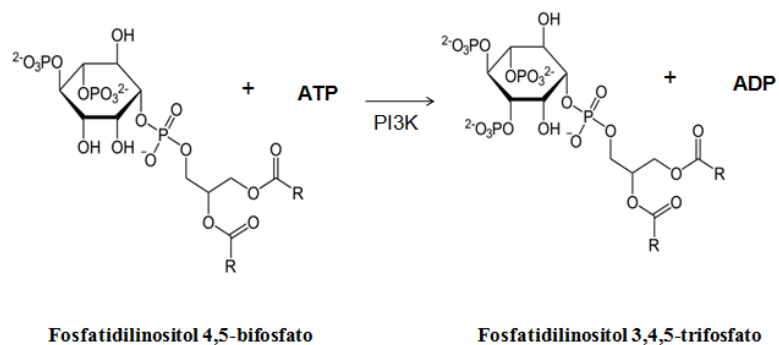


Figura 2 Reação catalisada pela enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (STEIN, 2001)

Assim como as TKs, as PI3Ks também estão envolvidas em um conjunto diversificado de funções celulares, como, por exemplo, metabolismo, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular. Com base nesse contexto, essas enzimas têm sido amplamente estudadas como alvos para o tratamento de várias doenças, inclusive o câncer de mama (BISCARDI et al., 2000; FRY, 2001; AGRAWAL et al., 2005; BHUVA; KINI, 2010; ZHANG et al., 2010; ANGELO et al., 2011; KIM et al., 2011; HINOHARA et al., 2012). Na Figura 3 estão representadas as estruturas cristalográficas das enzimas TK (STAMOS; SLIWKOWSKI; EIGENBROT, 2002) e PI3K (ANGELO et al., 2011), bem como as cavidades dos sítios ativos com volumes de  $247,0 \text{ \AA}^3$  e  $385,0 \text{ \AA}^3$ , respectivamente.

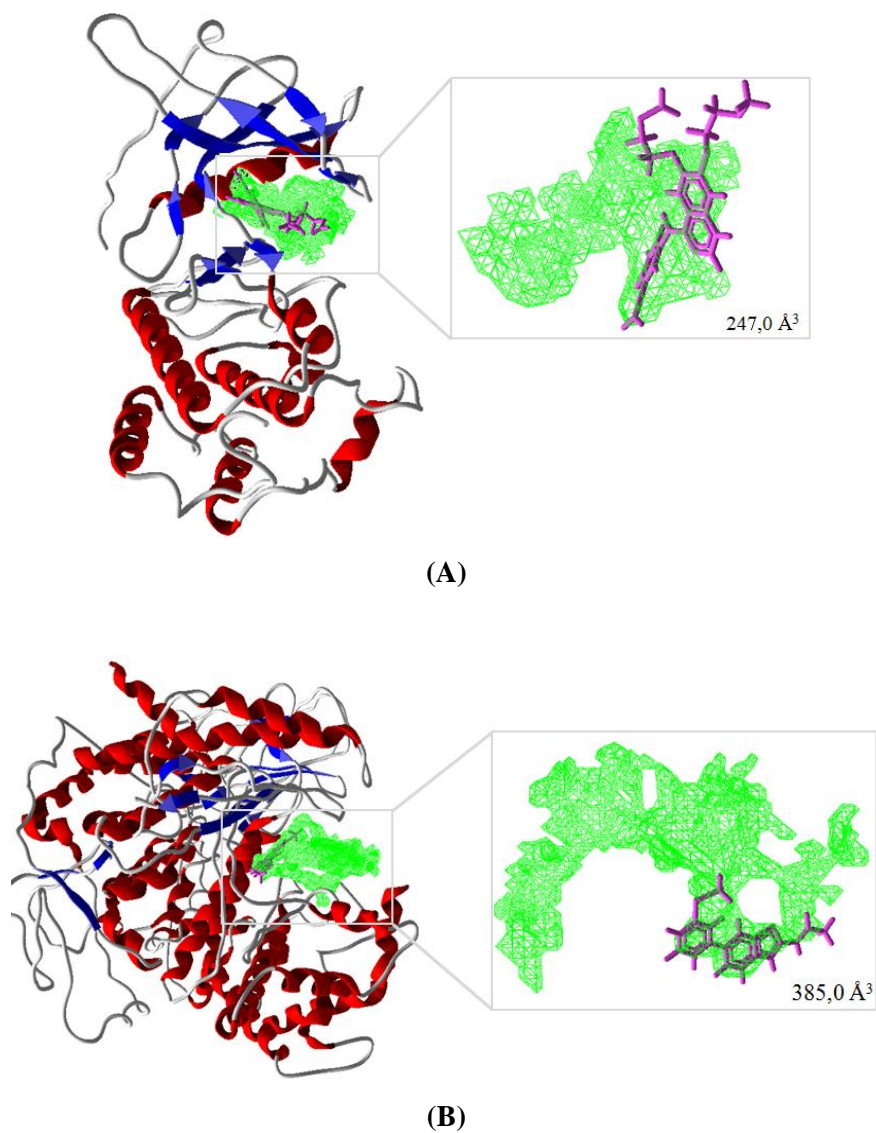


Figura 3 Estruturas cristalográficas: (A) EGFR tirosina quinase complexada com o composto 4-anilinoquinazolina (Código PDB: 1M17) (B) PI3K complexada com o composto *N*-{6-[2-(metilsulfanil)pirimidin-4-il]-1,3 - benzotiazol-2-il}-acetamida (Código PDB: 3QJZ). Os ligantes estão representados em lilás e as cavidades, em verde

Como descrito anteriormente, as proteínas quinases apresentam um domínio catalítico que contém uma fenda, na qual se liga uma molécula de ATP. A inibição alostérica, que altera a conformação espacial dessas enzimas e, conseqüentemente, bloqueia os sítios de ligação do ATP (SILVA et al., 2009), tem apresentado resultados promissores na busca de novos métodos para o tratamento do câncer de mama. Recentes estudos mostram que os derivados benzotiazóis são potentes inibidores das proteínas quinases e competem pelos sítios de ligação do ATP (BHUVA; KINI, 2010; ANGELO et al., 2011).

#### 2.4 Derivados benzotiazóis

Um derivado azólico é caracterizado por um anel de cinco membros com heteroátomos nas posições 1 e 3, sendo o da posição 3 sempre um nitrogênio (Figura 4A). Quando este anel de cinco membros é condensado com um anel benzênico, formam os compostos da classe dos heterociclos benzazólicos (GRANDO, 2009). Além disso, a introdução de grupamento fenila na posição 2 leva à formação dos fenilbenzazólicos. Diferentes heteroátomos na posição 1 podem formar diferentes derivados, como fenilbenzoxazol (X=O), fenilbenzimidazol (X=NH) e fenilbenzotiazol (X=S) (Figura 4A) (GRANDO, 2009).

Os fenilbenzotiazóis são compostos altamente seletivos e têm atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (TZANOPOULOU et al., 2010). O composto líder dessa série, 2-(4'-aminofenil)benzotiazol (ABT, Figura 4B), exibe atividade nanomolar *in vitro* contra algumas células do câncer de mama em humanos (SHI et al. 1996; TZANOPOULOU et al., 2010).

Sua atividade foi descoberta pela primeira vez em 1990 e seu desenvolvimento como agente antitumoral ocorreu, principalmente, em Nottingham, contando com a colaboração de um número grande de laboratórios

em todo o mundo, destacando os EUA, por meio do Instituto Nacional do Câncer (INC) e os membros da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (BRADSHAW; WESTWELL, 2004).

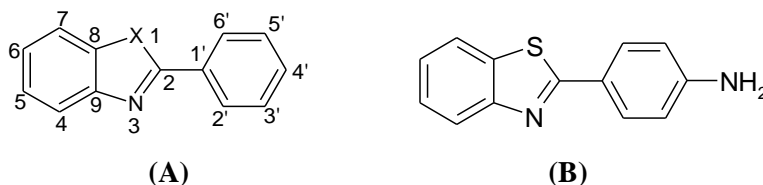


Figura 4 Compostos do tipo fenilbenzazólicos, em que X= O, NH ou S (A); estrutura do composto ABT (B)

#### 2.4.1 Benzotiazol: dupla fluorescência

De acordo com a literatura, outro membro da classe fenilbenzotiazol, o 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol (HBT, Figura 5), tem sido bastante explorado devido às suas características físico-químicas, ou seja, no estado excitado, o composto HBT é caracterizado por uma forte mudança na estrutura, causada pela ultra-rápida transferência intramolecular de prótons (ESIPT) (Figura 5A) (BARBATTI et al., 2009; KUNGWAN et al., 2012). Para o HBT no vácuo e em solução, o processo ESIPT pode ocorrer como mostrado na Figura 5.

A forma enol é a predominante no estado fundamental ( $S_0$ ) e apresenta forte ligação intramolecular entre o hidrogênio do grupo enol e o nitrogênio do grupo imina (Figura 5A). Após uma fotoexcitação, o primeiro singleto excitado ( $S_1$ ) da forma enol é populado; em seguida, ocorre a tautomerização, ou seja, a forma enol é convertida no tautômero ceto por meio da transferência intramolecular do hidrogênio para o nitrogênio (ZHAO et al., 2012). Essa conversão ocorre porque, no estado excitado ( $S_1$ ), o grupo doador se torna mais ácido e o grupo aceptor mais básico, sendo, assim, a forma ceto mais estável.

Uma vez que o  $S_1$  da forma ceto é populado, o tautômero relaxa ao estado fundamental com emissão de fluorescência (Figura 5A) (ZHAO et al., 2012).

Uma vez que o ESIPT é muito mais rápido (cerca de 30-50 fs) do que o decaimento radiativo, a fluorescência é observada, na maioria das vezes, pela forma ceto do composto HBT (Figura 5A). Entretanto, dependendo do ambiente (por exemplo, solventes polares ou apolares), o processo ESIPT pode ser parcialmente ou completamente inibido, uma vez que o solvente pode formar ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila do HBT, aumentando o rendimento quântico de fluorescência da espécie enol (Figura 5B). Isso abre a possibilidade da criação de marcadores com duas cores fluorescentes, tal como indicado na Figura 5 (BARBATTI et al., 2009; KUNGWAN et al., 2012; ZHAO et al., 2012).

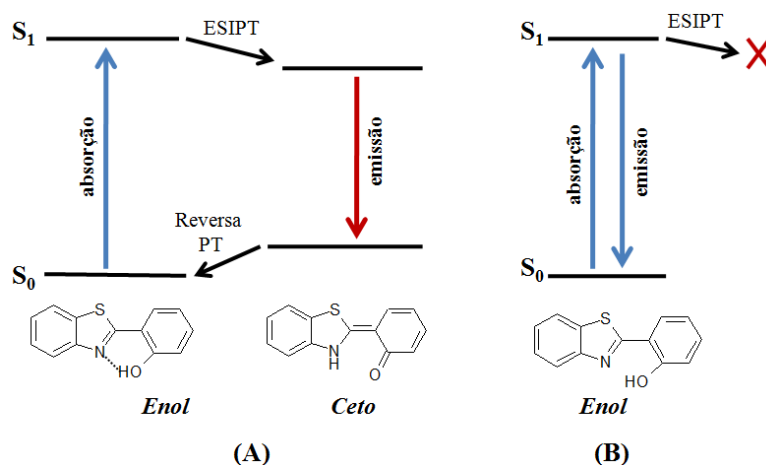


Figura 5 Esquema da transferência de prótons no estado excitado (ESIPT) do composto HBT (ZHAO et al., 2012)

Nesse contexto, unindo as propriedades farmacológicas e físico-químicas dos compostos fenilbenzotiazóis, sugere-se que essa classe de compostos deve ser funcionalizada, de tal maneira que possa agir sobre as

células tumorais, entregar medicamentos em locais específicos ou fornecer informação de imagem como um marcador fluorescente (atuando como biossensores).

Além dessa característica fluorescente, é conhecido na literatura que alguns derivados benzotiazóis também podem se coordenar com radioisótopos e atuar como radiofármacos (TZANOPOULOU et al., 2010). Segundo Tzanopoulou e colaboradores (2010), o composto ABT (Figura 4B) pode ser utilizado para transportar o radioisótopo de escolha para o tecido doente, facilitando as aplicações diagnósticas e terapêuticas contra o câncer de mama (TZANOPOULOU et al., 2010).

## **2.5 Radiofármacos de derivados benzotiazóis**

Os radiofármacos começaram a ser utilizados em 1905, após a descoberta dos raios X, por Wilhelm Conrad Roentgen, em 8 de novembro de 1895 (SANTOS-OLIVEIRA; CARNEIRO-LEÃO, 2008). Também conhecidos como drogas radioativas, os radiofármacos são medicamentos que contêm radionuclídeos responsáveis em emitir radiação (CALLAHAN et al., 2001) e são usados rotineiramente na medicina nuclear (LIU, 2008).

Dependendo de suas aplicações médicas, os radiofármacos podem ser divididos em duas classes principais, que são a diagnóstica e a terapêutica. Eles também podem ser classificados de acordo com suas características de biodistribuição: aqueles em que a distribuição é determinada, exclusivamente, por suas propriedades físico-químicas, e aqueles em que a principal distribuição é determinada por sua capacidade de ligação ao receptor ou outras interações biológicas (LIU, 2008).

### 2.5.1 Radioatividade (radionuclídeos)

A radioatividade se baseia em um processo no qual radionuclídeos instáveis transformam-se espontaneamente em outro mais estável, emitindo partículas ( $\alpha$ ,  $\beta^-$  ou  $\beta^+$ ) e/ou radiações eletromagnéticas (raios  $\gamma$ ) (OLIVEIRA et al., 2006).

As radiações  $\beta$  e  $\gamma$  apresentam um poder penetrante maior do que as partículas  $\alpha$ , no entanto, são as que originam menores danos biológicos. Esses danos biológicos potencializam-se com a ionização em meios aquosos (como, por exemplo, é o caso do corpo humano), provocando a quebra das moléculas de água e a formação de radicais livres que, por sua vez, podem danificar o material biológico (OLIVEIRA et al., 2006).

Nesse contexto, aplicações de diagnóstico em medicina nuclear utilizam radiofármacos que apresentam na sua constituição, principalmente, radionuclídeos emissores de radiação  $\gamma$  ou pósitrons  $\beta^+$ , uma vez que o decaimento desses radionuclídeos dá origem a uma radiação eletromagnética penetrante que consegue atravessar os tecidos e pode ser detectada externamente. Por outro lado, os radiofármacos mais utilizados para terapia são aqueles que incluem, em sua composição, radionuclídeos emissores de partículas ( $\alpha$  ou  $\beta^-$ ), cuja ação se baseia na destruição seletiva de tecidos (OLIVEIRA et al., 2006).

Os radiofármacos atualmente disponíveis na medicina nuclear são moléculas ligadas a elementos radioativos, como, por exemplo, o tecnécio-99m, o rênio-186/188, o iodo-123, o índio-111, o gálio-67 e o tálio-201, entre outros (ARAÚJO, 2005).

## 2.5.2 Tecnécio: propriedades espectroscópicas

O tecnécio (Tc, Z=43) foi descoberto em 1937, por Carlo Perrie e Emilio Gino Segré. Esse nome vem do adjetivo grego *technetos*, ou artificial, e foi utilizado pelo fato de o tecnécio ter sido o primeiro elemento químico preparado de forma artificial (MURPHY; FERRO-FLORES, 2003; ARAÚJO, 2005).

O Tc é um metal da segunda série de transição da tabela periódica, pertencente à família 7B e está localizado entre o molibdênio e o rutênio e entre o manganês e o rênio. Todos os isótopos conhecidos do Tc são radioativos, desde o Tc-90 ao Tc-110, e incluem oito pares de isômeros nucleares (é um estado metaestável de um átomo causado pela excitação de um próton ou nêutron no seu núcleo atômico), entre eles o  $^{99}\text{Tc}$  e seu isômero metaestável  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (MURPHY; FERRO-FLORES, 2003; ARAÚJO, 2005; ABRAM; ALBERTO, 2006). De todos os 19 isótopos conhecidos do Tc, o  $^{99}\text{Tc}$  é o mais estável (BERMÚDEZ et al., 2001).

De acordo com a literatura, alguns radioisótopos de Tc podem ser núcleos promissores para estudo de RMN e MRI (BÜHL; GOLUBNYCHIY, 2008). Com base nesse contexto, Tzanopoulou et al. (2006), sintetizaram o complexo de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  conjugado com o composto ABT (Figura 6) (TZANOPOULOU et al., 2006).

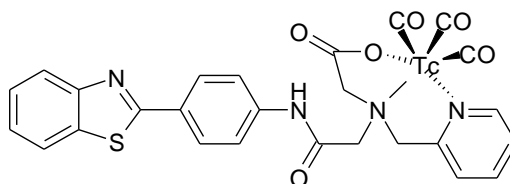


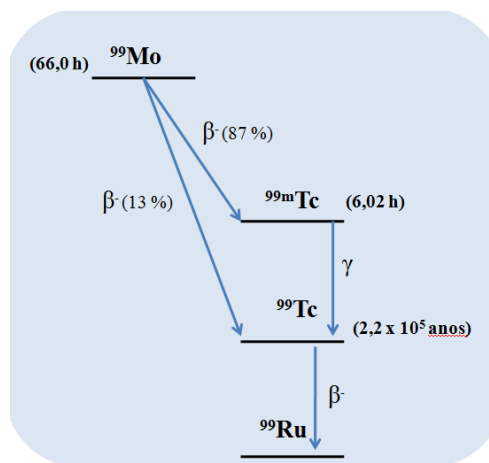
Figura 6  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-(NNO)}$  conjugado com o composto ABT



O  $^{99m}\text{Tc}$  é um monoemissor gama de baixa energia ( $E_\gamma = 140 \text{ keV}$ ) e tem tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$  = tempo necessário para reduzir à metade a atividade inicial de um radionuclídeo) relativamente curto, 6,02 h e não emite radiação do tipo particulado ( $\alpha$ ,  $\beta^-$ ) (ABRAM; ALBERTO, 2006). Com isso, esse radioisótopo tem sido utilizado rotineiramente na medicina nuclear diagnóstica.

O radionuclídeo  $^{99m}\text{Tc}$  é produto do decaimento radioativo do molibdênio-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ), ou seja, cerca de 87% dos átomos de  $^{99}\text{Mo}$  de uma amostra desintegram-se por emissão de radiação  $\beta^-$  e originam núcleos de  $^{99m}\text{Tc}$  que, por sua vez, desintegram-se por emissão de radiação gama para originar o  $^{99}\text{Tc}$  que se desintegra a  $^{99}\text{Ru}$  (rutênio-99) (ABRAM; ALBERTO, et al., 2006) (Esquema 1). O radioisótopo  $^{99}\text{Tc}$  apresenta um tempo de meia-vida longo ( $t_{1/2} = 2,2 \times 10^5$  anos) e emissão  $\beta$  ( $E_{\text{max}} = 0,29 \text{ MeV}$ ), e é similar aos radioisótopos de rênio  $^{186}\text{Re}$  ( $E_{\text{max}} = 1,07 \text{ MeV}$ ) e  $^{188}\text{Re}$  ( $E_{\text{max}} = 2,12 \text{ MeV}$ ), que também emitem radiação  $\beta$  e, de acordo com a literatura, já são utilizados na medicina nuclear para aplicações de radioterapia (TZANOPOULOU et al., 2006; TZANOPOULOU et al., 2010).

De acordo com Bühl e Golubnychiy (2008), a espectroscopia de RMN pode ser considerada uma potente técnica utilizada para a caracterização dos complexos de Tc (BÜHL; GOLUBNYCHIY, 2008).



Esquema 1 Diagrama do decaimento do  $^{99}\text{Mo}$  (MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001; ABRAM; ALBERTO, 2006)

## 2.6 Técnicas espectroscópicas

As técnicas espectroscópicas têm sido empregadas em muitas linhas de pesquisa e em diversas áreas, como, por exemplo, na química, na física e na biologia, entre outras. Dentre as várias técnicas espectroscópicas utilizadas atualmente, neste trabalho foram abordadas a espectroscopia de ressonância magnética nuclear e a espectroscopia de fluorescência.

### 2.6.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) é considerada uma poderosa técnica espectroscópica para a determinação da estrutura e da geometria molecular. A propriedade de interesse na RMN é o *spin* nuclear ( $I$ ), ou seja, núcleos que apresentam  $I = 0$  (por exemplo, o  $^{12}\text{C}$ ) não apresentam momento magnético e, conseqüentemente, são inativos na RMN. Por outro lado, núcleos com valores de  $I$  inteiros ou fracionários apresentam atividade (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991; FREITAS; RAMALHO, 2013). O  $^{99}\text{Tc}$  é um

exemplo de núcleo que apresenta *spin* fracionário,  $I = 9/2$  (GORSHKOV et al., 2003).

Espectros de RMN são obtidos monitorando-se transições de *spin* nuclear sofridas por núcleos atômicos submetidos a um campo de indução magnética. Em tais condições, a energia envolvida nessas transições é quantizada; sendo o deslocamento químico ( $\delta$ ) um dos parâmetros fundamentais da RMN, está diretamente relacionado com a frequência da radiação absorvida por um núcleo ao sofrer esse processo. Essa frequência ( $\nu$ ) depende, por sua vez, da intensidade do campo de indução magnética,  $B$ , a que o núcleo se encontra submetido (Eq. 1):

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} |\vec{B}_0| \quad (1)$$

em que  $\gamma$  é a chamada constante magnetogírica, que depende exclusivamente do núcleo monitorado (SANDERS; HUNTER, 1993).

Em um espectrômetro de RMN, a amostra é submetida a um campo de indução magnética  $\vec{B}_0$ , contudo, os núcleos presentes nessa amostra não estão efetivamente submetidos a este campo. Isso acontece porque, quando submetidos a  $\vec{B}_0$ , os elétrons interagem com ele e, dessa maneira, passam a criar eles mesmos um campo magnético induzido  $\vec{B}$  (toda a carga elétrica em movimento cria um campo de indução magnética), cuja intensidade é proporcional à do campo externo  $\vec{B}_0$  (GIL; GERALDES, 1991):

$$|\vec{B}| = \sigma |\vec{B}_0| \quad (2)$$

em que a constante de proporcionalidade entre  $|\vec{B}|$  e  $|\vec{B}_0|$  é chamada constante de blindagem e designada por  $\sigma$ . Assim, um núcleo presente na amostra estará submetido a um campo de indução magnética efetiva  $|\vec{B}|$ , de intensidade dada pela Equação 3.

$$|\vec{B}| = |\vec{B}_0| - |\vec{B}'| = |\vec{B}_0| - \sigma |\vec{B}_0| \Leftrightarrow |\vec{B}| = |\vec{B}_0| (1 - \sigma) \quad (3)$$

Os deslocamentos químicos dos diversos núcleos de uma molécula dependem do ambiente eletrônico (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991) que circunda cada um deles (Eq. 2 e 3) e essa dependência se encontra expressa pela constante de blindagem  $\sigma$ . O deslocamento químico é um número pequeno e adimensional, geralmente expresso em partes por milhão (ppm) (Eq. 4).

$$\delta = \sigma_{referência} - \sigma_{núcleo} \quad (4)$$

### 2.6.2.1 Fatores que influenciam a constante de blindagem

A partir de argumentos mecânico-quânticos, é possível expressar a constante de blindagem  $\sigma$  como uma combinação linear de vários termos, de acordo com a Eq. 5 (SAIKA; SLICHTER, 1954).

$$\sigma = \sigma_{dia}^{AA} + \sigma_{para}^{AA} + \sum_{B \neq A} \sigma^{AB} + \sigma' \quad (5)$$

Nesta Equação, a primeira parcela,  $\sigma_{dia}^{AA}$ , representa a chamada contribuição diamagnética para a blindagem nuclear. Esse termo está

intimamente associado à simetria da nuvem eletrônica ao redor do núcleo (LAMB, 1941). Quando submetido ao campo de indução magnética externa, a nuvem eletrônica passa a executar um movimento de rotação ao redor do núcleo, de forma tal que é criado um campo magnético que se opõe ao campo aplicado. Trata-se de algo semelhante ao descrito pela Lei de Biot-Savart do eletromagnetismo (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 1993), tendo como efeito líquido uma blindagem do núcleo. Trata-se da parcela mais importante nos deslocamentos químicos de próton, em que a nuvem eletrônica tem uma simetria bastante próxima da esférica e correlaciona-se bem com a eletronegatividade do grupo vizinho. A fórmula de Lamb (LAMB, 1941) para a contribuição diamagnética é dada pela Equação 6.

$$\sigma_{dia} = \frac{e^2 \mu_0}{3m_e} \int_0^\infty \rho_e r dr \quad (6)$$

A Equação 5 mostra que a constante de blindagem é função da densidade eletrônica ( $\rho_e$ ) e da sua distribuição ao redor do núcleo. De fato, como é do nosso conhecimento, diversos outros fatores devem afetar os elétrons e sua distribuição no átomo, especialmente a existência de ligações químicas e os efeitos do meio onde se encontram os átomos ou as moléculas. Sabe-se que a chamada constante de blindagem,  $\sigma$ , é uma quantidade de alta complexidade, visto que ela, por definição, deve incluir todos os efeitos no deslocamento químico do núcleo atômico que sejam de origem eletrônica.

O segundo termo da Equação 5,  $\sigma_{para}^{AA}$ , é chamado contribuição paramagnética, sendo a parcela mais importante para deslocamentos químicos de núcleos como Carbono-13. A correção paramagnética,  $\sigma_P$ , que, ao invés da blindagem diamagnética que é originada nos elétrons das camadas internas, está

relacionada com os elétrons de valência e as ligações químicas, é representada pela chamada equação de Ramsey (Eq. 7) em coordenadas esféricas (RAMSEY, 1950; FACELLI, 2011):

$$\sigma_p = \frac{e^2 \hbar^2}{m_e^2 \Delta E} \langle \Psi_0 | \sum_{j,k} \frac{1}{r^3} \frac{\partial^2}{\partial \phi_j \partial \theta_k} | \Psi_0 \rangle \quad (7)$$

Na Equação de Ramsey (RAMSEY, 1950),  $\Psi_0$  é a função de onda eletrônica no estado fundamental,  $\Delta E$  é a energia média de excitação eletrônica referente ao estado fundamental e  $\mathbf{r}$  é a distância média do orbital em consideração ao núcleo. Neste caso, como a blindagem é inversamente proporcional a  $\Delta E$ , o efeito é mais importante em núcleos com mais elétrons.

O terceiro termo da Equação 5,  $\sum_{B \neq A} \sigma^{AB}$ , representa as contribuições interatômicas para os deslocamentos químicos, ou seja, a contribuição de grupos vizinhos. Aqui se destacam os clássicos efeitos de anisotropia dos átomos pesados, dos grupos carbonila e nitrila e das correntes de anel presentes em compostos aromáticos. O último termo,  $\sigma'$ , engloba todos os fatores intermoleculares que afetam os deslocamentos químicos, especialmente os efeitos do solvente (SAIKA; SLICHTER, 1954).

## 2.6.2 Espectroscopia de fluorescência

Em alguns estudos tem sido demonstrado que a espectroscopia de fluorescência é uma promissora técnica com alta sensibilidade para diagnóstico de várias doenças (SHAHZAD et al., 2009; SHAHAZAD; EDETSBERGER; KOEHLER, 2010; WEI et al., 2013).

Dois estados são importantes no mecanismo de absorção e emissão de luz de uma molécula: o *estado fundamental* e o *primeiro estado excitado* (LAKOWICZ, 2006). A fluorescência (denominada processo radioativo) é caracterizada pelas transições  $\pi^* \rightarrow \pi$  (entre orbitais pi antiligantes – orbital pi ligante) e em menor escala  $\pi^* \rightarrow n$  (entre orbitais pi antiligantes – orbitais não ligantes) (LAKOWICZ, 2006).

As transições eletrônicas que ocorrem durante o processo de absorção de luz estão diretamente relacionadas com a estrutura molecular responsável pela absorção dessa energia (cromóforos) em uma determinada faixa da radiação e, além disso, são de diferente natureza. Qualquer alteração na estrutura do cromóforo pode influenciar significativamente o comprimento de onda absorvido (FORESTIER, 2008; CORRÊA, 2010).

A emissão de energia ocorre do nível eletrônico excitado de mais baixa energia. Uma vez que a molécula é excitada, ela pode emitir radiação e voltar ao estado fundamental por meio do processo de fluorescência ou desativar-se para o estado fundamental por dois caminhos: cruzamento entre sistemas (IC, do inglês *internal conversion*) ou conversão intersistemas (ISC, do inglês *intersystem crossing*). O IC ocorre entre *spins* de mesma multiplicidade (singleto ( $S_2$ ) – singleto ( $S_1$ ); tripleto ( $T_2$ ) – tripleto ( $T_1$ )). Por outro lado, ISC é observado entre *spins* de diferentes multiplicidades (singleto – tripleto), ocorrendo, assim, o processo conhecido como fosforescência (LAKOWICZ, 2006; ZHAO et al., 2012). Esses processos descritos anteriormente são caracterizados como não radioativos (competem com a fluorescência) e podem ser visualizados de forma resumida pelo diagrama de Jablonski (um físico polonês) (Figura 7) (LAKOWICZ, 2006). Esse diagrama ilustra os estados eletrônicos de uma molécula, bem como as possíveis transições eletrônicas entre esses estados. Os estados estão organizados verticalmente por energias e agrupados

horizontalmente por multiplicidade de *spin*. As transições radiativas são indicadas por setas retas e cheias.

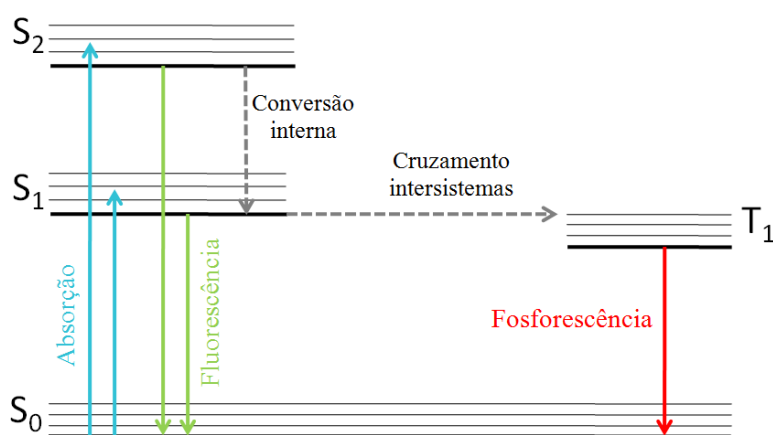


Figura 7 Diagrama de Jablonski simplificado

A energia de transição eletrônica é igual à diferença de energia entre o primeiro e o último nível energético. Portanto, a transição de energia  $E$  ( $\text{J mol}^{-1}$ ) é determinada pela Equação 8 (LAKOWICZ, 2006):

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (8)$$

em que  $h$  é a constante de Planck ( $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ ),  $c$  é a velocidade da luz e  $\lambda$  é o comprimento de onda (nm). Portanto, cada transição ocorre com uma energia específica e, assim, em um comprimento de onda específico e único (LAKOWICZ, 2006).

O rendimento quântico de fluorescência ( $Q$ ) é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, como descrito na Equação 9:



$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (9)$$

em que  $\Gamma$  é a taxa emissiva da molécula fluorescente e  $k_{nr}$  é a taxa não radioativa de decaimento para o estado fundamental ( $S_0$ ).

O tempo de vida do estado excitado é definido pela média do tempo que a molécula gasta no estado excitado para retornar ao estado fundamental. Geralmente, o tempo de vida ( $\tau$ ) fluorescente pode variar de  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  s e é determinado pela Equação 10 (LAKOWICZ, 2006).

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (10)$$

A emissão de fluorescência é um processo aleatório e poucas moléculas emitem seus fótons precisamente (LAKOWICZ, 2006). O tempo de vida da molécula fluorescente na ausência de um processo não radiativo é chamado de tempo de vida intrínseca ou natural, e é dada pela Equação 11.

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} \quad (11)$$

Muitas moléculas absorvem radiação ultravioleta ou visível, porém, poucas apresentam fluorescência. A presença de uma estrutura suficientemente rígida é uma condição fundamental para que ocorra a fluorescência. O derivado benzotiazol, HBT (Figura 5), é um exemplo de composto que apresenta uma ligação de hidrogênio intramolecular (BARBATTI et al., 2009; KUNGWAN et al., 2012; ZHAO et al., 2012). Essa ligação intramolecular proporciona ao composto uma maior rigidez estrutural, contribuindo, assim, para a emissão de

fluorescência. Além da rigidez estrutural, outros fatores também podem contribuir para emissão de fluorescência, como a planaridade da molécula, conjugação de elétrons  $\pi$  e aromaticidade (LAKOWICZ, 2006; GRANDO, 2009).

Vários estudos teóricos têm sido realizados no intuito de se obter parâmetros espectroscópicos de diversas moléculas (BÜHL; GOLUBNYCHIY, 2008; BARBATTI et al., 2009; RAMALHO; PEREIRA; THIEL, 2011) e é nesse contexto que entram os métodos de química computacional.

### 3 QUÍMICA COMPUTACIONAL

A união entre ciência e tecnologia vem provocando, nas últimas décadas, várias transformações que implicam no desenvolvimento de ambas (LACERDA JÚNIOR, 2007). Nos últimos anos, uma grande quantidade de informações tem sido processada rapidamente devido ao avanço e à sofisticação da informática (LEAL; MOITA NETO, 2010). Além disso, com o auxílio de novas ferramentas e metodologias computacionais, resultados precisos vêm sendo obtidos na tentativa de simular uma variedade de parâmetros físico-químicos e biológicos. Uma das grandes vantagens dos métodos computacionais é seu baixo custo frente a métodos experimentais, visto que simulações podem ser feitas e aplicadas com sucesso para estudo de uma ampla faixa de problemas de interesse químico, como, por exemplo, cinética de reação (estados de transição), propriedades magnéticas (tensor blindagem e constante de acoplamento), estabilidade conformacional e reatividade, entre outros (LACERDA JÚNIOR, 2007).

A aplicação de métodos computacionais para solucionar problemas químicos estende-se às áreas nas quais a química desempenha um importante papel, direto ou indireto. Nesse contexto, um conhecimento mais detalhado de compostos ativos (fármacos), bem como suas propriedades físico-químicas e interações com um receptor, podem ser avaliadas, preditas e simuladas utilizando métodos de química computacional (JENSEN, 2007; MATOS et al., 2011; CUNHA; MANCINI; RAMALHO, 2012; MANCINI et al., 2012; KARPLUS; LEVITT; WARSHEL, 2013). Seguindo essa mesma linha de aplicação em biotecnologia, novos compostos podem ser modelados e propostos como potenciais protótipos para o diagnóstico de diversas doenças, em particular neste trabalho, o câncer de mama.

### 3.1 Métodos de mecânica molecular

Os métodos baseados na mecânica molecular (MM) utilizam as leis da física clássica para prever propriedades estruturais e moleculares. Esse tipo de cálculo ignora os movimentos dos elétrons e calcula a energia de um sistema como uma função apenas das posições nucleares. Isso torna a MM um método adequado para lidar com sistemas contendo um número grande de átomos, como, por exemplo, proteínas (HIGGINS; TAYLOR, 2001; FRANÇA, 2004).

O conjunto de equações empíricas e parâmetros utilizados em cada esquema da MM é chamado de campo de forças. Cada campo de força é parametrizado para um tipo específico de sistema. No caso de sistemas biomoleculares, os campos de forças mais utilizados são CHARMM (BROOKS et al., 1983; MACKERELL et al., 1998; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008), GROMOS (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987; VAN GUNSTEREN et al., 1996; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008), AMBER (WEINER et al., 1984; WEINER et al., 1986; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008) e OPLS (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

A maioria dos campos de forças é composta por um simples conjunto de quatro componentes que correspondem às forças intra e intermoleculares do sistema (JESSEN, 1999), ou seja, os campos de forças são descritos como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de Van Der Waals e de Coulomb) (JESSEN, 1999; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Um típico campo de forças pode ser descrito pela Equação 12.

$$E(\mathbf{r}^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} V_n [1 + \cos(n\theta - \gamma)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (12)$$

em que  $E(\mathbf{r}^N)$  é a energia potencial total, que é uma função das posições ( $\mathbf{r}$ ) de N partículas (normalmente átomos). O primeiro termo modela as interações entre pares de átomos ligados, modelados aqui pelo potencial harmônico que dá o aumento na energia quando o seu comprimento  $r_i$  desvia do valor de referência  $r_{i,0}$ . O segundo termo é uma soma sobre todos os ângulos de valência (ângulos A-B-C) na molécula, novamente modelada usando um potencial harmônico. O terceiro termo é o potencial torcional que modela como a energia varia quando as ligações giram. A quarta contribuição é o termo não ligado, que é calculado entre todos os pares de átomos (i e j) que estão em diferentes moléculas ou na mesma molécula, mas separados por, no mínimo, três ligações.

Em um campo de forças simples, o termo não ligado é usualmente modelado usando um termo de potencial de Coulomb para interações eletrostáticas e um termo de potencial de Lennard-Jones para as interações de *van der Waals*, como representado na Equação 12.

### 3.1.1 Ancoramento molecular (*docking*)

Neste trabalho foi realizado o estudo de ancoramento molecular, a fim de se obter os deslocamentos químicos dos núcleos  $^{13}\text{C}$  e  $^{99}\text{Tc}$  no sítio ativo da enzima PI3K.

O processo de ancoramento molecular envolve a predição da conformação do ligante e sua orientação dentro do sítio de interação da proteína.

Para entender o mecanismo de interação de um fármaco, é essencial saber o posicionamento tridimensional para a sua interação molecular com a proteína alvo. A predição da geometria e da energia de interação é de grande

interesse para o planejamento de novos medicamentos (IWATA et al., 2000). Uma das conformações estruturais mais confiáveis é obtida por análise de raios X de cristais do complexo ou RMN, mas não é fácil obter dados experimentais de todos os inibidores de interesse. A simulação computacional do ancoramento molecular (*docking*) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre a proteína e o ligante (SILVEIRA, 2003; GUIMARÃES, 2010). Nesse tipo de simulação é possível encontrar a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcular essa estabilidade relativa.

Os valores da função utilizada no ancoramento (*docking scoring function*),  $E_{score}$ , são definidos pela Equação 13:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (13)$$

em que o termo  $E_{inter}$ , que corresponde à energia de interação ligante-proteína, é definido de acordo com a Equação 14.

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[ E_{PLP} \left( \frac{1}{r_{ij}} \right) - 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}} \right] \quad (14)$$

O primeiro termo,  $E_{PLP}$ , representado na Equação 13, é um termo de energia potencial que utiliza dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos e outro potencial para a ligação hidrogênio. O segundo termo é responsável por descrever as interações eletrostáticas entre os átomos. O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática para  $\text{kcal mol}^{-1}$  (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; RAMALHO et al., 2009).

O termo  $E_{intra}$ , que corresponde à energia interna do ligante, é definido de acordo com a Equação 15.

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(ij) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A [1 - \cos(\theta - \theta_0)] + E_{penalizada} \quad (15)$$

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante, excluindo-se os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à energia de torção, em que  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é utilizada se diversas torções são determinadas. O último termo,  $E_{penalizada}$  (termo de correção), atribui uma penalidade de 1.000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2,0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. Em resumo, essas funções são utilizadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (proteína).

A técnica de ancoramento molecular encontra uma média de estruturas estáveis do ligante na proteína e calcula essa estabilidade relativa. Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados, eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo. Contudo, o número de combinações envolvidas é muito grande (MIZUTANI; TOMIOKA; ITAI, 1994).

### 3.1.2 Dinâmica molecular (clássica)

Os cálculos de dinâmica molecular (DM) são fundamentados nos princípios da mecânica clássica e fornecem informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (HÖLTJE et al., 2003; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

A DM pode ser empregada tanto para sistemas com elétrons, átomos, quanto para sistemas macromoleculares (TUCKERMAN; MARTYNA, 2000; GONÇALVES, 2009). Quando se trata de sistemas biomoleculares, utilizam-se cálculos da mecânica clássica, porém, quando o sistema envolve reações químicas, são empregados alguns termos quânticos (KARPLUS; PETSKO, 1990; FRANÇA, 2004).

Os cálculos de DM consistem da solução numérica, passo a passo, da equação de movimento de Newton, que pode ser descrita para um sistema atômico simples pelas Equações 16 e 17.

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (16)$$

$$F_i(t) = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (17)$$

em que  $F_i$  representa a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo  $t$ , e  $a_i$  é a aceleração do átomo  $i$  de massa  $m_i$  (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Quando já se define o campo de forças (ver seção 3.1), é possível determinar a força que atua sobre cada átomo, calculando-se a primeira derivada da energia potencial obtida do campo de forças escolhido com relação à posição dos núcleos (Equação 17) (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Essas equações são resolvidas simultaneamente em um pequeno espaço de tempo. Com isso se tem a trajetória de cada átomo do sistema com relação ao tempo. O conjunto de propriedades e configurações mantidas constantes durante a integração das equações de Newton, e que representam o estado do sistema, é chamado de *ensemble*. Dentre as várias opções de *ensemble*, se destacam o NVT (com



número de partículas, volume e temperatura constantes) e o NPT (com número de partículas, pressão e temperatura constantes). Essas duas alternativas de *ensemble* foram desenvolvidas para controlar separadamente a temperatura e a pressão no sistema (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Existem algumas condições iniciais que são essenciais para simulações de DM. Por exemplo, para se realizar um cálculo de DM é importante especificar as posições iniciais das partículas que compõem o sistema. Geralmente, elas são situadas na posição de uma rede cristalina para evitar sobreposições indesejáveis entre elas (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). O sistema é montado dentro de uma caixa que pode adotar diferentes geometrias, mas, geralmente, se utiliza uma caixa cúbica. No caso de sistemas biomoleculares, são adicionadas moléculas de águas dentro do sistema e, na caixa, é aplicado o modelo de condição periódica de contorno, evitando que as moléculas de água escapem do meio (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Antes de se iniciar as simulações de DM, o sistema deve ser minimizado, a fim de evitar maus contatos entre os átomos (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). A minimização, ou otimização, do sistema é feita a fim de obter uma energia próxima do mínimo local. Os algoritmos de minimização mais utilizados são o método do máximo declive (*steepest descent*), o método dos gradientes conjugados e o método quasi Newton Raphson.

### **3.1.2.1 Método do máximo declive**

O método do máximo declive (WIBERG, 1965; JESEN, 1999) é um método de primeira derivada que converge vagorosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia. De modo geral, com esse algoritmo é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou

construir estruturas a partir de informações de RMN ou por modelagem comparativa (JESEN, 1999; FRANÇA, 2004).

### **3.1.2.2 Método dos gradientes conjugados**

Um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Esse método, denominado “gradientes conjugados”, permite, em geral, uma convergência mais rápida que o método do máximo declive que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. O método dos gradientes conjugados utiliza, para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior (JESEN, 1999; FRANÇA, 2004).

### **3.1.2.3 Método quasi Newton-Raphson**

O método Newton-Raphson utiliza tanto as derivadas primeiras quanto as derivadas segundas da função. Assim, além de usar as informações do gradiente, utiliza a curvatura para prever onde a função mudará a direção ao longo do gradiente (JESEN, 1999, NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

## **3.2 Métodos de mecânica quântica**

Os métodos quânticos utilizados em modelagem molecular baseiam-se, em geral, na equação fundamental da mecânica quântica que, para uma partícula, pode ser escrita com a Equação 18 (JENSEN, 2007; FREITAS; RAMALHO, 2013):

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left( \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \Psi(r, t) + V(r) \Psi(r, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(r, t)}{\partial t} \quad (18)$$

em que  $\Psi$  é a função de onda que descreve o sistema, sujeito a um potencial externo  $V$ . O termo entre chaves corresponde ao operador hamiltoniano  $H$ , que fornece a energia do sistema ao ser aplicado à função de onda que o descreve.

O hamiltoniano total é composto por termos relativos à energia cinética dos núcleos e elétrons,  $T_n$  e  $T_e$ , respectivamente, e também às energias potenciais resultantes das interações entre esses dois tipos de partículas (Equação 9).

$$H = T_n + T_e + V_{el} + V_{ne} + V_{ee} + V_{nn} \quad (19)$$

Quando os potenciais são independentes do tempo, tem-se uma equação mais simplificada, em que  $E$  é a energia do sistema (Equação 20).

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(r) + V(r) \Psi(r) = E \Psi(r) \quad (20)$$

em que

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (21)$$

A equação de Schrödinger,  $H\Psi(\vec{r}) = E\Psi(\vec{r})$ , pode ser resolvida analiticamente apenas para alguns problemas simples, como o átomo de hidrogênio. Para outros átomos e moléculas, apenas soluções aproximadas podem ser obtidas. A determinação dessas soluções é auxiliada pelo princípio variacional, no qual a energia de uma função de onda aproximada é sempre igual

ou maior que a energia da solução exata (JENSEN, 2007; FREITAS; RAMALHO, 2013).

Uma aproximação bastante utilizada é a de Born-Oppenheimer, que desconsidera o movimento dos núcleos da molécula, uma vez que a massa nuclear é várias vezes maior que a massa dos elétrons. Assim, a equação de Schrödinger é resolvida apenas para os elétrons descritos por uma função de onda puramente eletrônica, na presença de um potencial produzido pelos núcleos que assumem posições fixas no espaço (JENSEN, 2007; SANT'ANNA, 2009). Outra aproximação que também pode ser empregada é a desconsideração de efeitos relativísticos, que são normalmente desprezíveis para átomos das três primeiras linhas da tabela periódica (JENSEN, 2007; FREITAS; RAMALHO, 2013).

A partir dessas aproximações, existem duas formas gerais de resolver a equação de Schrödinger: nos métodos *ab initio*, um modelo para a função de onda é utilizado, incluindo todos os elétrons dos átomos em questão, e a equação é resolvida utilizando-se somente constantes fundamentais; os métodos semiempíricos utilizam uma forma simplificada do hamiltoniano, além de parâmetros baseados em dados experimentais, sendo considerados somente os elétrons da camada de valência (JENSEN, 2007).

A função de onda aproximada para a molécula pode ser montada a partir de combinações lineares dos orbitais atômicos envolvidos. Um requisito da função de onda é atender ao Princípio de Pauli, segundo o qual a função de onda total tem que ser necessariamente antissimétrica (isto é, deve mudar de sinal) em relação ao intercâmbio de qualquer par de elétrons. Os orbitais atômicos são substituídos por orbitais de spin  $\phi$ , constituídos pelo produto do orbital por uma função de *spin*. A função de onda para preencher os requisitos de antissimetria é, então, representada por um determinante de Slater ( $\Phi$ ) que, para N elétrons e N orbitais de *spin*, é dado pela Equação 22.

$$\Phi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_2(1) & \dots & \phi_N(1) \\ \phi_1(2) & \phi_2(2) & \dots & \phi_N(2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \phi_1(N) & \phi_2(N) & \dots & \phi_N(N) \end{vmatrix} \quad (22)$$

No método Hartree-Fock, as repulsões entre os elétrons são tratadas de forma média, ou seja, consideram-se cada elétron como sujeito ao potencial de atração do núcleo e um potencial médio de repulsão dos outros (N-1) elétrons. Este efeito é decorrente da utilização de apenas um determinante de Slater para a descrição da função de onda. Essa aproximação leva às equações de Hartree-Fock, cuja solução é obtida indiretamente, de forma a determinar a melhor função de onda possível com um único determinante. Inicialmente, um conjunto de orbitais de *spin* aproximados é formulado e as equações de Hartree-Fock são resolvidas, gerando um novo conjunto de orbitais de *spin*. Essa sequência é repetida até que se atinja um critério de convergência. Esse procedimento é conhecido como campo autoconsistente (*self consistent Field*, SCF) (JENSEN, 2007).

Nas simulações de dinâmica molecular quântica (DMQ), a energia do sistema e suas derivadas são obtidas a partir de um tratamento mecânico quântico (REGA; IYENGAR; VOTH, 2004). Tradicionalmente, simulações de DMQ envolvem a convergência da função de onda do sistema para cada passo da simulação. A DMQ apresenta vantagens significativas para estudos que envolvem estruturas e propriedades eletrônicas de sistemas moleculares complexos. Porém, uma das suas desvantagens é o elevado custo computacional, quando comparado aos métodos de dinâmica molecular clássicos (ver seção 3.1.2). Nesse contexto, algumas abordagens para contornar esse problema da demanda computacional têm sido investigadas, como, por exemplo, os cálculos dinâmicos utilizando um lagrangiano estendido (Equação 23) (SCHLEGEL et

al., 2002; IYENGAR; SCHLEGEL; VOTH, 2003; REGA; IYENGAR; VOTH, 2004).

Os cálculos de DMQ que utilizam um lagragiano estendido são particularmente bem adaptados para simular sistemas caracterizados por um elevado número de grau de liberdade (REGA; IYENGAR; VOTH, 2004). Nessa abordagem, a função de onda é propagada juntamente com os graus de liberdade nucleares clássicos e por um ajuste do tempo relativo dos movimentos eletrônicos e nucleares. Um exemplo de método de trajetória de dinâmica molecular com lagragiano estendido é o ADMP (do inglês *atom-centered density matrix propagation*), que utiliza funções de base para um átomo central e uma matriz de densidade de propagação. Essa abordagem é bem adequada para a dinâmica de sistemas químicos complexos (REGA; IYENGAR; VOTH, 2004). Para o método ADMP, o lagragiano do sistema pode ser escrito como (Equação 23)

$$\mathcal{L}_{ADMP} = \frac{1}{2} \text{Tr} \mathbf{V}^T \mathbf{M} \mathbf{T} + \frac{1}{2} \text{Tr} \{ \mu^{\frac{1}{4}} \mathbf{W} \mu^{\frac{1}{4}} \}^2 - E(\mathbf{R}, \mathbf{P}) - \text{Tr} [\Lambda (\mathbf{P} \mathbf{P} - \mathbf{P})] \quad (23)$$

em que  $\mathbf{R}$ ,  $\mathbf{V}$  e  $\mathbf{M}$  representam as posições nucleares, as velocidades e as massas, respectivamente;  $\mathbf{P}$  é matriz de densidade;  $\mathbf{W}$  é a velocidade da matriz de densidade e  $\mu$  representa o tensor massa fictício para os graus de liberdade eletrônico;  $E(\mathbf{R}, \mathbf{P})$  representa a função da energia potencial *ab initio*; o laplaciano multiplicador de matriz ( $\Lambda$ ) é usado para aplicar N-representabilidade, ou seja, restrições sobre o número total de elétrons e uma potência na matriz de densidade de uma partícula (REGA; IYENGAR; VOTH, 2004).

Algumas vantagens específicas do método ADMP frente a outros métodos de DMQ incluem a liberdade para tratar rigorosamente todos os elétrons do sistema ou usar pseudopotenciais; a capacidade de utilizar

razoavelmente grande passos de tempo por meio da utilização de um tensorial de massa fictícia e um menor valor para essa massa (em outras palavras, permite reter os átomos de hidrogênio no sistema e não substitui por isótopos mais pesados); emprega grande variedade de funcionais precisos e eficazes de troca e correlação incluindo os funcionais híbridos e tem boa eficiência computacional devido ao uso de menos funções de base e maiores passos de tempo (SCHLEGEL et al., 2002).

Além disso, uma grande vantagem da ADMP sobre os métodos de campo de força é que métodos de estrutura eletrônica podem descrever de forma mais apropriada, por exemplo, interações específicas entre o solvente e o soluto, além de descrever a quebra e a formação de ligação (SCHLEGEL et al., 2002; IYENGAR; SCHLEGEL; VOTH, 2003; REGA; IYENGAR; VOTH, 2004; PHATAK; SUMNER; IYENGAR, 2012; NAM, 2013).

### 3.2.1 Métodos DFT e TD-DFT

A teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês *density functional theory*), que usa a densidade eletrônica como variável fundamental (em vez da função de onda), é a base de uma nova classe de métodos de cálculo da estrutura eletrônica, em plena expansão e com grandes potencialidades. Ele emergiu como uma alternativa aos tradicionais métodos semiempíricos e *ab initio* (por exemplo, Hartree-Fock ou pós-Hartree-Fock) no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. Além disso, tem apresentado boa concordância com os dados experimentais disponíveis (KOCH; HOLTHAUSEN, 2001; CRAMER; TRUHLAR, 2009).

Comparado aos métodos HF e semiempíricos, o método DFT apresenta a vantagem de incluir de forma implícita a correlação eletrônica nos cálculos (KOCH; HOLTHAUSEN, 2001; FERREIRA, 2011; ROCHA, 2013). Além

disso, o método DFT tem sido bastante explorado, devido à possibilidade de estudar sistemas com elevados números de átomos a um custo computacional relativamente menor com relação aos métodos *ab initio*. Isso se deve ao fato de que, usando a densidade eletrônica, a integral para repulsão de Coulomb necessita ser feita somente sobre a densidade eletrônica, que é uma função tridimensional, como  $N^3$ , em que  $N$  é o número de funções de bases. Já os métodos *ab initio* escalam acima de  $N^4$  (KIRKPATRICK; GELATT; VECCHI, 1983).

As vantagens citadas anteriormente são as principais responsáveis pela emergência da aproximação DFT como um método computacional tangível e versátil. Nesse sentido, a DFT é empregada com sucesso na obtenção de dados termodinâmicos, estruturas moleculares, campos de forças e frequências, estruturas de estados de transição, espectroscopia ultravioleta, EPR (ressonância paramagnética eletrônica), fotoeletrônica e RMN (ressonância magnética nuclear), bem como na determinação de barreiras de ativação, momentos de dipolos e outras propriedades eletrônicas (FUKUI, 1981; JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988; LEE; YANG; PARR, 1988; BECKE, 1993; DUARTE; ROCHA, 2007).

A DFT se baseia na teoria proposta por Thomas e Fermi, em que a energia cinética e a energia de Coulomb dos elétrons eram expressas somente pela densidade (THOMAS, 1927; FERMI, 1928). Ou seja, o método DFT é baseado na densidade eletrônica, designada por  $\rho(r)$ , uma função tridimensional que carrega toda informação do sistema. Um funcional de densidade é utilizado para obter a energia para a densidade eletrônica, e a minimização desse funcional leva à energia do estado fundamental do sistema multieletrônico. É preciso ter em mente que um funcional é uma função de uma função que, nesse caso, é a densidade eletrônica. Existe uma gama de diferentes funcionais que



podem apresentar vantagens e/ou desvantagens na descrição de um sistema (KOCH; HOLTHAUSEN, 2001; FERREIRA, 2011; ROCHA, 2013).

O teorema da existência de Hohenberg e Kohn (1964) prova que existe um único funcional, tal que

$$E[\rho(r)] = E_{elec} \quad (24)$$

em que  $E_{elec}$  é a energia eletrônica exata.

Além disso, demonstra-se que a densidade do elétron obedece ao teorema variacional (KOCH; HOLTHAUSEN, 2001).

A fim de resolver a energia pelo método DFT, Kohn e Sham propuseram que o funcional tem a forma, de acordo com a equação

$$E[\rho(r)] = T_e[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] \quad (25)$$

em que o termo da energia potencial de atração núcleo-elétron  $V_{ne}$ , é

$$V_{ne}[\rho(r)] = \sum_j^{nuclei} \int \frac{Z_j}{|r - r_k|} \rho(r) dr \quad (26)$$

$V_{ee}$ , é a energia potencial de repulsão elétron-elétron, dada pela Equação 27

$$V_{ee}[\rho(r)] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (27)$$

e  $E_{xc}$  é um termo que inclui todos os efeitos de correlação eletrônica. Em geral, esse termo é dividido em uma energia de troca  $E_x$  e uma energia de correlação

$E_c$ . A dificuldade no método DFT é, portanto, a definição do funcional  $E_{xc}$  e é nesse aspecto que os vários métodos diferem.

Os métodos LDA (do inglês *local density approximation*) assumem que a densidade pode ser tratada uniformemente em âmbito local. Dessa forma, o termo  $E_{xc}$  é função apenas da densidade eletrônica. Uma considerável melhora foi obtida por meio das aproximações do gradiente generalizado (GGA). Os métodos GGA (do inglês *generalized gradient approximation*) consideram a densidade eletrônica como não uniforme, de forma que suas derivadas são incluídas nos funcionais. Métodos híbridos incluem uma mistura da energia de troca resultante do cálculo HF com funcionais de troca e correlação da teoria DFT e, geralmente, são considerados os mais precisos (KOCH; HOLTHAUSEN, 2001; JENSEN, 2007).

Como mencionado anteriormente, o método DFT é utilizado para cálculos de sistemas multieletrônico no estado fundamental. Ou seja, no caso dos estudos em que são descritas transições eletrônicas em estados excitados, é preciso utilizar recursos adicionais, como a teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT, do inglês *time dependent density functional theory*).

### **3.2.1.1 Teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT)**

A TD-DFT é uma extensão da DFT, na qual se baseia em princípios da mecânica quântica dependente do tempo (JENSEN, 2007). Devido ao sucesso da aplicação do método DFT no estado fundamental, a descrição de estados dependentes do tempo (estados excitados), em termos do funcional da densidade, tem sido realizada. Por meio desse método é possível obter resultados de energias de excitações, assim como as propriedades espectroscópicas

(absorção e emissão) de uma molécula (BARBATTI et al., 2009; SALZMANN et al., 2009).

A equação de Schrödinger dependente do tempo para um sistema de  $N$  elétrons e coordenadas  $r = (r_1, \dots, r_N)$  pode ser expressa de acordo Equação 28 (BURKE; GROSS, 1998).

$$i \frac{\partial}{\partial t} \Psi(r, t) = H(r, t) \Psi(r, t) \quad (28)$$

Assim, o hamiltoniano do sistema fica na forma

$$H(r, t) = T(r, t) + \hat{U}(r, t) + V_{ext}(r, t) \quad (29)$$

em que  $T$  representa a energia cinética e  $\hat{U}$ , a repulsão de Coulomb entre os elétrons. Além disso, os elétrons estão sob a influência de um potencial externo dependente do tempo  $V_{ext}$  (Equação 30).

$$V_{ext} = \sum_{i=1}^N v_{ext}(r_i, t) \quad (30)$$

O método TD-DFT é baseado no teorema de Runge e Gross (1984). De acordo com esse teorema, para um dado sistema de elétrons em um determinado estado inicial, existe uma relação entre o  $v_{ext}$  e a densidade eletrônica dependente do tempo  $\rho(r, t)$ . De posse do teorema Runge-Gross (RUNGE; GROSS, 1984) é possível escrever uma equação de Kohn-Sham (KS) dependente do tempo (Equação 31).

$$i \frac{\partial}{\partial t} \varphi_i(r, t) = -\frac{\nabla^2}{2} + v_{KS} \rho(r, t) \varphi_i(r, t) \quad (31)$$

### 3.2.2 Métodos quânticos relativísticos

Um efeito importante, mas, em geral, considerado apenas para elementos das linhas inferiores da tabela periódica, é o efeito relativístico (JENSEN, 2007). Neste trabalho, foram utilizados os métodos relativísticos teóricos como os métodos ZORA (do inglês *zero order relativistic approximation*) e ZORA-SO (ZORA com correção para o acoplamento spin-órbita), implementados no software ADF (Amsterdam Density Functional) (TE VELDE et al., 2001). A equação ZORA é obtida reescrevendo-se a expressão da energia (Equação 32) e expandindo-a no parâmetro  $E/(2mc^2 - V)$  (TE VELDE et al., 2001).

$$E = \frac{p^2 c^2}{2m_0 c^2 - V} + V \quad (32)$$

Utilizando-se somente os termos de ordem zero, obtém-se o hamiltoniano ZORA (Equação 33) (TE VELDE et al., 2001).

$$\begin{aligned} H_{ZORA} &= \boldsymbol{\sigma} \cdot \mathbf{p} \frac{c^2}{2mc^2 - V} \boldsymbol{\sigma} \cdot \mathbf{p} + V \\ &= \sum_i p_i \frac{c^2}{2mc^2 - V} p_i + \frac{mc^2}{(2mc^2 - V)^2} \boldsymbol{\sigma} \cdot \nabla V \times \mathbf{p} + V \end{aligned} \quad (33)$$

Os efeitos de spin-órbita (SO) resultam da interação do momento magnético do elétron com o campo magnético gerado pelo seu próprio movimento na órbita. A inclusão de correções SO pode tornar o cálculo muito

mais acurado, pois os termos escalares relativísticos são invariantes com relação à simetria molecular (TE VELDE et al., 2001).

### 3.2.3 O modelo contínuo polarizável

O modelo contínuo polarizável (PCM, do inglês *polarizable continuum model*) foi utilizado neste trabalho para a descrição do solvente. Esse modelo foi introduzido por Tomasi e colaboradores (TOMASI; PERISCO, 1994; TOMASI; MENNUCCI; CANCES, 1999) e baseia-se numa descrição do solvente como um meio macroscópico contínuo, de propriedades particulares (constante dielétrica, coeficiente de expansão térmica, etc). De acordo com o PCM, a molécula de soluto é introduzida numa cavidade aberta no meio do dielétrico, cujo formato guarda correspondência com a geometria do soluto (TOMASI; PERISCO, 1994; TOMASI; MENNUCCI; CANCES, 1999).

A cavidade em que se encontra o soluto é definida por esferas centradas nos núcleos dos átomos do soluto. As interações soluto-solvente se manifestam através do campo de reação do solvente, graças à presença do dielétrico. Na versão quanto-mecânica do método, somente a molécula do soluto é estudada quanto-mecanicamente e sua interação com o solvente considerada por meio de um potencial de interação  $V_R$ , que atua como uma perturbação do soluto no vácuo (Equação 34)

$$H^o \Psi^o = E^o \Psi^o \quad (34)$$

em solução (Equação 35)

$$[H^o + V_R] \Psi = E \Psi \quad (35)$$

em que  $H^o$  é o hamiltoniano do soluto no vácuo e  $\Psi^o$  e  $\Psi$ , as funções de onda do soluto no vácuo e em solução, respectivamente.

Na Equação 35 pode-se adotar a aproximação de Born-Oppenheimer e proceder-se à separação do hamiltoniano do sistema em uma parte nuclear e outra eletrônica, realizada por meio da correspondente fatoração de  $\Psi$  numa componente eletrônica e outra nuclear. Nesta equação (Equação 35), refere-se à função de onda eletrônica com o hamiltoniano eletrônico dependendo diretamente das coordenadas dos elétrons e parametricamente das coordenadas dos núcleos do soluto (TOMASI; PERISCO, 1994).

O potencial de interação  $\hat{V}_R$  pode ser dividido em duas componentes distintas, uma dependendo explicitamente da função de onda eletrônica do soluto ( $\phi$ ) e outra não.

$$\hat{V}_R = \hat{V}_R'(\phi) + \hat{V}_R'' \quad (36)$$

em que o termo  $\hat{V}_R'(\phi)$  tem a forma  $\hat{V}_R'(\phi) = \hat{A}(\phi\phi^*)$ , sendo  $\hat{A}$  o operador integral conveniente para expressar os efeitos do meio solvente sobre o sistema (TOMASI; PERISCO, 1994).

Voltando à Equação 36, é possível observar que o potencial de interação soluto-solvente foi desmembrado numa parte dependente da função de onda eletrônica do soluto ( $\phi$ ) e numa outra,  $\hat{V}_R''$ , independente desta. A parte não eletrostática dessa última componente ainda pode ser subdividida em duas outras, relativas à origem física das interações (Equação 37) (TOMASI; PERISCO, 1994):

$$V_R'' = \hat{V}_{cavitação} + \underbrace{\hat{V}_{repulsão} + \hat{V}_{dispersão}}_{\hat{V}_{estérico}} \quad (37)$$

### 3.2.4 Teoria quântica de átomos em moléculas

A teoria quântica de átomos em moléculas (QTAIM, do inglês *Quantum Theory of Atoms in Molecules*) visa ao estudo da estrutura eletrônica e de ligações químicas, sendo bastante eficaz na caracterização de ligações intra e/ou intermoleculares (BADER; NGUYEN-DANG, 1981; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010). De acordo com os conceitos mecânico-quântico da QTAIM, as propriedades observáveis de um sistema químico estão contidas em sua densidade eletrônica molecular,  $\rho(r)$ . Em outras palavras, a  $\rho(r)$  é usada como um observável mecânico-quântico para a execução de integrações numéricas, em que o vetor gradiente ( $\nabla\rho$ ) é considerado condição básica para determinar a topologia molecular (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010).

A partir de uma sequência de  $\nabla\rho$  é que são obtidas todas as trajetórias ou linhas de contorno da densidade eletrônica, sendo essas trajetórias definidas por um ponto específico no espaço, conhecido como atrator. As trajetórias do gradiente da densidade eletrônica se moldam para descrever um sistema químico e se originam de um ponto localizado entre dois atratores, denominados pontos críticos de ligação (BCP, do inglês *bond critical point*) (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010). Quando duas trajetórias de  $\nabla\rho$  direcionadas aos núcleos são formadas a partir de um único BCP, elas são chamadas de linhas interatômicas (IL, do inglês *interatomic lines*) (O'BRIEN; POPELIER, 1999; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010) ou trajetórias de ligação (BP, do inglês *bond path*) (POPELIER, 1999; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010). Ou seja, quando um BP interliga dois atratores, significa que esses dois núcleos formam uma ligação química. A localização dos

BCP é feita por meio do laplaciano da densidade eletrônica ( $\nabla^2\rho$ ), o qual é dado pela equação 38.

$$\nabla^2\rho = \frac{\partial^2\rho}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\rho}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\rho}{\partial z^2} = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 \quad (38)$$

em que os três autovalores ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ ) de  $\rho$  têm dois valores negativos ( $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ ) e um positivo ( $\lambda_3$ ). As três derivadas de  $\rho$  mostradas na Equação 38 são obtidas a partir da diagonalização de uma matriz simétrica (3 x 3). Essa diagonalização representa uma rotação das coordenadas do sistema molecular mediante uma sobreposição com os eixos de curvatura (x, y e z) do BCP, e é nesse ponto em que o laplaciano é calculado para ser utilizado como parâmetro na modelagem topológica da ligação química (FRENKING; ESTERHUYSEN; KOVACS, 2006; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010)

O sinal do  $\nabla^2\rho$  tem a propriedade de descrever a concentração de densidade eletrônica em uma determinada zona de ligação e pode trazer informações fundamentais para a compreensão do sistema químico (GRABOWSKI et al., 2006; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010). Por exemplo, se  $\nabla^2\rho < 0$ , tem-se que a densidade eletrônica se acumula nos BCPs das ligações químicas, enquanto, se  $\nabla^2\rho > 0$ , os núcleos atômicos suportam toda a concentração de carga (BADER; NGUYEN-DANG, 1981; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010). A equação 39 relaciona  $\nabla^2\rho$  com os parâmetros topológicos energéticos em um determinado ponto crítico.

$$\frac{1}{4}\nabla^2\rho = 2G + V \quad (39)$$

$$H = G + V \quad (40)$$



em que  $G$  representa a energia cinética;  $V$ , a energia potencial e  $H$ , a densidade de energia total. De acordo com Rozas e colaboradores (ROZAS; ALKORTA; ELGUERO, 2000), as ligações de hidrogênio (LHs) são classificadas com base nos valores de  $\nabla^2\rho$  e  $H$ . Por exemplo, se  $\nabla^2\rho > 0$  e  $H > 0$ , tem-se que as LHs são fracas e médias; para LHs fortes,  $\nabla^2\rho > 0$  e  $H < 0$  e, no caso de LHs muito fortes, têm-se  $\nabla^2\rho < 0$  e  $H < 0$ . Para Koch e Popelier, outros critérios também podem ser levados em consideração para se determinar a existência das LHs, entre eles, os valores de  $\rho$  e  $\nabla^2\rho$  devem estar nos intervalos de 0,002-0,040 au e 0,024-0,139 au, respectivamente (KOCH; POPELIER, 1995).

Por meio da densidade eletrônica  $\rho$  e do Laplaciano  $\nabla^2\rho$  obtidos pelo QTAIM, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar fenômenos químicos, proporcionando, assim, uma descrição quântica sobre a localização e o comportamento dos átomos em uma ligação química (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2010).

### **3.2.5 Método híbrido: mecânica quântica e mecânica molecular**

O método híbrido mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM) tem se destacado para tratar reações em sistemas biomoleculares, como, por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, etc. Os métodos de mecânica quântica (QM) são utilizados para descrever as reações químicas e outros processos eletrônicos, como transferência de carga ou excitações eletrônicas. Porém, os métodos QM são restritos para tratar sistemas com até algumas centenas de átomos. No entanto, a dimensão e a complexidade conformacional de algumas biomoléculas exigem a utilização de métodos que podem descrever um grande número de átomos e, além disso, permitir simulações em escalas de tempo de dezenas de nanossegundos e é nesse contexto que entram os métodos

de mecânica molecular (MM) baseados em campos de força (SENN; THIEL, 2009).

Com isso, para modelar grandes sistemas moleculares, uma opção é combinar as duas técnicas e usar um método QM para a região quimicamente ativa (por exemplo, substratos e cofatores em uma reação enzimática) e um tratamento MM para o ambiente (por exemplo, proteína e solvente). Os estudos envolvendo o método híbrido QM/MM proporcionam uma boa precisão do sistema a um esforço computacional razoável (SENN; THIEL, 2009).

Uma ilustração geral da divisão do sistema em partes QM e MM é mostrada na Figura 8. Todo o sistema (S) é particionado pela região interna (I), que é tratado por mecânica quântica (QM) e a região exterior (Q), que é descrita por um campo de força (parte MM).

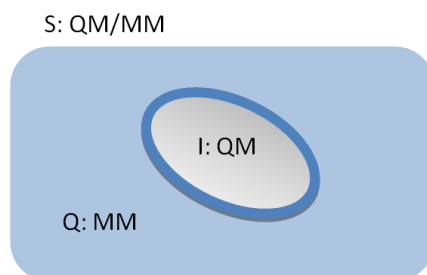


Figura 8 Particionamento do sistema total (S) em dois subsistemas: interior (I) e exterior (Q). O anel escuro representa a região de fronteira (entre as regiões QM e MM) (SENN; THIEL, 2009)

O formalismo QM/MM pode acomodar qualquer combinação dos métodos QM e MM. A escolha do método QM segue os mesmos critérios nos estudos puros de QM (ver seções 3.2). Essencialmente, o método QM deve ser capaz de realizar um tratamento do campo autoconsistente (SCF), na presença de um campo externo que representa o modelo de carga MM (*point-charge*) (SENN; THIEL, 2009). Atualmente, as aplicações QM/MM em sistemas

biomoleculares usam o DFT (ver seção 3.2.1) como método QM, devido à sua precisão nos resultados e um razoável esforço computacional, quando comparado aos outros métodos *ab initio* (MATOS, et al., 2011; CUNHA; MANCINI; RAMALHO, 2012).

O ChemShell é um exemplo de programa que tem sido bastante utilizado em aplicações QM/MM para sistemas biomoleculares (SENN; THIEL, 2009). A maioria dos cálculos de QM/MM atualmente utilizados é representada pela Equação 41.

$$E_{QM/MM}(S) = E_{MM}(Q) + E_{QM}(I) + E_{QM-MM}(I, Q) \quad (41)$$

em que  $E_{MM}(Q)$  representa a energia do subsistema MM;  $E_{QM}(I)$ , a energia do subsistema QM e o termo  $E_{QM-MM}(I, Q)$ , coleta as energias de interação entre os dois subsistemas, incluindo ligações, interações de van der Waals e eletrostáticas para os átomos que estão entre as regiões QM e MM. O termo  $E_{QM-MM}(I, Q)$  é representado pela Equação 42.

$$E_{QM-MM}(I, Q) = E_{QM-MM}^b + E_{QM-MM}^{vdW} + E_{QM-MM}^{el} \quad (42)$$

#### 4 OBJETIVOS

A partir do exposto, este trabalho foi realizado com os objetivos de: 1) investigar a transferência de prótons no estado excitado do composto 2-(2'-hidroxi-4'-aminofenil)benzotiazol (HABT) no sítio ativo da enzima tirosina quinase e seus efeitos na fluorescência e 2) prever o deslocamento químico do núcleo  $^{99}\text{Tc}$  para o composto 2-(4'-aminofenil)benzothiazol complexado com  $^{99}\text{Tc}$  e investigar suas modificações estruturais em diferentes ambientes.

Baseado nesse contexto, parâmetros espectroscópicos de fluorescência e de RMN para os compostos fenilbenzotiazóis citados anteriormente foram calculados e serão abordados nos artigos 1 e 2, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

AALTEN, D. M. F. et al. PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, Dordrecht, v. 10, n. 3, p. 255-262, June 1996.

ABRAM, U.; ALBERTO, R. Technetium and rhenium: coordination chemistry and nuclear medical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 1486-1500, nov./dez. 2006.

AGRAWAL, A. et al. Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, London, v. 12, p. S135–S144, July, 2005.

ANGELO, N. D. D. et al. Discovery and Optimization of a Series of Benzothiazole Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Dual Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1789-1811, Mar. 2011.

ARAÚJO, E. B. A utilização do elemento Tecnécio-99m no diagnóstico de patologias e disfunções dos seres vivos. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola**, Rio de Janeiro, n. 6, p. 31-35, 2005.

AVILA, C. M.; ROMEIRO, N. C. Proteínas tirosinas quinases: desafios do desenvolvimento de fármacos para a terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, Florianópolis, v. 2, n. 1, p. 59-82, jan./mar. 2010.

BADER, R. F. W. A bond path: a universal indicator of bonded interactions. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 102, n. 37, p. 7314-7323, Aug. 1998.

BADER, R. F. W.; NGUYEN-DANG, T. T.; TAL, Y. A topological theory of molecular structure. **Reports on Progress in Physics**, Bristol, v. 44, n. 8, p. 893-948, 1981.

BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, Orlando, v. 31, n. 4, p. 260-277, Oct. 2001.

BARBATTI, M. et al. Ultrafast internal conversion pathway and mechanism in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole: a case study for excited-state intramolecular proton transfer systems. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 11, n. 9, p. 406-415, Mar. 2009.

BARONE, V.; COSSI, M.; TOMASI, J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 19, n. 4, p. 404-417, 1998.

BECKE A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, New York, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, Sept. 1988.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry: 3. the role of exact exchange. **Journal of Chemical Physical**, Ithaca, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, Apr. 1993.

BERMÚDEZ, J. I. et al. Determination of technetium by total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta: part B: atomic spectroscopy**, Oxford, v. 56, p. 2247-2251, Nov. 2001.

BHUVA, H. A.; KINI, S. G. Synthesis, anticancer activity and docking of some substituted benzothiazoles as tyrosine kinase inhibitors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, New York, v. 29, n. 1, p.32-37, Aug. 2010.

BISCARDI, J. S. et al. Tyrosine kinase signalling in breast cancer Epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast Câncer. **Breast Cancer Research and Treatment**, The Hague, v. 2, n. 3, p. 203-210, 2000.

BRADSHAW, T. D.; STEVENS, M. F. G.; WESTWELL, A. D. The discovery of the potent and selective antitumour agent 2-(4-Amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203) and related compounds. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 8, n. 2, p. 203-210, Feb. 2001.

BRADSHAW, T. D.; WESTWELL, A. D. The Development of the Antitumour Benzothiazole Prodrug, Phortress, as a Clinical Candidate. **Current Medicinal Chemistry**. v.11, p. 1241-1253, 2004.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, Schiphol, v. 4, n. 2, p. 187-217, 1983.

BÜHL, M.; GOLUBNYCHIY, V. Density-functional computation of <sup>99</sup>Tc NMR chemical shifts. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 46, n. 1, p. S36-S44, 2008.

BURGER, M. T. et. al. Synthesis and in Vitro and in Vivo Evaluation of Phosphoinositide-3-kinase Inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 2, n. 1, p. 34-38, Oct. 2011.

BURKE, K.; GROSS, E. K. U. A guided tour of time-dependent density functional theory. In: JOUBERT, D. (Ed.). **Density functional: theory and applications**. Berlin: Springer, 1998. p. 116-46.

BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. **Molecular mechanics**. Washington: ACS, 1982. (ACS Monograph, 177).

CAETANO, M. S. **Avaliação teórica do processo de inativação do herbicida glifosato e formação do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP)** 2011. 133 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAETANO, M. S. **Estudos computacionais entre análogos do glifosato e a enzimas EPSP sintase nativa e mutante Gly96Ala**. 2007. 53 p. Monografia (Graduação em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CALLAHAN, R. J. et. al. Society of nuclear medicine procedure guideline for the use of radiopharmaceuticals: version 3.0. **Society of Nuclear Medicine Procedure Guidelines Manual**, Saint Louis, p. 81-84, June 2001.

CANCES, T. M.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. **Journal of Chemical Physics**, Ithaca, v. 107, p. 3032-3041, 1997.

CHANDRASOMA, P.; TAYLOR, C. R. **Patologia básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall, 1993.

CHAVES, I. G. et al. **Mastologia**: aspectos multidisciplinares. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1999.

CHUA, M. S. et al. Antitumor benzothiazoles. 7. Synthesis of 2-(4-acylamino-phenyl)benzothiazoles and investigations into the role of acetylation in the antitumor activities of the parent amines. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 42, n. 3, p. 381-392, Feb. 1999.

CORRÊA, B. A. M. **Modelagem molecular, docking e estudos teóricos do espectro eletrônico de absorção de derivados da benzofenona**. 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.



COSSI, M.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. Ab initio study of ionic solutions by a polarizable continuum dielectric model. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 286, n. 3-4, p. 253-260, Apr. 1998.

COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; BARONE V. New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution. **Journal of Chemical Physics**, Ithaca, v. 117, n. 1, p. 43-54, 2002.

CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Density functional theory for transition metals and transition metal chemistry. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 11, p. 10757-10816, 2009.

CUNHA, E. F. F. da; MANCINI, D. T.; RAMALHO, T. C. Molecular modeling of the *Toxoplasma gondii* adenosine kinase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, New York, v. 21, n. 5, p. 590-600, May 2012.

DUARTE, H. A.; ROCHA, W. R. Teoria do funcional de densidade. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p. 73-111.

DUNN, B. Cancer: solving an age-old problem. **Nature**, London, v. 483, p. S2-S6, Mar. 2012.

EARLY, J. P.; LANDA, E. R. Use of therapeutic radionuclides in medicine. **Health Physics**, Hagerstown, v. 69, n. 5, p. 677-694, Nov. 1995.

FACELLI, J. C. Chemical shift tensors: theory and application to molecular structural problems. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Elmsford, v. 58, n. 3-4, p. 176-201, May 2011.

FARIAS, R. E.; SOUZA, A. R.; AARESTRUP, F. M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductalinfiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 209-218, jun. 2005.

FERMI, E. Eine statistische begründung zur bestimmung einiger eigenschaften des atoms und ihre anwendungen auf die theorie des periodischen systems der elemente. **Zeitschrift fur Physik**, Berlin, v. 48, p. 73-79, 1928.

FERREIRA, D. E. C. **Estudo teórico de modelos biomiméticos para a hidrólise de ésteres fosfóricos**. 2011. 154 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 58, n. 5, p. S133-S138, May 2008.

FRANÇA, T. C. C. **Modelagem molecular da serina hidroximetil transferase de *Plasmodium Falciparum*: modelos tridimensionais e proposta de potenciais inibidores seletivos**. 2004. 232 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.

FRANKLIN, J. K. et al. Chemical applications of technetium-99 NMR spectroscopy: preparation of novel technetium(VII) species and their characterization by multinuclear NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 104, n. 20, p. 5303-5306, Oct. 1982.

FREITAS, M. P.; RAMALHO, T. C. **Princípios de estrutura eletrônica e orbitais em química orgânica**. Lavras: UFLA, 2013.

FREITAS-JUNIOR, R. et al. Incidence trend for breast câncer among young women in Goiânia, Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 128, n. 2, p. 81-84, 2010.

FRENKING, G.; ESTERHUYSEN, C.; KOVÁCS, A. Reply to 'comment on the comparative use of the electron density and its laplacian'. **Chemistry a European Journal**, Washington, v. 22, n. 10, p. 7773-7774, Oct 2006.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 03**: revision C.02. Wallingford: Gaussian, 2004.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 98**: revision A.11. Pittsburg: Gaussian, 2001.

FRY, M. J. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? **Breast Cancer Research and Treatment**, The Hague, v. 3, p. 304-312, June 2001.

FUKUI, K. The path of chemical reactions: the IRC approach. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 14, n. 12, p. 363-364, Dec. 1981.

GALVÃO, E. R. C. G. N. et al. Breast cancer proteomics: a review for clinicians. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 137, p. 915-925, 2011.

GIL, V. M. S; GERALDES, C. F. G. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkiana, 1991.

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforadotabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009. 207 p. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GORSHKOV, N. I. et al.  $^{99}\text{Tc}$  NMR study of complexation of  $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  with halide and thiocyanate ions in aqueous solutions. **Czechoslovak Journal of Physics**, Prague, v. 53, n. 1, p. S745-S749, 2003.

GRABOWSKI, S. J. et al. Quantitative classification of covalent and noncovalent H-bonds. **Journal of Physical Chemistry B**, Ithaca, v. 110, n. 13, p. 6444-6446, Mar. 2006.

GRANDO, S. R. **Efeitos da matriz no mecanismo de fluorescência em sílicas contendo corantes orgânicos do tipo benzazolas**. 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GUEDES, A. M. **Espectrometria Raman, UV, DOS e circular dicroísmo de alcalóides do cigarro**. 2011. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Física) - Universidade Federal do Pará, Belém.

GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 227-234, jul. 2005.

GUIMARÃES, A. P. **Estudos por ancoramento e dinâmica molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo hidrolase de bacillus anthracis**. 2010. 170 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GUNDLER, P. V. et al. Relevance of the ligand exchange rate and mechanism of fac-[(CO)<sup>3</sup>M(H<sub>2</sub>O)<sup>3</sup>]<sup>+</sup> (M = Mn, Tc, Re) complexes for new radiopharmaceuticals. **Inorganic Chemistry**, Easton, v. 45, n. 25, p. 10378-10390, Dec. 2006.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentals of physics**. 4. ed. Nova York: John Wiley, 1993.

HELGAKER, T.; JSZUNSKI, M.; RUUD, K. Ab initio methods for the calculation of NMR shielding and indirect spin-spin spin coupling constants. **Chemical Reviews**, Washington, v. 99, n. 1, p. 293-352, 1999.

HELGAKEER, T.; PECUL, M. Spin–Spin coupling constants with HF and DFT methods. In: KAUPP, M.; BÜHL, M.; MALKIN, V. G. (Ed.). **Calculation of NMR and ESR parameters: theory and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. Cap. 7, p. 101-121.

HICKS, J. W. et al. Radiolabeled small molecule protein kinase inhibitors for Imaging with PET or SPECT. **Molecules**, Washington, v. 15, n. 11, p. 8260-8278, 2010.

HIGGINS, D.; TAYLOR, W. **Bioinformatics sequence, structure and databanks**. Oxford: Oxford University, 2001.

HINOHARA, K. et. al. ErbB receptor tyrosine kinase/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, New Haven, v. 109, n. 17, p. 6584-6589, Apr. 2012.

HIRSCH, E.; COSTA, C.; CIRAOLO, E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone Signaling. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 194, n. 2, p. 243-256, Aug. 2007.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, New York, v. 136, n. 3B, p. 864-871, Nov. 1964.

HÖLTJE, H. D. et al. **Molecular modeling: basic principles and applications**. Darmstadt: Wiley-VCH, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas da mortalidade por câncer**. Brasília: INCA, 2013. Disponível em:  
<<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>>. Acesso em: 01 jul. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. Ministério da Saúde. Brasil. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: CEDC, 2012.

ISMAEL, G. F. V.; SEGALLA, J. G. M.; ROSA, D. D. O desenvolvimento de drogas com alvo molecular e o seu impacto no tratamento do câncer. **Prática Hospitalar**, São Paulo, v. 9; n. 54, 2007.

IWATA, Y. et al. Conformational analysis and docking study of potent factor XIII a inhibitors having a cyclopropenone ring. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, New York, v. 18, n. 6, p. 591-599, Dec. 2000.

IYENGAR, S. S. et al. Ab initio molecular dynamics: Propagating the density matrix with Gaussian orbitals. II. Generalizations based on mass-weighting, idempotency, energy conservation and choice of initial conditions. **Journal of Chemical Physics, Ithaca**, v. 115, p. 10291-10302, 2001.

IYENGAR, S. S.; SCHLEGEL, H. B.; VOTH, G. A. Atom-centered density matrix propagation (ADMP): generalizations using bohmian mechanics. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 107, n. 37, p. 7269-7277, Aug. 2003.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA: cancer journal for clinicians**, New York, v. 60, n. 5, p. 277-300, Sept./Oct. 2010.

JENSEN, F. **Introduction to computational chemistry**. 2. ed. New York: John Wiley, 2007.

JENSEN, F. **Introduction to computational chemistry**. New York: John Wiley, 1999.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 118, p. 11225-11236, 1996.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 110, p. 1657-1666, 1988.

KARPLUS, M.; LEVITT, M.; WARSHEL, A. Nobel da química de 2013 para modelização por computador de reacções químicas. **Público Comunicação Social**, Portugal, out. 2013. Disponível em: <<http://www.publico.pt/ciencia/noticia/nobel-da-quimica-de-2013-para-modelizacao-de-processos-quimicos-por-computador-1608524>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

KARPLUS, M.; PETSKO, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, London, v. 347, n. 6294, p. 631-639, Oct. 1990.

KAUPP, M.; BÜHL, M.; MALKIN, V. G. (Ed.). **Calculation of NMR and ESR parameters: theory and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004.

KIM, O. et al. Design and synthesis of imidazopyridine analogues as inhibitors of phosphoinositide 3-Kinase signaling and angiogenesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 54, n. 7, p. 2455-2466, Mar. 2011.

KIRKPATRICK, S.; GELATT, C. D.; VECCI, M. P. Optimization by simulated annealing. **Science**, Amsterdam, v. 220, n. 4598, p. 671-680, May 1983.

KOCH, U.; POPELIER, P. L. A. Characterization of C-H-O hydrogen bonds on the basis of the charge density. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 99, n. 24, p. 9747-9754, June 1995.

KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C. **A Chemist's guide to density functional theory**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 353, p. 172-187, July 2005.

KUMAR, V. et al. **Patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUNGWAN, N. et al. The effect of hydrogen bonding on the excited-state proton transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole: a TDDFT molecular dynamics study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 14, n. 25, p. 9016-9025, July 2012.

KUPLICH, M. D. **Síntese de novos heterociclos benzazólicos e sua incorporação em matrizes de celulose**. 2007. 124 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KUTZELNIGG, W.; FLUSCHER, U.; SCHINDLER, M. **The IGLO-method ab initio calculation and interpretation of nmr chemical shift and magnetic susceptibilities**: volume 23. Heidelberg: Springer, 1999.

KYPRIANIDOU, P. et al. First example of well-characterized Re and <sup>99m</sup>Tc tricarbonyl complexes of ciprofloxacin and norfloxacin in the development of infection-specific imaging agents. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 370, n. 1, p. 236-242, May 2011.

LACERDA JÚNIOR, V. Reatividade em reações de diels-alder: uma prática computacional. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 727-730, jun. 2007.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Berlin: Springer, 2006.

LAMB, W. E. Internal diamagnetic fields. **Physical Review**, New York, v. 60, n. 11, p. 817-819, 1941.



LEAL, R. C.; MOITA NETO, J. M. A química quântica na compreensão de teorias de química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1211-1215, 2010.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Physical Review B**, New York, v. 37, n. 2, p. 785-789, Jan. 1988.

LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Washington, v. 60, n. 12, p. 1347-1370, Sept. 2008.

LIU, S. Ether and crown ether-containing cationic  $^{99m}\text{Tc}$  complexes useful as radiopharmaceuticals for heart imaging. **Dalton Transactions: an international journal of inorganic chemistry**, Cambridge, v. 28, n. 12, p. 1183-1193, Mar. 2007.

LIU, S.; EDWARDS, D. S.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **Chemical Reviews**, Washington, v. 99, n. 9, p. 2235-2268, Sept. 1999.

MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, Ithaca, v. 102, n. 18, p. 3586-3616, Apr. 1998.

MALUF, M. F. M.; MORI, L. J.; BARROS, A. C. S. D. O impacto psicológico do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 149-154, 2005.

MALZYNER, A.; CAPONERO, R.; DONATO, E. M. O. D. Ametamorfose de uma angústia: o tratamento do câncer da mama de Halsted ao BRCA-1. In: GIMENES, M. G. G.; FÁVERO, M. H. (Org.). **A mulher e o câncer**. Campinas: Livro Pleno, 2000. p. 71-107.

MANCINI, D. T. et al. Molecular modeling studies on nucleoside hydrolase from the biological warfare agent *Brucella suis*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, New York, v. 30, n. 1, p. 125-136, 2012.

MARONE, R. et al. Targeting phosphoinositide 3-kinase-Moving towards therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1784, n. 1, p. 159-185, Jan. 2008.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.

MARTÍN, N.; LI, Y. A new class of minimum power divergence estimators with applications to cancer surveillance. **Journal of Multivariate Analysis**, New York, v. 102, p.1175-1193, 2011.

MATOS, J. C.; PELLOSO, S. M.; CARVALHO, M. D. B. Fatores associados à realização da prevenção secundária do câncer de mama no Município de Maringá, Paraná, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 5, p. 888-898, maio 2011.

MATOS, K. S. et al. Molecular aspects of the reactivation process of acetylcholinesterase inhibited by cyclosarin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 10, p. 1999-2004, 2011.

MILLER, T. W.; BALKO, J. M.; ARTEAGA, C. L. Phosphatidylinositol 3-Kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 29, n. 33, p. 4452-4461, Nov. 2011.

MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 243, n. 2, p. 310-326, Oct. 1994.

MOURA, L. et al. Evaluation of the population based cancer registry of the municipality of Goiânia, Goiás state, Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.15, n. 4, p. 7-17, Dec. 2006.

MURPHY, C. A.; FERRO-FLORES, G. **Compuestos de tecnecio**. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 2003.

NAM, K. Acceleration of semiempirical quantum mechanical calculations by extended lagrangian molecular dynamics approach. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Umeå, v. 9, n. 8, p. 3393-3403, June 2013.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, Marília, v. 33, p. 13-24, 2008.

O'BRIEN, S. E.; POPELIER, P. L. A. Quantum molecular similarity. part 2: the relation between properties in BCP space and bond length. **Canadian Journal of Chemistry Revue Canadienne de Chimie**, Ottawa, v. 77, n. 1, p. 28-36, 1999.

OLIVEIRA, A. A. **Estudos de correlações quantitativas estrutura**: atividade de inibidores da aromatase. 2009. 40 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, B. G. et al. Small heterocyclics as hydrogen bond acceptors and donors: the case of the  $C_2H_3XS \cdots NH_3$  complexes (X = H, F and CH<sub>3</sub>). **Structural Chemistry**, Deerfield Beach, v. 20, n. 4, p. 663-670, 2009.

OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U. A topologia molecular qtaim e a descrição mecânico-quântica de ligações de hidrogênio e ligações de di-hidrogênio. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1155-1162, 2010.

OLIVEIRA, R. et al. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 151-165, abr./jun. 2006.

PERDEW, J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, New York, v. 33, n. 12, p. 8822-8824, 1986.

PERDEW, J. P.; WANG Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. **Physical Review B**, New York, v. 45, n. 23, p. 13244-13249, June 1992.

PEREIRA, M. C. et al. Nanostructured  $\delta$ -FeOOH: a novel photocatalyst for water splitting. **Journal of Materials Chemistry**, Cambridge, v. 21, p. 10280-10282, June 2011.

PHATAK, P.; SUMNER, I.; IYENGAR, S. S. Gauging the flexibility of the active site in soybean lipoxygenase-1 (SLO-1) through an atom-centered density matrix propagation (ADMP) treatment that facilitates the sampling of rare events. **The Journal Physical Chemistry B**, Ithaca, v. 116, p. 10145-10164, Aug. 2012.

POPELIER, P. L. A. Quantum molecular similarity. 1. BCP space. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 103, n. 15, p. 2883-2890, Mar. 1999.

RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, New York, v. 27, n. 2, p. 195-208, Oct. 2009.

RAMALHO, T. C.; BÜHL, M. Probing NMR parameters, structure and dynamics of 5-nitroimidazole derivatives. Density functional study of prototypical radiosensitizers. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 43, n. 2, p. 139-146, Feb. 2005.

RAMALHO, T. C.; PEREIRA, D. H.; THIEL, W. Thermal and solvent effects on NMR indirect spin-spin coupling constants of a prototypical Chagas disease drug. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 115, n. 46, p. 13504-13512, Nov. 2011.

RAMOS, B. F.; LUSTOSA, M. A. Câncer de mama feminino e psicologia. **Revista da Sociedade Brasileira de Psicologia Hospitalar**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 85-97, jun. 2009.

RAMSEY, N. F. Magnetic shielding of nuclei in molecules. **Physical Review**, New York, v. 78, n. 6, p. 699-703, June 1950.

REGA, N.; IYENGAR, S. S.; VOTH, G. A. Hybrid ab-initio/empirical molecular dynamics: combining the ONIOM scheme with the atom-centered density matrix propagation (ADMP) approach. **The Journal of Physical Chemistry B**, Ithaca, v. 108, p. 4210-4220, 2004.

ROCHA, M. V. J. **Propriedades estruturais e térmicas do híbrido orgânico/inorgânico pmma-óxido de ferro: um estudo teórico e experimental**. 2013. 104 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROZAS, I.; ALKORTA, I.; ELGUERO, J. Behavior of ylides containing N, O, and C atoms as hydrogen bond acceptors. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 122, n. 45, p. 11154-11161, Nov. 2000.

RUNGE, E.; GROSS, E. K. U. Density-functional theory for time-dependent systems. **Physical Review Letters**, New York, v. 52, n. 12, p. 997-1000, 1984.

SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 4. ed. EUA: Springer, 1998.

SAIKA, A.; SLICHTER, C. P. A note on the fluorine resonance shifts. **Journal of Chemical Physics**, Ithaca, v. 22, p. 26-28, 1954.

SALZMANN, S. et al. Influence of the LOV domain on low-lying excited states of flavin: a combined quantum-mechanics/molecular-mechanics investigation. **The Journal of Physical Chemistry B**, Ithaca, v. 113, n. 47, p. 15610–15618, Nov. 2009.

SANDERS, J. K. M.; HUNTER, B. K. M. **NMR spectroscopy: a guide for chemists**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1993.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, Florianópolis, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. História da radiofarmácia e as implicações da Emenda Constitucional N. 49. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 377-382, jul./set. 2008.

SCHLEGEL, H. B. et al. Ab initio molecular dynamics: Propagating the density matrix with Gaussian orbitals. III. comparison with born–oppenheimer dynamics. **Journal of Chemical Physics**, Ithaca, v. 117, p. 8694-8704, 2002.

SCLOWITZ, M. L. et al. Condutas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 340-349, 2005.

SENN, H. M.; THIEL, W. QM/MM methods for biomolecular systems. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 48, n. 7, p. 1198-1229, 2009.

SHAHZAD, A. et al. Emerging applications of fluorescence spectroscopy in medical microbiology field. **Journal of Translational Medicine**, New York, v. 7, n. 99, p. 1-6, Nov. 2009.

SHAHZAD, A.; EDETSBERGER, M.; KOEHLER, G. Fluorescence spectroscopy: an emerging excellent diagnostic tool in medical sciences. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 45, n. 1, p. 1-11, 2010.

SHI, D. F. et al. Antitumor benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles and evaluation of their activities against breast cancer cell lines in vitro and in vivo. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 39, n. 17, p. 3375-3384, Aug. 1996.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

SILVA, L. C. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 13, n. 2, p. 231-237, 2008.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em *Eucalyptus*. **Addubare**, Piracicaba, v. 2, n. 9, p. 4-7, out./dez. 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5. ed. Nova York: John Wiley, 1991.

SPOEL, D. V. D. et al. **GROMACS user manual version 3.0**. Groningen: University of Groningen, 2001. Disponível em: <<http://www.gromacs.org>>. Acesso em: 11 jul. 2013.

STAMOS, J.; SLIWKOWSKI, M. X.; EIGENBROT, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 277, n. 48, p. 46265-46272, Nov. 2002.

STEIN, R. C. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. **Endocrine-Related Cancer**, London, v. 8, n. 3, p. 237-248, Sept. 2001.

TE VELDE, G. et al. Chemistry with ADF. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 22, n. 9, p. 931-967, July 2001.

THOMAS, L. H. Wave mechanical treatment of the Fermi Gas. **Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 23, p. 542-544, 1927.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. *MolDock*: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, June 2006.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B. E.; CANCES, E. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 464, n. 1-3, p. 211-226, May 1999.

TOMASI, J.; PERISCO, M. Molecular-interactions insolution: an overview of methods based on continuous distributions of the solvent. **Chemical Reviews**, Washington, v. 94, n. 7, p. 2027-2094, Nov. 1994.

TUCKERMAN, M. E.; MARTYNA, G. J. Understanding modern molecular dynamics: techniques and applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, Ithaca, v. 104, n. 2, p. 159-178, Dec. 2000.

TZANOPOULOU, S. et al. Evaluation of Re and <sup>99m</sup>Tc complexes of 2-(4'-Aminophenyl) benzothiazole as potential breast cancer radiopharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 53, n. 12, p. 4633-4641, June 2010.



TZANOPOULOU, S. et al. Synthesis, characterization, and biological evaluation of  $M(I)(CO)_3(NNO)$  Complexes ( $M = Re, {}^{99m}Tc$ ) conjugated to 2- (4-Aminophenyl) benzothiazole as potential breast cancer radiopharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 18, p. 5408-5410, Sept. 2006.

VAN GUNSTEREN, W. F. et al. **Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide**. Zurich: VDF Hochschulverlang, 1996.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. **Groningen molecular simulation (GROMOS): library manual**, biosmos. Netherlands: Groningen, 1987. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp984217f>>. Acesso em: 10 set. 2013.

VERSLUIS, L.; ZIEGLER, T. The determination of molecular structures by density functional theory. The evaluation of analytical energy gradients by numerical integration. **Journal of Chemical Physics**, Ithaca, v. 88, p. 322-328, 1988.

WEI, L. et al. Laser-induced fluorescence: progress and prospective for *in vivo* cancer diagnosis. **Chinese Science Bulletin**. v. 58, n. 17, p. 2003-2016, June 2013.

WEINER, S. J. et al. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **Journal of Computational Chemistry**, Schiphol, v. 7, n. 2, p. 230-252, Apr. 1986.

WEINER, S. J. et al. New force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 106, n. 3, p. 765-784, Feb. 1984.

WIBERG, K. B. A Scheme for Strain energy minimization: application to the cycloalkanes. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 87, n. 5, p. 1070-1078, Mar. 1965.

ZHANG, H. et al. Disulfiram treatment facilitates phosphoinositide 3-kinase inhibition in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, Baltimore, v. 70, n. 10, p. 3996-4004, May 2010.

ZHAO, J. et al. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 14, n. 25, p. 8803-8817, July 2012.

ZILM, K. W.; DUCHAMP, J. C. Comparisons of shielding anisotropies for different nuclei and other insights into shielding from an experimentalist's viewpoint. In: TOSSEL, J. A. (Ed.). **Nuclear magnetic shieldings and molecular structure**: volume 386. Kluwer: Dordrecht, 1993. p. 315-386.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS****ARTIGO 1****SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF A PROTOTYPICAL BREAST  
CANCER DRUG: EXPLORING DUAL FLUORESCENCE IN  
PHENYLBENZOTHAZOLE DERIVATIVES FOR IMAGING  
MARKERS**

Artigo redigido conforme normas da Revista Journal of the American Chemical  
Society (JACS)

Daiana T. Mancini, Kakali Sen, Mario Barbatti, Walter Thiel, Teodorico C.  
Ramalho

**ABSTRACT**

The phenylbenzothiazole (PBT) compounds show antitumor properties and are highly selective. In this work, we have explored the combined quantum-mechanical/molecular-mechanical (QM/MM) approach to perform calculations in the ground and excited states of the four different QM regions (QM-1 to QM-4). All QM/MM ground-state geometry optimizations were carried out using the density functional theory DFT/B3LYP/TZVP and for excited-states, optimizations were performed using (time dependent) density functional theory TD-DFT/B3LYP/TZVP. The protein environment (Tyrosine Kinase) was represented by the CHARMM force field. The results highlight that there can occur two fluorescence bands in the Tyrosine Kinase active site, corresponding to the enol and keto forms of the 2-(2'-hydroxy-4'-aminophenyl)benzothiazole (HABT). This fact opens opportunity to possible application of this compound as a fluorescent probe in breast cancer diagnostics.

## 1 INTRODUCTION

In spite of much progress in prevention, diagnosis and treatment, cancer is still one of the most serious problems facing humanity, causing many deaths and having a great and limiting influence on the quality and development of life in many countries.<sup>1</sup> The breast cancer is one of the major health problems among women, representing the first cause of death in women between 40–59 years old.<sup>2</sup>

The phenylbenzothiazoles (PBT) compounds are highly selective and possess potent antitumor properties *in vitro* and *in vivo*.<sup>3,4</sup> From the medical standpoint, the original leading compound in this series, 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole (ABT; see Fig. 1), exhibits nanomolar *in vitro* activity against certain human-breast cancer cell lines with a characteristic biphasic dose-response relationship.<sup>4,5,6</sup> Its chemical activity is connected to docking properties<sup>7</sup> of this molecule to the protein Tyrosine Kinase (TK). This enzyme occupies a central position in cellular proliferation control.<sup>8,9</sup>

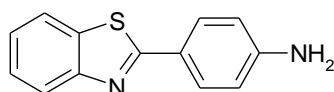


Figure 1 Structure of the 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole compound

From the physical-chemical standpoint, another member of the PBT class, the 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole (HBT; Fig. 2), is well known by its strong Stoke Shift (about 150 nm) caused by ultrafast intramolecular proton transfer in the excited-state (ESIPT).<sup>10-12</sup> Molecules exhibiting ESIPT have been intensively studied for presenting an important role in chemistry and biochemistry.<sup>10,11</sup> For HBT in gas phase and in solution, this process occurs as indicated in Figure 2. After photoexcitation, the singlet excited state ( $S_1$ ) of the

enol form is populated, then an ultrafast ESIPT process occurs and the keto form at the  $S_1$  is produced, which is stabilized by the intramolecular hydrogen bond.<sup>12</sup> Besides the radiative decay, two deactivation processes can occur: the intersystem crossing (ISC), leading to the formation of the keto tautomer triplet excited state ( $T_1$ ) and the isomerization to the trans-keto form. Since the ESIPT is much faster (30-50 fs) than the radiative decay, the fluorescence observed is often due to the keto tautomer (Fig. 2A).<sup>12</sup> However, depending on the environment, the ESIPT emission can be partially or completely inhibited, thus increasing the fluorescence quantum yield of the enol species (Fig. 2B), this opens the possibility of creating two-color fluorescent markers.

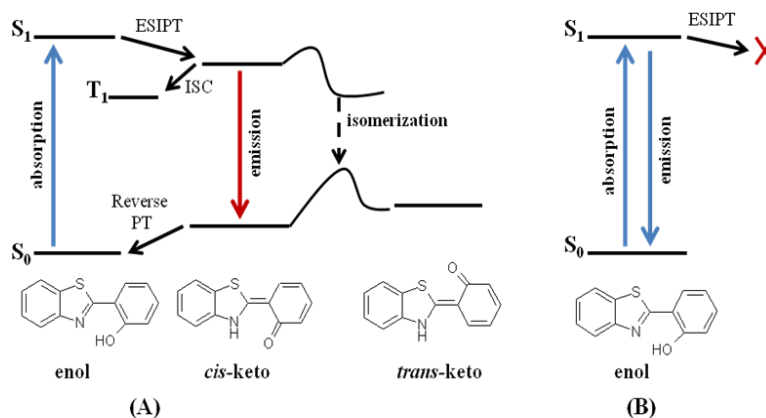


Figure 2 Excited-state proton transfer and two-color fluorescent scheme for HBT

Over the past decade, a series of methodologies for excited state calculations have been made available for investigating the ESIPT process.<sup>13,14</sup> All of them are restricted either by computational or conceptual issues.<sup>13,14</sup> The application of accurate *ab initio* methods, such as MS-CASPT2 or CC3, is still limited in practice to rather small molecules, being of limited interest for the kind of molecules that we will investigate. On the other hand, time-dependent density functional theory TD-DFT, multi-reference semiempirical and multi-

reference DFT methods have grown in importance to provide ways to treat excitations of relatively large molecules under controlled computational costs.<sup>15-18</sup>

Based on this context, our goal is to evaluate the electronic-structure properties of 2-(2'-hydroxy-4'-aminophenyl)benzothiazole (HABT)-Tyrosine Kinase complex. Furthermore, in order to reach a possible application to breast cancer diagnostics, the role of the chemical environment on the excited-state proton transfer of HABT within the TK enzyme and its impact on the fluorescence parameters were evaluated.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1. System Preparation and MD Simulation

For the classical dynamics calculation, we used the crystal structure of the 1M17 protein with a resolution of 2.6 Å (PDB code: 1M17).<sup>19</sup> The construction of (HABT-enzyme) complex was performed by the overlap of HABT with the 4-anilinoquinazoline compound complexed in the 1M17 crystal active site using the MOLDEN software.<sup>20</sup> In this procedure, the HABT coordinates are copied to the .pdb file of the crystal structure.

The resulting system consisting of protein, HABT and crystallographic water molecules was solvated with TIP3P water molecules (in cubic boxes containing around 30.426 water molecules and two Cl<sup>-</sup> ions). The propKa module of the PDB2PQR suite of programs<sup>21-23</sup> was used to adjust the protonation states of ionizable residues. In addition, the protonation states of His residues as well as the orientation of site chains for the residues Asp and Cys were checked. Preparatory minimization and molecular dynamics simulations were performed with the NAMD 2.6 program.<sup>24</sup>

The minimized system was then submitted to MD simulations in two steps. Initially, in order to ensure a balance of the solvent molecules around the residues of the protein at the NVT state, 1ns of MD at 300K and physiologic pH was carried out considering the entire system as fixed, except the water molecules. Subsequently, at the NPT state, 1ns of MD simulation at 300K and physiologic pH was performed with harmonic restraints. Finally, an MD production run without restraints was performed for 20 ns at NPT for completing the preparation of the system with a total of the 4000 frames. To analyze the structures generated after the MD steps, plots of random mean square deviation variation (RMSD) as well as H-bond distances between amino acid residues and HABT along the MD simulation were developed using the visual molecular dynamics (VMD)<sup>25</sup> program.

## 2.2. AIM calculations

The topological properties of electron density in the O...H chemical bond were performed using the Atoms in Molecules (AIM) theory of Bader as implemented in the AIM2000 program.<sup>26</sup> The AIM parameters localized at bond critical points (BCP) are useful tools for the characterization of chemical bonds. Moreover, these properties can be used to correlate with the reactivity efficiency of the compounds toward the inert molecule of interest.<sup>26-29</sup> In the present work, the BCP was located in  $_{\text{Thr766}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  and  $_{\text{water}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  bonds of all the conditions (QM-1 to QM-4). At the BCP, the electron density  $\rho(r)$  and Laplacian  $\nabla^2\rho(r)$  were performed. For applications,  $\rho(r)$  has been used as a measure of the hydrogen bond strengths and the  $\nabla^2\rho(r)$  shows the regions where  $\rho(r)$  is concentrated or depleted.<sup>30-33</sup>

### 2.3. QM/MM calculations

The QM/MM<sup>34,35</sup> calculations were carried out with the ChemShell<sup>36</sup> package. The MM part was described by the CHARMM/TIP3P<sup>37,38</sup> force field. The electrostatic interaction between QM and MM atoms was taken into account by including all MM point charges in the part of the QM Hamiltonian.

All QM/MM ground-state (gs) geometry optimizations were carried out using the density functional theory DFT/B3LYP/TZVP and for excited-states (ex), optimizations were performed using (time dependent) density functional theory TD-DFT/B3LYP/TZVP<sup>39-41</sup> with the TURBOMOLE<sup>42</sup> (version 6.3) program package. Both techniques employed the HDLC<sup>43</sup> optimizer in ChemShell. The ground-state and excited-states geometry was optimized for all possible QM region combinations (QM-1 to QM-4) and for the enol/keto forms of HABT. The QM energies ( $E_{QM}$ ), MM energies ( $E_{MM}$ ), total energies ( $E_{total}$ ) (see supporting information) as well as the  $\Delta E$  were calculated for the HABT enol and keto forms in the ground-state and excited-states geometry.

The energy barriers (transition states - TS) for the intramolecular proton transfer (TS<sup>a</sup>) and isomerization to *trans*-keto form (about 90° *twist* of the NCCC dihedral angle) (TS<sup>b</sup>) at the excited-state for the all conditions were calculated with TD-DFT. In order to determine the relative rate constants to cross the energy barriers TS<sup>a</sup> and TS<sup>b</sup>, we have employed Eq. 1.<sup>44</sup>

$$\frac{k_1}{k_i} = e^{\frac{\Delta E_i^\# - \Delta E_1^\#}{RT}} \rightarrow e^{\frac{\Delta \Delta E^\#}{RT}} \quad \text{Eq. 1}$$



### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Molecular Dynamics Simulation

Since the time-scale accessible to QM/MM simulations is very restricted, no extensive equilibration is possible and care must be taken to start from reasonably well pre-equilibrated configurations. To this end, we first prepared a classical system through an MD simulation using the CHARMM force field.

Figure 3 shows the RMSD protein along the simulation. The RMSD analysis can give an idea of how much the three-dimensional structure has fluctuated over time as well as allow the monitoring of local fluctuations, for instance, the residues with increased mobility along the MD simulation. It can be observed that among 2010-2020 frames, approximately, the system present a deviation of 1 Å. This deviation, however, is precisely the loop, which is far from the active site. Hence, this result suggests the stability of the system along the simulation (Figure 3).

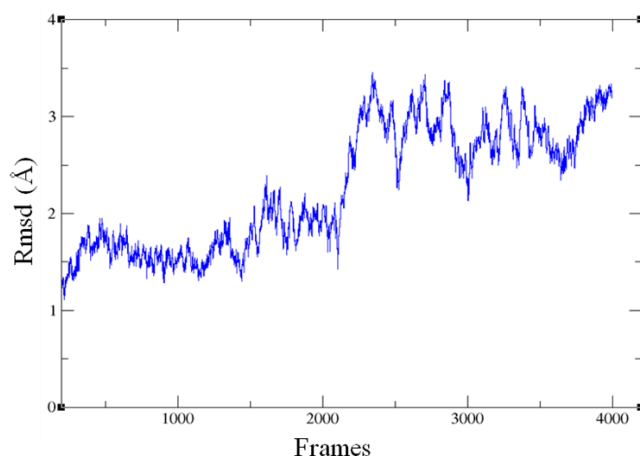


Figure 3 Rmsd from the MD simulation for the entire system

During the MD simulation we observed that amino acid residues of the TK active site form hydrogen bonds with the compound HABT. In addition, the residues Glu738, Thr766 and Lys721 remain close to HABT, performing hydrogen bonds (Figure 4) i.e., these residues are important for maintaining the stability of the compound in the TK active site .

After the MD simulation, the QM regions were selected. The QM region is composed of the main residues of the TK active site that shows hydrogen bonds (with distance of less than 2.3 Å) with HABT as well as some water molecules (Figure 5).

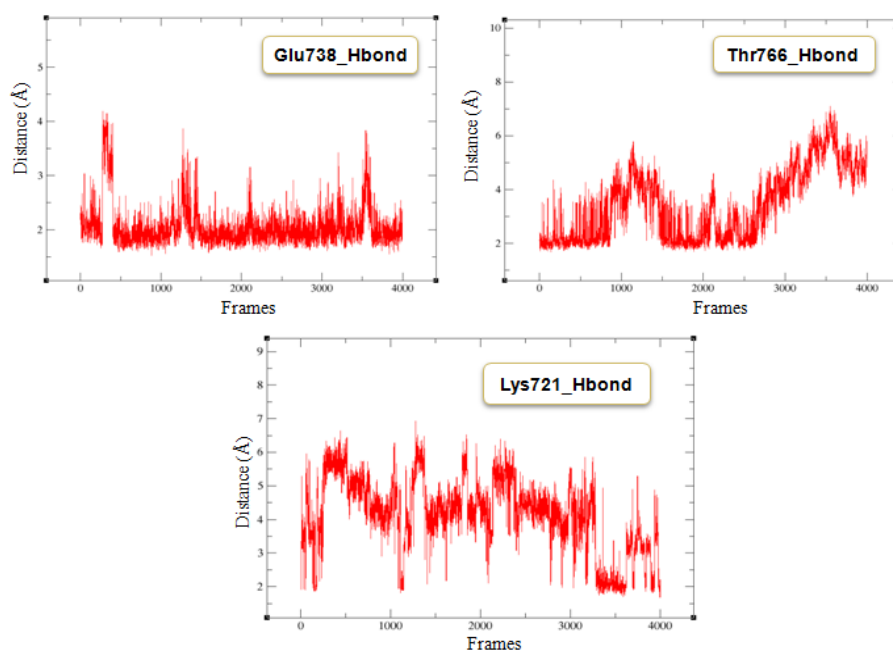


Figure 4 Hydrogen bond distances between amino acids and HABT along the MD simulation

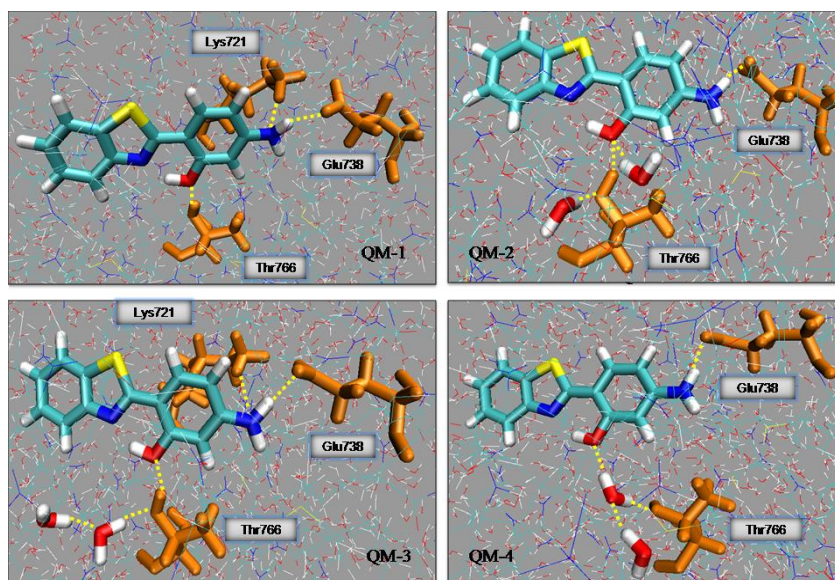


Figure 5 Illustration of various QM regions (solid bonds, thick atoms represent the QM region and thin atoms the MM region) for the HABT enol form in the TK enzyme active site

### 3.2. Intermolecular hydrogen bonds strength and geometrical parameters for the QM regions in the excited state

The electron density is commonly used to estimate the intermolecular hydrogen bonds. The electron distribution of a molecule is an excellent starting point to gain chemical insight into a molecule or an aggregate of molecules.<sup>45,46</sup> Among all known electron density methods, an appealing theory that takes advantage of this observation is the “Atoms in Molecules” model (AIM),<sup>47</sup> which is based on the charge density partition of a molecule into atoms in a natural way by using the concept of gradient path. In this regard, the bonding characteristics between Thr766 and HABT as well between water and HABT for all conditions have been investigated through the use of the AIM. We have investigated the  $_{\text{Thr766}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  and  $_{\text{water}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  (Figure 6) because these

intermolecular hydrogen bondings can influence in the intramolecular proton transfer, which is a common procedure for this compound in the excited state (see Figure 2).

For the AIM calculations, we located the BCP in the  $_{\text{Thr766}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  and  $_{\text{water}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  of the all conditions, i.e., points where the charge density function ( $\rho(r)$ ) are a minimum along the bond path and maximum in the other two directions. According to literature, a fairly good linear correlation exists between the charge densities at BCP and the strength of the linkages.<sup>30</sup> Local properties at BCPs convey valuable information about the molecular structure e.g., they can characterize ionic bonds, hydrogen bonds, van der Waals forces as well as covalent bonds. We have also evaluated the Laplacian of the charge density  $\nabla^2\rho(r)$  (Table 1).

Our study on the electronic topologies of the interactions  $_{\text{Thr766}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  and  $_{\text{water}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  was concentrated on the BCPs with positive  $\nabla^2\rho(r)$  ( $\nabla^2\rho(r) > 0$ ). According to Koch and Popelier (1995) the existence of the hydrogen bond can be estimated by a BCP with a positive  $\nabla^2\rho(r)$  (i.e.  $\nabla^2\rho(r) > 0$ , range from 0.024 to 0.139 au, and an order of magnitude a hundredth (i.e.  $10^{-2}$ ) of  $\rho(r)$  value.<sup>33</sup> Based on this context and in line with the results shown in Table 1, the existence of the intermolecular hydrogen bonds ( $_{\text{Thr766}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$  and  $_{\text{water}}\text{H}\dots\text{O}_{\text{HABT}}$ ) in all conditions (Figure 6) can be confirmed, corroborating, then, with results observed in the MD simulation.

Table 1 Electron density ( $\rho$ ) and Laplacian ( $\nabla^2$ ) for the intermolecular hydrogen bonds between Thr766 and HABT as well as water and HABT in all QM regions

Conditions	Species	$\rho(r)$ (a.u)	$\nabla^2\rho(r)$ (a.u)
QM-1	Thr766H1...O2 <sub>HABT</sub>	0.02444	0.09342
QM-2	Thr766H1...O2 <sub>HABT</sub>	0.02181	0.08637
	waterH3...O2 <sub>HABT</sub>	0.01278	0.05071
QM-3	Thr766H1...O2 <sub>HABT</sub>	0.02393	0.09094
QM-4	waterH4...O2 <sub>HABT</sub>	0.02565	0.09760

Furthermore, the AIM analysis of its electron density distribution,  $\rho(r)$ , was carried out to investigate the hydrogen bonds and revealed a BCP in all the internuclear region O...H. Higher values of the  $\rho(r)$  indicates a strong hydrogen bond<sup>33,46</sup> i.e., the  $\rho(r)$  values shown in Table 1 put in evidence that, in Condition **4**, HABT shows a stronger intermolecular hydrogen bond with the water molecule ( $\rho(r) = 0.02565$ ) when we compare to Condition **2** that also presents a hydrogen bond with the water molecule. This was expected, since in Condition **2** the H4 of the water is closer (1.91 Å) than the O2-HBT. Furthermore, the O4–H4...O2 angle (174°) favors this intermolecular bond (Table 2, Figure 6). Turning now to Condition **1**, HABT shows a stronger intermolecular hydrogen bond with Thr766 residue ( $\rho(r) = 0.02444$ ) when we compare to Condition **2** and **3** (Table 1). In Condition **1**, the atom H1 from the amino acid residue Thr766 is closer (1.93 Å) than the O2-HBT and the O1–H1...O2 angle (165°) also favors this intermolecular bond (Table 2, Figure 6).

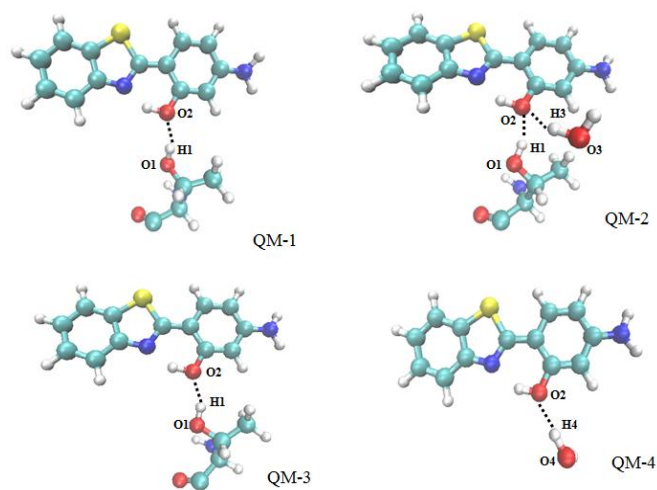


Figure 6 QM/MM excited state optimized structures. The MM region as well as some residues of the QM region were omitted for a better visualization

Table 2 Selected bond lengths ( $\text{\AA}$ ), bond angles ( $^\circ$ ) of the HABT intermolecular hydrogen bonds with Thr766 and the water molecule for all conditions in the excited state

Conditions	Species	B3LYP/TZVP
QM-1	$r(\text{H1}\dots\text{O2})$	1.93
	$\phi(\text{O1-H1}\dots\text{O2})$	165.0
QM-2	$r(\text{H1}\dots\text{O2})$	2.00
	$r(\text{H3}\dots\text{O2})$	2.25
	$\phi(\text{O1-H1}\dots\text{O2})$	143.0
	$\phi(\text{O3-H3}\dots\text{O2})$	146.0
QM-3	$r(\text{H1}\dots\text{O2})$	1.94
	$\phi(\text{O1-H1}\dots\text{O2})$	158.7
QM-4	$r(\text{H4}\dots\text{O2})$	1.91
	$\phi(\text{O4-H4}\dots\text{O2})$	172.0

### 3.3. QM/MM study: Analysis of the ESIPT; Intersystem Crossing (ISC) and Torsional Coordinate

Currently, different theoretical methods have been employed to determine the vertical excitation energies for HBT in vacuum and solution.<sup>8,9,11,12</sup> Among those several theoretical methods, TD-DFT is considered a promising approach.<sup>15-18</sup> In fact, this method has grown in importance, because it can provide ways for excited-state calculations of relatively large molecules under controlled computational costs. In this work, we have used the TD-DFT method and the popular functional B3LYP to determine the first singlet excited state, the triplet and the transition state energies relative to the minimum of the enol form of HABT in the ground-state geometry (see Table 3).

The energy barriers for the intramolecular proton transfer (TS<sup>a</sup>) and isomerization to the *trans*-keto form (about 90° *twist* of the NCCC dihedral angle) (TS<sup>b</sup>) at the excited-state also was calculated for the different QM regions of the enol and keto forms of HABT in the excited-state geometries in a biological system, i.e., in the active site of the TK enzyme (Table 3). For those reaction intermediates, the electronic properties were calculated with the TD-DFT method at the B3LYP/TZVP level. Equation 1 was used to obtain the relative rate constants of HABT to cross the energy barriers TS<sup>a</sup> and TS<sup>b</sup> (Table 4). It should be kept in mind that, a higher  $k_1/k_i$  value indicates a much slower passage by energy barriers, i.e. for the TS<sup>a</sup> and TS<sup>b</sup>. Our data point out the rate order for the intramolecular proton transfer (TS<sup>a</sup>) is  $k_1^a > k_3^a > k_2^a > k_4^a$  while the isomerization to *trans*-keto form (TS<sup>b</sup>) is  $k_1^b > k_2^b > k_3^b > k_4^b$  (Table 4).

Table 3 Singlet (S), triplet (T) and transition state (TS) energies relative to the minimum of the enol form in the ground-state (gr) geometry  $\Delta E$  (eV). Energy barriers  $\Delta E^\ddagger$  (eV) for different QM regions of the enol and keto forms in the ground-state and excited-state (ex) geometry within of the active site

Geometry	State	$\Delta E$ (eV)			
		QM-1	QM-2	QM-3	QM-4
enol (gr)	S <sub>0</sub>	0.000	0.000	0.000	0.000
	S <sub>1</sub>	3.747	3.691	3.741	3.577
enol (ex)	S <sub>0</sub>	0.138	0.146	0.196	0.099
	S <sub>1</sub>	3.475	3.542	3.539	3.476
enol (ex)	TS <sup>a</sup>	3.541	3.638	3.628	3.723
keto (gr)	S <sub>0</sub>	0.123	0.074	0.142	0.005
	S <sub>1</sub>	3.384	3.431	3.466	3.287
keto (ex)	S <sub>0</sub>	0.527	0.607	0.611	0.567
	S <sub>1</sub>	3.081	3.071	3.066	2.836
keto (ex)	TS <sup>b</sup>	3.082	3.085	3.179	2.966
<i>Twist</i> -keto	S <sub>0</sub>	2.432	2.310	2.484	2.871
	S <sub>1</sub>	2.647	2.402	2.979	2.865
keto (ex)	T <sub>1</sub>	2.366	2.496	2.516	2.317
<b>Relative energy barriers <math>\Delta E^\ddagger</math> (eV)</b>					
enol (ex)	TS <sup>a</sup> - S <sub>1</sub>	0.066	0.096	0.089	0.247
keto (ex)	TS <sup>b</sup> - S <sub>1</sub>	0.001	0.014	0.113	0.130
keto (ex)	S <sub>1</sub> → T <sub>1</sub>	0.716	0.575	0.550	0.519

<sup>a</sup> Transition state energy for the intramolecular proton transfer (enol to keto form) in the excited state

<sup>b</sup> Transition state energy for the keto to *twist*-keto form in the excited state



Table 4 Transitions state (TS<sup>a</sup> and TS<sup>b</sup>) energies ( $\Delta E^\ddagger$ ) and rate constants (k) relative to the minimum for Condition **1**

Conditions	Energy barriers (TS <sup>a</sup> )	
	$\Delta E_i^{a\ddagger} - \Delta E_1^{a\ddagger}$ (eV)	$\frac{k_1^a}{k_i^a}$
QM-1	0.000	1.000
QM-2	0.030	1.029
QM-3	0.023	1.022
QM-4	0.181	1.189
Conditions	Energy barriers (TS <sup>b</sup> )	
	$\Delta E_i^{b\ddagger} - \Delta E_1^{b\ddagger}$ (eV)	$\frac{k_1^b}{k_i^b}$
QM-1	0.000	1.000
QM-2	0.013	1.012
QM-3	0.112	1.113
QM-4	0.129	1.129

<sup>a</sup> Transition state energy for the intramolecular proton transfer (enol to keto form) in the excited state

<sup>b</sup> Transition state energy for the keto to *twist*-keto form in the excited state

From Figures 7A, 7B and 8C, it is possible to observe that the barrier for ESIPT is small in Conditions **1-3**, 0.066, 0.096 and 0.089 eV, respectively (Table 3). On the other hand, this barrier is large for Condition **4**, 0.247 eV (Figure 8D and Table 3). In other words, in Conditions **1-3** the ESIPT process occurs more easily ( $\frac{k_1^a}{k_i^a} = 1.000$ ,  $\frac{k_2^a}{k_i^a} = 1.029$  and  $\frac{k_3^a}{k_i^a} = 1.022$  eV) than in Condition **4** ( $\frac{k_4^a}{k_i^a} = 1.189$  eV) (see Table 4).

The reaction paths show three conditions connected with Thr766 (Conditions **1-3**, Figure 5), ESIPT takes place and keto emission (blue) and

internal conversion is the main pathway to deactivation. In the fourth condition, ESIPT is disrupted and emission from enol (violet) is the main deactivation pathway (see, Figure 8D). The difference in the energy barrier values of Condition **4** when compared to the other conformations evidence that the electronic effect of the Thr766 amino acid residue can significantly contribute to the ESIPT process. In this case, our data put in evidence that the hydrogen bonding with the Thr766 can compete with intermolecular hydrogen bonding between the OH group of HABT and water molecules in the TK active site, favoring the ESIPT process, which is not observed in Conformation **4**. Previous studies have shown that the intermolecular hydrogen bond between the OH group of the compound and the solvent protic (especially water) can interrupt the proton transfer.<sup>11,12</sup>

According to literature, besides the radiative decay, two deactivation processes can occur: the intersystem crossing (ISC) as well as torsional coordinate.<sup>10</sup> In this work, we observed that the ISC process in the TK active site does not occur, i.e., the phosphorescence does not compete with the fluorescence process, since there is a high energy barrier between the first singlet excited ( $S_1$ ) of the keto form and its triplet excited ( $T_1$ ). For all conditions, this energy barrier is higher than 0.5 eV (see Table 3), hindering the crossing of the compound from the  $S_1$  to  $T_1$  state (Figures 7 and 8).

Other important aspect investigated was the NCCC dihedral angle torsion of HABT in the active site. The planar form is an important chemical characteristic that contributes to fluorescence emission, increasing the interaction as well as the  $\pi$ -conjugation. This study shows that in the excited state, the barriers for the torsional coordinate (from keto to *twist*-keto form) is small for Conditions **1-3** (Figures 7A, 7B, 8C) and large for **4** (Figure 8D). This fact was expected, since as previously discussed, the keto tautomer formation is more difficult to be observed in Condition **4**.

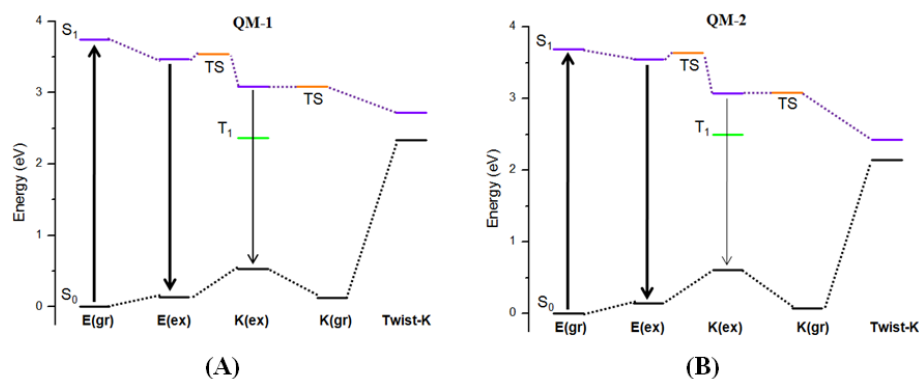


Figure 7 Perspective for fluorescence in the TK active site for the QM-1 (A) and QM-2 (B)

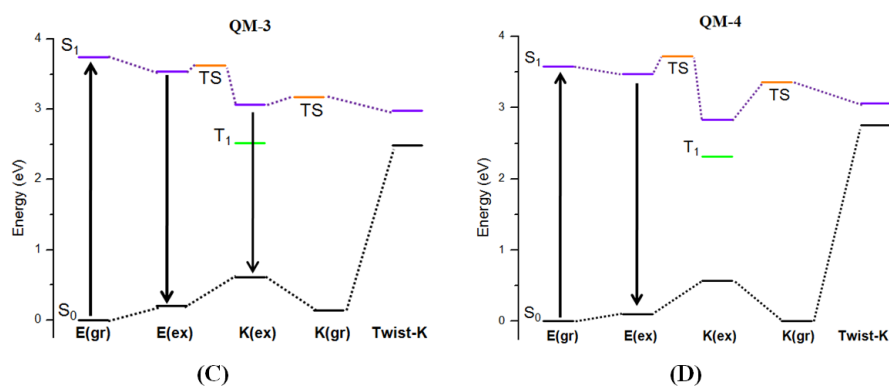


Figure 8 Perspective for fluorescence in the TK active site for the QM-3 (C) and QM-4 (D)

### 3.4. Perspective for dual application of HBT

In fact, it is well-known that in polar solvents, HBT can form hydrogen bonds and two fluorescence bands are observed for the compound, one around 380 nm corresponding to the enol form and another band around 550 nm due to the keto form. On the other hand, in gas phase only the band corresponding to the keto form is observed (550 nm).<sup>11,48-50</sup>

It is worth mentioning that for Condition **3**, where all amino acids residues and water molecules are present in the QM region (Figure 5), our theoretical findings reveal two fluorescence bands around 372 and 506 nm corresponding to the enol and keto form of HABT, respectively. In order to evaluate the chemical environment effect on the wavelength values of HABT, we have performed theoretical calculations in gas phase using the same geometry of the compound in Condition **3**. Our results point out that the wavelength value for the keto form of HABT in gas phase is around 565 nm.

Our data thus puts in evidence, that the spectroscopic parameters of HABT are very sensitive to structural and electronic effects generated by the chemical environment (e.g. vacuum or protein). Certainly, this fact opens the possibility of using benzothiazol derivatives as prototype structures to probe structural modifications in biological systems as well as to act as a fluorescent probe in the active site of enzymes related to cancer.

It should be kept in mind that ABT shows therapeutic applications against breast cancer.<sup>3,4</sup> Furthermore, previous studies indicate that HBT isomers, for instance 2-(3-hydroxyphenyl)benzothiazole, also have antitumor activity in the human breast cell lines MCF-7 (51.8  $\mu$ M).<sup>51</sup>

Although, in recent years, much research has been devoted to the study of the intramolecular proton transfer in excited-state of HBT in vacuum and solution;<sup>10-12</sup> application of fluorescence parameters of HBT derivatives in biological systems has lagged behind. HABT, an HBT derivative, is formed by introduction of an amino group in HBT, which leads to a shift of about 15 nm in vacuum corresponding to the keto form. To date, no first-principles approach has emerged aiming to investigate the spectroscopic parameters of HABT. Regarding this outlook and focusing on the results obtained in this work, we can suggest a dual application, diagnostic as well as therapeutic of HABT

derivatives for the treatment of cancer. At the theoretical level, the present application demonstrates the feasibility of this approach.

## 4 CONCLUSIONS

The results obtained, by MD simulations using the CHARMM force field, showed that the Glu738, Thr766 and Lys721 amino acids residues, as well as some water molecules, were important to maintain the stability of HABT in the Tyrosine Kinase active site, performing hydrogen bonds during the simulated time. The AIM calculations confirmed the results obtained in the MD simulation.

In this work, we have explored the combined quantum-mechanical/molecular-mechanical (QM/MM) to perform theoretical calculations in the ground (DFT), as well as excited states (TD-DFT), of four different QM regions (QM-1 to QM-4). In general, our investigations indicate that fluorescence in the TK active site can occur. One example is Condition **3** that shows two fluorescence bands corresponding to enol and keto forms. In line with this result, we can suggest that the Glu738, Thr766 and Lys721 amino acid residues, as well as some water molecules, were important for maintaining the planar form of the HABT compound in the active site.

Finally, our theoretical findings point out that the use of HABT can be a promising approach and opens the opportunity to employ benzothiazol derivatives as prototype fluorescent probes in diagnostics against breast cancer. To our knowledge, this is the first application of this methodology. We hope that our results will stimulate new experimental and full-dimensional theoretical investigations that could assess the validity of this assumption.

### Acknowledgments

This work was supported by German agency DAAD and Brazilian agencies FAPEMIG, CAPES and CNPq. The calculations were performed of the Max-Planck-Institut für Kohlenforschung.

### REFERENCES

- [1] Brown Ns, J. M.; Koong, A. *J Nat Canc Inst.* **1991**, *83*, 178.
- [2] Galvão, E. R. C. G. N. et al. *Cancer Res. Clin. Oncol.* **2011**, *137*, 915.
- [3] Bradshaw, T. D.; Westwell, A. D. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1241.
- [4] Tzanopoulou, S.; Sagnou, M.; Paravatou-Petsotas, M.; Gourni, E.; Loudos, G.; Xanthopoulos, S.; Lafkas, D.; Kiaris, H.; Varvarigou, A.; Pirmettis, I. C.; Papadopoulos, M.; Pelecanou, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4633.
- [5] Shi, D. F.; Bradshaw, T. D.; Wrigley, S.; McCall, C. J.; Lelieveld, P.; Fichtner, I.; Stevens, M. F. G. *J. Med. Chem.* **1996**, *37*, 3375.
- [6] da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C.; Mancini, D. T.; Fonseca, E. M. B.; Oliveira, A. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1787.
- [7] Mancini, D. T.; Matos, K. S.; da Cunha, E. F. F.; Assis, T. M.; Guimarães, A. P.; França, T. C. C.; Ramalho, T. C. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, *30*, 125.
- [8] Bhuva, H. A.; Kini, S. G. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, *29*, 32.
- [9] Hicks, J. W. et al. *Molecules.* **2010**, *15*, 8260.
- [10] Barbatti, M.; Aquino, A. J. A.; Lischka, H.; Schrieffer, C.; Lochbrunner, S.; Riedle, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 1406.
- [11] Kungwan, N.; Plasser, F.; Aquino, A. J. A.; Barbatti, M.; Wolschann, P.; Lischka, H.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 9016.
- [12] Zhao, J.; Ji, S.; Chen, Y.; Guo, H.; Yang, P.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8803.

- [13] Salzmann, S.; Silva-Junior, M. R.; Thiel, W.; Marian, C. M. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 15610.
- [14] Plasser, F.; Barbatti, M.; Aquino, A. J. A.; Lischka, H. *Theor. Chem. Acc.* **2012**, *131*, 1.
- [15] Silva-Junior, M. R.; Schreiber, M.; Sauer, S. P. A.; Thiel, W. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*, 104103.
- [16] Goerigk, L.; Moellmann, J.; Grimme, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4611.
- [17] Jacquemin, D.; Wathelet, V.; Perpète, E. A.; Adamo, C. *J. Chem. Theory. Comput.* **2009**, *5*, 2420.
- [18] Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Ciofini, I.; Adamo, C. *J. Chem. Theory. Comput.* **2010**, *6*, 1532.
- [19] Jennifer, S.; Mark, X. S.; Charles, E. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 46265.
- [20] Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. *J. Comput. Aided Mol. Design.* **2000**, *14*, 123.
- [21] Bas, D. C.; Rogers, D. M.; Jensen, J. H. *Proteins.* **2008**, *73*, 765.
- [22] Dolinsky, T. J.; Czodrowski, P.; Li, H.; Nielsen, J. E.; Jensen, J. H.; Klebe, G.; Baker, N. A. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W522.
- [23] Kieseritzky, G.; Knapp, E. W. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 2575.
- [24] Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781.
- [25] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33.
- [26] Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, **1990**, Clarendon Press, Oxford.
- [27] Suresh, C. H.; Koga, N., *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1573.
- [28] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A.* **2004**, *108*, 6908.
- [29] Suresh, C. H.; Sajith, P. K. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 8085.



- [30] Palusiak, M.; Krygowski, T. M. *Chem. Eur.* **2007**, *13*, 7996.
- [31] Nakanishi, W., Hayashi, S. *Current. Org. Chem.* **2010**, *14*, 181.
- [32] Bader, R. F. W.; Matta, C. F. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5603.
- [33] Koch, U.; Popelier, P. L. A. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 9747.
- [34] Senn, H. M.; Thiel, W. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *268*, 173.
- [35] Senn, H. M.; Thiel, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1198.
- [36] Sherwood, P.; et al. *J. Mol. Struct.* **2003**, *632*, 1.
- [37] Jorgensen, L. W.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- [38] Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187.
- [39] Bauernschmitt, R.; Ahlrichs, R. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *256*, 454.
- [40] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- [41] Stephens, P. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.
- [42] Ahlrichs, R.; Bar, M.; Haser, M.; Horn, H.; Kolmel, C. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 165.
- [43] Kastner, J.; Thiel, S.; Senn, H. M.; Sherwood, P.; Thiel, W. *J. Chem. Theory. Comput.* **2007**, *3*, 1064.
- [44] Ramalho, T. C.; de Alencastro, R. B.; La-Scaleac, M. A.; Figueroa-Villar, J. D. *Biophys. Chem.* **2004**, *110*, 267.
- [45] Nozad, A. G.; Meftah, S.; Ghasemi, M. H.; Kiyani, R. A.; Aghazadeh, M. *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 49.
- [46] Toledo, E. J. L.; Custodio, R.; Ramalho, T. C.; Porto, M. E. G.; Magriotis, Z. M. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*. **2009**, *915*, 170.
- [47] Mata, I.; Molins, E.; Alkorta, I.; Espinosa, E. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 044104.

- [48] Lochbrunner, S.; Stock, K.; Riedle, E. in *Hydrogen-Transfer Reactions*, ed. J. T. Hynes, J. P. Klinman, H. H. Limbach and R. L. Schowen, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006.
- [49] Potter, C. A. S.; Brown, R. G.; Vollmer, F.; Rettig, W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 59.
- [50] Cheng, Y. M.; Pu, S. C.; Hsu, C. J.; Lai, C. H.; Chou, P. T. *Chem. Phys. Chem.* **2006**, *7*, 1372.
- [51] Wells, G.; Bradshaw, T. D.; Diana, P.; Seaton, A.; Shi, D. F.; Westwell, A. D.; Stevens, M. F. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 513.

**Supporting Information Available:** Extended information of the QM energies ( $E_{\text{QM}}$ ), MM energies ( $E_{\text{MM}}$ ), the total energies ( $E_{\text{total}}$ ) calculated for the HABT enol and keto forms in the ground-state and excited-state geometries.

Table S1 QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.) for QM-1 region

Geometry	States	Energy (a.u.)		
		$E_{\text{QM}}$	$E_{\text{MM}}$	$E_{\text{QM/MM}}$
enol (gs)	S <sub>0</sub>	-1564.173546	-99.626453	-1663.800000
	S <sub>1</sub>	-1564.035853	-99.626453	-1663.662306
	S <sub>2</sub>	-1564.018141	-99.626453	-1663.644594
enol (ex)	S <sub>0</sub>	-1564.165124	-99.629787	-1663.794911
	S <sub>1</sub>	-1564.042510	-99.629787	-1663.672297
	S <sub>2</sub>	-1564.020288	-99.629787	-1663.650075
enol (ex)	TS	-1564.039307	-99.630559	-1663.669866
keto (gs)	S <sub>0</sub>	-1564.166413	-99.629077	-1663.795490
	S <sub>1</sub>	-1564.046545	-99.629077	-1663.675622
	S <sub>2</sub>	-1564.030058	-99.629077	-1663.659135
keto (ex)	S <sub>0</sub>	-1564.150783	-99.629858	-1663.780641
	S <sub>1</sub>	-1564.056922	-99.629858	-1663.686780
	S <sub>2</sub>	-1564.028699	-99.629858	-1663.658557
keto (ex)	TS	-1564.057673	-99.629073	-1663.686746
Triplet-keto	T <sub>1</sub>	-1564.083191	-99.629858	-1663.713049
<i>twist</i> -keto	S <sub>0</sub>	-1564.083390	-99.627247	-1663.710637
	S <sub>1</sub>	-1564.075474	-99.627247	-1663.702721

Table S2 QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.) for QM-2 region.

Geometry	States	Energy (a.u.)		
		$E_{QM}$	$E_{MM}$	$E_{QM/MM}$
enol (gs)	S <sub>0</sub>	-1620.931925	-97.047142	-1717.979067
	S <sub>1</sub>	-1620.796292	-97.047142	-1717.843434
	S <sub>2</sub>	-1620.774921	-97.047142	-1717.822063
enol (ex)	S <sub>0</sub>	-1620.921602	-97.052104	-1717.973706
	S <sub>1</sub>	-1620.796791	-97.052104	-1717.848895
	S <sub>2</sub>	-1620.770440	-97.052104	-1717.822544
enol (ex)	TS	-1620.794478	-97.050902	-1717.845379
keto (gs)	S <sub>0</sub>	-1620.908848	-97.067484	-1717.976332
	S <sub>1</sub>	-1620.785474	-97.067484	-1717.852958
	S <sub>2</sub>	-1620.776441	-97.067484	-1717.843925
keto (ex)	S <sub>0</sub>	-1620.882850	-97.073924	-1717.956774
	S <sub>1</sub>	-1620.792282	-97.073924	-1717.866206
	S <sub>2</sub>	-1620.765481	-97.073924	-1717.839405
keto (ex)	TS	-1620.792271	-97.073420	-1717.865691
Triplet-keto	T <sub>1</sub>	-1620.813420	-97.073924	-1717.887344
<i>twist</i> -keto	S <sub>0</sub>	-1620.817188	-97.076998	-1717.894186
	S <sub>1</sub>	-1620.813778	-97.076998	-1717.890775

Table S3 QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.)  
for QM-3 region

Geometry	States	Energy (a.u.)		
		$E_{QM}$	$E_{MM}$	$E_{QM/MM}$
enol (gs)	S <sub>0</sub>	-1717.095012	-99.394573	-1816.489585
	S <sub>1</sub>	-1716.957524	-99.394573	-1816.352097
	S <sub>2</sub>	-1716.941241	-99.394573	-1816.335814
enol (ex)	S <sub>0</sub>	-1717.087172	-99.395196	-1816.482368
	S <sub>1</sub>	-1716.964332	-99.395196	-1816.359528
	S <sub>2</sub>	-1716.945241	-99.395196	-1816.340437
enol (ex)	TS	-1716.960827	-99.395414	-1816.356241
keto (gs)	S <sub>0</sub>	-1717.091625	-99.392757	-1816.484381
	S <sub>1</sub>	-1716.969447	-99.392757	-1816.362204
	S <sub>2</sub>	-1716.958713	-99.392757	-1816.351470
keto (ex)	S <sub>0</sub>	-1717.070746	-99.396383	-1816.467129
	S <sub>1</sub>	-1716.980534	-99.396383	-1816.376917
	S <sub>2</sub>	-1716.952800	-99.396383	-1816.349183
keto (ex)	TS	-1716.980113	-99.392645	-1816.372758
Triplet-keto	T <sub>1</sub>	-1717.000744	-99.396383	-1816.397127
<i>twist</i> -keto	S <sub>0</sub>	-1717.009401	-99.388905	-1816.398306
	S <sub>1</sub>	-1716.991210	-99.388905	-1816.380114

Table S4 QM energies (a.u.), MM energies (a.u.), total QM/MM energies (a.u.)  
for QM-4 region

Geometry	State:	Energy (a.u.)		
		$E_{QM}$	$E_{MM}$	$E_{QM/MM}$
enol (gs)	S <sub>0</sub>	-1620.922156	-99.352549	-1720.274705
	S <sub>1</sub>	-1620.790685	-99.352549	-1720.143234
	S <sub>2</sub>	-1620.769102	-99.352549	-1720.121651
enol (ex)	S <sub>0</sub>	-1620.916362	-99.354699	-1720.271061
	S <sub>1</sub>	-1620.792255	-99.354699	-1720.146954
	S <sub>2</sub>	-1620.767406	-99.354699	-1720.122105
enol (ex)	TS	-1620.785335	-99.352554	-1720.137890
keto (gs)	S <sub>0</sub>	-1620.920296	-99.354576	-1720.274872
	S <sub>1</sub>	-1620.799329	-99.354576	-1720.153905
	S <sub>2</sub>	-1620.792088	-99.354576	-1720.146664
keto (ex)	S <sub>0</sub>	-1620.895087	-99.358766	-1720.253853
	S <sub>1</sub>	-1620.811714	-99.358766	-1720.170480
	S <sub>2</sub>	-1620.781317	-99.358766	-1720.140083
keto (ex)	TS	-1620.816492	-99.349220	-1720.165712
Triplet-keto	T <sub>1</sub>	-1620.830791	-99.358766	-1720.189557
<i>twist</i> -keto	S <sub>0</sub>	-1620.821441	-99.347737	-1720.169178
	S <sub>1</sub>	-1620.821658	-99.347737	-1720.169396

**ARTIGO 2****<sup>99</sup>Tc NMR AS A PROMISING TECHNIQUE FOR STRUCTURAL  
INVESTIGATION OF BIOMOLECULES:  
THEORETICAL STUDIES ON THE SOLVENT AND THERMAL  
EFFECTS OF PHENYLBENZOTHAZOLE COMPLEX**

**Artigo redigido conforme norma da revista Magnetic Resonance in  
Chemistry (MRC)**

Daiana T. Mancini, Eugenio F. Souza, Melissa S. Caetano and Teodorico C.  
Ramalho

**ABSTRACT**

The phenylbenzothiazole (PBT) compounds show antitumor properties and are highly selective. In this paper, the <sup>99</sup>Tc chemical shifts based on the (<sup>99m</sup>Tc)(CO)<sub>3</sub>(NNO) complex conjugated to the antitumor agent 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole, is reported. Thermal and solvent effects were studied computationally by quantum-chemical methods, using the density functional theory (DFT- level BPW91/aug-cc-pVTZ for the Tc and BPW91/IGLO- II for the other atoms) to compute the NMR parameters for the complex. We have calculated the <sup>99</sup>Tc NMR chemical shifts of the complex in gas phase and solution using different solvation models (PCM and explicit solvation). To evaluate the thermal effect, molecular dynamics (MD) simulations were carried, using the atom-centered density matrix propagation (ADMP) method at the DFT level (BP86/LanL2dz). The results highlight that the <sup>99</sup>Tc NMR spectroscopy can be a promising technique for structural investigation of biomolecules, at the molecular level, in different environments.

## 1 INTRODUCTION

Cancer is an old and serious problem facing humanity,<sup>[1]</sup> having a great and limiting influence on the quality of life and development of many countries, besides causing many deaths.<sup>[2]</sup> In this context, breast cancer is one of the major health problems of the western world, where more than 1 million new cases occur every year, mainly in women between 40–59 years old.<sup>[3,4]</sup>

Currently, drugs containing radionuclide, denominated radiopharmaceuticals, are used frequently in nuclear medicine for the diagnosis or therapy of cancer and various other diseases.<sup>[5-7]</sup> In fact, a large number of different classes of radiopharmaceuticals can be employed. Among them, one of the most commonly used is based on Technetium (Tc) metallic complexes,<sup>[8]</sup> highlighting the nuclides  $^{99}\text{Tc}$ <sup>[9]</sup> and its metastable nuclear isomer  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .<sup>[8]</sup>

Within this context, in 2006 Tzanopoulou *et al.* synthesized the ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )(CO)<sub>3</sub>(NNO) (Tc atom coordinated with three carbon monoxide molecules, two nitrogen and one oxygen atom) complex conjugated to the antitumor agent 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole (ABT; see Fig. 1).<sup>[8]</sup> The phenylbenzothiazole (PBT) compounds show antitumor properties and are highly selective.<sup>[10-13]</sup> The original lead compound in this series, ABT, exhibits nanomolar in vitro activity against certain human-breast cancer cell lines.<sup>[10,14]</sup> Its chemical activity is connected to docking properties of this molecule to the protein Phosphoinositide 3-kinase (PI3K). This enzyme is involved in multiple cellular activities such as: cell proliferation, metabolism, survival and membrane trafficking.<sup>[15-18]</sup>

According to Tzanopoulou *et al.* (2010) the ABT compound can be used to carry the radionuclide of choice to the diseased tissue, facilitating the diagnostic or therapeutic applications to breast cancer.<sup>[10]</sup>



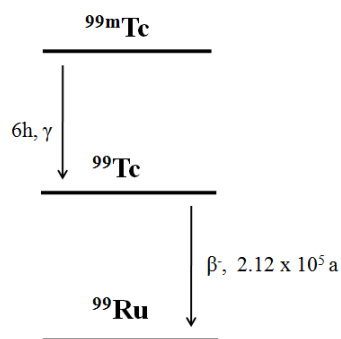
Therefore, due to instability of the  $^{99m}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6\text{h}$ ,  $E_{\gamma} = 140\text{ keV}$  – see Scheme 1),<sup>[19]</sup> the  $^{99m}\text{Tc}$  complex is synthesized in low-scale, hindering the structural characterization (NMR spectroscopy).<sup>[8]</sup> An alternative is the production of complexes with the  $^{99}\text{Tc}$  isotope that is more stable than  $^{99m}\text{Tc}$  (Scheme 1).<sup>[19]</sup> Furthermore, the  $\beta$ -emitting radioisotopes of Tc,  $^{99}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 2.12 \times 10^5$  years,  $E_{\text{max}} = 0.29\text{ MeV}$ )<sup>[19]</sup> are similar to radioisotopes of Rhenium  $^{186}\text{Re}$  ( $E_{\text{max}} = 1.07\text{ MeV}$ ) and  $^{188}\text{Re}$  ( $E_{\text{max}} = 2.12\text{ MeV}$ ) that also are  $\beta$ -emitting, which are already used in nuclear medicine for radiotherapy applications.<sup>[8,10]</sup> The previous studies of NMR spectroscopy, involving the research group of Pelecanou *et al.*, point out that Tc and Re complexes present similar structural properties.<sup>[8,10,20,21]</sup>

Recent studies show that the radioisotopes of Tc are promising nuclei for applications involving Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Magnetic Resonance Images (MRI) techniques.<sup>[9,21,22,23]</sup> According to Bühl and Golubnychi,  $^{99}\text{Tc}$  NMR spectroscopy can be used as a powerful spectroscopic technique used for characterization of Tc complexes,<sup>[9,24]</sup> since the  $\delta(^{99}\text{Tc})$  values cover a large chemical-shift range (ca 9000 ppm) and can be very sensitive to slight variations in geometric and electronic parameters.<sup>[9]</sup> The  $^{99}\text{Tc}$  nuclei presents a quadrupole moment equal to  $-0.19 \times 10^{-28}\text{ m}^2$  and a large spin,  $I = 9/2$ ,<sup>[25,26]</sup> which contribute often to prevent the recording of spectra for larger molecules. It should be kept in mind, however, that ultrahigh-field NMR techniques in solid state can be used to overcome this problem.<sup>[27]</sup>

In spite of the great importance of investigating the solvent and thermal effects on NMR parameters of such metal complexes of biological interest, very few studies about this subject have been reported.<sup>[9]</sup> Actually, theoretical approaches to compute NMR parameters are now implemented in very efficient codes using computer facilities with rapidly increasing performance.<sup>[2]</sup> Nowadays, *ab initio* computation of NMR parameters, such as chemical shifts or

coupling constants, can be very useful to support recorded spectra and investigate structure–property relationships.<sup>[2,28,29]</sup> In fact, calculations based on density functional theory (DFT) with a suitable choice of functionals are able to provide accurate values for many NMR properties.<sup>[2,30,31]</sup> Furthermore, the DFT method can be used for larger molecules, such as biological systems, because it is an inexpensive computational technique<sup>[2,32]</sup> capable of describing large parts of the electron correlation.<sup>[2,31-33]</sup>

Based on this context, our first goal is to model and predict experimental parameters like the  $^{13}\text{C}$  and  $^{99}\text{Tc}$  chemical shifts for compound **1a** and Complex **1b**, respectively (see Fig. 1), using modern computational tools, calling attention to thermal and solvation effects on spectroscopic properties. After that we applied  $^{99}\text{Tc}$  NMR calculations to probe the structural modifications in the PI3K enzyme active site.



Scheme 1. Decay of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .<sup>[19]</sup>

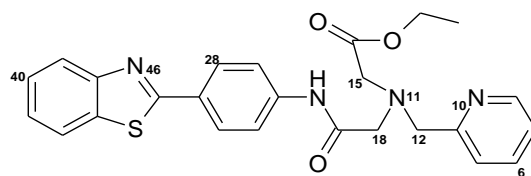
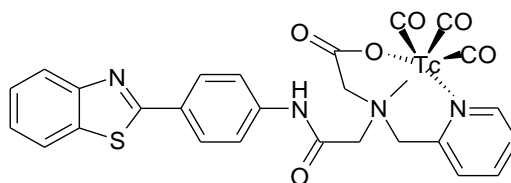
**1a****1b**

Figure 1 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole with the chelator metal (N-(2-pyridylmethyl)-aminoacetic acid (1a);  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{NNO})$  conjugated with 2-(4'-aminophenyl) benzothiazole (1b)

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1. Optimization and molecular dynamics procedure

Geometries were fully optimized using the gradient-corrected BP86 combination of density functional<sup>[34]</sup> and LanL2dz basis set, either in vacuum or in the presence of a polarizable continuum in the integral equation formalism model,<sup>[35-38]</sup> using the dielectric constants of water [denoted PCM(H<sub>2</sub>O)]. The same method of optimizing was used for the system containing water molecules explicitly [denoted H<sub>2</sub>O]. Water molecules were introduced in the system using the ADF<sup>[39]</sup> (Amsterdam Density Functional) software, the radius of solvent sphere was 15 Å and the solute factor was 1.0 Å approximately. Since the time-scale accessible to the atom-centered density matrix propagation (ADMP)<sup>[40]</sup> method is very restricted, no extensive equilibration is possible and care must be taken to start from reasonably well pre-equilibrated configurations. To this end, we first prepared the system through a classical molecular dynamics (MD) simulation. The basis set superposition error (BSSE) for the complex-water results was estimated using the counterpoise correction method.<sup>[41]</sup>

The MD simulations were performed using the ADMP method at the DFT level<sup>[40]</sup> (BP86/LanL2dz). ADMP employs an extended Lagrangian similar to the well-known Car-Parrinello molecular dynamics. It can treat all electrons quantum-mechanically and can control the deviations from the Born-Oppenheimer surface precisely.<sup>[40,42]</sup> In this work, we have used a temperature of 310K (physiologic temperature) throughout the simulation. In fact, this temperature is suitable to simulate the behavior of compounds in biological systems. After an equilibrium time of 1 ps, in which a temperature of 310K was maintained via velocity rescaling, statistical averages and snapshots for the NMR calculations were collected from subsequent unconstrained micro

canonical runs of 1 ps. Snapshots were taken every 25 fs for use in the NMR calculations. All optimization and MD calculations were carried out using Gaussian 09 software.<sup>[43]</sup>

## 2.2. NMR calculations

Magnetic shieldings  $\sigma$  were computed for equilibrium geometries and for snapshots taken from the MD simulations at the GIAO (gauge-including atomic orbitals) – DFT method involving the functional combinations according to Becke<sup>[9,34a]</sup> and Perdew and Wang<sup>[9,44]</sup> (denoted BPW91). In these calculations we used aug-cc-pVTZ basis (obtained from EMSL Basis Set Library)<sup>[45]</sup> for Tc atom and individual gauge for localized orbital (IGLO)-basis II<sup>[46]</sup> for all other elements. The IGLO-II basis was validated in a previous study using other <sup>99</sup>Tc complex.<sup>[9]</sup> Additionally, with the aim of exploring the relativistic effect for the <sup>99</sup>Tc complex, we used the zeroth-order regular approximation (ZORA)<sup>[39]</sup> formalism, including spin-orbit (SO), the PW91 functional and Slater-type (STO) basis set with polarized function triple-zeta (TZP) for all atoms. This calculation was carried using the ADF software.<sup>[39]</sup>

The <sup>13</sup>C and <sup>99</sup>Tc NMR chemical shifts  $\delta$  were calculated relative to benzene and TcO<sup>4-</sup>, respectively, optimized and simulated at the same level. The corresponding  $\sigma$  values are collected in Tables 1 and 3, in the gas phase at equilibrium and thermal average.

All NMR calculations for **1a** and **1b** compounds were carried out using Gaussian 09 software<sup>[43]</sup> in order to evaluate the thermal and solvent effects. A number of methods used to calculate shieldings were very well implemented in the Gaussian and ADF (for exploring the relativistic effect) packages in recent years. These include Hartree-Fock (HF), DFT, Second-order Møller-Plesset Perturbation Theory (MP2), and coupled cluster (Coupled Cluster Singles

(CCS), Coupled Cluster Singles and Doubles (CCSD)).<sup>[47]</sup> For example, the DFT and CCSD(T) methods have been widely used for nuclear shielding calculations and have shown good results for small molecules.<sup>[9,48,49]</sup> It should be kept in mind that CCSD(T) calculations with large basis sets can lead to better results, however, in terms of computational cost, our idea behind is to employ a simpler methodology (DFT) to simulate the solvent and thermal effects, minimizing the computational cost, and then making possible this study for biological systems. Furthermore, recent studies show that GIAO-DFT present good results of nuclear shielding for molecules of medium size using Gaussian 09 software.<sup>[50,51,52,53]</sup>

The resulting <sup>13</sup>C chemical shifts were converted to the usual TMS scale using the experimental value for benzene [ $\delta(^{13}\text{C}) = 128.5 \text{ ppm}$ ]<sup>[2,32]</sup> and the resulting <sup>99</sup>Tc chemical shifts were converted using the experimental value for TcO<sup>-4</sup> [ $\delta(^{99}\text{Tc}) = 0 \text{ ppm}$ ].<sup>[9,54]</sup>

### 2.3. Docking Studies

In this paper a docking study was also performed in order to obtain the <sup>13</sup>C and <sup>99</sup>Tc chemical shift for the Complex **1b** (Figure 1) present in the active site of the PI3K enzyme.

The three-dimensional structures of Complex **1b** were built using the program *PC Spartan Pro*<sup>®</sup><sup>[55]</sup> and their partial atomic charges were corrected by electronic structural methods. The Complex **1b** was docked inside of the PI3K crystallographic structure complexed with N-{6-[2-(methylsulfanyl)pyrimidin-4-yl]-1,3-benzothiazol-2-yl}acetamide (active ligand) (Protein Data Bank (PDB) code 3QJZ;<sup>[56]</sup> resolution = 2,90 Å) using the software *Molegro Virtual Docker* (MVD<sup>®</sup>)<sup>[57]</sup> according to the same procedure adopted previously.<sup>[58-63]</sup> The binding site was restricted into a sphere with variation in the radius of 10-12 Å

and the residues within a radius of 11 Å was considered flexible. Due to the stochastic nature of the docking algorithm, about 10 runs were performed for the compound with 30 poses (conformation and orientation of the ligand (Complex **1b**)) returned to the analysis of the ligand - protein interactions and the overlaps with the active ligand inside PI3K. The best conformation of the compound was selected according to its degree of structural similarity to the active ligand and accommodation in the cavity, evaluating the best energy of interaction with the enzyme.

The potential energy surface of the interaction between protein and substrate is explored by means of docking calculations using Monte Carlo methodology<sup>[64]</sup> by docking approach. Thus, the most appropriate conformations of how a ligand will bind to a macromolecule, considering the flexibility of residues around the ligand, are selected for QM calculations from the docking stage. The most stable conformation of the ligand inside the protein joining with the amino acid residues present in the active site (Val882, Thr827, Lys800) which form hydrogen bonds with the ligand were selected for <sup>99</sup>Tc and <sup>13</sup>C NMR calculations. This procedure was validated in previous studies.<sup>[59,62,63]</sup> This study was carried out combining docking techniques and GIAO-DFT calculations at the QM interface for the NMR, using the same basis set and functional discussed before and the Gaussian 09 software.<sup>[43]</sup>

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

This work is divided into three parts. In the first part, we validated the theoretical methodology used comparing theoretical results with experimental data for  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of the free ligand (Fig. 1a). To understand the behavior of radiopharmaceutical models, in the second part, we have calculated the  $^{99}\text{Tc}$  NMR chemical shifts of Complex **1b** (Fig. 1b) in gas phase and solution using different solvation models. In the last part, we have evaluated the  $^{99}\text{Tc}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR parameters in the PI3K enzyme active site. The all NMR calculations for  $^{99}\text{Tc}$  complex were carried without including relativistic effects, since we observed a little difference in chemical shift values with and without relativistic effects for the  $^{99}\text{Tc}$  ( $\delta\Delta_{99\text{Tc}} = 34$  ppm in vacuum) as well as for carbons atoms directly attached to Tc ( $\delta\Delta_{13\text{C}} = 8$  ppm in vacuum). Furthermore, according to Bühl and Golubnychiy (2008) this effect is little pronounced for the  $^{99}\text{Tc}$ .<sup>[9]</sup> However, it is important to highlight that despite small difference in chemical shift values for  $^{99}\text{Tc}$  and  $^{13}\text{C}$  in this particular case, further and still more accurate theoretical calculations in order to investigate relativistic effects on Tc complexes are now in progress.

For the discussions of NMR calculations, we used the following notation: level of shielding computation//level of geometry optimization or MD simulation. For example: (//BP86) means shielding computation in vacuum//geometry optimization in vacuum; [PCM(H<sub>2</sub>O)//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)] means shielding computation with implicit solvent (PCM)//geometry optimization with PCM and (H<sub>2</sub>O//BP86/H<sub>2</sub>O) means shielding computation with explicit solvent//geometry optimization with explicit solvent. The same notation is utilized when including the dynamic effect (ADMP).



### 3.1. Validation of the NMR study

This stage of the work was performed to validate the theoretical methodology used to calculate the NMR parameters, because, to our knowledge, there is no carbon and technetium NMR data for the Complex **1b** (Fig. 1b) reported in literature so far. The validation study was performed with the compound **1a** (Fig. 1a), using the C6, C28, C40 (aromatic) and C12, C15, C18 (aliphatic) as a reference for discussion.

Table 2 presents the  $^{13}\text{C}$  chemical shift (ppm) results for the compound **1a** computed at the GIAO–BPW91/II. It is important to note that the chemical shift values (Table 2) found for the carbons are very close to the experimental results, i.e. the theoretical results obtained for the carbon chemical shift are in agreement with experimental results described by Tzanopoulou *et al.*<sup>[8]</sup>

Table 1 Absolute  $^{13}\text{C}$  shielding (ppm) for benzene

Level of approximation <sup>a</sup>	$^{13}\text{C}$
$\sigma_e$ (//BP86)	46.61
$\sigma^{310\text{K}}$ (//ADMP)	41.63

<sup>a</sup> Notation ‘level of shielding computation//level of geometry optimization or MD simulation.’

Table 2 <sup>13</sup>C chemical shifts (ppm) for compound 1a, computed at the GIAO–BPW91/II

Level of approximation <sup>a</sup>	Aromatic			Aliphatic			absolute deviation
	C6	C28	C40	C12	C15	C18	
$\delta_e$ (//BP86)	135.7/1.1 <sup>c</sup>	127.9/0.1 <sup>c</sup>	125.1/1.4 <sup>c</sup>	56.7/2.7 <sup>c</sup>	51.9/3.1 <sup>c</sup>	59.3/1.0 <sup>c</sup>	1.6
$\delta_e$ [//BP86/PCM(H <sub>2</sub> O)]	134.4/2.4 <sup>c</sup>	128.0/0.0 <sup>c</sup>	126.3/0.2 <sup>c</sup>	68.3/8.9 <sup>c</sup>	59.1/4.1 <sup>c</sup>	66.0/7.7 <sup>c</sup>	3.9
$\delta_e$ (//BP86/H <sub>2</sub> O)	134.7/2.1 <sup>c</sup>	127.4/0.6 <sup>c</sup>	126.5/0.0 <sup>c</sup>	65.0/5.6 <sup>c</sup>	56.6/1.6 <sup>c</sup>	68.5/10.2 <sup>c</sup>	3.4
$\delta_e$ [PCM(H <sub>2</sub> O)//BP86/PCM(H <sub>2</sub> O)]	136.8/0.0 <sup>c</sup>	128.0/0.0 <sup>c</sup>	127.7/1.2 <sup>c</sup>	67.5/8.1 <sup>c</sup>	59.5/4.5 <sup>c</sup>	65.8/7.5 <sup>c</sup>	3.6
$\delta_e$ (H <sub>2</sub> O//BP86/H <sub>2</sub> O)	136.7/0.1 <sup>c</sup>	129.2/1.2 <sup>c</sup>	128.9/2.4 <sup>c</sup>	63.1/3.7 <sup>c</sup>	56.5/1.5 <sup>c</sup>	67.1/8.8 <sup>c</sup>	3.0
$\delta^{310K}$ (//ADMP)	131.9/4.9 <sup>c</sup>	122.8/5.2 <sup>c</sup>	119.7/6.8 <sup>c</sup>	53.6/5.8 <sup>c</sup>	49.1/5.9 <sup>c</sup>	55.7/2.6 <sup>c</sup>	5.2
$\delta^{310K}$ [PCM(H <sub>2</sub> O)//ADMP/PCM(H <sub>2</sub> O)]	134.9/1.9 <sup>c</sup>	124.1/3.9 <sup>c</sup>	124.4/2.1 <sup>c</sup>	63.3/3.9 <sup>c</sup>	54.9/0.1 <sup>c</sup>	63.6/5.3 <sup>c</sup>	2.9
$\delta^{310K}$ [H <sub>2</sub> O//ADMP/BP86(H <sub>2</sub> O)]	134.7/2.1 <sup>c</sup>	124.5/3.5 <sup>c</sup>	125.8/0.7 <sup>c</sup>	59.5/0.1 <sup>c</sup>	52.6/2.4 <sup>c</sup>	64.2/5.9 <sup>c</sup>	2.5
Protein (PI3K) <sup>b</sup>	131.1/5.7 <sup>c</sup>	131.2/3.2 <sup>c</sup>	120.8/5.7 <sup>c</sup>	66.2/6.8 <sup>c</sup>	72.6/17.6 <sup>c</sup>	64.2/5.9 <sup>c</sup>	7.5
$\delta$ Experimental	136.8±0.01 <sup>d</sup>	128.0±0.01 <sup>d</sup>	126.5±0.01 <sup>d</sup>	59.4±0.01 <sup>d</sup>	55.0±0.01 <sup>d</sup>	58.3±0.01 <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Notation ‘level of chemical shift computation//level of geometry optimization or MD simulation.’

<sup>b</sup> Chemical shift computation for two conformations more stable than the benzothiazole complex adopted in the active site of the PI3K enzyme after the docking study

<sup>c</sup> Mean average deviation from experimental

<sup>d</sup> Experimental errors of <sup>13</sup>C.<sup>[65]</sup>

### 3.2. The $^{13}\text{C}$ NMR chemical shift

It is important to analyze how much the geometric, solvent and thermal effects influence the  $^{13}\text{C}$  chemical shift results for the compound **1a** (Fig. 1a). On going from the static equilibrium values to the thermal averages in the gas phase, the changes in the  $\delta(^{13}\text{C})$  values were up to 5.4 ppm for aromatic carbons and up to 3.6 ppm for aliphatic carbons [compare  $\delta_e$ (//BP86) and  $\delta^{310\text{K}}$ (//ADMP) values in Table 2]. For all nuclei, when the dynamic effect is added in gas phase the chemical shifts deviate from experimental results.

To describe the solvent effect in the spectroscopic property of **1a** and **1b** compounds (Fig. 1), in this paper we used some theoretical methodologies that were validated in previous studies, such as: continuum models,<sup>[2,9,42,66]</sup> explicit solvation model<sup>[2,42]</sup> and molecular dynamics (ADMP).<sup>[42]</sup> As a continuum approach, we used the well-known polarizable continuum model (PCM). This method has advantages over earlier, simpler variants, in that the cavity is not limited to spherical or ellipsoidal cases, but it has a realistic shape, and that the electrostatic problem is solved exactly without resorting to truncated multipolar expansions.<sup>[2,67]</sup> The PCM method was applied at two stages, first in the geometry optimization and second during the evaluation of the magnetic shielding constants.<sup>[2,38,68,69]</sup>

In Table 2 it is possible to observe that the chemical shift values for the aromatic carbons suffered a little variation in different environments, the difference between them never exceed 1.3 ppm and for the aliphatic carbons this difference reached up to 12 ppm for C-12 {compare  $\delta_e$ (//BP86) and  $\delta_e$ [//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)]}. This increase in the difference of the chemical shift for the aliphatic carbons can be explained by variation in geometry for optimized structure in vacuum and with solvent. As can be analyzed in Figure 2A for structure optimized in vacuum, the aromatic ring N10 approximates H24 to form

a specific hydrogen interaction, this approximation causes a higher electronic density close to C12, C15 and C18 leaving the nuclei more shielded, noticeably decreasing the chemical shift values when compared to optimized geometry with solvent, i.e. the presence of solvent prevents this intra-molecular interaction (Fig. 2B).

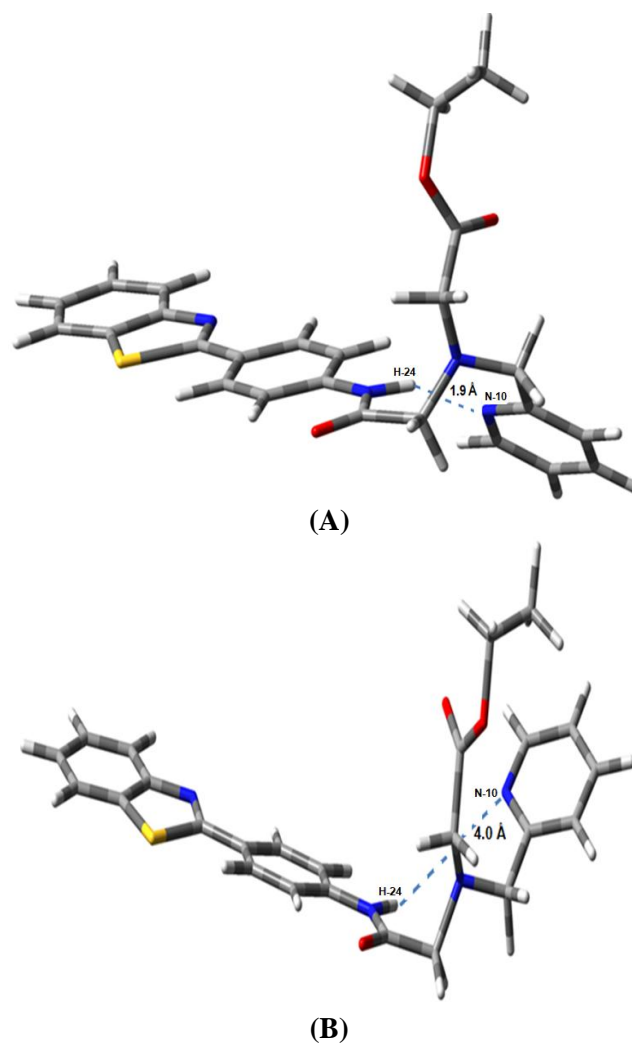


Figure 2 Geometry for compound 1a, (A) structure in vacuum and (B) structure in solution

As shown previously, we found changes of about 1.3 ppm for the aromatic carbons, on going from the gas-phase geometry to the optimized in a continuum with the dielectric parameters of water {compare  $\delta_e$ (//BP86) and  $\delta_e$ [//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)] entries in Table 2}. On the other hand, when the solvent effect is, in addition, introduced in the NMR calculation, the differences increased about 2.6 ppm for C40 {compare  $\delta_e$ (//BP86) and  $\delta_e$ [PCM(H<sub>2</sub>O)//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)] values}. It was observed that when the implicit solvent effect is introduced in the NMR calculation, the aromatic carbon chemical shift values increased, thus getting close to experimental results.

Regarding the aliphatic carbons, Table 2 shows that for the equilibrium chemical shifts, we found changes of about 12 ppm, on going from the optimized in a continuum with the dielectric parameters of water to the gas-phase geometry {compare  $\delta_e$ (//BP86) and  $\delta_e$ [//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)] entries in Table 2}. On the other hand, when the solvent effect is, in addition, introduced in the NMR calculation, the differences decrease about 11 ppm for C12 {compare  $\delta_e$ (//BP86) and  $\delta_e$ [PCM(H<sub>2</sub>O)//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)] values}. Thus, for the aliphatic carbons when the implicit solvent effect is introduced in the NMR calculation, the chemical shifts increased and deviated slightly from experimental results. This can be explained by the indirect effect of solvent in the system, causing the geometry to depart from the average conformation in solution, thus justifying a deviation in the values of chemical shifts when compared with the experimental results. However, when the implicit solvent effects were introduced in the NMR calculation, a better agreement between experiment and theoretical results was observed {compare  $\delta_e$ [//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)] and  $\delta_e$ [PCM(H<sub>2</sub>O)//BP86/PCM(H<sub>2</sub>O)] entries in Table 2}, which it is in agreement with recent studies in the literature involving NMR spectroscopy in solution.<sup>[42,</sup>

As observed, the solvent effect is most pronounced for C40 that is close to the N46 (Fig. 1a) that presents lone pairs of electrons and can form specific interactions with the solvent, in particular, it can act as a hydrogen-bond, making this nucleus deshielded and interfering in the chemical shift values of aromatic carbons. Even though the N11 (Fig. 1a), which is close to the aliphatic carbons, also presents a lone pair of electrons, it is connected to bulky groups that can present steric hindrance, causing a disadvantage regarding the interaction with solvent, which can in principle justify lesser impact of the solvent effect on C12. However, this effect cannot be realistically modeled in a PCM approach, and solvent molecules were included (explicit solvent) in the system (Fig. 3), in order to analyze the effect of explicit solvent on the geometry optimization and during the evaluation of the magnetic shielding constants.

For the  $\delta(^{13}\text{C})$  in the presence of water molecules, we found changes of about 1.4 ppm and 8.3 ppm for aromatic carbons and aliphatic carbons, respectively, on going from the optimized with explicit solvent to gas-phase geometry {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e(\text{//BP86/H}_2\text{O})$  data in Table 2}. When the explicit solvent effect is, in addition, introduced in the NMR calculation, the differences increase to about 3.8 ppm for C40 and 7.8 ppm for C18 {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e(\text{H}_2\text{O//BP86/H}_2\text{O})$  values}. Comparing the two solvation models (explicit and PCM) it was found that in most cases (C6, C28, C40 and C18) the chemical shift values using the continuum model fit slightly better to the experimental data {compare  $\delta_e(\text{H}_2\text{O//BP86/H}_2\text{O})$  and  $[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})\text{//BP86/PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  data in Table 2}. This suggests that the PCM approach can offer a reasonable description of the compound **1a** structure in solution. This fact shows that the explicit positioning of water molecules in the system has a great influence on the values of chemical shifts. In fact, the fluctuation of those water molecules around the ligand plays an important role

for NMR parameters in solution. Based on this context, we have performed calculation to evaluate the dynamic effect.

When the dynamic effects are included for the continuum model, all nuclei are noticeably shielded, up to 3.9 ppm for the aromatic carbons and up to 4.6 ppm for the aliphatic carbons {compare  $\delta_e[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})//\text{BP86}/\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  and  $\delta^{310\text{K}}[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})//\text{ADMP}/\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  values in Table 2}. We observed that the dynamic effect was more significant for the C12, C15, C18, i.e. when the dynamic effects are included for this continuum model, the chemical shift values for aliphatic carbons decreases and become close to experimental results {compare  $\delta_e[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})//\text{BP86}/\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  and  $\delta^{310\text{K}}[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})//\text{ADMP}/\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  values in Table 2}. This was expected, since the aliphatic carbons exhibit a greater degree of freedom to move compared to aromatic carbons. Similarly occurred in the presence of explicit water molecules when the dynamic effect was introduced into the NMR calculation, the chemical shift values for aliphatic carbons (C12, C18) decreases and become close to experimental results {compare  $\delta_e(\text{H}_2\text{O})//\text{BP86}/\text{H}_2\text{O}$  and  $\delta^{310\text{K}}[\text{H}_2\text{O}//\text{ADMP}/\text{BP86}(\text{H}_2\text{O})]$  values in Table 2}.

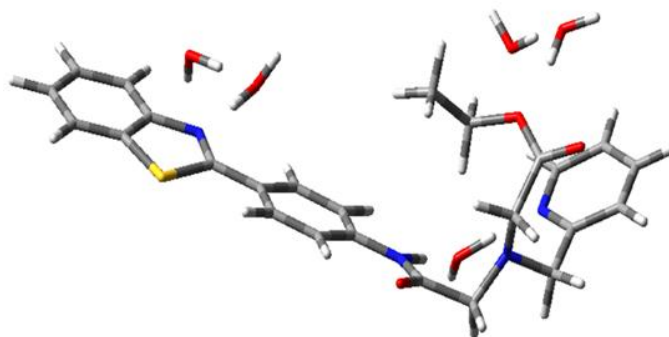


Figure 3 Geometry of compound 1a with explicit solven

### 3.3. The $^{99}\text{Tc}$ NMR chemical shift

The  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -phenylbenzothiazole complex (Fig. 1b) is a radiopharmaceutical which has been used in the field of nuclear medicine.<sup>[8,10]</sup> According to Tzanopoulou *et al.* the Complex **1b** is a potential candidate for imaging ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), facilitating the diagnosis against breast cancer.<sup>[10]</sup>

In view of that, we have performed NMR calculations evaluating thermal and solvent effects on the Complex **1b** (Fig. 1b). The corresponding  $\sigma$  values are collected in Table 3, in the gas phase at equilibrium and thermal average. Table 4 presents the  $^{99}\text{Tc}$  chemical shift results (ppm) for Complex **1b** computed at the GIAO–BPW91/II.

Table 3 Absolute  $^{99}\text{Tc}$  shielding (ppm) for  $\text{TcO}_4^-$

Level of approximation <sup>a</sup>	$^{99}\text{Tc}$
$\sigma_e$ (//BP86)	-1995.34
$\sigma^{310\text{K}}$ (//ADMP)	-2412.35

<sup>a</sup> Notation ‘level of shielding computation//level of geometry optimization or MD simulation.’



Table 4  $^{99}\text{Tc}$  NMR chemical shifts (ppm) for benzothiazole Complex (**1b**), computed at the GIAO–BPW91/aug-cc-pVTZ

Level of approximation <sup>a</sup>	$^{99}\text{Tc}$
$\delta_e$ (/BP86)	-1067.49
$\delta_e$ [/BP86/PCM(H <sub>2</sub> O)]	-1000.02
$\delta_e$ (/BP86/H <sub>2</sub> O)	-1024.94
$\delta_e$ [PCM(H <sub>2</sub> O)//BP86/PCM(H <sub>2</sub> O)]	-1043.21
$\delta_e$ (H <sub>2</sub> O//BP86/H <sub>2</sub> O)	-1231.20
$\delta^{310\text{K}}$ (/ADMP)	-1246.86
$\delta^{310\text{K}}$ [PCM(H <sub>2</sub> O)//ADMP/PCM(H <sub>2</sub> O)]	-1451.88
$\delta^{310\text{K}}$ [H <sub>2</sub> O//ADMP/BP86(H <sub>2</sub> O)]	-1429.78
Protein (PI3K) <sup>b</sup>	-769.42

<sup>a</sup> Notation 'level of chemical shift computation//level of geometry optimization or MD simulation.'

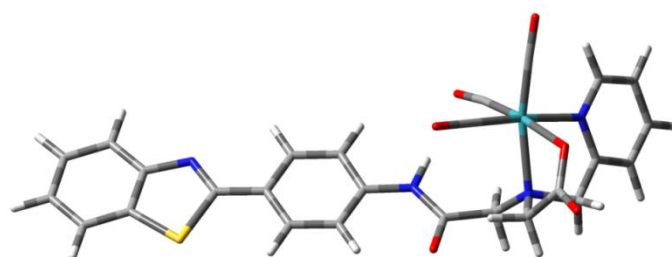
<sup>b</sup> Chemical shift computation for two conformations more stable than the benzothiazole complex adopted in the active site of the PI3K enzyme after the docking study.

It is important to notice that in 2008, Bühl and Golubnychiy<sup>[9]</sup> conducted studies with some  $^{99}\text{Tc}$  complexes, in particular, with the  $\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{MeCN})_3$  complex, in which the  $^{99}\text{Tc}$  shows a coordination site similar to Complex **1b** in the current study (Fig. 1b). The experimental value of  $\delta(^{99}\text{Tc})$  for the  $\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{MeCN})_3$  complex is -1098 ppm.<sup>[9,73]</sup> The  $\delta(^{99}\text{Tc})$  values obtained for Complex **1b** (Table 4) were close to this experimental result, again validating the calculation methodology used. The theoretical result of  $\delta(^{99}\text{Tc})$  obtained by Bühl and Golubnychiy<sup>[9]</sup> for the  $\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{MeCN})_3$  complex using the method

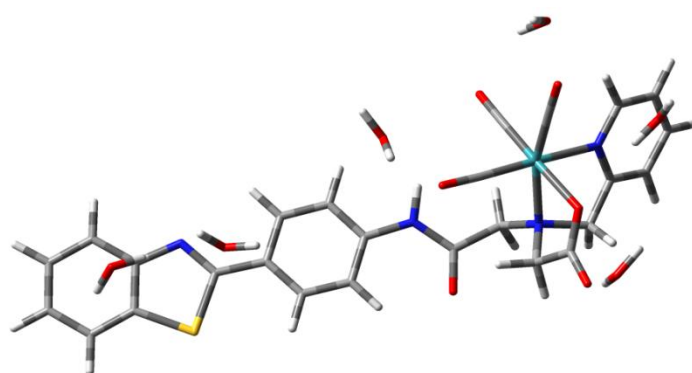
GIAO-BPW91/BP86 was -1397 ppm in vacuum. This result is also close to the  $^{99}\text{Tc}$  chemical shifts obtained in this study for Complex **1b** in vacuum (Table 4).

Evaluating the geometric effect on the chemical shifts of  $^{99}\text{Tc}$ , in Table 4 it is possible to observe that the  $\delta$  values suffered a variation of 68 ppm for optimized structure in vacuum and with implicit solvent (PCM), {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e[\text{//BP86/PCM}(\text{H}_2\text{O})]$ }. When the explicit solvation model is introduced during the geometry optimization the difference in the chemical shift values decreases up to 43 ppm {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e(\text{//BP86/H}_2\text{O})$  data in Table 4}. This large difference in the chemical shift values for optimized geometry in the vacuum and with solvent (Figure 4) was to be expected, since according to the literature, the  $\delta(^{99}\text{Tc})$  values are very sensitive to slight variation in geometric and electronic parameters.<sup>[9]</sup>

In Table 5 are shown the optimized geometrical parameters and the binding energy values for the  $^{99}\text{Tc}$  complex with the explicit water molecule (Figure 4B). The theoretical result of binding energy complex-water with BSSE was the -56.41 kcal/mol (Table 5), this result indicate that the studied complex can form hydrogen bonds with the water molecules (Figure 4B).



(A)



(B)

Figure 4 Geometry for Complex 1b, (A) structure in vacuum and (B) more stable structure in solution

Table 5 Optimized geometrical parameters and binding energy for Tc complex in solution, bond lengths and energy values with BSSE correction

<b>Parameter</b>	<b>BP86/LanL2dz (Å)</b>
Tc – C	1.91
Tc – C	1.90
Tc – C	1.91
Tc – N	2.27
Tc – N	2.20
Tc – O	2.15
<b>Binding</b>	<b>Binding energy (kcal/mol)</b>
Complex-water	-56.41

To evaluate the solvent effect on the  $\delta(^{99}\text{Tc})$  the polarizable continuum (PCM) and explicit solvation models were applied during the magnetic shielding constant calculations.

As shown previously, we found changes of about 68 ppm for the  $^{99}\text{Tc}$ , on going from the gas-phase geometry to the optimized in a continuum with the dielectric parameters of water {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e[\text{//BP86/PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  entries in Table 4}. On the other hand, when the implicit solvent effect is introduced in the NMR calculation, the differences decreased about 24 ppm {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})\text{//BP86/PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  values in Table 4}. When the water molecules were introduced explicitly in the NMR calculation, the difference in the  $\delta(^{99}\text{Tc})$  values increases from 43 ppm {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e(\text{//BP86/H}_2\text{O})$  data in Table 4} to 164 ppm {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta_e(\text{H}_2\text{O}\text{//BP86/H}_2\text{O})$  data in Table 4}. This large difference in the chemical shift values indicates that the solvent effect is important during the NMR calculations for the  $^{99}\text{Tc}$ .

We observed a lower  $\delta(^{99}\text{Tc})$  value for the explicit solvation model when compared to the PCM model {compare  $\delta_e(\text{H}_2\text{O}\text{//BP86/H}_2\text{O})$  and  $\delta_e[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})\text{//BP86/PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  data in Table 4}. This was expected since the

explicit presence of water molecules in the system increases the electronic density around the  $^{99}\text{Tc}$ , leaving the nucleus noticeably more shielded (see Fig. 4B).

Another important point evaluated was the contribution of dynamic effects to the  $^{99}\text{Tc}$  chemical shift. We observed that when the dynamic effect is introduced in gas phase, the chemical shift value decreased up to 179 ppm, on going from the static equilibrium values to the thermal averages in the gas phase {compare  $\delta_e(\text{//BP86})$  and  $\delta^{310\text{K}}(\text{//ADMP})$  values in Table 4}. On the other hand, when the dynamic effect is introduced in solution the chemical shift value decreases up to 409 ppm, on going from the static equilibrium values to the thermal averages in the solution {compare  $\delta_e[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})\text{//BP86}/\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  and  $\delta^{310\text{K}}[\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})\text{//ADMP}/\text{PCM}(\text{H}_2\text{O})]$  values in Table 4} and also decreases in the presence water molecules, up to 199 ppm, on going from the thermal averages to static equilibrium in the solution {compare  $\delta_e(\text{H}_2\text{O})\text{//BP86}/\text{H}_2\text{O})$  and  $\delta^{310\text{K}}[\text{H}_2\text{O}\text{//ADMP}/\text{BP86}(\text{H}_2\text{O})]$  values in Table 4}. When the dynamic effect was introduced in solution, the values  $\delta(^{99}\text{Tc})$  decreases more significantly. As expected, the thermal averaging is more pronounced than solvent effect. This can be explained by the indirect effect of solvent in the system, since the Tc atom is not coordinate with water molecules (see Figure 4B). However, it is noteworthy to observe that both solvent and thermal effects were important during the NMR calculations for the  $^{99}\text{Tc}$ .

### 3.4 The $^{99}\text{Tc}$ and $^{13}\text{C}$ NMR chemical shifts in the PI3K enzyme active site

Initially, from the docking calculation, it was possible to verify how the Complex **1b** (Fig. 1b) was positioned, taking into account the overlap and orientation of the rings, inside the active site, with respect to the active ligand (benzothiazol derived) (Fig. 5).

Another important aspect investigated was the hydrogen bonds that Complex **1b** performs within the active site. As we can see in Figure 6A, the Complex **1b** forms hydrogen bonds with the Lys800, Thr827 and Val882 amino acids. The active ligand also performs hydrogen interactions with the Val882 residue of the amino acid (Fig. 6B) and presents intermolecular interaction energy equal to  $-126.12 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Therefore from our docking studies, we can suggest that Complex **1b** interacts, as well as the active ligand, in the PI3K active site, with an intermolecular interaction energy value equal to  $-153.04 \text{ kcal mol}^{-1}$ . This theoretical result of intermolecular interaction energy indicates a greater stability of the Complex **1b** in the active site of the enzyme when compared to the active ligand (Fig. 6C). However, it should be kept in mind that the preliminary results do not take into account pharmacokinetic proprieties. Thus, additional *in vitro* testing are fundamental to evaluate the affinity of this complex in the PI3K active site.

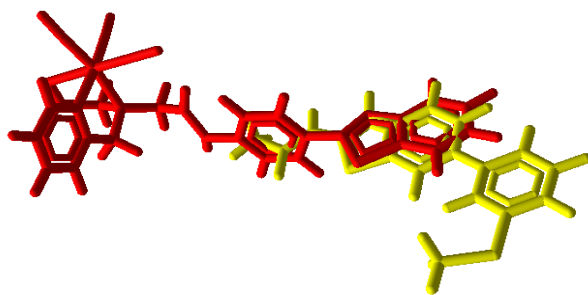


Figure 5 Complex 1b (red) docked in the active site of PI3K, the active ligand shown in yellow

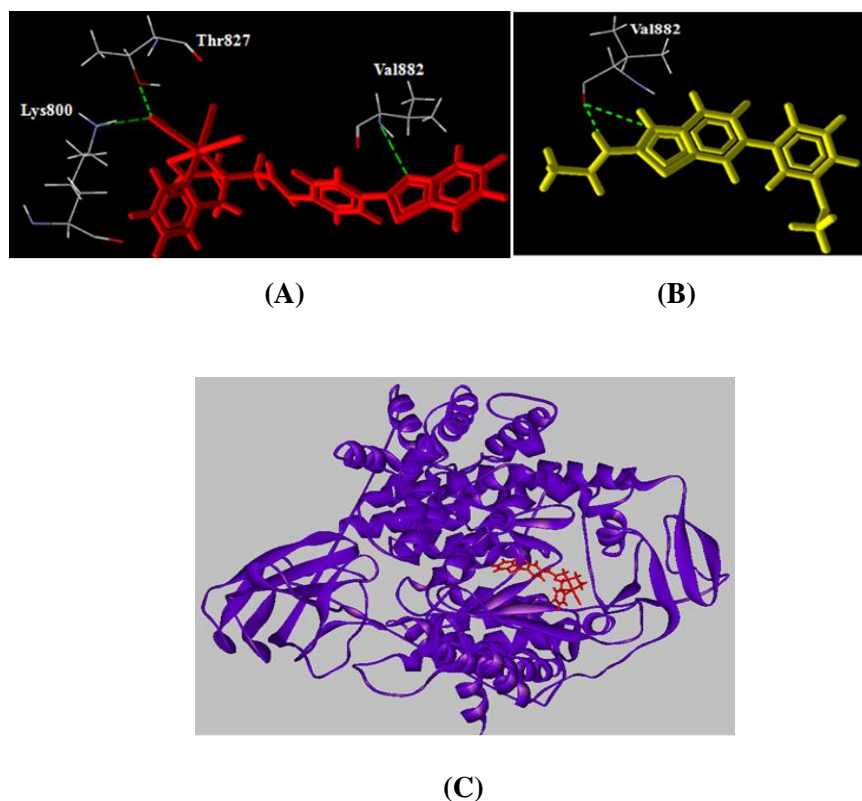


Figure 6 Complex **1b** (A, C) and crystal (B) docked in PI3K active site

Now, in order to investigate the possibility of using  $^{99}\text{Tc}$  NMR parameters to probe structural modifications in biomolecules, we have obtained  $^{13}\text{C}$  and  $^{99}\text{Tc}$  chemical shifts using theoretical approaches for the Complex **1b** inside the PI3K active site. The obtained values for the chemical shift were compared in order to shed some light on the behavior of this nucleus in different environments (Tables 2 and 4). On going from the vacuum and solution to the protein environment, the concomitant effects on  $\delta(^{99}\text{Tc})$  values were considerable, for instance -1246.86; -1429.78 and -769.42 ppm, respectively (Table 4).

The same behavior is not observed for the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift. Indeed, Table 2 shows a slight variation in the  $\delta(^{13}\text{C})$  values in different environments: protein, solution and vacuum. As expected, the  $^{13}\text{C}$  nucleus behaves similar to NMR parameters in different chemical environments. In line with this result,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy could not be used as an efficient technique to probe the structural modification in biomolecules.

On the other hand, for the  $^{99}\text{Tc}$ , it was possible to observe a significant variation in  $\delta(^{99}\text{Tc})$  values in different environments (Table 4).

Our theoretical findings indicate that the use of  $^{99}\text{Tc}$  instead of its isotope,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , in phenylbenzothiazole complexes opens opportunities to employ NMR spectroscopy as a probe to investigate structural modifications in biomolecules.

Based on this context, this work reveals the importance of using  $^{99}\text{Tc}$  in phenylbenzothiazole complexes for the dual application in nuclear medicine: diagnosis and treatment.



## 4 CONCLUSION

The GIAO-DFT method (functional BPW91 and the IGLO-II basis set) presents a realistic description of the system (compound **1a** in different environments: vacuum, solution, thermal), since a good agreement was observed between theoretical and the experimental results for  $^{13}\text{C}$  chemical shifts.

Furthermore, it was possible to theoretically determine the  $^{99}\text{Tc}$  chemical shifts for the Complex **1b**. Thermal and solvent effects were studied computationally by quantum-chemical methods. It was observed that these effects are important for  $^{99}\text{Tc}$  chemical shift calculations.

It is well-known that the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  isotope is unstable<sup>[19]</sup> and the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  complex (Fig. 1b) is, then, synthesized on a low-scale, hindering the structural characterization (NMR spectroscopy). It is also worth noting that experimental data of  $^{99}\text{Tc}$  NMR spectroscopy are very scarce in the literature. However, our theoretical findings point out that this technique, due to its high sensitivity, can be promising for investigation of the chemical structure at the molecular level in different environments. We hope that our results will stimulate new experimental and theoretical investigations that could assess the validity of this assumption.

### Acknowledgments

We thank the Brazilian agencies FAPEMIG, CAPES and CNPq for funding part of this work.

### REFERENCES

- [1] B. Dunn. *Nature*. **2012**, 483, S2.
- [2] T. C. Ramalho, M. Bühl. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43, 139.
- [3] E. R. C. G. N. Galvão, L. M. S. Martins, J. O. Ibiapina, H. M. Andrade, S. J. H. Monte. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **2011**, 137, 915.
- [4] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward, *CA. Cancer. J. Clin.* **2010**, 60, 277.
- [5] S. Liu. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1347.
- [6] U. Eberlein, J. H. Bröer, C. Vandevoorde, P. Santos, M. Bardiès, K. Bacher, D. Nosske, M. Lassmann. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2011**, 38, 2269.
- [7] T. Efferth, P. Langguth, *Radiat. Oncol.* **2011**, 6, 1.
- [8] S. Tzanopoulou, I. C. Pirmettis, G. Patsis, M. Paravatou-Petsotas, E. Livaniou, M. Papadopoulos, M. Pelecanou. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5408.
- [9] M. Bühl, V. Golubnychiy. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, 46, S36.
- [10] S. Tzanopoulou, M. Sagnou, M. Paravatou-Petsotas, E. Gourni, G. Loudos, S. Xanthopoulos, D. Lafkas, H. Kiaris, A. Varvarigou, I. C. Pirmettis, M. Papadopoulos, M. Pelecanou. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4633.
- [11] T. D. Bradshaw, A. D. Westwell. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 1241.
- [12] T. D. Bradshaw, M. F. G. Stevens, A. D. Westwell. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 203.
- [13] M. S. Chua, D. F. Shi, S. Wrigley, T. D. Bradshaw, I. Hutchinson, P. N. Shaw, D. A. Barrett, L. A. Stanley, M. F. G. Stevens. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 381.

- [14] D. F. Shi, T. D. Bradshaw, S. Wrigley, C. J. McCall, P. Lelieveld, I. Fichtner, M. F. G. Stevens. *J. Med. Chem.* **1996**, *37*, 3375.
- [15] A. G. Bader, S. Kang, L. Zhao, P. K. Vogt. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, *5*, 921.
- [16] L. C. Cantley. *Science.* **2002**, *296*, 1655.
- [17] I. Vivanco, C. L. Sawyers. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**, *2*, 489.
- [18] H. Zhang, D. Chen, J. Ringler, W. Chen, Q. C. Cui, S. P. Ethier, Q. P. Dou, G. Wu. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 3996.
- [19] U. Abram, R. Alberto. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1486.
- [20] M. Pelecanou, K. Chryssou, C. I. Stassinopoulou. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *79*, 347.
- [21] M. Sagnou, S. Tzanopoulou, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, H. Braband, R. Alberto, I. C. Pirmettis, M. Papadopoulos, M. Pelecanou. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *27*, 4279.
- [22] J. F. Valliant, R. W. Riddoch, D. W. Hughes, D. G. Roe, T. K. Fauconnier, J. R. Thornback. *Inorg. Chim. Acta.* **2001**, *325*, 155.
- [23] V. P. Tarasov, B. Yu. Muravlev, K. E. German, N. N. Popova. *Dokl. Phys. Chem.* **2001**, *377*, 71.
- [24] Y. Tooyama, H. Braband, B. Spinler, U. Abram, R. Alberto. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 257.
- [25] N. I. Gorshkov, A. A. Lumpov, A. E. Miroslovov, V. A. Mikhalev, D. N. Suglobov. *Czech. J. Phys.* **2003**, *53*, A745.
- [26] K. J. Franklin, C. J. L. Lock, B. G. Sayer, G. J. Schrobilgen. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5303.
- [27] K. J. Ooms, V. V. Terskikh, R. E. Wasylshen. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6704.
- [28] K. W. Zilm, J. C. Duchamp. In Nuclear Magnetic Shieldings and Molecular Structure, J. A. Tossel (ed). NATO ASI Series C386. Kluwer: Dordrecht, 1993, p 315.

- [29] M. Kaupp, M. Bühl, V. G. Malkin (eds). Calculation of NMR and ESR Parameters. Theory and Applications. Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
- [30] M. Bühl, M. Kaupp, O. L. Malkina, V. G. Malkin. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 91.
- [31] M. Bühl. *Theor. Chem. Acc.* **2002**, *107*, 336-342.
- [32] T. Helgaker, M. Jaszuński, K. Ruud. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 293.
- [33] T. Helgaker, M. Pecul, In Calculation of NMR and ESR Parameters. Theory and Applications, M. Kaupp, M. Bühl, V. G. Malkin (eds) Wiley-VCH: Weinheim 101 (2004).
- [34] (a) A. D. Becke. *Phys. Rev. A.* **1988**, *38*, 3098; (b) J. P. Perdew. *Phys. Rev. B.* **1986**, *33*, 8822; (c) J. P. Perdew. *Phys. Rev. B.* **1986**, *34*, 7406.
- [35] T. M. Cances, B. Mennucci, J. Tomasi. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032.
- [36] V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 404.
- [37] M. Cossi, V. Barone, B. Mennucci, J. Tomasi. *J. Chem. Phys.* **1998**, *286*, 253.
- [38] M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, V. Barone. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 43.
- [39] G. Tevelde, F. M. Bickelhaupt, E. J. Baerends, C. F. Guerra, S. J. A. Van Gisbergen, J. G. Snijders, T. Ziegler. *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 931.
- [40] S. S. Iyengar, H. B. Schlegel, G. A. Voth. *J. Phys. Chem. A.* **2003**, *107*, 7269.
- [41] M. Pecul, J. Lewandowski, J. Sadlej. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *333*, 139.
- [42] T. C. Ramalho, D. H. Pereira, W. Thiel. *J. Phys. Chem. A.* **2011**, *115*, 13504.
- [43] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao,

H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004, Gaussian 09, Revision C.02.

[44] (a) J. P. Perdew, In *Electronic Structure of Solids* (Eds: P. Ziesche, H. Eischrig), Akademie Verlag: Berlin, **1991**; (b) J. P. Perdew, Y. Wang. *Phys. Rev. B.* **1992**, *45*, 13244.

[45] <<https://bse.pnl.gov/bse/portal>> (a) D. Feller. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 1571; (b) K. L. Schuchardt, B. T. Didier, T. Elsethagen, L. Sun, V. Gurumoorthi, J. Chase, J. Li, T. L. Windus. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 1045.

[46] W. Kutzelnigg, U. Fluscher, M. Schindler, 1999 *The IGLO-Method Ab Initio Calculation and Interpretation of NMR Chemical Shift and Magnetic Susceptibilities* vol 23 (Heidelberg: Springer).

[47] J. C. Facelli. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *58*, 176.

[48] N. R. Jonsdottir, Á. Kvaran, S. Jonsdottir, I. Arnason, R. Bjornsson. *Struct. Chem.* **2013**, *24*, 769.

[49] T. Kupka, M. Stachów, M. Nieradka, J. Kaminsky, T. Pluta, S. P. A. Sauer. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 231.

[50] R. Ditchfield. *Mol. Phys.* **1974**, *27*, 789.

[51] K. Wolinski, J. F. Hilton, P. Pulay. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251.

[52] E. J. Borkowski, M. A. Alvarez, F. D. Suvire, R. D. Enriz. *Open Nat. Prod. J.* **2012**, *5*, 1.

- [53] R. B. Nazarski. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, DOI 10.1007/s10847-013-0298-x.
- [54] J. K. Franklin, J. L. Lock, B. G. Sayer, G. J. Schrobilgen. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5303.
- [55] W. J. Hehre, B. J. Deppmeier, P. E. PC SPARTAN Pro.Wavefunction, Inc., Irvine (1999).
- [56] N. D. D. Angelo, T. S. Kim, K. Andrews, S. K. Booker, S. Caenepeel, K. Chen, D. D. Amico, D. Freeman, J. Jiang, L. Liu, J. D. McCarter, T. S. Miguel, E. L. Mullady, M. Schrag, R. Subramanian, J. Tang, R. C. Wahl, L. Wang, D. A. Whittington, T. Wu, N. Xi, Y. Xu, P. Yakowec, K. Yang, L. P. Zalameda, N. Zhang, P. Hughes, M. H. Norman. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1789.
- [57] R. Thomsen, M. H. Christensen. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315.
- [58] D. T. Mancini, K. S. Matos, E. F. F. Cunha, T. M. Assis, A. P. Guimarães, T. C. C. França, T.C. Ramalho. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, *30*, 125.
- [59] E. F. F. da Cunha, D. T. Mancini, T. C. Ramalho. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 590.
- [60] A. P. Guimarães, T. C. C. França, T. C. Ramalho, M. N. Renno, E. F. F. da Cunha, K. S. Matos, D. T. Mancini, K. Kuca. *J. Appl. Biomed.* **2011**, *9*, 163.
- [61] A. P. Guimarães, T. C. C. França, A. A. Oliveira, E. F. F. da Cunha, T. C. Ramalho. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, *28*, 455.
- [62] K. S. Matos, D. T. Mancini, E. F. F. da Cunha, K. Kuca, T. C. C. França, T. C. Ramalho. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1999.
- [63] T. C. Ramalho, M. S. Caetano, D. Josa, G. H. Pereira, E. A. Freitas, E. F. F. da Cunha. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, *28*, 907.
- [64] R. Abagyan, M. Totrov. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 983.
- [65] S. Hayashi, M. Yanagisawa, K. Hayamizu. *Analytical Sciences.* **1991**, *7*, 955.

- [66] M. V. de Almeida, J. V. de Assis, M. R. C. Couri, C. P. A. Anconi, M. C. Guerreiro, H. F. dos Santos, W. B. de Almeida. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5458.
- [67] M. Cossi, O. Crescenzi. *J. Chem. Phys.* **2003**, *19*, 8863.
- [68] D. Cremer, L. Olsson, F. Reichel, E. Kraka. *Isr. J. Chem.* **1993**, *33*, 369.
- [69] B. Mennucci, J. M. Martínez, J. Tomasi. *J. Phys. Chem. A.* **2001**, *105*, 7287.
- [70] T. Pawlak, M. L. Munzarová, L. Pazderski, R. Marek. *J. Chem. Theory. Comput.* **2011**, *7*, 3909.
- [71] T. M. Alam, D. Hart, S. L. B. Rempe. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13629.
- [72] H. J. Tan, R. P. A. Bettens. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7541.
- [73] P. V. Gundler, L. Helm, R. Alberto, A. E. Merbach. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10378.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível determinar o papel dos diversos ambientes químicos sobre a transferência de prótons no estado excitado do composto HABT e seus efeitos na fluorescência. Os resultados obtidos por simulações DM, utilizando o campo de força CHARMM, mostraram que os resíduos de aminoácidos Glu738, Lys721 e Thr766, bem como algumas moléculas de água, foram importantes para manter a estabilidade do HABT no sítio ativo da enzima TK, realizando ligações de hidrogênio durante todo o tempo simulado. Além disso, os cálculos AIM confirmaram os resultados obtidos na DM.

Em geral, os resultados obtidos pelos cálculos QM/MM no estado fundamental (utilizando método DFT) e no estado excitado (utilizando o método TD-DFT) para as quatro diferentes regiões QM (QM-1 a QM-4) indicaram que pode ocorrer a fluorescência no sítio ativo da TK. Ou seja, os resultados teóricos obtidos neste trabalho salientam que a utilização do composto HABT pode ser uma abordagem promissora e abre a possibilidade de empregar derivados de benzotiazol como um protótipo de sondas fluorescentes em diagnósticos contra o câncer da mama.

Além disso, neste trabalho também foi possível modelar e prever parâmetros experimentais, como o deslocamento químico do núcleo  $^{99}\text{Tc}$ , para o composto ABT complexado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e investigar suas modificações estruturais em diferentes ambientes, avaliando os efeitos térmicos e do solvente. Os resultados teóricos indicam que o uso de  $^{99}\text{Tc}$  em complexos fenilbenzotiazóis abre oportunidades para se utilizar a espectroscopia de RMN como uma sonda espectroscópica para pesquisar modificações estruturais em biomoléculas.

O método DFT apresentou uma descrição realista do sistema, uma vez que foi observada boa concordância dos resultados teóricos obtidos para o



deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  e os resultados experimentais descritos na literatura.

Vale a pena notar que os dados experimentais de espectroscopia de RMN para  $^{99}\text{Tc}$  são muito escassos na literatura. No entanto, nossos dados teóricos mostram que essa técnica pode ser promissora para a investigação estrutural, em âmbito molecular, em diferentes ambientes.

## Anexo

### - Trabalhos desenvolvidos:

*Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*  
Vol. 30, No. 1, 2012, 125–136



#### **Molecular modeling studies on nucleoside hydrolase from the biological warfare agent *Brucella suis***

Daiana T. Mancini<sup>a</sup>, Karina S. Matos<sup>a</sup>, Elaine F.F. da Cunha<sup>a</sup>, Tamiris M. Assis<sup>a</sup>, Ana P. Guimarães<sup>b</sup>, Tanos C.C. França<sup>b\*</sup> and Teodorico C. Ramalho<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Chemistry Department, Federal University of Lavras – Campus Universitário – UFLA, Lavras, Brazil; <sup>b</sup>Laboratory of Molecular Modeling Applied to Chemical and Biological Defense (LMCBD), Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro, Brazil

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

(Received 12 July 2011; final version received 22 December 2011)

*Brucella suis* is a dangerous biological warfare agent already used for military purposes. This bacteria cause brucellosis, a zoonosis highly infective and difficult to fight. An important selective target for chemotherapy against this disease is nucleoside hydrolase (NH), an enzyme still not found in mammals. We present here the first three-dimensional structure of *B. suis* NH (*Bs*NH) and propose this enzyme as a molecular target to the drug design in the fight against brucellosis. In addition, we performed molecular docking studies, aiming to analyze the three-dimensional positioning of nine known inhibitors of *Chritidia fasciculata* NH (*Cf*NH) in the active sites of *Bs*NH and *Cf*NH. We also analyzed the main interactions of some of these compounds inside the active site of *Bs*NH and the relevant factors to biological activity. These results, together with further molecular dynamics (MD) simulations, pointed out to the most promising compound as lead for the design of potential inhibitors of *Bs*NH. Most of the docking and MD results corroborated to each other and the docking results also suggested a good correlation with experimental data.

**Keywords:** *Brucella suis*; nucleoside hydrolase; homology modeling; docking; molecular dynamics

## New Approaches to the Development of Anti-Protozoan Drug Candidates: A Review of Patents

Elaine F. F. da Cunha,\* Teodorico C. Ramalho,\* Daiana T. Mancini,  
 Emanuella M. B. Fonseca and Aline A. Oliveira

Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras-MG, Brazil

As doenças causadas por protozoários afetam hoje em dia uma grande parcela da população mundial, provocando muitas mortes e exercendo grande influência na qualidade de vida e no desenvolvimento de muitos países. Estas doenças afetam principalmente países pobres e por isto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos são negligenciados. De fato, a maioria das drogas usadas no tratamento destas doenças data de décadas passadas e apresentam muitas limitações, incluindo o aparecimento da resistência às drogas. Este artigo tem como foco os mais recentes desenvolvimentos publicados no campo de patentes, entre 2001-2008, com especial atenção a promissores compostos atuando contra tripanossomíase, leishmaniose, malária, toxoplasmose, amebíase, giardíase, balantidíase e pneumocistose.

Protozoan infections are parasitic diseases that affect hundreds of millions of people worldwide, but have been largely neglected for drug development because they affect poor people in poor regions of the world. Most of the current drugs used to treat these diseases are decades old and have many limitations, including the emergence of drug resistance. This review will focus on the most recent developments (2001-2008) published in the field of patents and publications, paying particular attention to promising compounds acting against trypanosomiasis, leishmaniasis, malaria, toxoplasmosis, amebiasis, giardiasis, balantidiasis and pneumocystosis, their chemistry and biological evaluation, and to new chemical and pharmaceutical processes.

Med Chem Res (2012) 21:590-600  
 DOI 10.1007/s00044-011-9554-z

MEDICINAL  
 CHEMISTRY  
 RESEARCH

ORIGINAL RESEARCH

## Molecular modeling of the *Toxoplasma gondii* adenosine kinase inhibitors

Elaine F. F. da Cunha · Daiana Teixeira Mancini ·  
 Teodorico C. Ramalho

Received: 16 March 2010 / Accepted: 5 January 2011 / Published online: 29 January 2011  
 © Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** *Toxoplasma gondii* is the most common cause of secondary central nervous system infection in immunocompromised people such as AIDS patients. Since purine salvage is essential for *T. gondii* and other parasitic protozoa, inhibition of its salvage pathway, by blocking adenosine kinase (EC 2.7.1.20), the main responsible for the metabolism of adenosine (purine nucleoside) can block the parasite growth. Having this in mind, four-dimensional quantitative structure-activity relationship (4D-QSAR) analysis was applied to a series of 41 inhibitors of *T. gondii* adenosine kinase. Optimized 4D-QSAR models were constructed by genetic algorithm (GA) optimization and partial least squares (PLS) fitting, and evaluated by the leave-one-out cross-validation method. Moreover, we have used docking approaches to study the binding orientations and predict the interaction energies of some benzyladenosine

nervous system and causes lethal encephalitis in immunocompromised patients such those with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (Al Safarjania *et al.*, 2007). In spite of the tragic consequences of toxoplasmosis, the therapy for this disease has not changed in the last 20 years (El Kouni *et al.*, 1999). The current treatment consists on combinations of drugs, such as Pyrimethamine (Darprim®), trimethoprim-sulfamethoxazole (Bactrin®), Sulfadiazine (Triglobe®), or Clindamycin (Dalacin®) (Ngo *et al.*, 2000). Newborns with congenital toxoplasmosis are treated for at least a year with a combination of antibiotics. If a woman develops toxoplasmosis during pregnancy, her doctor may prescribe medications to reduce the risk of the child contract congenital toxoplasmosis. These drugs include spiramycin (Rovamicina® Periodontil®), Pyrimethamine, and Sulfadiazine. To decrease the possibility of

**Molecular Aspects of the Reactivation Process of Acetylcholinesterase  
Inhibited by Cyclosarin**

**Karina S. Matos,<sup>a</sup> Daiana T. Mancini,<sup>a</sup> Elaine F. F. da Cunha,<sup>a</sup> Kamil Kuča,<sup>b,c</sup>  
Tanos C. C. França<sup>a,d</sup> and Teodorico C. Ramalho<sup>a,d</sup>**

<sup>a</sup>Chemistry Department, Federal University of Lavras, Lavras-MG, Brazil

<sup>b</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences UO, University of Defence, Czech Republic

<sup>c</sup>University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>d</sup>Laboratory of Molecular Modeling Applied to the Chemical and Biological Defense (LMCBD),  
Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

No presente trabalho foi aplicada uma metodologia teórica desenvolvida em um trabalho anterior que utiliza os programas Molegro<sup>®</sup> e Spartan<sup>®</sup> para avaliar as constantes cinéticas de associação e reativação de oximas, em relação a resultados *in vitro* previamente reportados na literatura. Como observado antes, os resultados mostraram boa correlação entre as energias livres teóricas de ligação das oximas e os dados experimentais, corroborando a metodologia como adequada para a predição de parâmetros cinéticos e termodinâmicos, os quais podem ser úteis para o planejamento e seleção de novas e mais efetivas oximas.

In this work we applied a theoretical methodology developed in a former work, using the Molegro<sup>®</sup> and Spartan<sup>®</sup> softwares, to evaluate the association and kinetic reactivation constants of oximes, facing *in vitro* data previously reported in the literature. As reported before, results showed a good agreement between the theoretical binding free energies of the oximes and experimental data, corroborating the methodology as suitable for the prediction of kinetic and thermodynamic parameters that might be helpful for the design and selection of new and more effective oximes.

ORIGINAL ARTICLE

**Docking studies and effects of *syn-anti* isomery of oximes derived from pyridine imidazol bicycled systems as potential human acetylcholinesterase reactivators**

Ana Paula Guimarães<sup>1,2</sup>, Tanos Celmar Costa França<sup>1</sup>, Teodorico Castro Ramalho<sup>3</sup>,  
Magdalena Nascimento Rennó<sup>3</sup>, Elaine Fontes Ferreira da Cunha<sup>3</sup>, Karina Sílvia Matos<sup>3</sup>,  
Daiana Teixeira Mancini<sup>1</sup>, Kamil Kučá<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Modeling Applied to the Chemical and Biological Defense – Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Chemistry Department – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

<sup>3</sup>Pharmacy Faculty – Federal University of Rio de Janeiro – Campus Macaé, Macaé, RJ, Brazil

<sup>4</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové,

<sup>5</sup>University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Received 15<sup>th</sup> November 2010.

Revised 10<sup>th</sup> February 2011.

Published online 7<sup>th</sup> April 2011.

**Summary**

In order to contribute to a better understanding of the mechanism of action of oximes, we evaluated the affinities of 10 new oximes, derived from pyridine-imidazol bicycled systems, for human acetylcholinesterase (HcAChE) complexed with tabun, by estimating their docking energy values and comparing of the values

## Artigo

**Toxoplasmose: Perspectivas no Estudo de Novos Alvos Terapêuticos**

Mancini, D. T.; Assis, L. C.; Ramalho, T. C.;\* da Cunha, E. F. F.; França, T. C. C.

Rev. Virtual Quim., 2012, 4 (4), 434-455. Data de publicação na Web: 13 de agosto de 2012

<http://www.uff.br/rvq>**Toxoplasmosis: Perspectives on the Study of New Therapeutic Targets**

**Abstract:** *Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite responsible for causing the disease known as toxoplasmosis. This protozoan is easily found in nature and can cause infections in birds and mammals. Currently the toxoplasmosis treatment presents some limitations since the drugs used show low efficiency and can cause serious side-effects. Based on these therapeutic limitations arises the need for design and discovering more potent and selective new drugs against toxoplasmosis. In this context, the computational medicinal chemistry has been used as an important tool in the discovery of new therapeutic targets in the causative agents of several diseases, including toxoplasmosis. This work aims to quickly discuss some new molecular targets such as adenosine kinase, dihydrofolatereductase and thymidylate synthase enzymes, which have been exploited by computational techniques (*docking* and comparative modeling) in order to direct the planning of new drugs against toxoplasmosis.

**Keywords:** Toxoplasmosis; computational chemistry; therapeutic targets.

Hindawi Publishing Corporation  
Journal of Chemistry  
Volume 2013, Article ID 362894, 8 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/362894>

*Research Article*

## Bonding, Structure, and Stability of $[(\text{Na})_n(\text{Phe})_m]^{n+}$ Clusters: Some Surprising Results from an Experimental and Theoretical Investigation in Gas Phase

Melissa S. Caetano,<sup>1</sup> Teodorico C. Ramalho,<sup>1</sup> Tales G. Vieira,<sup>2</sup> Arlan da Silva Gonçalves,<sup>3</sup> Daiana T. Mancini,<sup>1</sup> and Elaine F. F. da Cunha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Federal University of Lavras, Campus Universitário, 37200-000 Lavras, MG, Brazil

<sup>2</sup> UNILAVRAS—Centro Universitário de Lavras, Rua Padre José Poggel 506, Centenário, 37200-000 Lavras MG, Brazil

<sup>3</sup> Chemistry Department, Federal Institute of Education Science and Technology, Estrada da Tartaruga S/N, 29215-090 Bairro Muquiçaba, Guarapari, ES, Brazil

Correspondence should be addressed to Teodorico C. Ramalho; [teo@dqf.ufla.br](mailto:teo@dqf.ufla.br)

Received 1 July 2012; Revised 14 January 2013; Accepted 15 January 2013

Academic Editor: Antonio M. Romero

Copyright © 2013 Melissa S. Caetano et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Structure and stability of  $[(\text{Na})_n(\text{Phe})_m]^{n+}$  clusters in the ground state were analyzed at the theoretical and experimental levels. Our experimental and theoretical findings showed that the  $[(\text{Na})_n(\text{Phe})_m]^{n+}$  clusters in gas phase tend to form mainly planar rings of four members. The symmetry and the small dipole moment in these specific configurations suggested that their stability could be associated with an alignment of the water molecules, maximizing attractive electrostatic interactions caused by changes in the charge distribution of the clusters.