



Universidade Federal do ABC

Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados

***Nanoclusters* de Violaceína: Estudo de Primeiros Princípios**

Telma Zambanini

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Teodoro Arantes Jr.

**Santo André
Março de 2015**

Telma Zambanini

***Nanoclusters* de Violaceína:
Estudo de Primeiros Princípios**

Dissertação apresentada à
Pós-Graduação em Nanociências e
Materiais Avançados da Universidade
Federal do ABC como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em
Nanociências e Materiais Avançados

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Teodoro Arantes Jr.

**Santo André
Março de 2015**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Zambanini, Telma

Nanoclusters de Violaceína : Estudo de Primeiros Princípios / Telma Zambanini — Universidade Federal do ABC, 2015.

155 fls. : il.

Orientador: Jeverson Teodoro Arantes Junior

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC, Programa de Pós Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, Santo André, 2015.


1. violaceína. 2. dímeros de violaceína. 3. estudo de primeiros princípios. 4. teoria do funcional da densidade. I. Arantes Junior, Jeverson Teodoro. II. Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, 2015. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados
Rua Abolição, s/nº – Vila São Pedro – Santo André – SP
CEP 09210-180 · Fone: (11) 4996-0017
ppg.nanomat@ufabc.edu.br

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Telma Zambanini, realizada em 28 de maio de 2015:


Prof.(a) Dr.(a) **Jeverson Teodoro Arantes Junior** (UFABC) – Presidente


Prof.(a) Dr.(a) **Iseli Lourenço Nantes** (UFABC) – Membro Titular


Prof.(a) Dr.(a) **Paula Homem-de-Mello** (UFABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Juliana Marchi** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Mauricio Domingues Coutinho Neto** (UFABC) – Membro Suplente

***Ao meu esposo, companheiro e amigo,
por sua compreensão, apoio e carinho,
durante esta jornada.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu esposo, presente ao meu lado em todos os momentos bons e não tão bons, respeitando minhas ausências e meus momentos de introspecção, sempre incentivando e me apoiando para que eu continuasse no caminho.

Agradeço aos familiares e amigos, por sua compreensão pelos momentos de ausência, lembrando que a distância não afasta os corações.

Aos novos amigos, conquistados durante esta jornada, pelo apoio, pelos ensinamentos e pelo companheirismo.

Aos colegas do grupo de estudos pelas dicas e orientações em momentos oportunos.

Agradeço, em especial, ao meu orientador, professor Jeverson, pelas conversas e pelos momentos em que me direcionou, quando eu começava a me perder em ideias distantes de meu objetivo.

A todos os professores da UFABC, que direta ou indiretamente, participaram de minha formação e me incentivaram nessa jornada.

Ao CENAPAD-Unicamp pelo suporte computacional para a realização deste trabalho.

Finalmente, ao CNPq pelo apoio financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

Nanoclusters de Violaceína:

Estudo de Primeiros Princípios

Telma Zambanini

RESUMO

*A violaceína é um corante de coloração arroxeada, produzido por bactérias do gênero **Chromobacterium**, abundantes em regiões tropicais. Esse pigmento vem sendo estudado nas últimas décadas devido a suas aplicações potenciais em diferentes áreas, destacando-se as aplicações biológicas. Trata-se de uma molécula hidrofóbica que possui tendência de se aglomerar em soluções aquosas, o que se torna um aspecto relevante quando se consideram suas aplicações **in vivo**. Os principais estudos realizados com a violaceína têm sido experimentais, avaliando-se o seu potencial em diversas áreas, porém poucas referências são encontradas sobre estudos teóricos ou semi-empíricos dessa molécula. No presente estudo são realizadas simulações de primeiros princípios, utilizando a teoria do funcional da densidade (DFT – Density Functional Theory) para otimização da molécula de violaceína e para análise de possíveis conformações de dímeros dessa molécula para melhor compreensão do seu processo de aglomeração.*

Palavras chaves: violaceína, dímero de violaceína, análise de primeiros princípios, teoria do funcional da densidade (DFT)

Nanoclusters of Violacein: Study of First Principles

Telma Zambanini

ABSTRACT

*Violacein is a dye purplish, produced by bacteria of the genus **Chromobacterium**, which are abundant in tropical regions. This pigment has been studied in recent decades due to their potential applications in different areas, with emphasis on biological applications. This is a hydrophobic molecule having tendency to agglomerate in aqueous solutions, which becomes an important issue when considering their applications **in vivo**. The main studies of the Violacein have been experimental, evaluating its potential in many areas, but few references are found on theoretical or semi-empirical studies of this molecule. In the present study we performed first principles simulations, using the Density Functional Theory (DFT) to optimize the Violacein molecule and analysis of possible conformations of this dimer molecule to better understanding of their agglomeration process.*

Key words: violacein, violacein dimer, analysis of first principles, density functional theory (DFT)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da violaceína.

Figura 2 – Biossíntese da violaceína e da deoxiviolaceína.

Figura 3 – Capacidade de tingimento da violaceína em: (a) algodão puro; (b) seda pura; (c) rayon puro; (d) rayon jacquard; (e) cetim de seda; (f) algodão; (g) poliéster.

Figura 4 – Palavra “ink” escrita com diferentes composições de tinta com violaceína: (a) 0%p; (b) 0,25%p.; (c) 1,24%p.; (d) 3,05%p.

Figura 5 – Palavras destacadas com diferentes composições de tinta com violaceína: (a) 0%p; (b) 1,98%p.; (c) 1,39%p.; (d) 0,67%p.; (e) 0,67%p.; (f) 0,60%p.

Figura 6 – Sistema supramolecular formado pelo complexo violaceína/ β -ciclodextrina associado à nanopartícula de ouro.

Figura 7 – Principais configurações do dímero de benzeno.

Figura 8 – Esquema do procedimento utilizado na convergência da densidade.

Figura 9 – Função de onda de todos os elétrons sujeitos ao potencial coulombiano (azul) e a pseudofunção de onda correspondente (vermelho).

Figura 10 – Padrão de cores utilizado nos átomos representados nos resultados.

Figura 11 – Energia de corte x Energia do sistema para a molécula de violaceína.

Figura 12 – Níveis eletrônicos da molécula de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Figura 13 – Diferentes vistas da estrutura otimizada da molécula de violaceína.

Figura 14 – Numeração dos átomos da molécula de violaceína.

Figura 15 – Densidade de probabilidade das regiões HOMO e LUMO da molécula de violaceína.

Figura 16 – Primeira conformação proposta.

Figura 17 – Segunda conformação proposta.

Figura 18 – Terceira conformação proposta.

Figura 19 – Quarta conformação proposta.

Figura 20 – Quinta conformação proposta.

Figura 21 – Diferentes vistas da primeira conformação otimizada.

Figura 22 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o primeiro dímero de violaceína, indicando as regiões de HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Figura 23 – Densidade de probabilidade de carga da primeira conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

Figura 24 – Diferentes vistas da segunda conformação otimizada.

Figura 25 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o segundo dímero de violaceína, indicando as regiões de HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Figura 26 – Densidade de probabilidade de carga da segunda conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

Figura 27 – Diferentes vistas da terceira conformação otimizada.

Figura 28 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o terceiro dímero de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Figura 29 – Densidade de probabilidade de carga da terceira conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

Figura 30 – Diferentes vistas da quarta conformação otimizada.

Figura 31 – Geometrias, momentos quadrupolo e distribuição de carga de interações π - π aromáticas típicas.

Figura 32 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o quarto dímero de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Figura 33 – Densidade de probabilidade de carga da quarta conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

Figura 34 – Diferentes vistas da quinta conformação otimizada.

Figura 35 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o quinto dímero de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Figura 36 – Densidade de probabilidade de carga da quinta conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

Figura 37 – Numeração dos átomos da molécula de violaceína.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da energia do sistema para diferentes energias de *cutoff*.

Tabela 2 – Energias da molécula isolada duplicada e dos dímeros de violaceína.

Tabela 3 – Distâncias interatômicas da molécula de violaceína otimizada.

Tabela 4 – Ângulos entre átomos da molécula de violaceína otimizada.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Å – Angstrom

C – carbono

Caco-2, HCT 116, SW 480, DLD-1 e HT 29 – linhagens de células de câncer colorretal (adenocarcinoma colorretal humano)

CCSD(T) - *Coupled-Cluster calculations with Single and Double substitutions with inclusion of noniterative Triple excitations*

CPMD – *Car and Parrinello Molecular Dynamics*

DCACP – *Dispersion Corrected Atom Centered Potentials*

DFT – *Density Functional Theory*

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

EAT – tumores ascíticos de Erlich

EMSL – *Environmental Molecular Sciences Laboratory*

eV – elétron-volt

FRhK-4 – linhagem de células de rim fetal de macaco Rhesus tratadas para cultura do vírus da Hepatite A

GGA – *Generalized Gradient Approximation*

H – hidrogênio

HEp-2 – linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano

MA 104 – linhagem de células de rim fetal de macaco Rhesus

HL60 – linhagem de células de leucemia promielocítica humana

HOMO – highest occupied molecular orbital

IPA – ácido indol-3-pirúvico

LDA – *Local Density Approximation*

LUMO – lowest unoccupied molecular orbital

N – nitrogênio

O – oxigênio

PCL – poli(ϵ -caprolactona)

PHBV – poli-(3-hidroxibuterato-co-3-hidroxivalerato)

PLGA – poli(lactídeo-co-glicolídeo)

Ry – Rydeberg

TF1 – linhagem de células de eritroleucemia

TNF – fator de necrose tumoral

V79 – linhagem de células de fibroblastos de Hamster chinês

VERO – linhagem de células epiteliais do rim do macaco verde africano

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	i
<i>Abstract</i>	iii
<i>Lista de figuras</i>	v
<i>Lista de tabelas</i>	ix
<i>Lista de símbolos, siglas e abreviaturas</i>	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Motivação.....	3
1.2. Referencial teórico	6
1.2.1. Sistemas nanoestruturados	6
1.2.2. Violaceína e sua biossíntese	7
1.2.3. Violaceína e suas aplicações	11
1.2.4. Violaceína e seus dímeros	17
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivos gerais	23
2.2. Objetivos específicos	24
3. Métodos.....	25
3.1. Conceitos iniciais	27
3.2. Teoria do funcional da densidade	31
3.3. Potencial de troca-correlação	36
3.4. Teoria do pseudopotencial.....	39
3.5. Potenciais de correção de dispersão - DCACP.....	43
3.6. Metodologia.....	46
4. Resultados.....	49
4.1. Molécula de violaceína.....	51

4.2. Propostas para os dímeros de violaceína	57
4.2.1. Primeira conformação.....	60
4.2.2. Segunda conformação.....	66
4.2.3. Terceira conformação.....	70
4.2.4. Quarta conformação	75
4.2.5. Quinta conformação	82
4.2.6. Visão geral sobre os dímeros	87
5. Conclusão.....	89
5.1. Conclusão e perspectivas	91
6. Anexos.....	95
6.1. Atividades biológicas da violaceína.....	97
6.2. Distâncias interatômicas e ângulos entre os átomos da violaceína ..	112
Referências bibliográficas	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. MOTIVAÇÃO

Os produtos naturais provenientes de plantas ou de microrganismos têm atraído cada vez mais interesse, pois representam uma fonte de produtos farmacêuticos, corantes, enzimas entre outras utilizações, algumas ainda inexploradas (REIS *et al.*, 2002).

Dentre os produtos naturais que vem sendo estudados nas últimas décadas está a violaceína, um pigmento arroxeado produzido por bactérias do gênero *Chromobacterium* que tem atraído um crescente interesse, principalmente devido as suas importantes atividades biológicas e potencial farmacológico. Entre as atividades biológicas apresentadas por esse pigmento, podem ser citadas atividades antitumoral, antibacteriana, antimicobacteriana, antimicótica, antiviral, antiparasitária, entre outras (DURÁN *et al.*, 2007).

A violaceína é biossintetizada a partir de duas moléculas de L-triptofano e consiste de três unidades estruturais: 5-hidroxiindol (lado esquerdo), oxiindol (lado direito) e um núcleo 2-pirrolidona (parte central), conforme pode ser observado na Figura 1 (MOMEN e HOSHINO, 2000; HOSHINO, 2011).

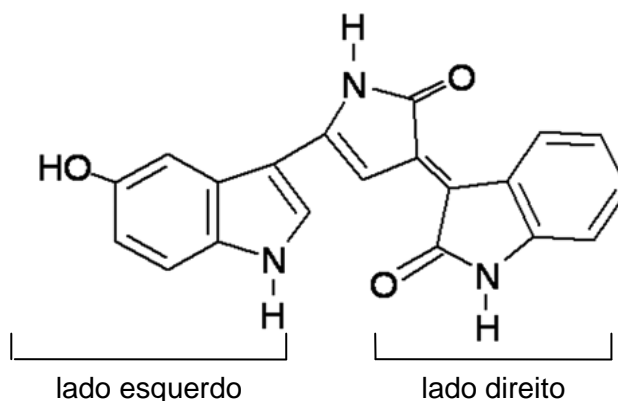


Figura 1 – Estrutura da violaceína.

Fonte: Adaptado de Momen e Hoshino

A violaceína, assim como outros produtos naturais que vem sendo estudados, é pouco solúvel em água (DURÁN *et al.*, 2007). Em termos de seu potencial biológico, essa baixa solubilidade representa um problema na seleção de novos compostos para atividades farmacológicas, no desenvolvimento de formulações e testes clínicos (MÜLLER e JUNGHANNS, 2006), pois essas moléculas tendem a agregar-se na presença de água para alcançar um estado energeticamente mais favorável, o que diminui a área de superfície hidrofóbica exposta à água (devido ao efeito hidrofóbico) (LODISH *et al.*, 2014).

O potencial apresentado por esse corante, bem como seu caráter hidrofóbico tornou-se o foco de interesse deste trabalho, que tem por objetivo estudar as características moleculares da violaceína e a formação de dímeros dessa molécula.

Em pesquisas bibliográficas, foram encontrados diversos estudos que têm sido realizados sobre a violaceína, principalmente em relação aos seus potenciais farmacêuticos, com foco em sua atividade antitumoral, porém, a maioria desses estudos se restringe a análises experimentais não sendo

encontrado quase nenhum dado disponível sobre análises de primeiros princípios da molécula da violaceína e sua inclusão em sistemas de liberação controlada.

Além disso, devido a seu caráter hidrofóbico, há indícios de que a violaceína forme aglomerados em solução aquosa, conforme relatado no trabalho de Mantoan *et al.* (2008), onde foi observado um desvio da linearidade da absorbância a partir de concentrações de 0,4 μM de violaceína. Também não foram encontradas análises teóricas sobre a formação de dímeros e agregados superiores de violaceína e sobre a estrutura assumida por esses dímeros.

Com base nesses achados, no presente estudo é proposta a análise de primeiros princípios, com a utilização da teoria do funcional da densidade (DFT – *Density Functional Theory*) e dos potenciais de correção de dispersão DCACP (*Dispersion Corrected Atom Centered Potentials*) de acordo com as espécies atômicas da molécula de violaceína, buscando-se a otimização da molécula isolada e a análise da formação de dímeros de violaceína.

1.2. REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Como afirmam Medeiros, Paterno e Mattoso (2006), a nanotecnologia é uma área de pesquisa ampla e interdisciplinar, cujo domínio compreende partículas/estruturas entre 0,1 e 100 nanômetros, baseadas em diferentes tipos de materiais (polímeros, metais, cerâmicas, compósitos, semicondutores e biomateriais) formando blocos de construção (*clusters*, nanopartículas, nanotubos), sendo que as propriedades desses materiais podem ser determinadas e controladas. O arranjo desses blocos de construção para formar dispositivos e materiais nanoestruturados é o objetivo central da nanotecnologia.

Sistemas atômicos e/ou moleculares em escala nanométrica são, em geral, conhecidos como ‘clusters’ ou ‘nanoclusters’ (aglomerados de átomos e/ou moléculas). Devido aos efeitos quânticos, ‘clusters’ são sistemas capazes de possuir propriedades especiais. Esses sistemas também se apresentam em uma faixa intermediária de energia, com propriedades diferentes daquelas observadas em átomos e/ou moléculas isoladas. Assim, é de importância fundamental entender as propriedades físicas e químicas dos ‘clusters’ para o entendimento destes sistemas, propiciando o desenvolvimento de novas tecnologias em nanoescala (SANTOS *et al*, 2003).

1.2.2. VIOLACEÍNA E SUA BIOSÍNTESE

A violaceína é um pigmento versátil que tem ganhado cada vez maior importância em diversos segmentos do mercado, como na medicina, área cosmética e na área têxtil. Na área farmacológica, principal foco dos estudos com essa molécula, suas propriedades incluem atividade antioxidante, imunomodulatória, antitumoral e antiparasitária (DURÁN *et al.*, 2011).

A violaceína [3-(1,2-di-hidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-di-hidro-2H-indol-2-ona] possui massa molecular de 343,3, e é insolúvel em água, levemente solúvel em etanol, moderadamente solúvel em dioxano e acetona, e solúvel em DMSO (dimetil sulfóxido), metanol e acetato de etila (DURAN *et al.*, 2007).

Esse pigmento de cor arroxeada é produzido por bactérias do gênero *Chromobacterium*. De forma geral a *Chromobacterium violaceum* é a bactéria mais estudada na produção da violaceína, porém outras bactérias também produzem esse pigmento, como a *Janthinobacterium lividum* (anteriormente conhecida como *Chromobacterium lividum*) e a *Alteromonas luteoviolacea* (DURAN *et al.*, 2007).

Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, da classe Betaproteobacteria, frequentemente encontrada em solos e águas em regiões tropicais e temperadas. No Brasil é encontrada em abundância nas águas e nas margens do rio Negro na região amazônica e tem sido objeto de estudo desde a década de 1970 (HUNGRIA *et al.*, 2005). A *Chromobacterium violaceum* pode também

estar presente ocasionalmente em infecções purulentas de seres humanos e outros animais (MADIGAN *et al.*, 2010).

Estudos realizados com a *Chromobacterium violaceum* relacionam-se à regulação fenotípica da produção de violaceína e de cianeto, além do potencial biotecnológico relacionado à capacidade de sintetizar bioplástico e outros polímeros de cadeia curta (HUNGRIA *et al.*, 2005). Estudos indicam que a produção da violaceína pela *Chromobacterium violaceum* atua como um antioxidante produzido para autoproteção contra espécies reativas de oxigênio (AZEVEDO *et al.*, 2000b).

A biossíntese da violaceína tem sido extensivamente estudada e possui uma complexidade notória. A produção desse composto só ocorre sob condições aeróbicas, pois é necessário o oxigênio molecular no processo de hidroxilação do triptofano, nas primeiras etapas da biossíntese (MOMEM e HOSHINO, 2000). A modulação da biossíntese da violaceína é feita pelo sistema *Quorum sensing*, o qual se trata de um processo de comunicação bacteriana que se baseia na produção, detecção e resposta a moléculas sinalizadoras extracelulares chamadas auto-indutores. Esse sistema permite à bactéria sincronizar seu comportamento em resposta às mudanças da comunidade bacteriana circundante, como densidade de população e composição de espécies (CHEN *et al.*, 2011).

O *operon* dessa biossíntese (Figura 2) é composto por 5 genes (VioABCDE). Inicialmente ocorre a oxidação do L-triptofano originando uma molécula de imina ácido indol-3-pirúvico (IPA) (VioA). A seguir ocorre o acoplamento oxidativo de duas moléculas de imina IPA, formando um dímero

de imina IPA (VioB). Ocorre então uma mudança conformacional (rearranjo intramolecular) produzindo ácido prodeoxiviolaceínico (VioE). Este pode ser convertido espontaneamente em prodeoxiviolaceína por auto-oxidação. Também pode ocorrer oxigenação dos indóis 2 (VioD) e 5 (VioC), produzindo ácido protoviolaceínico e ácido violaceínico respectivamente. A conversão subsequente em violaceína envolve um processo não enzimático de descarboxilação oxidativa (LEAL, 2011; DANTAS, TAULER e FERREIRA, 2012). Duas moléculas de L-triptofano, ou dois intermediários indólicos produzidos pelo metabolismo do triptofano são essenciais para a formação de uma molécula de violaceína (MOMEM e HOSHINO, 2000).

A deoxiviolaceína também é produzida como um subproduto da biossíntese da violaceína, ou seja, a violaceína produzida em cepas selvagens contém até 10% de deoxiviolaceína. Em comparação com a violaceína, esta apresenta um átomo de oxigênio a menos na posição 6 do anel indol (lado esquerdo, conforme Figura 1) (WANG et al, 2012).

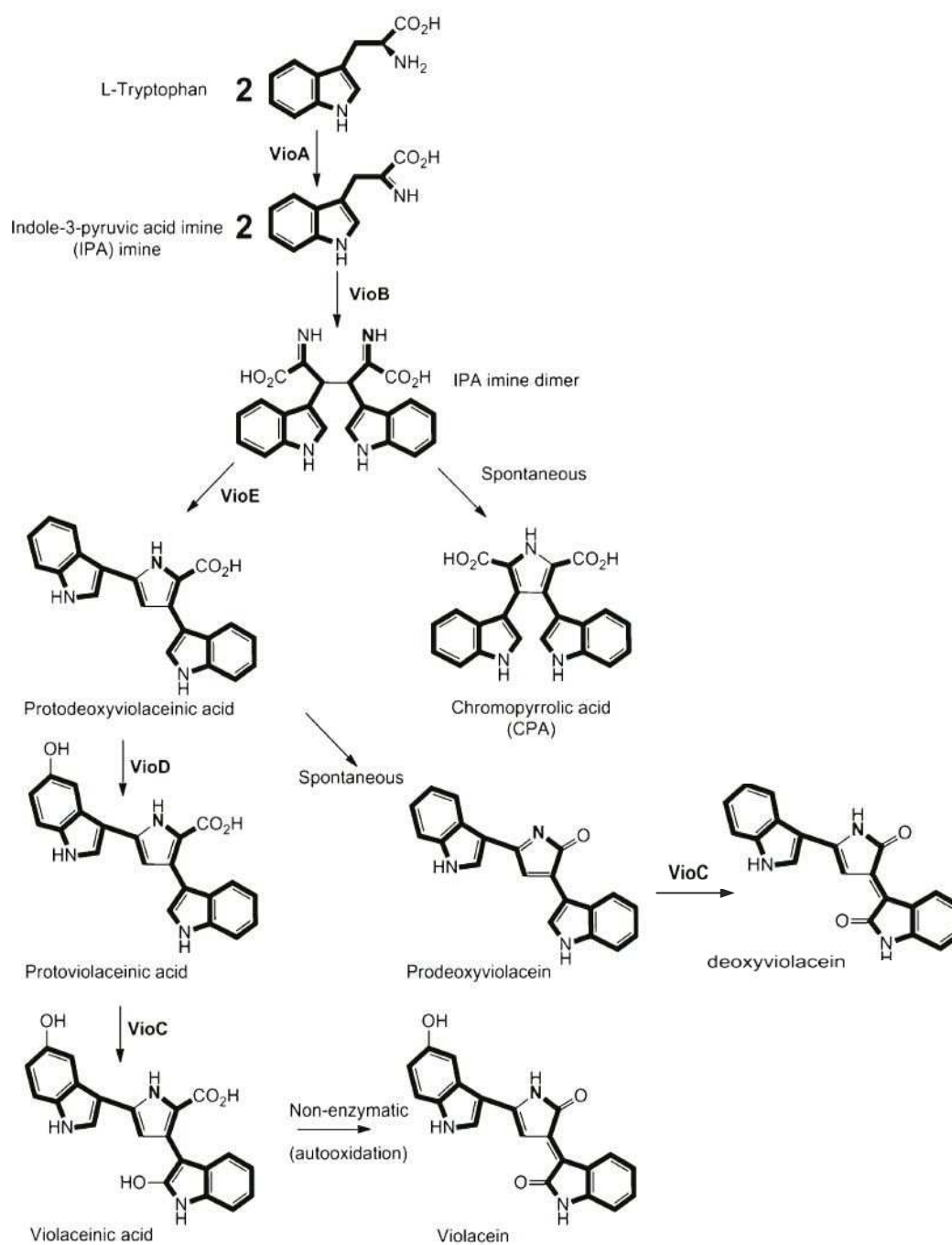


Figura 2 – Biossíntese da violaceína e da deoxiviolaceína.

Fonte: Adaptado de Dantas, Tauler e Ferreira

1.2.3. VIOLACEÍNA E SUAS APLICAÇÕES

A violaceína é um pigmento versátil que tem ganhado cada vez maior importância em diversos segmentos do mercado, como na medicina, área cosmética e na área têxtil. Na área farmacológica, principal foco dos estudos com essa molécula, suas propriedades incluem atividade antioxidante, imunomodulatória, antitumoral e antiparasitária (DURÁN et al., 2011).

Na área têxtil, Ahmed *et al.* (2012) descrevem a avaliação do potencial da violaceína como corante para fibras naturais e sintéticas, com resultados que apontam para a capacidade da violaceína no tingimento de ambos os tipos de fibras, com diferentes tonalidades (Figura 3).

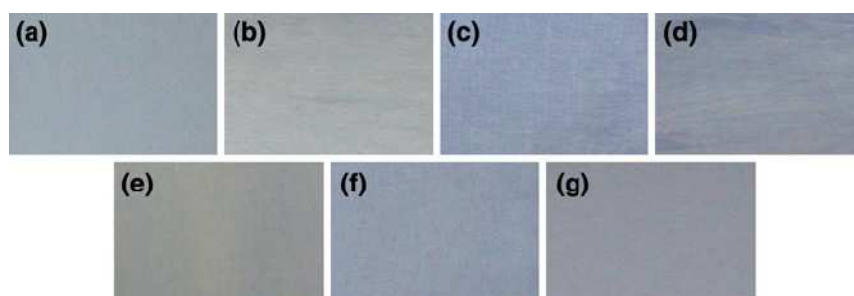


Figura 3 – Capacidade de tingimento da violaceína em: (a) algodão puro; (b) seda pura; (c) rayon puro; (d) rayon jacquard; (e) cetim de seda; (f) algodão; (g) poliéster.

Fonte: Adaptado de Ahmed *et al.*

Ahmed *et al.* também avaliaram o potencial uso da violaceína em canetas esferográficas (Figura 4) e canetas marca-texto (Figura 5), obtendo uma tinta com coloração roxa escura, sendo que a intensidade aumenta com o aumento da concentração do pigmento.

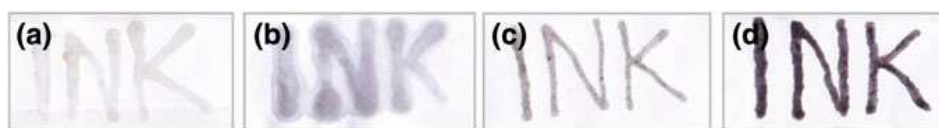


Figura 4 – Palavra “ink” escrita com diferentes composições de tinta com violaceína:
(a) 0%p; (b) 0,25%p.; (c) 1,24%p.; (d) 3,05%p.

Fonte: Adaptado de Ahmed *et al.*

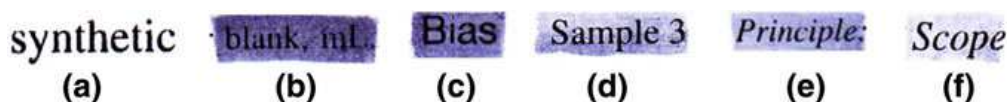


Figura 5 – Palavras destacadas com diferentes composições de tinta com violaceína:
(a) 0%p; (b) 1,98%p.; (c) 1,39%p.; (d) 0,67%p.; (e) 0,67%p.; (f) 0,60%p.

Fonte: Adaptado de Ahmed *et al.*

Na possível utilização da violaceína na área cosmética, Enomoto (2013) na Cosme Tech 2013 apresentou um pôster onde destacou a possibilidade do uso da violaceína em cosméticos, levando em consideração as suas propriedades. Enomoto também destacou que essa possibilidade de uso depende da produção da violaceína em larga escala e propôs um novo método de produção do pigmento com sua estabilização sob calor e luz.

Suryawanshi *et al.*, avaliaram a atividade fotoprotetiva, antioxidativa e antibacteriana da violaceína como suplemento de protetores solares e concluíram que a violaceína é um potencial ingrediente para novos produtos pois exibiu atividades antioxidantes e antimicrobianas, além de aumentar o fator de proteção solar de protetores solares já comercializados.

Porém, destaca-se a potencial aplicação farmacológica da violaceína, com um número mais extenso de estudos e pesquisas, entre os quais alguns são apontados a seguir.

Andrighetti-Fröhner *et al.* (2003) avaliaram a ação antiviral da violaceína e obtiveram como resultado que o pigmento apresenta uma fraca inibição da replicação viral em vírus como vírus da herpes simples tipo 1 HSV-1 (cepa KOS e ATCC/VR-733), poliovírus tipo 2 e rotavírus SA 11.

Nakamura *et al.* (2003) e Cazoto (2008) avaliaram a ação antibacteriana do pigmento formado pela mistura de violaceína e deoxiviolaceína, observando ampla ação em bactérias gram-positivas, porém com ação restrita entre as gram-negativas.

Andrighetti-Fröhner *et al.* (2006) avaliaram a genotoxicidade da violaceína, em doses não citotóxicas, e observaram que o pigmento causa danos em algumas linhagens celulares testadas, sendo que os danos dependem das características das linhagens.

Barreto *et al.* (2008) testaram a atividade antifúngica, comparando os produtos (sobrenadantes) de 24 cepas brasileiras e uma malásia, sendo que todas as cepas apresentam ação antifúngica contra alguns tipos de fungos patogênicos testados, porém para alguns fungos, somente cepas específicas apresentaram ação antifúngica, indicando que a ação pode não ser específica da violaceína, mas da combinação com outros sobrenadantes.

Antonisamy *et al.* (2009) relataram respostas positivas para a atividade anti-diarreia e de proteção contra úlceras apresentada pela violaceína *in vivo*, em experimentos com ratos Wistar.

Lopes *et al.* (2009) avaliaram a atividade anti-malária, observando uma inibição no desenvolvimento do parasita *Plasmodium falciparum*, tanto *in vitro*, como *in vivo*, em experimentos com camundongos.

Antonisamy e Ignacimuthu (2010) também avaliaram os efeitos imunomodulatório, analgésico e antipirético da violaceína *in vivo*, em ratos albinos Wistar e em camundongos e concluíram que a violaceína é efetiva no tratamento de doenças inflamatórias, possuindo efeito imunomodulatório, analgésico e antipirético.

Rambo *et al.* (2012) relataram a produção de scaffolds de PHBV (poli-(3-hidroxibuterato-co-3-hidroxivalerato)) incorporado com violaceína e concluíram que os scaffolds produzidos com PHBV com violaceína são possíveis candidatos para aplicação em engenharia tecidual, na regeneração de tecidos ósseos.

Dentre as aplicações farmacológicas, destacam-se pesquisas sobre sua atividade antitumoral, com diversos estudos que relatam sua ação em diferentes tipos de células tumorais.

Ferreira *et al.* (2004) destacam o especial interesse na possibilidade da violaceína ser utilizada como tratamento anti-leucemia, pois o pigmento induz a morte celular em especial da linhagem HL60 (células de leucemia promielocítica humana), sem apresentar o mesmo efeito citotóxico em outros tipos celulares.

Kodach *et al.* (2006) e Carvalho *et al.* (2006) avaliaram a ação da violaceína *in vitro*, em células de câncer colorretal (de diferentes linhagens) e, em ambos os trabalhos, os autores sugerem que a violaceína pode ser ativa no tratamento de tumores colorretais.

Bromberg *et al.* (2010) avaliaram o potencial antitumoral da violaceína contra tumores ascíticos de Erlich (EAT) e observaram que em estudos *in vitro*,

a citotoxicidade da violaceína em relação às células do EAT foi duas vezes maior que em linfócitos humanos e *in vivo*, em experimentos com camundongos, a violaceína inibiu significativamente o crescimento dos tumores (em torno de 70%), e aumentou a sobrevivência dos animais.

Queiroz *et al.* (2012) referem que em patologias como o câncer há alterações no processo denominado morte celular programada e que a violaceína pode operar pela indução de diferentes tipos de morte celular. Em células HL60, a violaceína induz a apoptose das células, porém em células de leucemia TF1 (células de eritroleucemia – forma rara de leucemia mielóide humana) a morte celular ocorre devido à linearização do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi.

Também existem trabalhos que objetivam aumentar a solubilidade, além de trazer melhoras na biodisponibilidade da violaceína para aplicação biológica. Azevedo (2005) e Martins *et al.* (2010) descreveram a sua inclusão em nanopartículas poliméricas formando sistemas de liberação da violaceína como agente antitumoral. Azevedo *et al.* (2000a e 2000b) analisaram a formação de um complexo de inclusão entre a violaceína e a β -ciclodextrina com o objetivo de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade visando o tratamento de câncer. Durán *et al.* (2003) analisaram o efeito da inclusão da violaceína na β -ciclodextrina na prevenção de ulceração gástrica em camundongos. Gimenez *et al.* (2005) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de um sistema supramolecular composto por violaceína complexada com β -ciclodextrina associada a nanopartículas de ouro (Figura 6), sendo um sistema também voltado para o tratamento do câncer.

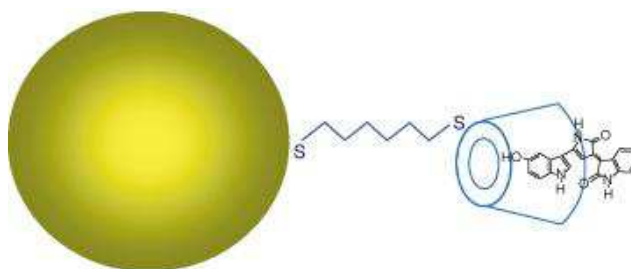


Figura 6 – Sistema supramolecular formado pelo complexo violaceína/ β -ciclodextrina associado à nanopartícula de ouro.

Fonte: Gimenez *et al.*

Uma descrição mais detalhada dos trabalhos citados em relação à atividade biológica da violaceína encontra-se no anexo 1.

1.2.4. VIOLACEÍNA E SEUS DÍMEROS

Mantoan *et al.* (2008) analisaram as propriedades fotoquímicas da violaceína para estabelecer seu potencial uso em terapia fotodinâmica, através da análise da absorbância em concentrações entre 0,05 e 3,2 μM . Foi observado que em meio aquoso a violaceína mantém-se de forma monomérica somente até a concentração de 0,4 μM , sendo que a partir dessa concentração ocorre um desvio da linearidade da absorbância. Os autores sugerem que a presença de um dipolo na molécula de violaceína pode significar uma agregação pelo alinhamento dos dipolos elétricos de cada molécula.

A formação de agregados de moléculas hidrofóbicas ocorre em ambiente aquoso, pois a água apresenta momentos dipolos, sendo que entre as moléculas de água a estrutura de ligações de hidrogênio representa papel fundamental. Termodinamicamente a interação entre a água e grupos ou moléculas não polares é desfavorável por não formarem ligações de hidrogênio e esses grupos, colocados em água, tendem a ficar juntos, formando agregados, para reduzir a energia da mistura, devido ao chamado efeito hidrofóbico, ou seja, moléculas com longas cadeias de carboidratos ou anéis aromáticos não contribuem para a diminuição da energia do sistema e não são solúveis em água, sendo chamadas hidrofóbicas (TUSZYNSKI e KURZYNSKI, 2003).

A auto-agregação gera espécies pequenas (dímeros e trímeros) e grandes agregados. O estudo desses estados é importante, pois afetam as propriedades espectrais e energéticas do sistema (SOARES, 2006). Os corantes, de forma geral, apresentam como característica a auto-agregação em

solução, tornando seu estudo de especial interesse para o estabelecimento de novas aplicações (ALVES *et al.*, 2013). Os agregados formados em soluções podem apresentar diferentes estruturas, sendo que o processo de agregação desses corantes depende da estrutura da molécula isolada, da concentração em solução, do solvente, de fatores como temperatura e pressão, além da presença e concentração de catalisadores (SILVA, 2010).

Muitos compostos aromáticos, imiscíveis em água, interagem através de forças fracas e, a partir da estrutura do benzeno, a mais simples estrutura de compostos aromáticos, é possível racionalizar sobre o comportamento de sistemas mais complexos. Para compreender o processo de agregação, a compreensão das geometrias próximas ao equilíbrio pode ser obtida pela análise da distância do centro de massa e do ângulo formado por duas moléculas (ALBERTÍ, 2012). As interações entre anéis aromáticos, também são onipresentes na natureza, e estão relacionadas à estabilização de estrutura secundária e terciária de proteínas, e a doenças como Alzheimer, que ocorre pela agregação de amiloide β . (PURUSHOTHAM e SASTRY, 2014).

Segundo Sinnokrot e Sherrill (2006), dímeros de benzeno têm sido extensivamente estudados teórica e experimentalmente, e muitos estudos propõem três configurações principais (Figura 7), onde a configuração '*sandwich*' apresenta as duas moléculas de benzeno uma sobre a outra, a '*T-shaped*' onde uma das moléculas aponta para o centro do outro anel e a '*parallel-displaced*' similar à configuração *sandwich*, porém com um deslizamento paralelo de uma molécula sobre a outra.

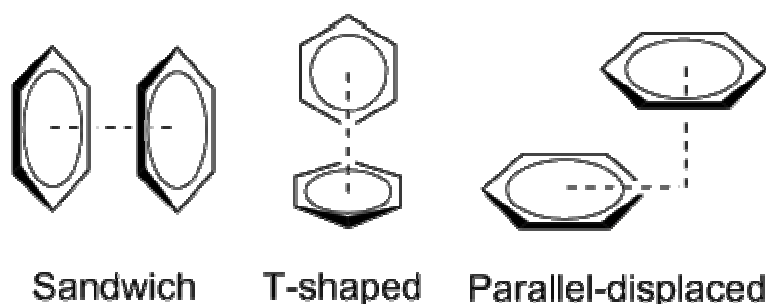


Figura 7 – Principais configurações do dímero de benzeno.

Fonte: Adaptado de Sinnokrot e Sherrill.

O azul de metileno, um dos corantes mais estudados, principalmente em aplicações em terapia fotodinâmica, apresenta um caráter hidrofílico, porém, dependendo de sua concentração, pode formar agregados. Isso ocorre pela presença do grupo CH_2 em sua estrutura, o qual não interage com a água, e à medida que a concentração de azul de metileno aumenta, ocorre um favorecimento na formação de agregados. Os dados em espectroscopia de fluorescência apontam para uma diminuição da intensidade com o aumento da porcentagem de água, indicando a formação dos agregados, porém, mesmo em altas concentrações, a emissão não desaparece completamente, indicando a presença de moléculas não agregadas (LIMA et al., 2007).

Em solução aquosa o azul de metileno apresenta-se na forma de monômeros (solução diluída), dímeros e agregados maiores (soluções bastante concentradas). As bandas de absorção permitem distinguir essas diferentes formas (máximos em 664nm, 600nm e na região de 550 nm, respectivamente) (PELOI, 2007). Segundo Homem-de-Mello *et al.* (2007) os dímeros podem ser formados por duas moléculas de azul de metileno quase paralelas, com uma configuração 'sandwich' ou podem ser coplanares, com os monômeros no mesmo plano xy.

Outros corantes orgânicos também tendem a formar agregados, como a clorofila e a feofitina (SOARES, 2006), o azul de toluidina (ALVES *et al.*, 2013), a rodamina (SILVA, 2010), a laranja de acridina e a proflavina (HOMEM-DE-MELLO *et al.*, 2007).

Por outro lado, Purushotham e Sastry (2014) analisaram a formação de dímeros de triptofano (molécula precursora da violaceína) e concluíram que esses dímeros podem ser estabilizados por interações OH- π , NH- π , π - π e CH- π , presentes em quase todas as conformações de dímero estudadas, além das convencionais ligações de hidrogênio. Segundo os autores, as moléculas de triptofano podem assumir diferentes ângulos entre si e dependendo da estrutura formada, também apresentam diferentes distâncias entre as moléculas.

A partir dos estudos experimentais dos dímeros de violaceína e dos dados observados nos dímeros de benzeno, azul de metileno e triptofano foram propostas algumas configurações para os dímeros de violaceína apresentados neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho, utilizando a DFT e os potenciais de dispersão DCACP, é analisar teoricamente a molécula de violaceína e a formação de possíveis conformações de dímeros para melhor compreensão do processo de agregação dessa molécula.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- simular a molécula de violaceína no vácuo, otimizar sua estrutura e analisar suas propriedades.

- simular a estrutura de diversas conformações de dímeros no vácuo, analisar suas propriedades e definir conformações com maior probabilidade de ocorrência.

3. MÉTODOS

3.1. CONCEITOS INICIAIS

Existem comportamentos do mundo microscópico que não estão relacionados à mecânica newtoniana, algumas descrições dos fenômenos relacionados ao universo atômico são provenientes das leis da mecânica quântica (VÁZQUEZ et al., 2005).

Quando problemas relacionados a estruturas atômicas e/ou moleculares, sob as leis da mecânica quântica, são solucionados sem ajustes empíricos, os métodos são chamados *ab initio* (em latim: do início).

Cálculos *ab initio* têm por base a solução da equação de Schrödinger e a natureza da aproximação necessária ao cálculo determina o seu nível de acurácia. Os métodos *ab initio* são utilizados para calcular geometria molecular, energias, frequência vibracional, entre outras propriedades. (LEWARS, 2010)

Atualmente, grande parte dos recursos computacionais em simulação em áreas como química, física, biologia, materiais, entre outras, é para solucionar os problemas de muitos corpos. Em muitos casos, problemas envolvendo sistemas de duas partículas podem ser solucionados de forma exata, envolvendo métodos matemáticos, cujos resultados são funções analíticas. Porém, problemas envolvendo sistemas com mais de duas partículas não encontram soluções por métodos analíticos. Assim, a utilização

de métodos computacionais pode produzir soluções aproximadas, com bom grau de acurácia (JENSEN, 2013).

Os materiais estudados por simulação são constituídos por átomos, moléculas, nanoestruturas, sólidos e superfícies (PERDEW, 2013) e frequentemente existe a necessidade de se prever as propriedades relacionadas ao estado fundamental desses sistemas, como a geometria de equilíbrio, frequência vibracional, densidade eletrônica, energia total e energia de superfície (PERDEW e RUZSINSZKY, 2010).

Uma maneira de se encontrar essas propriedades é solucionar a equação de Schrödinger, sendo que, no caso de um sistema com um número N de elétrons, a função de onda do estado fundamental será uma função de N -elétrons (PERDEW e RUZSINSZKY, 2010). Pode-se utilizar a equação de Schrödinger independente do tempo:

$$\hat{H} \Psi(\vec{r}, \vec{R}) = E \Psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad (3.1)$$

Onde \hat{H} é o operador Hamiltoniano; $\Psi(\vec{r}, \vec{R})$ é a função de onda que caracteriza o movimento da partícula, sendo $\vec{r} = (\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$ e $\vec{R} = (\vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_N)$ as coordenadas dos elétrons e dos núcleos, respectivamente; e E é a energia do sistema. O operador Hamiltoniano de um sistema constituído de M núcleos com N elétrons pode ser escrito como:

$$\hat{H} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.2)$$

Em que $-\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2$ refere-se à energia cinética dos elétrons, $-\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2$ refere-se à energia cinética dos núcleos, $-\sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}}$ está

relacionado à energia potencial da interação núcleo-elétron, $+ \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}}$ está relacionado à energia potencial da interação elétron-elétron e finalmente $+ \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$ refere-se à energia potencial da interação núcleo-núcleo.

Como pode ser observado, na equação de Schrödinger, o movimento de cada elétron está ligado ao movimento de todos os outros elétrons através de forças coulombianas de repulsão. Esta é uma abordagem potencialmente acurada e completa, porém o tempo computacional aumenta rapidamente com o número de elétrons, tornando-se impraticável quando esse número é grande (PERDEW, 2013; PERDEW e RUZSINSZKY, 2010), além disso, encontrar a solução exata só é possível para sistemas muito pequenos, com no máximo duas partículas. Entretanto, um grande número de métodos de aproximação tem sido desenvolvido com o objetivo de conseguir a melhor relação entre acurácia e custo computacional.

A aproximação de Born-Oppenheimer leva em consideração a diferença entre as massas do núcleo e do elétron. Como a massa do núcleo é muito maior que a massa do elétron, os elétrons podem se ajustar quase que instantaneamente a quaisquer mudanças na posição do núcleo (LEACH, 2001).

A aproximação de Born-Oppenheimer separa a energia nuclear da energia eletrônica, desconsiderando a energia cinética dos núcleos e considerando a interação núcleo-núcleo constante, dependente somente das coordenadas nucleares. Dessa forma, o Hamiltoniano eletrônico pode ser escrito como:

$$\hat{H}_{el} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.3)$$

Essa aproximação tem sua importância centrada no desacoplamento entre o movimento nuclear e o eletrônico, sendo considerada a primeira aproximação para aplicação da Mecânica Quântica em relação a moléculas e sólidos (TONETTO, 2011).

O método de Hartree-Fock propõe uma aproximação mais simples para a complicada função de onda de muitos elétrons. Essa aproximação consiste na utilização de um produto anti-simétrico de N funções de onda de um elétron no lugar da função de onda de N -elétrons (KOCH e HOLTHAUSEN, 2007). Assim, a partir de uma base de funções de orbitais atômicos é feita uma expansão para um orbital molecular, ou seja, os movimentos individuais dos elétrons são considerados, instantaneamente, independentes em relação aos outros elétrons. O resultado é que se encontra uma equação para cada orbital calculado, sendo que as soluções são obtidas por um processo iterativo (LOPES, 2009).

A aproximação de Hartree-Fock reduz o problema de muitos corpos em vários problemas de um corpo, onde a interação simultânea entre os elétrons é substituída pela interação de cada elétron N com um campo ou potencial central médio criado pelos demais $N-1$ elétrons. O princípio de antissimetria é incluído pela expressão da função de onda como um determinante de Slater. Busca-se, então, a função de onda aproximada que fornece a melhor energia (menor energia) para o estado fundamental. O maior problema para representar os orbitais de Hartree-Fock é a escolha das funções matemáticas a serem utilizadas, sendo que a busca por melhores funções de base para descrever os sistemas é uma constante, porém essa aproximação representa o primeiro passo para métodos mais refinados que surgiram posteriormente.

3.2. TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE

Um dos métodos utilizados para se resolver a equação de Schrödinger eletrônica é a Teoria do Funcional da Densidade de Kohn-Sham (DFT em inglês *Density Functional Theory*), desenvolvida em 1965 e que se tornou popular a partir da década de 1970. Pelo desenvolvimento dessa teoria Walter Kohn recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1998.

Trata-se de um método de primeiros princípios que vem sendo amplamente utilizado para determinação de estrutura eletrônica devido a sua relativamente alta precisão e baixo custo computacional (TAPAVICZA *et al.*, 2007).

A Teoria do Funcional da Densidade retorna aos primórdios da mecânica quântica, utilizando a aproximação de Thomas–Fermi, proposta em 1927 por H. L. Thomas e E. Fermi, que considera a densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$ e não a função de onda do sistema para buscar a resolução da equação de Schrödinger (FREITAS, 1998). Ou seja, a entidade básica da DFT é a densidade eletrônica – $\rho(\vec{r})$, a qual descreve a distribuição de carga em uma molécula, adotada como “observável” mecânico-quântico (MORGAN e CUSTÓDIO, 1994). A ideia principal é que, em princípio, para sistemas com um elétron, é possível encontrar a energia E exata do estado fundamental e outras propriedades a partir da densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$ exata do estado

fundamental, pela solução efetiva da equação de Schrödinger para um elétron (LEACH, 2001; PERDEW, 2013). Assim, a proposta dessa aproximação de uma função de onda de N elétrons da equação de Schrödinger para o produto de N funções de onda de um elétron (KOCH e HOLTHAUSEN, 2007) torna o processo muito mais simples, pois lidar com uma função de onda de um elétron (ou seja, um orbital) é menos complexo do que lidar com uma função de onda correlacionada para N elétrons, quando N é muito grande (PERDEW, 2013). E, utilizando a aproximação de Thomas-Fermi, o problema fica reduzido a somente três dimensões relacionadas à densidade (FREITAS, 1998), pois a densidade depende somente de três variáveis, sendo mais simples em sua interpretação e menos abstrata que a função de onda do sistema (TONETTO, 2011).

A vantagem computacional da DFT sobre outros métodos *ab initio* está no fato de que, em um sistema arbitrário de N funções de base, o esforço computacional utilizando DFT aumenta na ordem de N^3 , enquanto outros métodos baseados em Hartree-Fock aumentam em N^4 ou N^5 para técnicas de interação de configuração (MORGAN e CUSTÓDIO, 1994).

Conforme relatado por Koch e Holthausen (2007) e Tonetto (2011), a DFT tem como base os conceitos desenvolvidos nos teoremas de Hohenberg e Kohn, os quais estabelecem a conexão entre densidade eletrônica e a equação de Schrödinger para muitas partículas pela aproximação de funcionais de troca-correlação (em inglês *exchange-correlation functionals*) de Kohn e Sham. A energia de troca-correlação representa a “cola da natureza”, a qual mantém os átomos ligados para formar moléculas e sólidos (PERDEW e RUZSINSZKY, 2010).

O primeiro teorema afirma que “O potencial externo V_{ext} e, portanto, a energia total, é um funcional único da densidade eletrônica no estado fundamental $\rho_0(\vec{r})$ ”:

$$\rho_0(\vec{r}) \leftrightarrow V_{ext} \rightarrow \rho_0(\vec{r}) \leftrightarrow E_0 \quad (3.4)$$

Isso representa que a função de onda do estado fundamental Ψ_0 é um funcional da densidade no estado fundamental ρ_0 e, por consequência, todos os observáveis do estado fundamental também são funcionais de ρ_0 . Essa função de onda, também minimiza a energia (CAPELLE, 2006).

O segundo teorema afirma que “A energia do estado fundamental pode ser obtida de forma variacional: a densidade que minimiza a energia total é a densidade exata do estado fundamental”:

$$E_0 \leftrightarrow E(\rho_0) \quad (3.5)$$

Pelo princípio variacional, pode-se afirmar que o valor da energia encontrado para uma função de onda aproximada ou para uma densidade eletrônica aproximada será sempre maior ou igual que o valor da energia exata do estado fundamental (MORENO e TEIXEIRA, 1999).

Assim, para solucionar problemas de estrutura molecular, a função é escrita como combinação linear dos orbitais atômicos conhecidos e busca-se minimizar o funcional energia E , para aproximá-lo de E_0 .

Kohn e Sham sugeriram, em seu artigo de 1965, um modo prático para solucionar o teorema de Hohnberg-Kohn para um conjunto de elétrons interagindo (LEACH, 2001). Essa proposta é definida pelas equações autoconsistentes de Kohn-Sham, as quais são, de certo modo, similares às equações de Hartree para partículas únicas que tornam possível obter a

densidade eletrônica de átomos. A energia pode, então, ser escrita como um funcional da densidade:

$$E(\rho) = T_S[\rho] + V_C[\rho] + V_H[\rho] + V_X[\rho] + V_{ext}[\rho] \quad (3.6)$$

A energia cinética é dividida em duas partes, a primeira representando a energia cinética de um gás de partículas não interagentes ($T_S[\rho]$) e a segunda descrevendo a energia de correlação ($V_C[\rho]$); o potencial elétron-elétron também pode ser dividido em dois termos, o primeiro descrevendo a interação coulombiana entre os elétrons ($V_H[\rho]$) e o segundo representando a interação de troca ($V_X[\rho]$), e, finalmente, $V_{ext}[\rho]$ representa o potencial externo (TONETTO, 2011).

Os termos de correlação e de troca, $V_C[\rho]$ e $V_X[\rho]$ respectivamente, podem ser unidos em um único termo denominado potencial de troca-correlação ($V_{XC}[\rho]$). Assim, reescrevendo a expressão (3.6), obtém-se:

$$E(\rho) = T_S[\rho] + V_{XC}[\rho] + \int \rho(\vec{r})V_{ext}(\vec{r})d\vec{r} + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}d\vec{r}' \quad (3.7)$$

Onde $V_{ext}[\rho]$ foi escrito como $\int \rho(\vec{r})V_{ext}(\vec{r})d\vec{r}$ e $V_H[\rho]$ como $+\frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}d\vec{r}'$, ou seja, em função da densidade.

Para determinação da densidade no estado fundamental, segue-se o seguinte procedimento:

- Um valor inicial $\rho'(\vec{r})$ é determinado para a densidade no estado fundamental $\rho_0(\vec{r})$;
- A partir de $\rho'(\vec{r})$ é obtido o potencial efetivo $V_{Ef}(\vec{r})$;

- O potencial encontrado é utilizado na resolução da equação com

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V(r,t);$$

- Uma nova densidade $\rho'^{+1}(\vec{r})$ é determinada;
- É realizada uma comparação entre a nova densidade $\rho'^{+1}(\vec{r})$ com a anterior $\rho'(\vec{r})$. Se a nova densidade for similar à anterior, então $\rho'^{+1}(\vec{r})$ é a densidade procurada, caso contrário, o ciclo recomeça utilizando-se a nova densidade $\rho'^{+1}(\vec{r})$ como inicial. O ciclo se repete até seja alcançada a convergência.

O esquema do procedimento pode ser observado na Figura 8.

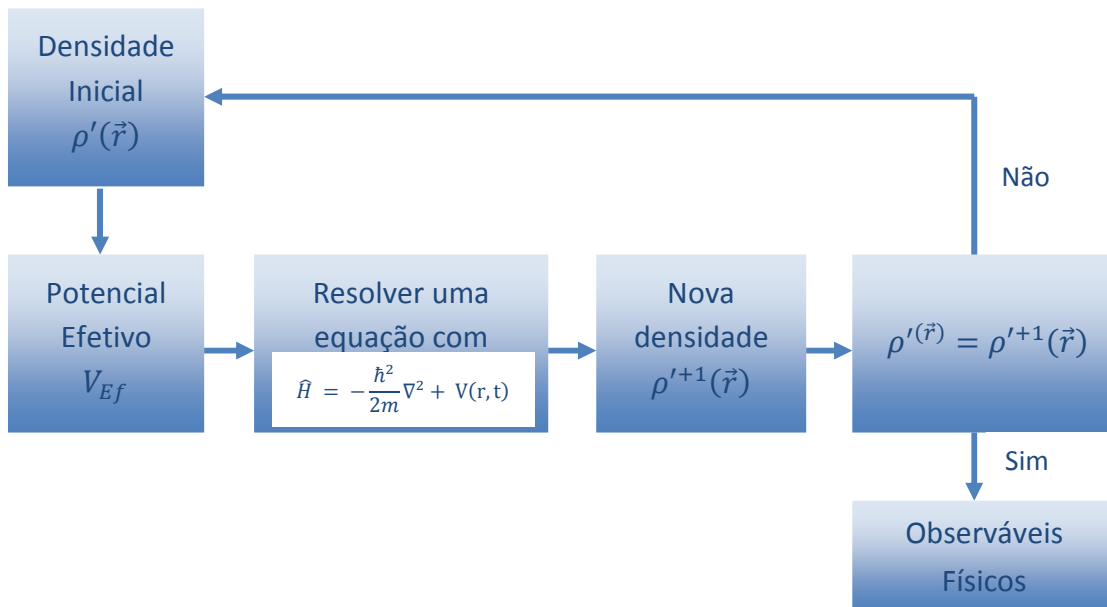


Figura 8 – Esquema do procedimento utilizado na convergência da densidade.

Fonte: Adaptado de Oliveira *et al* (2009).

As energias resultantes, funções de onda e densidade eletrônica são meramente o ponto inicial dos cálculos de muitas propriedades diferentes (observáveis físicos), tais como propriedades mecânicas ou termodinâmicas e espectros eletrônicos ou vibracionais (HAFNER *et al.*, 2006).

3.3. POTENCIAL DE TROCA-CORRELAÇÃO

Quando a energia é escrita em função da densidade:

$$E(\rho) = T_S[\rho] + V_{xc}[\rho] + V_H[\rho] + V_{ext}[\rho], \quad (3.8)$$

o único termo que permanece desconhecido é aquele denominado como potencial de troca-correlação ($V_{xc}[\rho]$). Obviamente, a qualidade da aproximação do funcional de densidade depende somente da acurácia da aproximação escolhida para o funcional de troca-correlação. Dessa forma, encontrar valores para $V_{xc}[\rho]$ cada vez melhores torna-se o coração da DFT (KOCH e HOLTHAUSEN, 2007).

O potencial de correlação está associado à repulsão coulombiana entre duas densidades de carga e o potencial de troca, apesar de não ter um significado clássico como o potencial de correlação, está relacionado às modificações energéticas que ocorrem pelos efeitos de correlação entre spins.

Segundo Duarte e Rocha (2007), os diversos funcionais de troca-correlação desenvolvidos devem ser utilizados em função das propriedades que se deseja calcular, e, dificilmente, haverá um funcional $V_{xc}[\rho]$ universal em um futuro próximo. Assim, na prática, cada funcional e a forma como foi desenvolvido caracterizam os vários métodos de DFT conhecidos.

A aproximação de densidade local (LDA - *Local Density Approximation*), utilizada no presente trabalho, pertence à primeira classe de funcionais de

troca-correlação, onde se considera que a energia do funcional $V_{xc}[\rho]$ de um sistema real comporta-se localmente de forma uniforme, similar a um gás de elétrons homogêneo (SABATINI, 2012). De acordo com Koch e Holthausen (2007), o gás de elétrons homogêneo apresenta lugar proeminente na DFT, pois é o único sistema para o qual se conhece a forma dos funcionais de troca-correlação de forma exata ou com alta acurácia. A ideia de se utilizar este modelo de aproximação se encontra no artigo original de Kohn e Sham de 1965. Esse funcional apresenta uma forma bastante simples e pode ser escrito como:

$$E_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r})) d\vec{r}, \quad (3.9)$$

onde $\varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r}))$ é a energia de troca-correlação por partícula de um gás de elétrons uniforme de densidade $\rho(\vec{r})$, sendo que a energia por partícula é ponderada pela probabilidade $\rho(\vec{r})$ de um elétron ocupar determinada posição no espaço.

Para sistemas com densidade eletrônica uniforme, essa aproximação é capaz de apresentar uma boa descrição de sistemas que apresentam uma densidade eletrônica que varia suavemente, como o estado fundamental de diversos sistemas sólidos, principalmente aqueles que apresentam ligações metálicas ou covalentes. Em sistemas cuja densidade não varia suavemente, o uso dessa aproximação deve ser feito com cautela (TONETTO, 2011).

Enquanto a LDA emprega somente a densidade local, existem aproximações que empregam funcionais semi-locais, através da adição de restrições exatas, como a aproximação do gradiente generalizado (GGA –

Generalized Gradient Approximation), que adiciona o gradiente de densidade. (PERDEW, 2013; CAPELLE, 2006).

A LDA e a GGA são as duas aproximações mais utilizadas na descrição do funcional de troca-correlação e são computacionalmente muito eficientes.

Existem também funcionais não locais, que acrescentam um número maior de restrições, tornando-os potencialmente mais acurados, porém também representam um custo computacional maior, como exemplo podem ser citados os funcionais híbridos, que incluem a exata densidade de energia de troca ou a própria energia de troca exata, utilizando parâmetros semi-empíricos. (PERDEW, 2012).

O funcional de troca-correlação utilizado, dentro da aproximação de densidade local (LDA), foi o BLYP, que utiliza o funcional de troca de Becke (B) e o funcional de correlação de Lee, Yang e Parr (LYP). O funcional de troca de Becke foi proposto por A. D. Becke em 1988 e associa o Slater de troca com correções do gradiente de densidade (GAUSSIAN 09). Trata-se de um funcional que contém apenas um parâmetro e aproxima as energias exatas de troca de Hartree-Fock com notável acurácia para diversos sistemas atômicos (BECKE, 1988). O funcional de correlação de Lee, Yang e Parr foi proposto por C. Lee, W. Yang e R.G. Parr em 1988 e inclui termos locais e não locais (GAUSSIAN 09). Os autores retomam a fórmula de correlação de energia de Colle e Salvetti (1975), onde a energia de correlação é expressa em termos de uma matriz de densidade de Hartree-Fock de segunda ordem e de densidade de elétron e, a partir disso inserem expansões de gradiente para a densidade de energia cinética local, obtendo as fórmulas do funcional de densidade para a energia de correlação e para o potencial de correlação (LEE, YANG e PARR, 1988).

3.4. TEORIA DO PSEUDOPOTENCIAL

A teoria do pseudopotencial foi desenvolvida por Phillips e Kleinman e por Antoncik com o objetivo de diminuir o custo computacional em sistemas com um número elevado de elétrons. Através do uso dos pseudopotenciais evita-se a descrição explícita dos elétrons próximos ao núcleo e a rápida oscilação das funções de onda desses elétrons, as quais exigem um conjunto de bases complicadas (BLÖCHL *et al.*, 2005). A ideia é, então, levar em conta somente os elétrons de valência, que são os que participam efetivamente das ligações químicas.

Essa teoria foi desenvolvida a partir do método de onda plana ortogonalizada, proposto por Herring, o qual combina as oscilações rápidas da região mais interna do átomo de forma a apresentar o comportamento parecido ao de uma onda plana. Nessa teoria é proposta a separação entre as funções de onda dos níveis mais internos, bem localizados ao redor dos sítios da rede e dos elétrons de valência, que apresentam grande probabilidade de se encontrarem em regiões intersticiais. A teoria do pseudopotencial é basicamente a remodelação do método de onda plana ortogonalizada (ASHCROFT e MERMIN, 2011), sendo que nos pseudopotenciais, a condição de ortogonalidade é substituída por um potencial efetivo, o qual mimetiza a repulsão dos elétrons do caroço e compensa a atração eletrostática dos núcleos (BLÖCHL *et al.*, 2005).

Dessa forma, a teoria dos pseudopotenciais representa uma separação entre os estados eletrônicos de moléculas ou de sólidos em estados de caroço e estados de valência (TONETTO, 2011).

O forte potencial coulombiano dos elétrons de caroço é substituído por um potencial mais suave, substituindo as funções de onda de valência que oscilam muito na região de caroço por uma pseudo-função de onda suavizada, sem nós e idêntica à função de onda de todos os elétrons na região de valência (Figura 9). Isso resulta em um número menor de ondas planas para representar a pseudofunção, do que aquelas necessárias para representar a função de onda resultante do cálculo de todos os elétrons, com uma consequente diminuição do tamanho da matriz hamiltoniana e menor custo computacional (AMORIM, 2005).

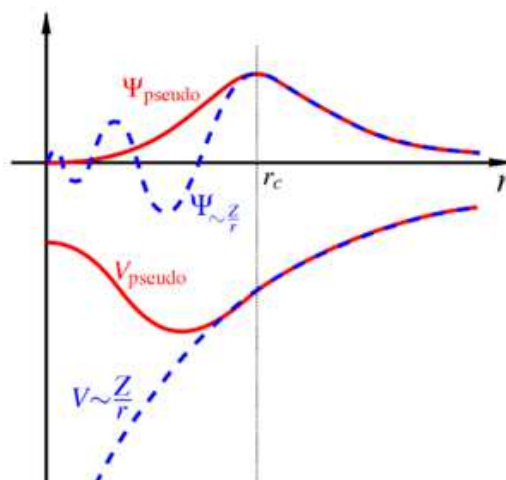


Figura 9 – Função de onda de todos os elétrons sujeitos ao potencial coulombiano (azul) e a pseudofunção de onda correspondente (vermelho).

Fonte: Kiss

Nesse caso, nos cálculos de ondas planas, as interações elétron-caroço são descritas por um pseudopotencial, eliminando a necessidade de um tratamento explícito das fortes ligações dos elétrons do caroço, que são quimicamente inertes (HAFNER *et al.*, 2006). Essas substituições devem

manter o comportamento químico tão inalterado quanto possível (BARRIGÓN, 2004).

Existem os pseudopotenciais de primeiros princípios, os quais liberam os cálculos das restrições de parâmetros empíricos, e apresentam excelente acurácia, principalmente com semicondutores e metais simples, mas não há garantia restrita de acurácia, se utilizados em moléculas ou sólidos (BLÖCHL *et al.*, 2005).

Os pseudopotenciais são divididos em dois grupos principais, os pseudopotenciais de norma conservada estabelecidos por Hamman, Schuluter e Chiang e os ultrassuaves (*ultrasoft*), que são pseudopotenciais de norma não conservada (ALMEIDA, 2012). Nos pseudopotenciais de norma conservada, uma pseudofunção suave sem nós e com a mesma norma (mesma carga na região) substitui a função de onda de todos os elétrons, dentro de um raio de corte, após o qual, ambas as funções são idênticas. O raio de corte, nesse caso, fica próximo ao máximo mais extremo da função de onda de todos os elétrons, para garantir transferabilidade e reproduzir a distribuição de carga e do momento (KISS, 2010). Por outro lado, os pseudopotenciais ultrassuaves, com funções de onda mais suaves e um raio de corte bem maior, foram generalizados por Vanderbilt e Laasonen e melhoram drasticamente a convergência do conjunto de bases (BLÖCHL *et al.*, 2005; ALMEIDA, 2012), entretanto, o aumento do raio de corte, ao mesmo tempo que suaviza as funções de onda, compromete a transferabilidade, e exige testes adicionais para verificar sua qualidade em novos ambientes (KISS, 2010).

Os pseudopotenciais utilizados neste trabalho foram de norma conservada de Troullier-Martins, na forma de Kleinman – Bylander. Os

pseudopotenciais de Troullier-Martins foram descritos por N. Troullier e J. L. Martins em 1991, sendo pseudopotenciais de norma conservada suaves, que apresentam baixo custo computacional se usados com uma base de ondas planas, com grande eficiência nos casos onde a expansão das ondas planas tem uma convergência lenta. A forma proposta por Kleinman e Bylander, transforma um potencial semi-local em uma forma não local separável, o que resulta em menor custo e memória computacional. Segundo Troullier e Martins demonstraram, esse método de gerar pseudopotenciais de ondas planas pode ser utilizado de forma eficiente em cálculos utilizando a aproximação de densidade local (LDA) para qualquer tipo de material (TROULLIER e MARTINS, 1991).

3.5. POTENCIAIS DE CORREÇÃO DE DISPERSÃO - DCACP

As forças de dispersão de London são fundamentais para a descrição apropriada de sistemas biológicos (TAPAVICZA *et al.*, 2007). Entre esses sistemas podem ser citados formação de estruturas terciárias e quaternárias de biomoléculas, intercalação de drogas no DNA, entre muitos outros exemplos. Essas forças também ocorrem em sistemas inorgânicos, como nas interações entre moléculas de gases nobres. As forças de dispersão de London pertencem ao grupo de forças fracas de van der Waals de longo alcance (VON LILIENFELD *et al.*, 2004).

As forças de London ocorrem entre moléculas apolares ou em moléculas que apresentam regiões sem dipolo permanente e dependem da capacidade de formação de dipolos temporários nas porções apolares das moléculas. Esta interação pode ser visualizada como sendo o efeito da distorção temporária da nuvem eletrônica de uma molécula, induzindo, por sua vez, uma deformação nas nuvens eletrônicas das moléculas vizinhas. Essa interação depende das forças de atração e repulsão e sua energia mínima é encontrada em certa distância de separação, onde a resultante entre as forças de atração e repulsão é nula. Em distâncias menores, a repulsão aumenta de forma abrupta e em distâncias maiores a energia de atração aumenta, até uma distância onde não exista mais nenhuma interação (NETZ e ORTEGA, 2008).

Como essas forças são devidas aos efeitos de correlação entre elétrons, elas são difíceis e computacionalmente caras para se capturar usando abordagens convencionais da química quântica (TAPAVICZA *et al.*, 2007).

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT), com aproximação da densidade local (LDA – *local density approximation*) e com a aproximação do gradiente generalizado (GGA – *Generalized Gradient Approximation*), apresenta bons resultados esporádicos, mas falha completamente em justificar as forças de dispersão de London em outros casos (LIN *et al.*, 2007).

Para incluir essas forças em DFT, muitos recursos têm sido propostos e implementados, como, por exemplo, uso da teoria de perturbação simétrica adaptada, desenvolvimento de aproximações mais sofisticadas para o potencial de troca-correlação, adição de um termo explícito de dispersão com um coeficiente C_6 determinado empiricamente, entre outros (TAPAVICZA *et al.*, 2007).

Recentemente, a aproximação de potenciais de correção de dispersão DCACP (*Dispersion Corrected Atom Centered Potentials*) tem apresentado resultados com um desempenho notavelmente bom para muitos casos, indicando tratar-se de uma forma para se conseguir uma boa descrição dessas forças fracas dentro de cálculos auto-consistentes da DFT (TAPAVICZA *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007a). Entre os casos bem sucedidos podem ser citados grafite, cristais de benzeno, cristais líquidos, adsorção de argônio em grafite (LIN *et al.*, 2007b). Além disso, essa aproximação apresenta a vantagem de não ocasionar quaisquer distorções intramoleculares significativas nas geometrias e estruturas eletrônicas (LIN *et al.*, 2007a).

Os DCACPs são potenciais dependentes do momento angular não local, representando potenciais eletrônicos baseados em átomos que corrigem os funcionais de troca-correlação padrões (LIN *et al.*, 2007b). O problema eletrônico é resolvido na presença de um potencial de correção centrado no átomo:

$$H = H_0 + \sum_i V_{ik} (R_i - r) \quad (3.10)$$

onde H_0 é o Hamiltoniano padrão de Kohn-Sham, e V_{ik} é o potencial de correção, centrado em cada átomo i , específico para cada elemento k .

Cada V_{ik} tem a forma de uma Gaussiana e é ajustado por meio de uma função que reproduz as energias de interação referentes à dispersão. A função é calculada para um sistema simples com base numa metodologia de alto nível (CCSD(T)) (CASCELLA *et al.*, 2009).

Outro ponto positivo em relação aos DCACPs é que apresentam forte transferabilidade para outros sistemas, ou seja, uma vez calibrados, DCACPs podem ser aplicados em vários meios químicos sem necessidade de novos refinamentos de parâmetros (LIN *et al.*, 2007a). Como afirma Cascella *et al.* (2009) a transferabilidade e a comparabilidade de DCACPs para sistemas heterogêneos têm sido largamente discutidas e testadas com sucesso.

A aproximação de potenciais de correção de dispersão DCACP foi utilizada neste trabalho para corrigir as forças de dispersão de London.

3.6. METODOLOGIA

No presente trabalho foi utilizado o programa CPMD (*Car-Parrinello Molecular Dynamics*). O CPMD é um pacote computacional que proporciona diferentes métodos para se computar propriedades de sistemas moleculares ou periódicos, desenvolvido pelo EMSL (*Environmental Molecular Sciences Laboratory*) no *Pacific Northwest National Laboratory*. Esse método utiliza descrições padrão da mecânica quântica de função de onda eletrônica ou densidade (CPMD).

O programa foi rodado utilizando-se a otimização da geometria e da função de onda da molécula isolada, este último para obtenção da energia, sendo que o mesmo procedimento foi utilizado para a otimização das conformações propostas para os dímeros. A otimização da geometria foi realizada apenas no ponto gamma por tratar-se de uma molécula isolada e a simetria estava ativada.

Como citado anteriormente, foi utilizada a Teoria do Funcional da Densidade, utilizando a aproximação de densidade local, com o potencial de troca-correlação BLYP, os pseudopotenciais de norma conservada de Troullier-Martins, na forma de Kleinman – Bylander e os potenciais de correção de dispersão DCACP.

Os cálculos foram rodados, em sua maior parte, nos computadores do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo, na

Universidade Estadual de Campinas (CENAPAD – UNICAMP), através de acesso remoto.

Para a molécula isolada de violaceína, simulada no vácuo, foram utilizadas energias de *cutoff* entre 160 e 300 Rydberg, para se determinar a energia de corte que representasse uma estabilização do sistema com menor custo computacional, sendo definida a energia em 220 Rydberg. Com a definição da energia de corte foram determinadas as energias do orbital molecular ocupado mais alto - HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e do orbital molecular não ocupado mais baixo - LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), a geometria otimizada e a densidade de probabilidade das regiões HOMO e LUMO.

Utilizando a energia de 220 Rydberg para a simulação no vácuo foram propostas diferentes configurações para dímeros de violaceína. A primeira configuração foi pela aproximação lateral de uma molécula de violaceína com a extremidade de outra molécula. A segunda configuração foi pela aproximação lateral de duas moléculas mantendo-as em um mesmo plano. A terceira configuração também foi pela aproximação lateral de duas moléculas, mas com seus planos formando um ângulo de aproximadamente 90°. A quarta configuração foi pelo empilhamento de duas moléculas, mantendo-as praticamente paralelas e a quinta configuração também foi pelo empilhamento de duas moléculas, mas com uma angulação de aproximadamente 90° entre as moléculas. Simulando essas configurações foram determinadas as energias do orbital molecular ocupado mais alto - HOMO e do orbital molecular não ocupado mais baixo - LUMO, a otimização das configurações, com as distâncias entre as moléculas, a densidade de probabilidade das regiões

HOMO e LUMO e foram comparadas as energias desses prováveis dímeros com a energia de duas moléculas isoladas para se discutir a probabilidade de formação dessas configurações de possíveis dímeros, sendo também discutida a possibilidade dessas configurações se formarem em ambiente aquoso.

4. RESULTADOS

4.1. MOLÉCULA DE VIOLACEÍNA

A molécula da violaceína foi simulada no vácuo em diversas energias de *cutoff* para se determinar o valor adequado para a energia total do sistema, relacionado à estrutura otimizada da molécula.

Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 1, sendo que na terceira coluna, os valores da energia do sistema são zerados em 160 Rydberg, para melhor observação da variação energética do sistema.

Tabela 1 - Resultados da energia do sistema para diferentes energias de *cutoff*

Energia de <i>cutoff</i> (Ry)	Energia do sistema (eV)	Energia do sistema (eV)
160	-5406,46792	0
170	-5406,50557	-0,03765
180	-5406,53085	-0,06293
190	-5406,54850	-0,08058
200	-5406,55978	-0,09186
210	-5406,56750	-0,09958
220	-5406,57246	-0,10454
230	-5406,57557	-0,10765
240	-5406,57747	-0,10955
250	-5406,57852	-0,11060
260	-5406,57944	-0,11152
270	-5406,58032	-0,11240
280	-5406,58109	-0,11317
290	-5406,58179	-0,11387
300	-5406,58244	-0,11452

A energia de corte foi definida em 220 Rydberg, pois este valor representa uma estabilização do sistema com custo computacional menos elevado, como pode ser observado na Figura 11.

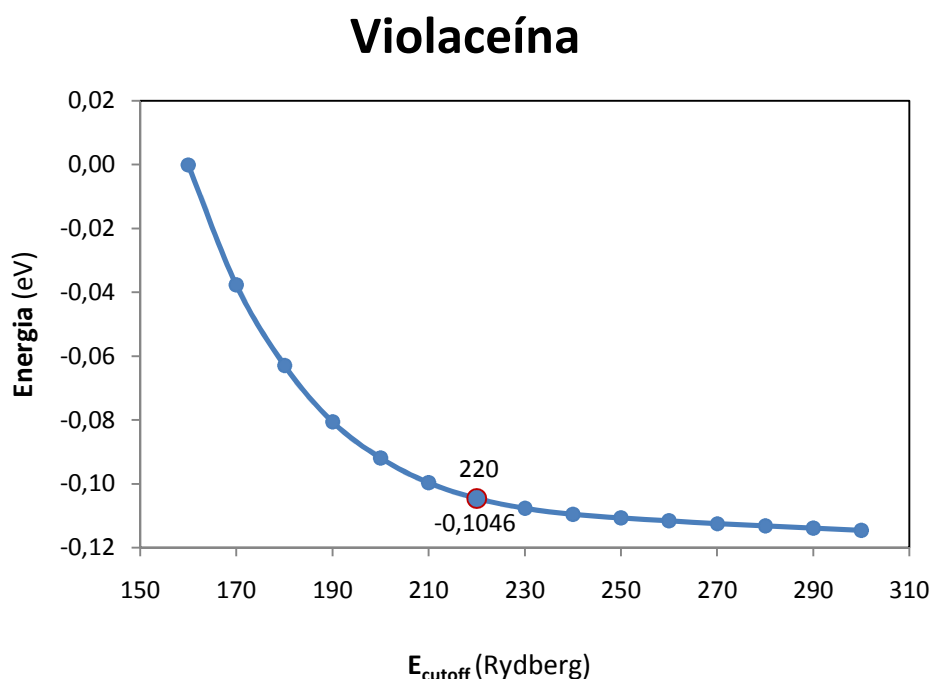


Figura 11 – Energia de corte x Energia do sistema para a molécula de violaceína.

Com base nos resultados obtidos com a energia de corte de 220 Ry, podem-se determinar as energias do orbital molecular ocupado mais alto - HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e do orbital molecular não ocupado mais baixo - LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), e dos dois próximos níveis ocupados e desocupados, também pode ser determinada a energia que separa HOMO e o LUMO, que foi de 1,38 eV, como pode ser observado na Figura 12.

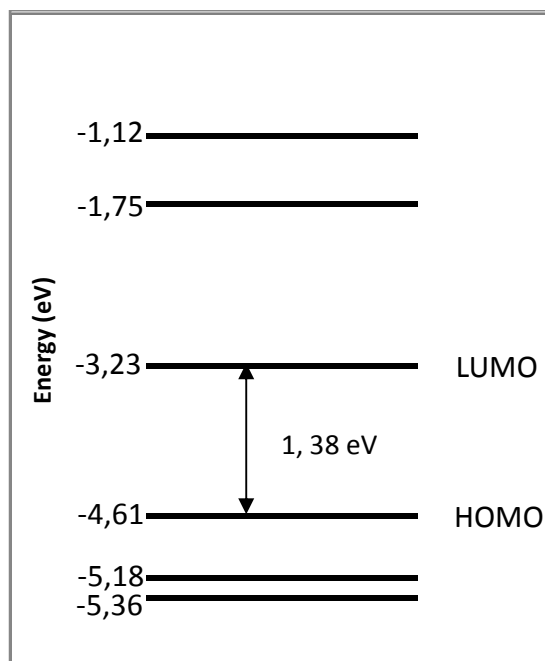


Figura 12 – Níveis eletrônicos da molécula de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Quando os orbitais HOMO e LUMO encontram-se próximos, em termos energéticos, para se excitar um elétron da região HOMO para a região LUMO é necessária uma pequena quantidade de energia, assim, fótons de luz visível possuem energia suficiente para promover essa excitação e ao serem absorvidos resultam na cor percebida (ATKINS *et al.*, 2010).

Com as coordenadas obtidas com a energia de *cutoff* de 220 Ry foi plotada a molécula otimizada da violaceína, a qual pode ser observada na Figura 13.

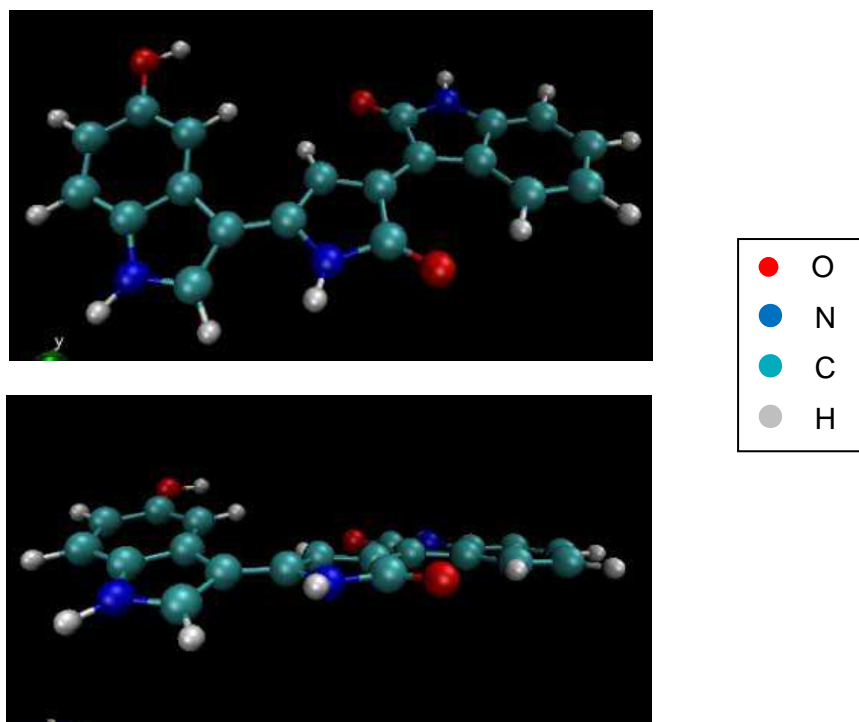


Figura 13 – Diferentes vistas da estrutura otimizada da molécula de violaceína.

Também foram obtidas as distância e os ângulos entre os átomos componentes da molécula de violaceína em suas posições otimizadas (as tabelas com os valores obtidos encontram-se no Anexo 2). Na Figura 14 encontram-se os átomos numerados.

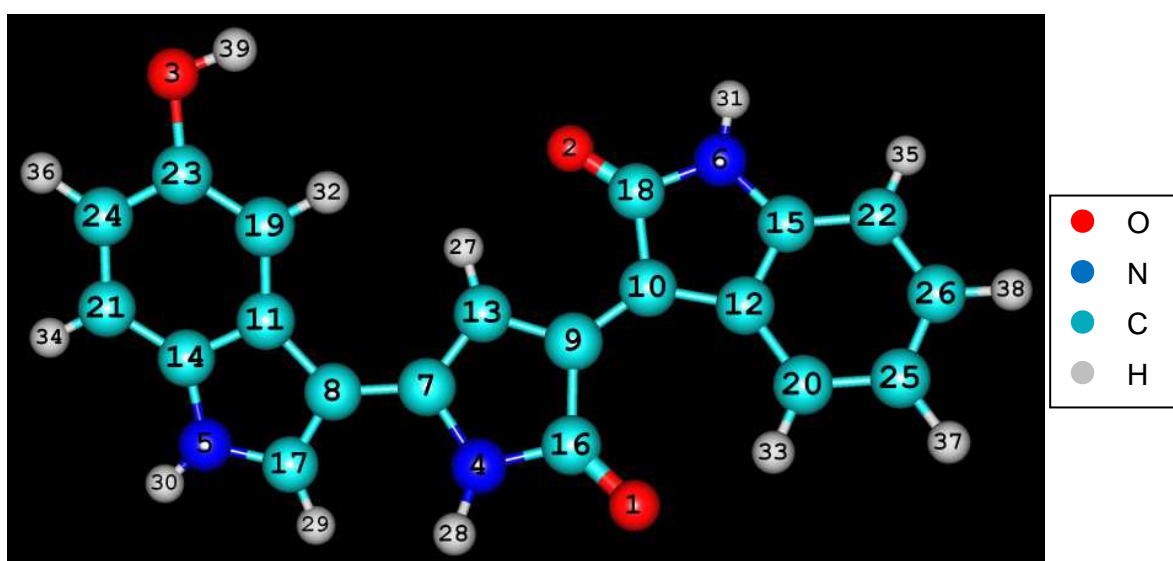


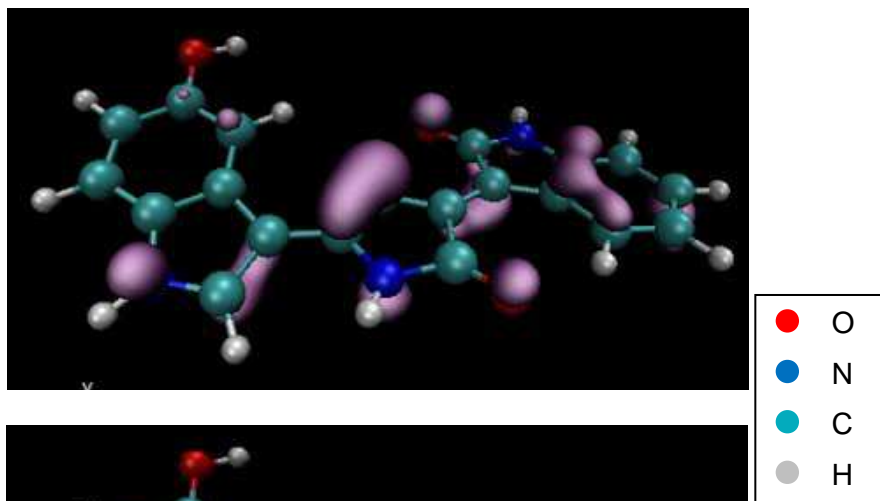
Figura 14 – Numeração dos átomos da molécula de violaceína.

Como é possível observar na Figura 8, a molécula da violaceína apresenta uma angulação entre suas três partes componentes. O oxiindol e a 2-pirrolidona são praticamente coplanares, com um ângulo de diedro entre os átomos C(13) - C(9) - C(10) - C(18) de aproximadamente $-0,2^\circ$, já entre o hidroxindol e a 2-pirrolidona foi obtido um ângulo de diedro entre os átomos C(13) - C(7) - C(8) - C(11) de aproximadamente $-17,3^\circ$. Rettori (2002) encontrou valores similares para o ângulo de diedro entre o oxiindol e a 2-pirrolidona (próximo a zero), porém o valor para o ângulo de diedro entre o hidroxindol e a 2-pirrolidona encontrado por ele foi maior, sendo de aproximadamente 23° . Os cálculos realizados pelo autor utilizaram a base CEP-31G, utilizando o pacote Gaussian 94. Como o próprio autor refere, seus cálculos de primeiros princípios foram “pobres”, não considerando correlação eletrônica ou interação de configurações.

Com os dados obtidos também foi possível obter a densidade de probabilidade de carga da molécula, conforme pode ser observado na Figura 15.

Pode ser observado que a densidade de probabilidade da região HOMO e da região LUMO concentra-se nos átomos de carbono e oxigênio, e, mais ligeiramente, nos átomos de nitrogênio. O lado da molécula onde se encontra o oxiindol apresenta uma concentração de cargas maior que o lado do 5-hidroxindol.

HOMO



LUMO

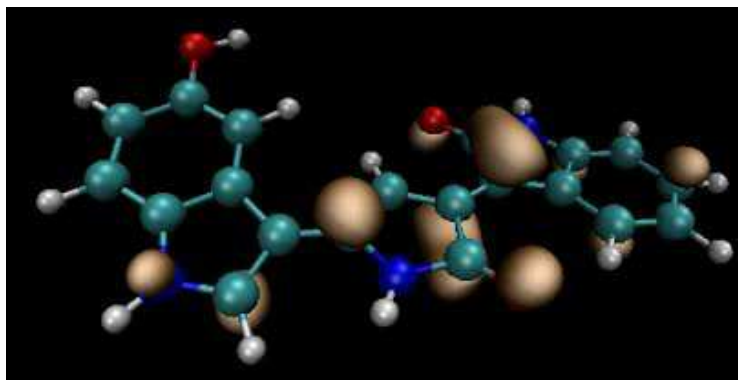


Figura 15 – Densidade de probabilidade das regiões HOMO e LUMO da molécula de violaceína.

Em termos dos átomos de carbono, os orbitais atômicos que apresentam maior contribuição para o HOMO são os carbonos 7, 8, 10, 13, 15, 26 e para o LUMO são os carbonos 7, 9, 10, 16.

Em termos dos átomos de oxigênio, os átomos 1 e 2, os quais possuem duplas ligações, são os principais contribuintes tanto para o HOMO como para o LUMO.

4.2. PROPOSTAS PARA OS DÍMEROS DE VIOLACEÍNA

A partir da molécula otimizada da violaceína foram propostas algumas conformações para os dímeros.

A primeira conformação de dímero proposta (Figura 16) foi pela aproximação da lateral de uma das moléculas da violaceína com a extremidade da outra molécula, mantendo-as quase coplanares em xy.

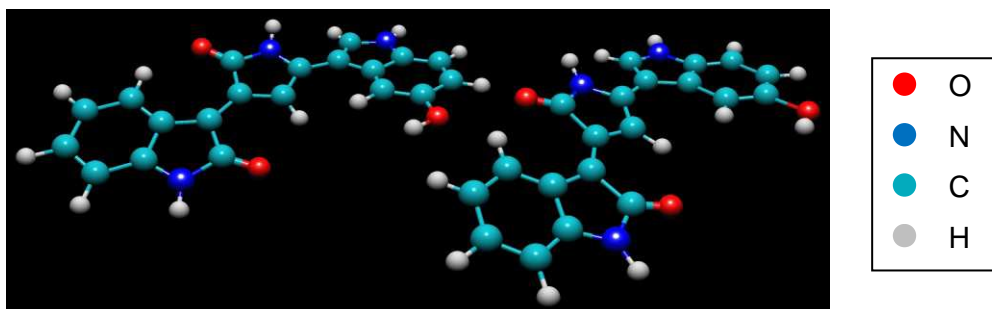


Figura 16 – Primeira conformação proposta.

A segunda conformação de dímero proposta (Figura 17) foi pela aproximação lateral de duas moléculas de violaceína, mantendo-as quase coplanares em xy.

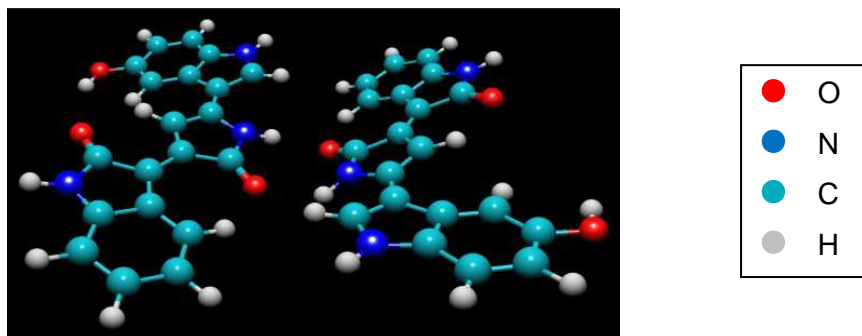


Figura 17 – Segunda conformação proposta.

A terceira conformação de dímero proposta (Figura 18) foi pela aproximação lateral de duas moléculas de violaceína formando um ângulo aproximado de 90° entre as moléculas.

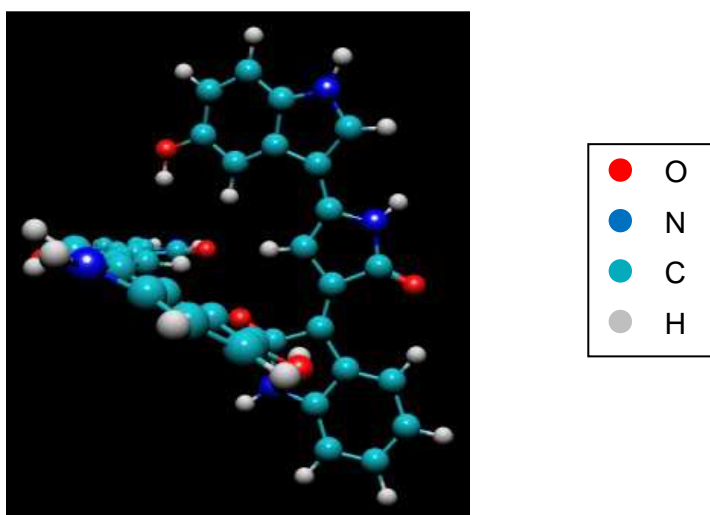


Figura 18 – Terceira conformação proposta.

A quarta conformação de dímero proposta (Figura 19) foi pelo empilhamento de duas moléculas de violaceína, mantendo-as praticamente paralelas, com o hidroxiindol de uma das moléculas em direção ao oxiindol da outra.

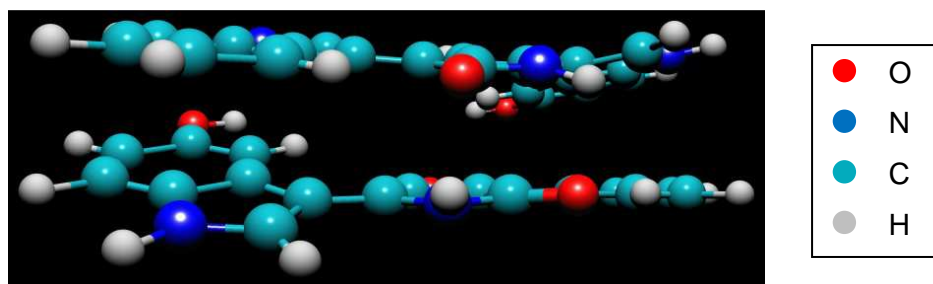


Figura 19 – Quarta conformação proposta.

A quinta conformação de dímero proposta (Figura 20) foi pelo empilhamento de duas moléculas de violaceína, sendo que as moléculas foram colocadas praticamente perpendiculares entre si.

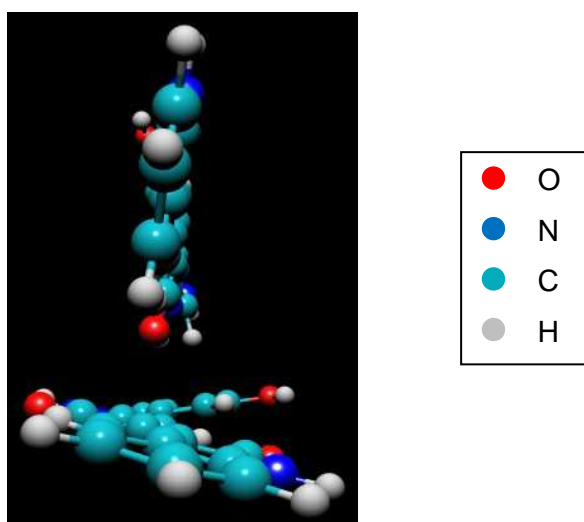


Figura 20 – Quinta conformação proposta.

Utilizando a energia de corte de 220 Ry, a mesma utilizada para a molécula de violaceína isolada, essas conformações foram simuladas no vácuo.

4.2.1. PRIMEIRA CONFORMAÇÃO

Na primeira conformação de dímero proposta (aproximação da pirrolidona e do oxiindol de uma das moléculas da violaceína com o hidroxindol da outra molécula, ou seja, aproximação da lateral de uma das moléculas com a extremidade da outra, mantendo-as quase coplanares em xy), a aproximação ocorreu entre átomos de oxigênio e hidrogênio, sendo a formação do possível dímero por ligações de hidrogênio.

Segundo Kollman e Allen (1972), a ligação de hidrogênio representa uma interação intermolecular entre um hidrogênio deficiente de elétrons e uma região de alta densidade eletrônica de outra molécula. Na teoria de ligação por elétrons de valência, o hidrogênio formaria uma única ligação química, porém, em diversas situações o hidrogênio possui duas valências, sendo a adicional chamada de 'ligação de hidrogênio'. Essa ligação ocorre, por exemplo, em dímeros de água $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}-\text{OH}$. Em cristais moleculares, foi observado que essa ligação apresenta uma distância menor que a soma dos raios de van der Waals do hidrogênio e do átomo eletronegativo que participam da ligação. A energia de ligação entre esses átomos é principalmente eletrostática, sendo que em distâncias mais curtas também podem participar a repulsão e a delocalização, mas a repulsão é menor que em outros tipos de ligação. Outro ponto destacado pelos autores é que existem ligações de hidrogênio mais fortes que outras, sendo que as mais fortes são aquelas que trazem mudanças significativas em ambas as moléculas participantes da ligação.

Segundo Rodrigues (2000), as ligações de hidrogênio consideradas mais fortes ocorrem em compostos iônicos, sendo que, quanto mais simétricas

(próton equidistante dos átomos a que se ligam, sendo igualmente compartilhado por ambos), mais fortes são as ligações. Quando a distância entre hidrogênios ligados a oxigênio é menor que 2,55 Å, essa distância é considerada um indicativo de ligações de hidrogênio fortes ou moderadamente fortes. Quando essa distância é curta, ou seja, maior que a ligação covalente (maior que 0,9 Å), mas menor que 2,0 Å, essas ligações são consideradas mais fortes.

Bueno e Oliveira (2014) citam distância de ligações de hidrogênio de aproximadamente 2,69 Å, entre o hidrogênio de uma molécula e o oxigênio ligado a um carbono de outra molécula por dupla ligação ($\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}$), sendo essa distância menor que a soma dos raios de van der Waals, sendo este considerado um requisito obrigatório para se formar uma ligação de hidrogênio.

Por outro lado existem estudos que referem ligações de hidrogênio com distâncias maiores, como Brito (2011), que cita a distância de ligações de hidrogênio entre fármacos e receptores em proteínas de até 3,3 Å; neste trabalho uma ligação de hidrogênio de 2,76 Å entre um hidrogênio ligado a um nitrogênio e um átomo de oxigênio de uma carbonila, é considerada forte.

Nessa conformação, as estruturas individuais das moléculas permaneceram praticamente inalteradas (Figura 21).

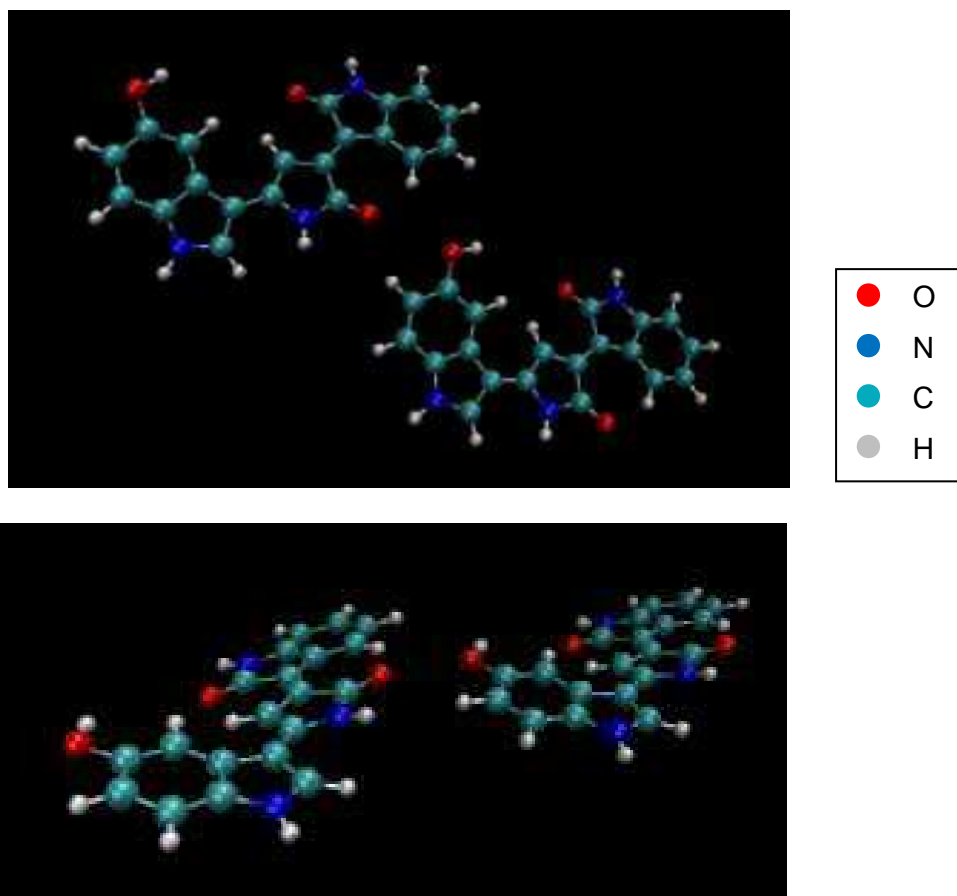


Figura 21 – Diferentes vistas da primeira conformação otimizada

A convergência manteve as distâncias com 2,485 Å entre o oxigênio com ligação dupla da pirrolidona e o hidrogênio ligado ao carbono do hidroxiindol da outra molécula e 2,819 Å entre o oxigênio da hidroxila do hidroxiindol e o hidrogênio ligado ao carbono do oxiindol da outra molécula. A interação com distância de 2,485 Å, como citado por Bueno e Oliveira representa uma distância menor que a soma dos raios de van der Waals, indicando uma ligação de hidrogênio. A distância de 2,819 Å pode indicar a não formação de uma ligação ou ser considerada uma ligação de hidrogênio mais fraca, podendo estar relacionada a uma aproximação em um ângulo não ideal para a formação da ligação.

Foram determinadas as energias do HOMO e do LUMO, e dos dois próximos níveis ocupados e desocupados, também pode ser determinada a energia que separa HOMO e o LUMO, que foi de 1,26 eV, a qual foi ligeiramente menor que na molécula isolada como pode ser observado na Figura 22.

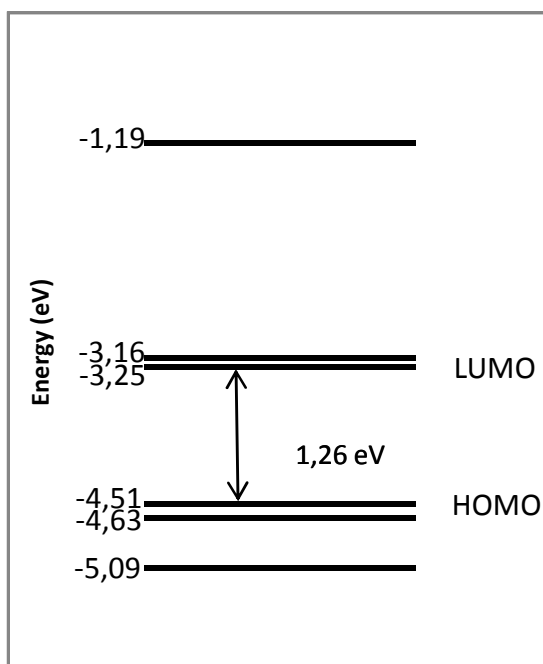
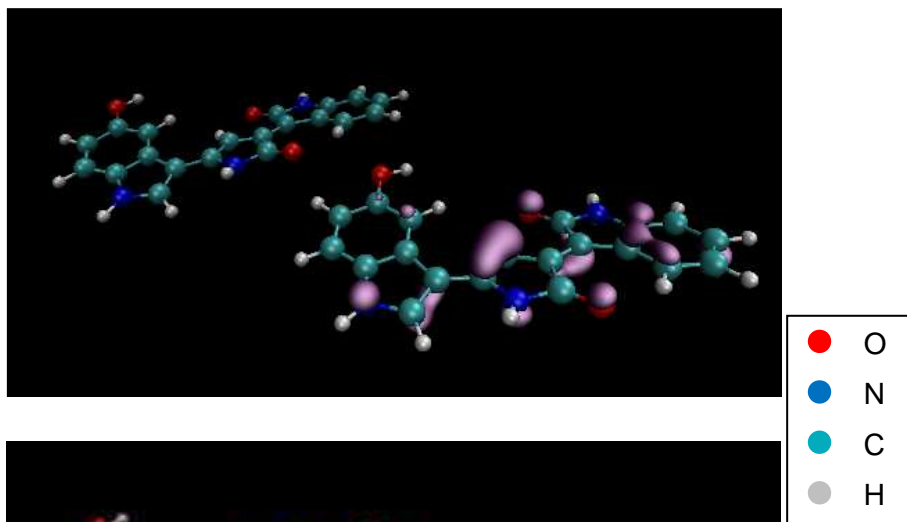


Figura 22 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o primeiro dímero de violaceína, indicando as regiões de HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

É possível observar que os níveis HOMO e HOMO-1, como também os níveis LUMO e LUMO+1, encontram-se quase degenerados, o que ocorreu, pois se tratam dos níveis de HOMO e de LUMO das duas moléculas analisadas que se apresentam bastante próximos.

Com os dados obtidos também foi possível obter a densidade de probabilidade de cargas da primeira conformação proposta para o dímero, conforme pode ser observado na Figura 23.

HOMO



LUMO

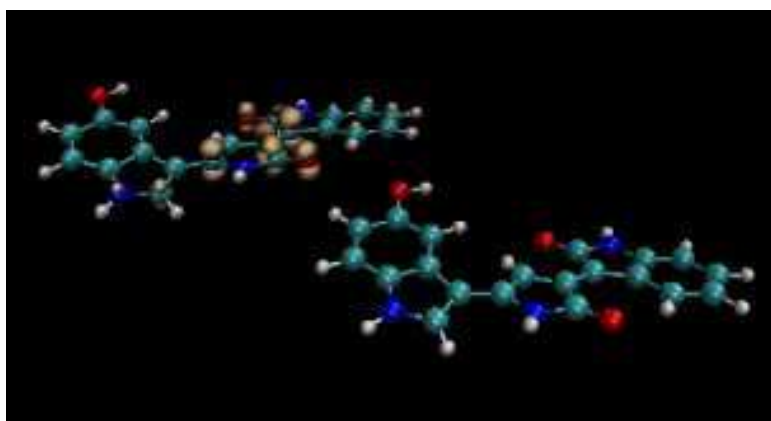


Figura 23 – Densidade de probabilidade de carga da primeira conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

Nesta configuração, a densidade de probabilidade da região HOMO concentrou-se em uma das moléculas enquanto a densidade de carga da região LUMO concentrou-se na outra molécula. Esse tipo de distribuição de carga também foi observado por Homem-de-Mello *et al.* (2007) em dímeros de azul de metileno e de laranja de acridina, quando aproximados lateralmente (moléculas coplanares).

Essa distribuição de probabilidade de densidades de carga indica haver uma interação entre as moléculas na conformação proposta para o dímero.

Nessa configuração a energia total do dímero foi maior que de duas moléculas isoladas (0,074 eV), o que indica baixa possibilidade de formação

dessa conformação do dímero, já que é energeticamente mais favorável as moléculas permanecerem isoladas. Em ambiente aquoso, essa ligação entraria em competição com uma possível ligação da molécula de violaceína com moléculas de água, as quais estabelecem facilmente ligações de hidrogênio com outras moléculas. Assim, provavelmente esse dímero apresenta pouca possibilidade de formação tanto no vácuo, como em ambiente aquoso.

4.2.2. SEGUNDA CONFORMAÇÃO

Na segunda conformação de dímero proposta (aproximação lateral entre as pirrolidonas de duas moléculas de violaceína, mantendo-as quase coplanares em xy), a aproximação ocorreu entre átomos de oxigênio ligados a um carbono do anel da pirrolidona por ligação dupla e átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio do anel da pirrolidona, sendo formadas possíveis ligações de hidrogênio, como na conformação proposta para o dímero 1, com as conformações individuais das moléculas praticamente inalteradas (Figura 24).

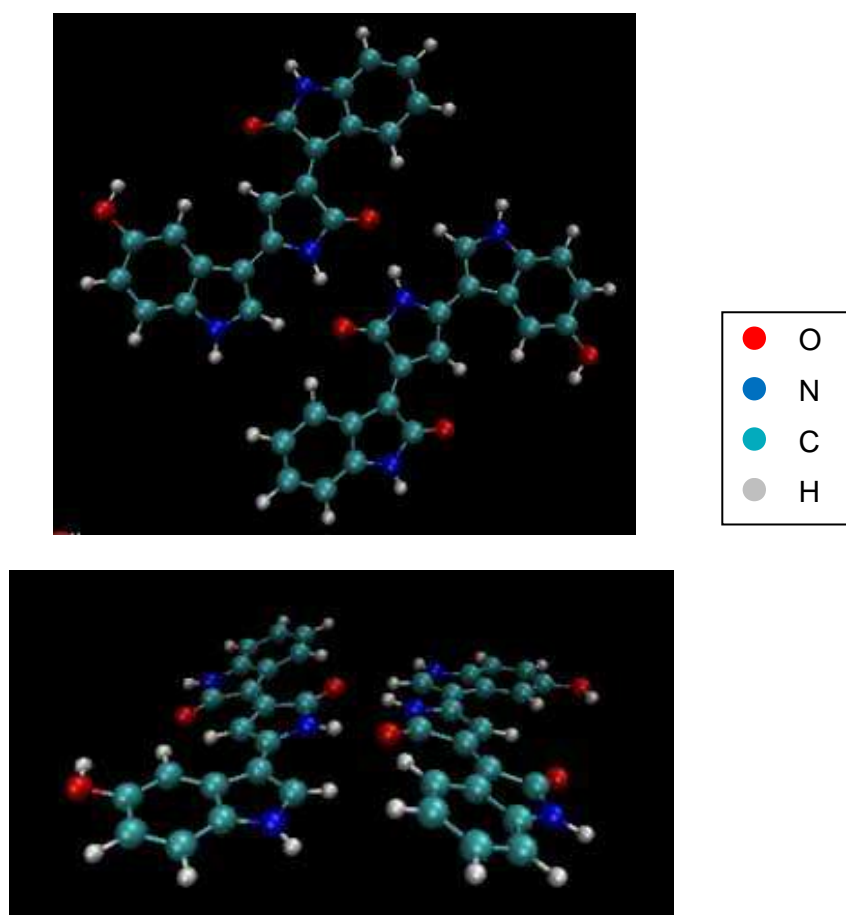


Figura 24 – Diferentes vistas da segunda conformação otimizada.

As distâncias entre os átomos de oxigênio e hidrogênio, após a convergência, foram de 2,007 e 1,876 Å. Nesta conformação, as distâncias

entre os átomos de hidrogênio e oxigênio foram menores que na conformação anterior, apontando para ligações de hidrogênio mais fortes que as encontradas na primeira conformação, já que uma delas (1,876 Å), inclusive, tem distância inferior a 2,0 Å, sendo uma ligação curta e, portanto, mais forte; a distância da outra ligação (2,007 Å), também está muito próxima a 2,0 Å. O fato de que os dois átomos de oxigênio que participam dessas ligações apresentarem apenas uma ligação dupla (sem formação de hidroxila) pode ter sido o fato determinante para essas distâncias serem menores que as observadas anteriormente.

Foram determinadas as energias do HOMO e do LUMO, e dos dois próximos níveis ocupados e desocupados, também pode ser determinada a energia que separa HOMO e o LUMO, que foi de 1,19 eV, a qual foi ligeiramente menor que na molécula isolada e também foi menor em relação à primeira conformação, como pode ser observado na Figura 25.

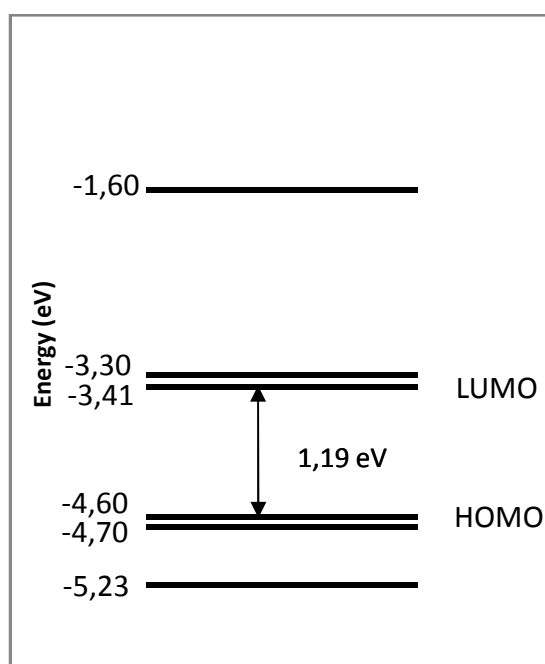
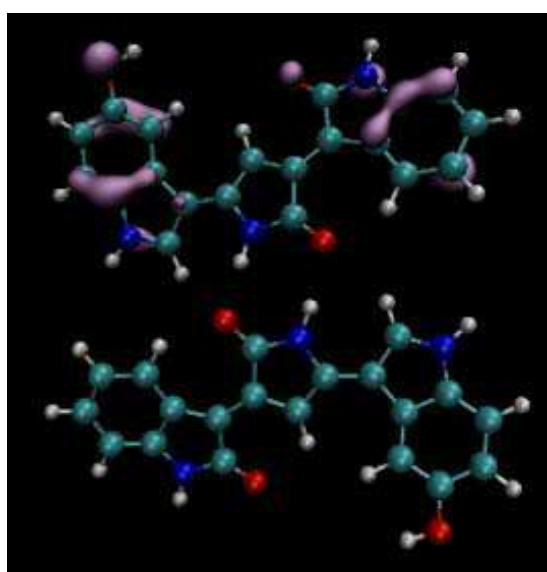


Figura 25 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o segundo dímero de violaceína, indicando as regiões de HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Neste caso também é possível observar que os níveis HOMO e HOMO-1, como também os níveis LUMO e LUMO+1, encontram-se quase degenerados, o que ocorreu pois tratam-se dos níveis de HOMO e de LUMO das duas moléculas analisadas que apresentam-se bastante próximos.

Com os dados obtidos também foi possível obter a probabilidade de densidade de cargas da segunda conformação proposta para o dímero, conforme pode ser observado na Figura 26.

HOMO



LUMO

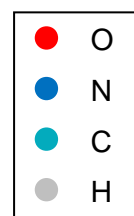
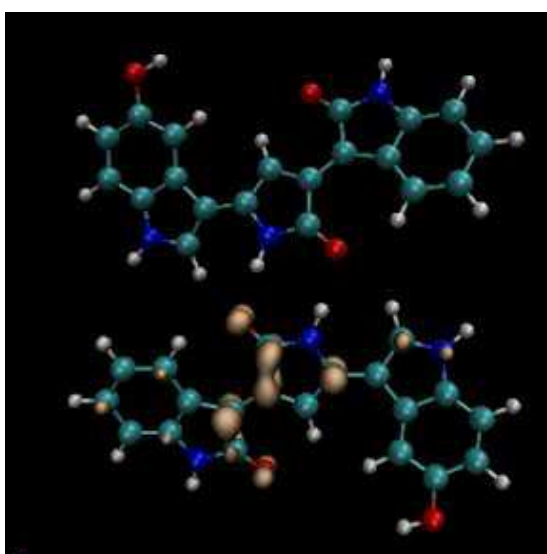


Figura 26 – Densidade de probabilidade de carga da segunda conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

A densidade de probabilidade da região HOMO concentrou-se em uma das moléculas e a densidade de probabilidade da região LUMO concentrou-se na outra molécula. Esse tipo de distribuição de probabilidade de carga, como já foi citado, foi observado também em dímeros de azul de metileno e de laranja de acridina, quando aproximados lateralmente (moléculas coplanares), conforme observado por Homem-de-Mello *et al.* (2007).

Neste caso também, essa distribuição de probabilidade de densidades de carga indica haver uma interação entre as moléculas da conformação proposta para o dímero.

Nessa conformação a energia total do dímero foi menor que de duas moléculas isoladas (-0,565 eV), o que indica maior possibilidade de formação do dímero nessa conformação, já que é energeticamente mais favorável a dimerização das moléculas do que sua permanência em forma isolada. Em ambiente aquoso, essa ligação entraria em competição com uma possível ligação da molécula de violaceína com moléculas de água, as quais estabelecem facilmente ligações de hidrogênio com outras moléculas. Assim, mesmo sendo essa dimerização energeticamente favorável, torna-se necessária a análise da ligação da molécula de violaceína com moléculas de água, para se determinar a possibilidade de formação desse dímero em ambiente aquoso.

4.2.3. TERCEIRA CONFORMAÇÃO

Na terceira conformação de dímero proposta (pela aproximação lateral entre as pirrolidonas de duas moléculas de violaceína formando um ângulo aproximado de 90° entre as moléculas) também ocorreu a aproximação entre átomos de oxigênio ligados ao carbono do anel contendo cinco átomos do oxiindol e dois hidrogênios, um deles ligado ao carbono da pirrolidona e outro ligado ao carbono do anel de seis átomos do hidroxiindol, sendo formadas possíveis ligações de hidrogênio com as estruturas individuais das moléculas praticamente inalteradas (Figura 27).

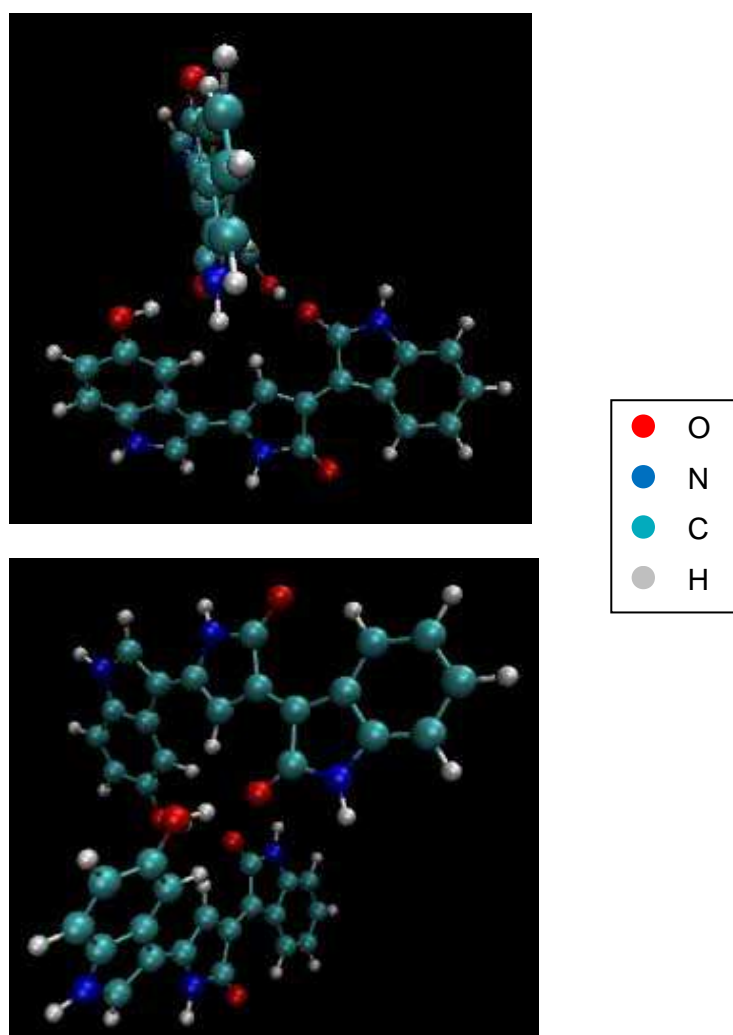


Figura 27 – Diferentes vistas da terceira conformação otimizada.

Após a convergência, cada átomo de oxigênio estava próximo de dois átomos de hidrogênio da outra molécula sendo que as distâncias foram de 2,347 Å e 1,808 Å para um dos oxigênios e 2,322 Å e 1,796 Å para o outro. A ligação intermolecular mais distante de cada oxigênio ficou com valores intermediários entre a primeira conformação proposta para o dímero (ligações mais longas) e a segunda proposta para o dímero (ligações mais curtas), porém as ligações mais curtas foram menores que na segunda conformação proposta para o dímero. As ligações mais curtas, inferiores a 2,0 Å, indicam tratar-se de ligações curtas e, portanto, ligações mais fortes. Também neste caso, como ocorre na segunda conformação proposta para o dímero, os átomos de oxigênio que participam das ligações de hidrogênio apresentam duplas ligações (não formam hidroxilas), porém o ângulo entre as moléculas pode ter interferido nas distâncias das ligações de hidrogênio resultantes e na energia dessas ligações.

Foram determinadas as energias do HOMO e do LUMO, e dos dois próximos níveis ocupados e desocupados, também pode ser determinada a energia que separa HOMO e o LUMO, que foi de 1,28 eV, a qual foi ligeiramente menor que na molécula isolada mas foi maior que nas conformações propostas anteriormente para os dímeros, como pode ser observado na Figura 28.

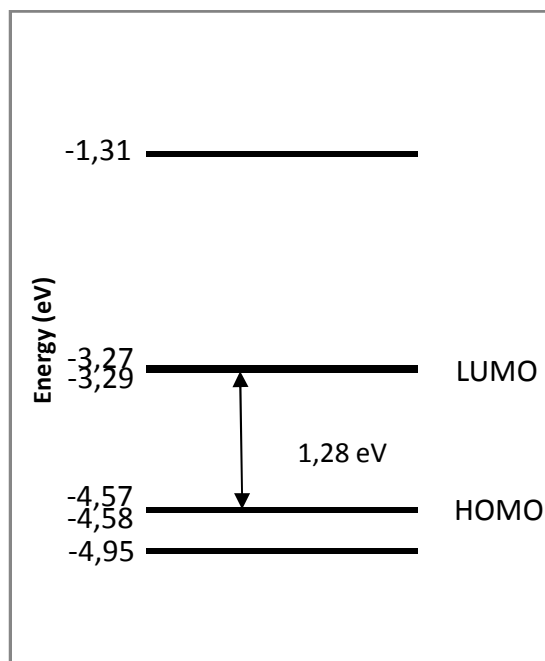
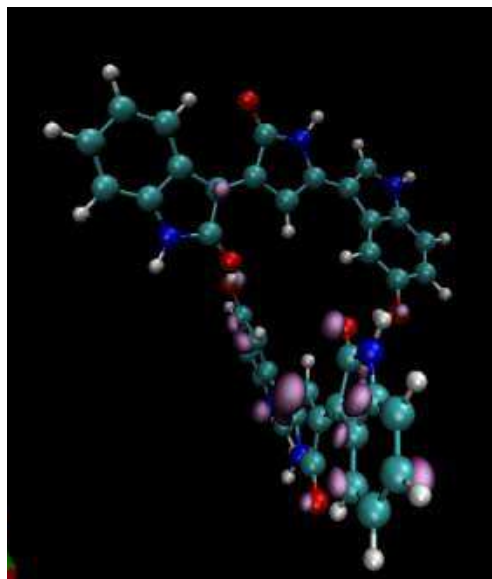


Figura 28 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o terceiro dímero de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Nesta conformação proposta para o dímero observa-se que os níveis HOMO e HOMO-1, como também os níveis LUMO e LUMO+1, encontram-se praticamente degenerados, o que ocorreu pois tratam-se dos níveis de HOMO e de LUMO bastante próximos das duas moléculas analisadas.

Com os dados obtidos também foi possível obter a densidade de probabilidade de cargas da conformação proposta para o terceiro dímero, conforme pode ser observado na Figura 29.

HOMO



LUMO

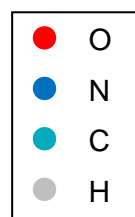
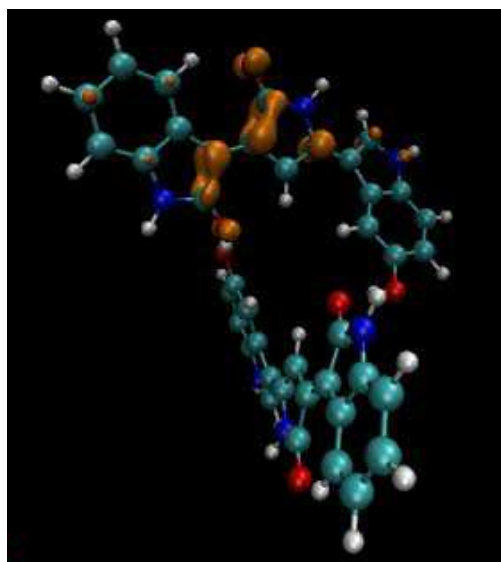


Figura 29 – Densidade de probabilidade de carga da terceira conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO

Nesta conformação, a densidade de probabilidade da região HOMO concentrou-se em uma das moléculas, porém podem ser visualizados alguns pontos relacionados a essa energia na outra molécula. A densidade de probabilidade da região LUMO concentrou-se na outra molécula.

Novamente esses dados indicam haver uma interação entre as moléculas da conformação proposta para o dímero.

Nessa conformação, como na segunda conformação proposta, a energia total foi menor que de duas moléculas isoladas (-0,491 eV), o que indica possibilidade de formação dessa conformação de dímero, pois a dimerização das moléculas é energeticamente mais favorável do que sua permanência na forma isolada. Esta conformação, como a anterior, quando em ambiente aquoso, apresentaria uma competição de suas ligações no dímero com uma possível ligação da molécula de violaceína com moléculas de água, as quais estabelecem facilmente ligações de hidrogênio com outras moléculas. Neste caso, também, mesmo sendo essa dimerização energeticamente favorável, torna-se necessária a análise da ligação da molécula de violaceína com moléculas de água, para se determinar a possibilidade de formação desse dímero em ambiente aquoso.

4.2.4. QUARTA CONFORMAÇÃO

Na quarta conformação de dímero proposta (pelo empilhamento de duas moléculas de violaceína, mantendo-as praticamente paralelas, com o hidroxindol de uma das moléculas em direção ao oxiindol da outra), a configuração resultante é similar à configuração '*parallel-displaced*' do dímero de benzeno, em relação aos grupos indóis, pois há um deslizamento paralelo de um grupo indol sobre o mesmo grupo da outra molécula (Figura 30).

Neste caso, a aproximação ocorreu entre os anéis carbônicos, gerando uma mudança conformacional nas moléculas de violaceína, que apresentam uma diminuição na angulação de diedro entre o hidroxindol e a 2-pirrolidona, além de uma curvatura, principalmente na molécula que se encontra na posição inferior da segunda imagem da Figura 30. A distância entre as moléculas na região central das mesmas ficou em 4,710 Å, que é uma distância maior que as encontradas anteriormente entre átomos de oxigênio e hidrogênio (ligação de hidrogênio), pois, neste caso a aproximação não ocorre entre tais átomos, mas sim entre os anéis carbônicos.

As interações entre anéis aromáticos vizinhos é, em geral conhecida como '*pi-stacking*' ou interações π - π , as quais descrevem uma interação energeticamente importante entre nuvens π de compostos aromáticos que tem sua maximização em empilhamentos paralelos de face centrada (MARTINEZ E IVERSON, 2012).

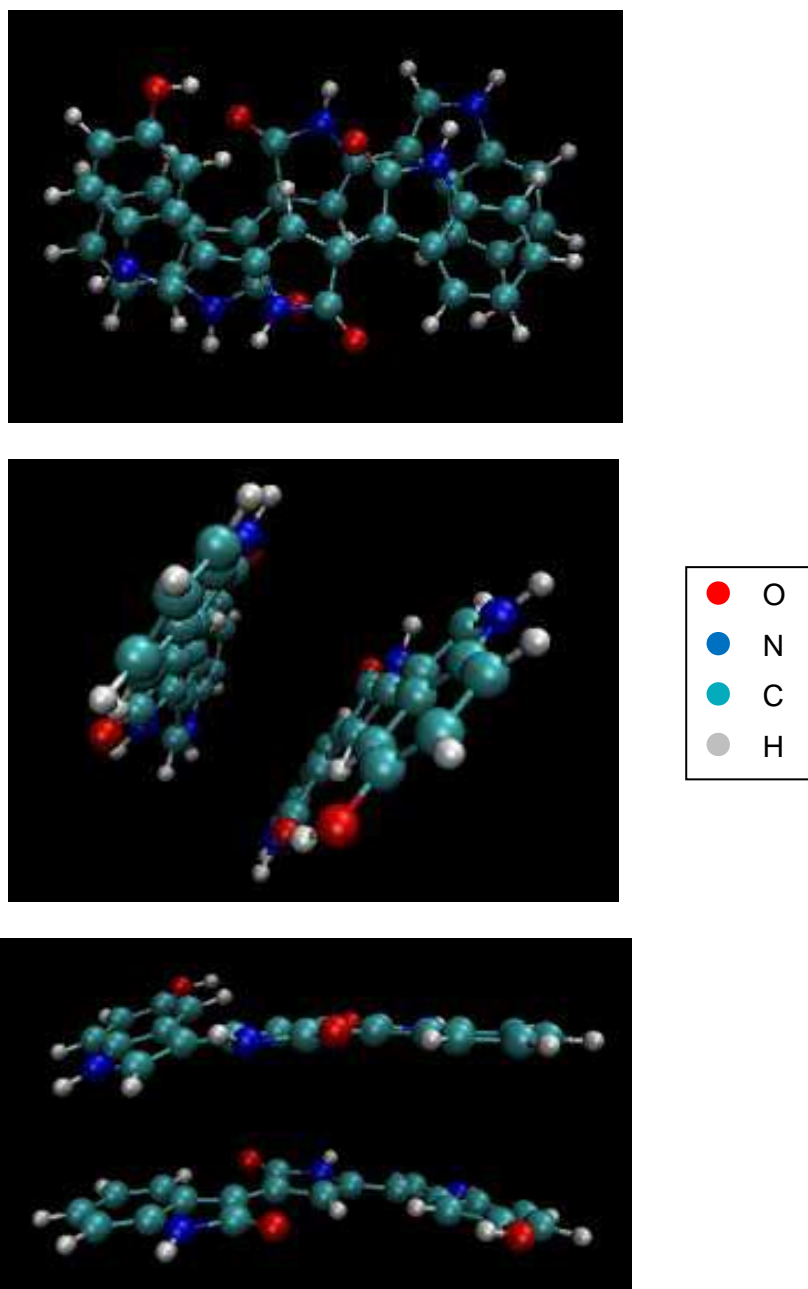


Figura 30 – Diferentes vistas da quarta conformação otimizada.

Segundo Sinnokrot e Sherrill (2006), em sistemas contendo anéis tipo fenil, a configuração '*sandwich*' é raramente observada, sendo as configurações '*parallel-displaced*' e '*T-shaped*', por outro lado, frequentemente observadas em estruturas cristalinas que apresentem compostos aromáticos pequenos.

A molécula de benzeno, utilizada como modelo para se estudar moléculas contendo anéis aromáticos, também possui um momento quadrupolo significativo, sendo que a interação eletrostática entre os quadrupolos do benzeno possui um papel decisivo para se determinar a sua estrutura mais estável, o que explica a instabilidade da configuração ‘sandwich’, já que as interações, nesse caso, são repulsivas (Figura 31). Essas interações eletrostáticas também são utilizadas para se determinar as geometrias favoráveis das interações π - π em outros sistemas. (TSUZUKI, 2005).

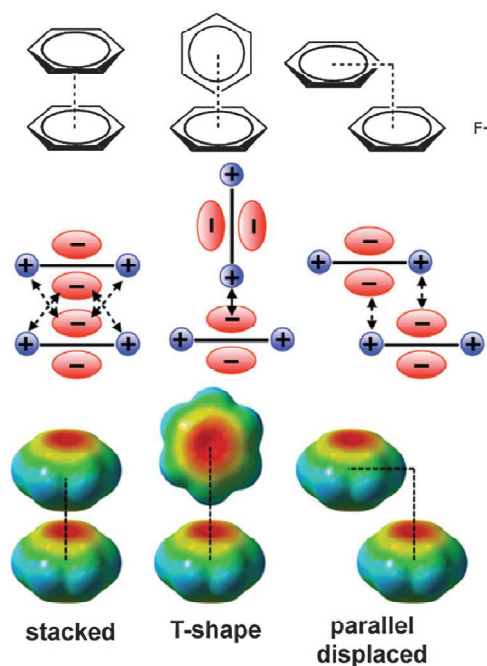


Figura 31 – Geometrias, momentos quadrupolo e distribuição de carga de interações π - π aromáticas típicas.

Fonte: Adaptado de Matthews *et al.* (2014)

Em dímeros de benzeno Tsuzuki (2005) refere que a distância energeticamente mais favorável na configuração ‘parallel-displaced’ é em torno de 3,5 Å. A distância encontrada nesta conformação proposta para o dímero de

violaceína foi superior a este valor, este fato provavelmente está relacionado à presença de outros átomos que influenciam a aproximação entre as moléculas.

Com base em tais dados pode-se inferir que a mudança conformacional nas moléculas de violaceína isoladas quando se apresentam nesse tipo de interação pode ser consequência de seu momento quadrupolo e das consequentes interações eletrostáticas entre suas partes componentes, indicando uma interação efetiva entre essas moléculas.

Também foram determinadas as energias do HOMO e do LUMO, e dos dois próximos níveis ocupados e desocupados, e a energia que separa HOMO e o LUMO, que foi de 1,23 eV, a qual foi ligeiramente menor que na molécula isolada e também foi menor em relação à primeira e à terceira propostas de conformação do dímero, mas foi maior em relação à segunda proposta de conformação, como pode ser observado na Figura 32.

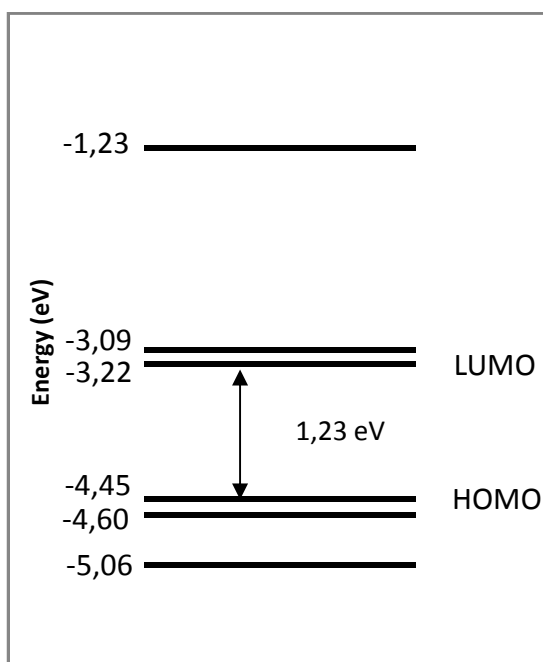
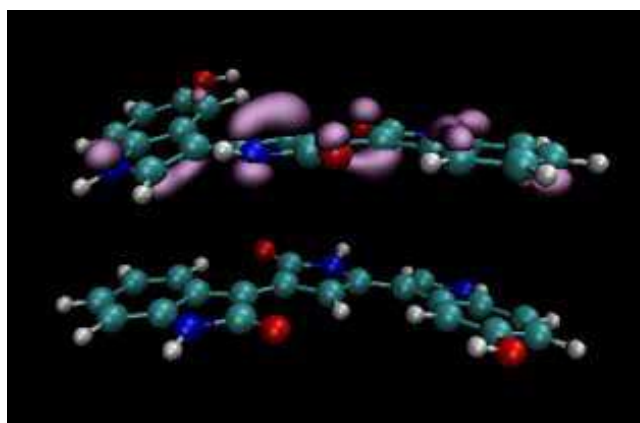


Figura 32 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o quarto dímero de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Novamente, nesta proposta de conformação para o dímero também foi observado que os níveis HOMO e HOMO-1, como também os níveis LUMO e LUMO+1, encontram-se quase degenerados, o que ocorreu, pois se tratam dos níveis de HOMO e de LUMO das duas moléculas analisadas que apresentam-se bastante próximos.

A partir dos dados obtidos também foi possível determinar a densidade de probabilidade de cargas da quarta conformação proposta para o dímero, conforme pode ser observado na Figura 33.

HOMO



LUMO

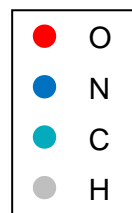
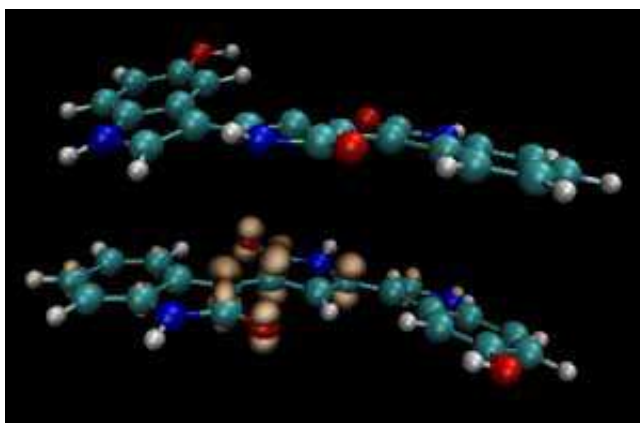


Figura 33 – Densidade de probabilidade de carga da quarta conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO.

A densidade de probabilidade da região HOMO concentrou-se em uma das moléculas e a densidade de carga da região LUMO concentrou-se na outra

molécula. Essa distribuição apresenta-se semelhante às demais conformações propostas para os dímeros analisadas, porém quando comparada ao dímero de azul de metileno (HOMEM-DE-MELLO *et al.*, 2007), essa distribuição mostra-se diferente, já que no dímero de azul de metileno, quando empilhado, tanto o HOMO quanto o LUMO apresentaram-se distribuídos pelas duas moléculas. Existe uma diferença entre esses dois corantes que pode estar associada a essa diferença na distribuição: enquanto a violaceína é um corante considerado não ionizada, o azul de metileno é um corante iônico.

De qualquer forma, essa distribuição de probabilidade de cargas é mais um indicativo, além da mudança conformacional, de interação entre as moléculas.

Nessa configuração, como na primeira conformação proposta para o dímero, a energia foi maior que de duas moléculas isoladas (+0,115 eV), indicando baixa possibilidade de formação desse dímero, já que é energeticamente mais favorável as moléculas permanecerem isoladas. Em ambiente aquoso, porém, esse tipo de conformação pode se tornar favorável, pois, como a violaceína é uma molécula hidrofóbica, há uma tendência em diminuir o contato da molécula com as moléculas de água, o que é possível caso as moléculas estejam próximas o suficiente para impedir a presença de moléculas de água entre elas. Assim, para se determinar a possibilidade de formação desse dímero em ambiente aquoso, é necessário avaliar o ganho energético da diminuição do número de moléculas de água interagindo com a molécula de violaceína e verificar se esse ganho é maior que possíveis interações de repulsão entre as moléculas de violaceína.

Em relação ao azul de metileno, Homem-de-mello *et al.* (2007), em seus estudos através de dados obtidos por espectroscopia de absorção, concluiu que somente conformações empilhadas podem ser consideradas como dímeros formados por moléculas que interagem entre si.

4.2.5. QUINTA CONFORMAÇÃO

O quinto dímero proposto foi pelo empilhamento de duas moléculas de violaceína, sendo que as moléculas foram colocadas praticamente perpendiculares entre si, apresentando, na região central das moléculas, uma aproximação entre o oxigênio de uma das pirrolidonas, com a nuvem π da outra pirrolidona, resultando na formação de uma configuração similar à '*T-shaped*' do dímero de benzeno, em relação aos grupos indóis em uma das extremidades do dímero (Figura 34).

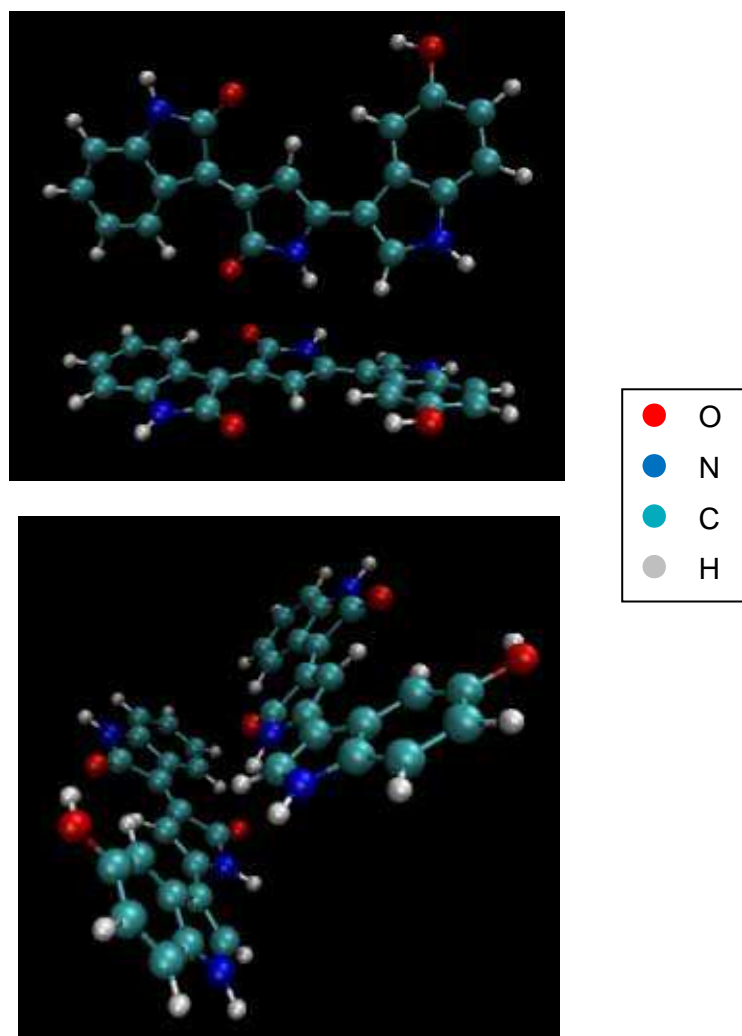


Figura 34 – Diferentes vistas da quinta conformação otimizada.

Nesse caso a interação entre os anéis aromáticos também pode ser considerada uma interação π - π , como pode ser observado na Figura 31. A distância intermolecular, na região central das moléculas, foi de 3,629 Å entre o oxigênio da pirrolidona na molécula superior da imagem 1 na Figura 34 e um dos carbonos do anel da pirrolidona na molécula inferior da imagem 1 na Figura 34. Essas distâncias são maiores que as encontradas em ligação de hidrogênio por serem do tipo π - π , mas em comparação à quarta configuração proposta, a distância entre as moléculas é menor, provavelmente devido à angulação entre as mesmas. Por outro lado, neste caso não são observadas alterações significativas na conformação das moléculas.

Segundo análises realizadas por Tsuzuki (2005), em dímeros de benzeno, a energia de interação nas configurações '*parallel-displaced*' e '*T-shaped*' são semelhantes. O autor sugere que, em dímeros de benzeno, ocorre uma grande oscilação entre essas duas estruturas.

Em relação à quinta conformação proposta, foram determinadas as energias do HOMO e do LUMO, e dos dois próximos níveis ocupados e desocupados, também pode ser determinada a energia que separa HOMO e o LUMO, que foi de 1,24 eV, a qual foi ligeiramente menor que na molécula isolada e também foi menor em relação à primeira e à terceira conformação proposta para os dímeros, porém foi maior em relação à segunda e à quarta conformação proposta para os dímeros, como pode ser observado na Figura 35.

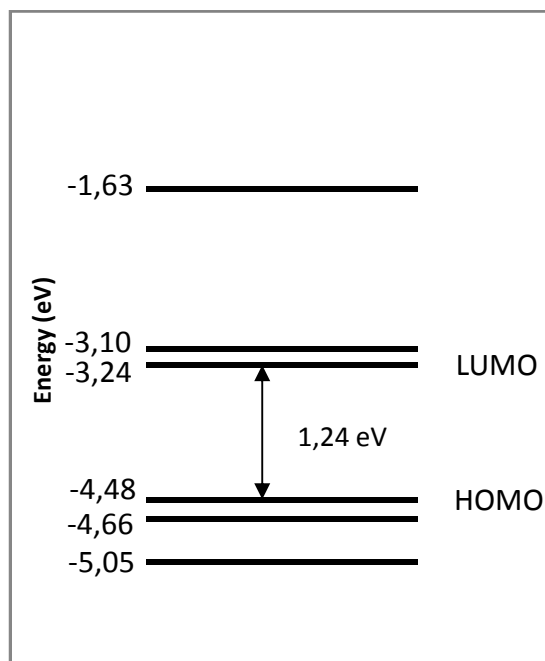


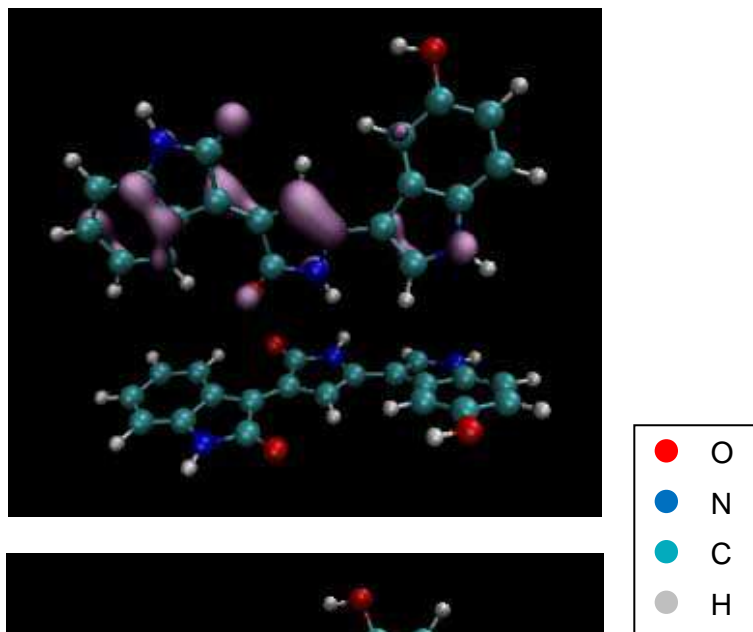
Figura 35 – Níveis eletrônicos da conformação proposta para o quinto dímero de violaceína, indicando as regiões HOMO e LUMO e o *gap* entre elas.

Como nos casos anteriores, nesta conformação proposta para o dímero também é possível observar que os níveis HOMO e HOMO-1, como também os níveis LUMO e LUMO+1, encontram-se quase degenerados, o que ocorreu pois tratam-se dos níveis de HOMO e de LUMO das duas moléculas analisadas que apresentam-se bastante próximos.

Com os dados obtidos também foi possível determinar a densidade de probabilidade de cargas da quinta conformação proposta para o dímero, conforme pode ser observado na Figura 36.

A densidade de carga da região HOMO concentrou-se em uma das moléculas e a densidade de carga da região LUMO concentrou-se na outra molécula, como ocorreu em todos os dímeros anteriores.

HOMO



LUMO

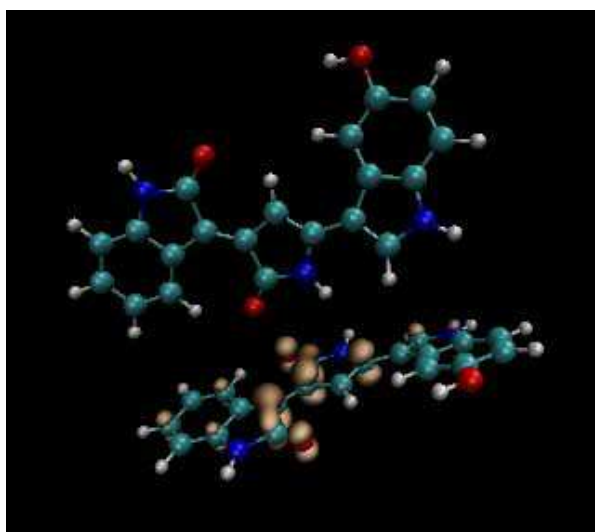


Figura 36 – Densidade de probabilidade de carga da quinta conformação proposta para o dímero de violaceína nas regiões HOMO e LUMO

Sendo este dado, novamente, indicativo de interação entre essas moléculas.

Nessa configuração, como na primeira e na quarta conformações propostas para o dímero, a energia total foi maior que de duas moléculas isoladas (+0,050 eV), indicando baixa possibilidade de formação desse dímero, pois a dimerização das moléculas é energeticamente menos favorável do que sua permanência em forma isolada. Esta conformação, diferente da primeira, segunda e terceira conformações propostas para os dímeros e de forma similar

à quarta conformação, quando em ambiente aquoso, não apresentaria uma competição da ligação entre as moléculas de violaceína com moléculas de água, pois interações π - π não ocorrem entre moléculas de água ou entre estas e outra moléculas. Neste caso, como no dímero 4, apesar da dimerização ser energeticamente desfavorável, o dímero formado pode diminuir o contato das moléculas de violaceína com as moléculas de água. Vale ressaltar que, Purushotham e Sastry (2014), em estudos realizados por seu grupo, concluíram que o ângulo de 90° entre dois planos de anéis aromáticos, em dímeros de triptofano, é o mais estável.

4.2.6. VISÃO GERAL SOBRE OS DÍMEROS

Em relação à energia de *gap*, foi observado que em todos os dímeros a energia foi menor que na molécula isolada e que os níveis HOMO e HOMO-1, apresentaram-se praticamente degenerados, provavelmente por se tratarem dos níveis HOMO bastante próximos de cada uma das moléculas. Esse fato também pode ser observado em relação aos níveis LUMO e LUMO+1, relacionados ao mesmo motivo. É interessante notar que esse aspecto de níveis degenerados foi mais evidente no dímero 3 do que nos demais, talvez relacionado ao tipo de interação entre as moléculas.

A distribuição de densidade de carga mostrou-se muito semelhante em todos os dímeros, havendo uma densidade de carga da região HOMO predominando em uma das moléculas, enquanto a densidade de carga da região LUMO predominou na outra molécula. Essa distribuição manteve-se nas diferentes conformações, de forma diferente do que Homem-de-mello *et al.* (2007) encontrou para os dímeros de azul de metileno.

A energia total de cada configuração pode ser observada na Tabela 2, onde também podem ser observadas a energia da molécula de violaceína isolada duplicada para comparação com a energia dos dímeros e a diferença entre a energia da molécula duplicada e os dímeros.

Tabela 2 – Energias da molécula isolada duplicada e dos dímeros de violaceína

	Violaceína (duplicada)	Dímero 1	Dímero 2	Dímero 3	Dímero 4	Dímero 5
Energia (eV)	-10813,151	-10813,077	-10813,716	-10813,642	-10813,036	-10813,101
Diferença	0	+0,074	-0,565	-0,491	+0,115	+0,050

Considerando a situação de simulação, entre os dímeros propostos, os de número 2 e 3 apresentam possibilidades maiores de serem formados, pois a dimerização é energeticamente mais favorável que a sua permanência de forma isolada, sendo o dímero 2 mais energeticamente favorável entre os dois. As ligações de hidrogênio que mantêm os dímeros 2 e 3, em ambientes aquosos teriam competição desse tipo de ligação com moléculas de água, assim, mesmo sendo energeticamente favoráveis e possivelmente formados em outros tipos de solventes não polares, a formação desses dímeros na água deve ser melhor analisada.

Os dímeros 1, 4 e 5, por outro lado, apresentam uma possibilidade menor de serem formados, pois a dimerização é energeticamente desfavorável, ou seja, as moléculas isoladas apresentam menor energia que os dímeros, indicando uma baixa probabilidade de agregação. Sendo, entre esses, o dímero 4 o menos favorável, seguido pelo dímero 1 e por último o dímero 5. A formação do dímero 1, onde ocorrem prováveis ligações de hidrogênio, pode ser considerada desfavorável tanto na presente simulação, como em ambiente aquoso, pois, além de ser energeticamente desfavorável no vácuo, a ligação de hidrogênio entre as moléculas de violaceína entraria em competição com ligações da violaceína com moléculas de água. As configurações do dímero 4 e do dímero 5, apesar de energeticamente desfavoráveis no vácuo, podem apresentar-se favoráveis em ambiente aquoso por diminuírem as interações da violaceína, uma molécula hidrofóbica, com moléculas de água e, se essa diminuição das interações com moléculas de água compensar a energia desfavorável da dimerização, provavelmente esse dímero ocorrerá em ambiente aquoso.

5. CONCLUSÃO

5.1. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A violaceína é uma molécula composta por três unidades estruturais: 5-hidroxiindol e oxiindol nas laterais e um núcleo 2-pirrolidona. As unidades oxiindol e 2-pirrolidona formam um segmento praticamente planar, e, entre o hidroxiindol e a 2-pirrolidona, foi encontrado um ângulo de diedro de $17,3^\circ$. A energia de *gap* encontrada entre HOMO e LUMO foi de 1,38 eV. Sua densidade de carga, tanto de HOMO, como de LUMO apresentou-se distribuída por átomos, principalmente da região mais centralizada da molécula.

Dos dímeros simulados no vácuo, três provavelmente são formados por ligações de hidrogênio.

Um deles foi energeticamente desfavorável, quando a aproximação ocorreu entre a lateral de uma das moléculas da violaceína com a extremidade da outra molécula mantendo-as quase coplanares em xy, resultando em baixa possibilidade de formação tanto no vácuo, como em ambiente aquoso.

Os demais foram energeticamente favoráveis, tanto quando a aproximação ocorreu entre as regiões laterais de duas moléculas de violaceína, mantendo-as quase coplanares em xy, como quando aproximação lateral de duas moléculas de violaceína ocorreu formando um ângulo aproximado de 90° . Apesar de energeticamente favoráveis no vácuo, é necessária uma análise em

ambiente aquoso, para determinar se a dimerização pode ocorrer também nesse ambiente.

Os dímeros restantes, pelo empilhamento de duas moléculas de violaceína, mantendo-as praticamente paralelas, com o hidroxindol de uma das moléculas em direção ao oxiindol da outra e pelo empilhamento de duas moléculas de violaceína colocadas praticamente perpendiculares entre si, provavelmente são formados por ligação do tipo pi-pi. De maneira oposta aos dímeros anteriores, estes dímeros, apesar de energeticamente desfavoráveis quando simulados no vácuo, podem apresentar-se favoráveis em ambiente aquoso, pois sua conformação diminui o contato da molécula de violaceína com moléculas de água. Nesse caso, essa diminuição de contato torna-se energeticamente favorável pelo fato da violaceína ser uma molécula predominantemente hidrofóbica.

A partir de tais dados, muitas opções se apresentam como perspectivas de continuidade do presente trabalho, voltadas principalmente para possíveis aplicações da violaceína em ambientes biológicos:

- simulação da formação de dímeros em ambientes aquosos;
- análise de um conjunto de moléculas de violaceína em ambientes aquosos por dinâmica molecular;
- simulação da violaceína em sistemas que aumentem sua solubilidade e sua biodisponibilidade, como em β -ciclodextrinas;
- simulação dos diversos complexos de inclusão da violaceína na molécula de β -ciclodextrina tanto no vácuo como em ambientes aquosos;

- simulação e análise da interação da violaceína com modelos de membranas biológicas;

- entre outras.

6. ANEXOS

6.1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA VIOLACEÍNA

Diversos produtos naturais têm sido muito utilizados tanto em estudos para decifrar o seu processo de biossíntese, como para o desenvolvimento de diversas drogas, sendo considerados a principal fonte de agentes terapêuticos inovadores para doenças infecciosas, câncer, imunomodulação, entre outras (CLARDY e WALSH, 2004). De forma geral, esses componentes têm apresentado efeitos interessantes em sistemas *in vitro* e em modelos animais (JUSTO e FERREIRA, 2005).

Entre esses produtos naturais, a violaceína tem aplicações médicas potenciais como droga antibacteriana, antitripanocida, anti-ulcerogênica e anticancerígena (HOSHINO, 2011). Diversos estudos têm reportado essas diferentes atividades biológicas da violaceína.

Em relação à atividade antiviral, Andrighetti-Fröhner *et al.* (2003), avaliaram a citotoxicidade e a atividade antiviral potencial da violaceína contra uma gama de vírus diversos. A violaceína mostrou uma resposta diretamente relacionada à concentração. Foram utilizados diferentes métodos para a avaliação da toxicidade da violaceína: determinação dos efeitos na morfologia celular e testes de viabilidade celular. Os resultados obtidos mostraram que a violaceína não apresentou inibição citopática contra alguns vírus, como o vírus

da herpes simples tipo 1 – HSV-1 (cepa 29-R), vírus da hepatite A (cepas HM 175 e HAF-203) e adenovírus tipo 5; e apresentou uma fraca inibição da replicação viral em vírus como vírus da herpes simples tipo 1 HSV-1 (cepa KOS e ATCC/VR-733), poliovírus tipo 2 e rotavírus SA 11.

Nakamura *et al.* (2003) avaliaram a ação antibacteriana do pigmento formado pela mistura de violaceína e deoxiviolaceína, visando sua possível utilização como inibidor de crescimento de bactérias em alimentos, atuando como uma tecnologia de prevenção de contaminação. A atividade antibacteriana da violaceína foi confirmada contra muitas bactérias, causando não somente a inibição de crescimento, como a morte celular em concentrações mais altas (acima de 15mg/L). Entre as gram-positivas sensíveis ao composto podem ser citadas as bactérias *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* e entre as gram-negativas, a *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se sensível. Entretanto não foi observada nenhuma inibição de crescimento das bactérias gram-negativas *Flavobacterium balastinum*, *Escherichia coli* ou fungos como *Trichosporon cutaneum*. As respostas dos microorganismos testados indicam que o pigmento pode decompor materiais essenciais para a manutenção da vida das células, destruindo a estrutura física ou inibindo reações metabólicas necessárias ao microorganismo.

A genotoxicidade da violaceína foi testada *in vitro* por Andrighetti-Fröhner *et al* (2006) em quatro diferentes linhagens celulares: VERO (células epiteliais do rim do macaco verde africano), HEp-2 (células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano), MA 104 (células de rim fetal de macaco Rhesus) e FRhK-4 (células de rim fetal de macaco Rhesus tratadas para cultura do vírus da Hepatite A). A genotoxicidade não estava associada à citotoxicidade, pois as

concentrações testadas não eram tóxicas a essas células (níveis de toxicidade referentes a testes anteriores). Os autores referem que, em concentrações efetivamente baixas (até 1,5µM) a violaceína não induz aumento significativo de danos no DNA das células HEp-2 e MA104, enquanto foram observados danos no DNA das células VERO e FRhK-4. Esses resultados podem estar sendo influenciados por características de cada linhagem celular, como processos de reparo de DNA, susceptibilidade a oxidantes e permeabilidade de membrana. Os autores sugerem maiores investigações com múltiplos ensaios para prover todas as informações necessárias para uma futura aplicação da violaceína como agente genotóxico.

A atividade antifúngica da violaceína produzida por 24 diferentes cepas da bactéria *Chromobacterium violaceum* presente na Amazônia Brasileira foi avaliada por Barreto *et al.* (2008). Sua ação foi comparada com a cepa ATCC 12472, originária da Malásia. A atividade antifúngica das cepas e os seus sobrenadantes (violaceína, cianeto e quitinases) contra dois tipos de fungos patogênicos *Fusarium* sp. e *Phomopsis* sp. foi testada e foi feita a comparação entre as cepas brasileiras e a cepa proveniente da Malásia. Entre as cepas brasileiras, dez apresentaram a mesma atividade e duas apresentaram melhor atividade antifúngica que a cepa malásia. A cepa malásia e as duas cepas brasileiras com melhor atividade antifúngica também foram testadas contra sete fungos patogênicos: os dois anteriormente testados além de *Cercospora kikuchi*, *Colletotrichum* sp., *Corynespora* sp., *Aspergillus* sp. e *Botryodiplodia* sp. As cepas brasileiras e seus sobrenadantes apresentaram maior atividade antifúngica que a cepa ATCC 12472 contra *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp e *Cercospora kikuchi*; apresentaram atividade equivalente contra *Aspergillus* sp.

e *Colletotrichum* sp; as cepas brasileiras, mas não a cepa ATCC 12472, apresentaram atividade antifúngica contra *Corynespora* sp.; e nenhuma das três ou seus sobrenadantes apresentaram atividade antifúngica contra *Botryodiplodia* sp. Investigando os mecanismos de atividade antifúngica da *C. violaceum* e seus sobrenadantes, a primeira candidata foi a violaceína, mas como todas as cepas produzem o corante em diferentes tonalidades, a atividade antifúngica pode não estar relacionada à violaceína pura, não sendo possível correlacionar essa ação à violaceína, ao cianeto, às quitinases ou outros metabólitos relacionados. Segundo os autores, apesar de não ter sido especificado o mecanismo da atividade antifúngica, fica evidente o potencial biotecnológico das cepas encontradas na região amazônica brasileira.

Cazoto (2008) avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* da violaceína em relação a algumas linhagens bacterianas de interesse médico veterinário. A autora refere que o surgimento de cepas de bactérias resistentes aos antibióticos existentes limita as opções de tratamento, sendo necessário explorar novas opções. Em relação ao gado, a mastite bovina é causada, principalmente, pela bactéria *Staphylococcus aureus*, sendo a *Escherichia coli* outro agente causador. Cazoto observou que todas as linhagens de *S. aureus* avaliadas, provindas da mastite bovina, foram sensíveis à violaceína, observada pela inibição de crescimento. As linhagens de *E. coli* não apresentaram sensibilidade à substância.

Em relação à atividade anti-diarreia e de proteção contra úlceras, Antonisamy *et al.* (2009) relataram a avaliação *in vivo*, em ratos Wistar, desses efeitos. Para induzir a diarreia, foi utilizado óleo de rícino e a violaceína foi utilizada em diferentes doses, sendo seus efeitos marcadamente dose

dependente. A violaceína inibiu significativamente a frequência de defecações e diminuiu a liquidez das fezes em comparação ao grupo controle (cerca de 87% de inibição em doses de 40mg/kg). Para evitar a reabsorção de água a nível intestinal, aumentando o volume do conteúdo do intestino foi administrado sulfato de magnésio nos animais. Nesse caso, a violaceína, também com ação dose dependente, aumentou a reabsorção de água, diminuindo o volume fecal. Segundo Antonisamy *et al.*, em ambos os casos, o efeito da violaceína está relacionado à inibição da motilidade intestinal, além disso a violaceína deve formar uma cobertura sobre a mucosa intestinal aumentando sua resistência ao mesmo tempo que diminui as secreções gastrointestinais. Para produzir lesões na mucosa gástrica foi utilizado etanol. A violaceína, com atividade dose dependente, protegeu a mucosa gástrica dos ratos contra os danos agudos produzidos pelo etanol, reduzindo o índice de úlceras em até 50%, indicando que a violaceína pode ser um efetivo agente gastro-protetor, sendo que seu efeito pode estar relacionado a um aumento na produção de muco gástrico. Os autores sugerem que os mecanismos envolvidos nas propriedades anti-diarreia e anti-úlceras da violaceína podem ser investigados em maiores detalhes.

A atividade anti-malária foi avaliada por Lopes *et al.* (2009). Os autores avaliaram a ação da violaceína *in vitro* contra eritrócitos infectados com cepas de *Plasmodium falciparum*: 3D7 (sensível a cloroquina) e S20 (resistente a cloroquina). A violaceína inibiu o desenvolvimento do parasita até em concentrações baixíssimas (0,06 μ M) e anulou completamente a viabilidade do parasita em concentrações maiores que 1,0 μ M; não houve diferenças significativas no efeito da violaceína nas diferentes cepas testadas. Lopes *et al.* também avaliaram a atividade anti-malária *in vivo*, em camundongos, onde

outras características como biodisponibilidade e farmacocinética devem ser consideradas. Os camundongos foram infectados com cepas não letal ou letal de *Plasmodium chabaudi chabaudi* por injeção intraperitoneal. A violaceína foi capaz de reduzir o crescimento parasitário significativamente durante a parasitemia patente (cepa não letal) em torno de 50% no sétimo dia de infecção em relação ao grupo controle. Na parasitemia com a cepa letal, enquanto os camundongos não tratados pereceram 100% até o décimo dia pós-infecção, os camundongos tratados com a violaceína apresentaram 80% de sobrevivência no dia 16 após a infecção, demonstrando um significativo efeito protetor da violaceína. Os autores referem que a violaceína apresentou inibição do crescimento de parasitas *Plasmodium* em humanos e em camundongos, sendo necessárias novas formulações baseadas em nanopartículas com violaceína para aumentar a solubilidade, a biodisponibilidade e a atividade, além de diminuir a toxicidade da droga.

Antonisamy e Ignacimuthu (2010) também avaliaram os efeitos imunomodulatório, analgésico e antipirético da violaceína *in vivo*, em ratos albinos Wistar e em camundongos. Para induzir o edema foi utilizada a ovalbumina injetada na pata traseira de camundongos. O efeito da violaceína reduziu clara e significativamente o edema, em comparação ao grupo controle, demonstrando os princípios imunomodulatórios (imunossupressores) da violaceína, afetando especialmente respostas inflamatórias, mas também demonstrando atividade potencial antialérgica (regulatória). Para analisar o efeito analgésico, a nocicepção foi avaliada em três testes distintos, realizados em camundongos: contorções induzidas por ácido acético, o ato de coçar a pata induzido por formalina (formol) e o teste dos pratos quentes. Em todos os

modelos testados, a violaceína apresentou resultados bastante significantes tanto a nível central (dor neurogênica), como a nível periférico (dor inflamatória), demonstrando que a violaceína apresenta atividade antinociceptiva. A violaceína provavelmente atua nos receptores opióides espinhais, sendo também possível sua ação na inibição de ciclooxigenases. Para avaliar o efeito antipirético, foi induzida a hiperpirexia em ratos com o uso de leveduras. A administração oral da violaceína levou a uma significativa inibição da pirexia induzida, sendo altamente efetiva quando comparada com paracetamol. Esse efeito pode estar associado à influência sobre a biossíntese de prostaglandina (reguladora da temperatura corporal). Antonisamy e Ignacimuthu concluíram que a violaceína é efetiva no tratamento de doenças inflamatórias, possuindo efeito imunomodulatório, analgésico e antipirético. O principal mecanismo desses efeitos pode estar relacionado à inibição da síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios.

Rambo *et al.* (2012) relataram a produção de scaffolds de PHBV (poli-(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)) incorporado com violaceína. Os autores afirmam que a incorporação de agentes bioativos em scaffolds biodegradáveis podem melhorar a performance terapêutica, pois podem atuar no sentido de evitar infecções, reações inflamatórias e proliferação de células cancerígenas. A evolução histológica do implante foi avaliada *in vivo*, através do implante dos scaffolds no fêmur de ratos Wistar. Os resultados revelaram que não ocorreram reações inflamatórias e que novo osso foi formado no implante, dado confirmado pela presença de matriz óssea no interior do scaffold. A partir desses resultados, Rambo *et al.* concluíram que os scaffolds produzidos com PHBV com violaceína são possíveis candidatos para aplicação em engenharia

tecidual, na regeneração de tecidos ósseos, sendo necessários novos estudos para se determinar o efeito da violaceína em tecidos danificados durante o período de atuação do implante.

Com base em todos os trabalhos anteriormente descritos é possível perceber a diversidade de possíveis aplicações da violaceína. Em relação à sua potencial atividade antitumoral existem diversos estudos que relatam sua ação em diferentes tipos de células tumorais.

Segundo Ferreira *et al.* (2004) a violaceína vem sendo extensivamente estudada, devido à sua atividade antitumoral, com especial interesse na possibilidade de ser utilizada como tratamento anti-leucemia, pois o composto efetivamente induz a morte celular nessas células. Os autores compararam *in vitro* a ação da violaceína na linhagem celular HL60 (células de leucemia promielocítica humana) com sua ação em outros tipos celulares como U937 (células de linfoma histiocístico - menos diferenciadas que as células HL60), K562 (células de leucemia mielogênica crônica), linfócitos e monócitos humanos de doadores saudáveis. Foi observada a morte celular somente nas células HL60, o que representa o efeito promissor da violaceína com respeito ao tratamento da leucemia promielocítica. O efeito citotóxico da violaceína nas células HL60 ocorre pela ativação do receptor do fator de necrose tumoral (TNF – tumoral necrosis factor), desencadeando uma série de vias que resultam na inibição do crescimento e na apoptose celular. Esse efeito é específico das células HL60 em resposta à violaceína. Os autores referem que são necessários novos estudos para ampliar o conhecimento dos mecanismos de atuação da violaceína em células de leucemia e em células normais, com possível comparação desses mecanismos.

Kodach *et al.* (2006) avaliaram a ação da violaceína *in vitro*, em células de câncer colorretal, como agente antitumoral isolado e em associação com o 5-Fluorouracil (5-FU). Apesar dos novos agentes quimioterápicos que vem sendo utilizados, no caso do câncer colorretal, os resultados permanecem insatisfatórios e o 5-FU ainda representa a base do tratamento e a resistência que as células desenvolvem à sua ação é o maior obstáculo ao sucesso da quimioterapia. Inicialmente foi examinado o efeito citotóxico da violaceína como um agente isolado em quatro linhagens de células de câncer colorretal (adenocarcinoma colorretal humano): Caco-2, HCT 116, SW 480 e DLD-1. A violaceína mostrou um efeito citotóxico altamente efetivo em relação a todas as linhagens avaliadas. Também foi estudada a ação da combinação da violaceína com o 5-FU em células HCT 116, as quais são instáveis e pobremente diferenciadas. Observou-se que a violaceína, em ação conjunta, potencializa o efeito citotóxico do 5-FU nessas células. Foi observado que a violaceína bloqueia o ciclo celular e reativa a cascata apoptótica, induzindo à morte celular. Para Kodach *et al.* esses dados sugerem que a violaceína pode ser ativa no tratamento de tumores colorretais e oferece novas perspectivas na superação da resistência a 5-FU.

A ação da violaceína em câncer de cólon também foi avaliada *in vitro* por Carvalho *et al.* (2006) em linhagens HT 29 e Caco-2 (ambas as linhagens de células de adenocarcinoma colorretal humano). A violaceína induziu a uma perda de viabilidade nas células Caco-2, as quais apresentaram sinais visíveis de apoptose, enquanto as células HT 29 mostraram maior resistência em entrar em apoptose. A violaceína foi capaz de implicar na produção de espécies de oxigênio reativas (ROS – reactive oxygen species) nas células Caco-2, o que

resultou na apoptose devido a danos oxidativos causados pelo acúmulo excessivo de ROS. O presente estudo foi o primeiro, segundo o conhecimento dos autores, a apontar o envolvimento da produção de ROS na indução da morte de células de câncer de cólon pela violaceína. Nesse estudo os autores também trazem uma informação interessante de que, em todos os casos observados até então, a toxicidade da violaceína em células normais requer quantidades bem maiores do composto quando comparado a células cancerígenas, enquanto o IC50 para células cancerígenas está entre 1 e 3 μ M, para células normais esse valor está entre 8 e 10 μ M.

Bromberg *et al.* (2010) avaliaram o potencial antitumoral da violaceína contra tumores ascíticos de Erlich (EAT – Erlich ascites tumor) *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vitro*, a citotoxicidade da violaceína em relação às células do EAT foi duas vezes maior que em linfócitos humanos. Sua toxicidade nas células EAT foi mediada por uma rápida produção de ROS e uma diminuição no nível de glutathione reduzido, provavelmente associadas ao estresse oxidativo. O glutathione reduzido possui ação quimioprotetora, principalmente devido a seu papel antioxidante e a diminuição no seu nível aumenta o estresse oxidativo. A diminuição da viabilidade das células apresentou uma relação dose dependente e as características apresentadas pelas células de EAT indicam que a morte celular ocorreu via apoptose. Para a avaliação *in vivo*, os tumores foram inoculados intraperitonealmente, em camundongos, na forma de ascites. Diferentes doses de violaceína foram administradas intraperitonealmente durante todo o ciclo de vida dos camundongos. A violaceína inibiu significativamente o crescimento dos tumores (em torno de 70%), e aumentou a sobrevivência dos animais, sendo que no grupo controle nenhum

camundongo sobreviveu após o décimo oitavo dia enquanto os camundongos tratados apresentaram 100% de sobrevivência no décimo sexto dia e cerca de 14% no trigésimo dia. Em vista desses resultados, para avaliar a citotoxicidade da violaceína, doses diárias foram administradas peritonealmente durante um período de 35 dias em camundongos saudáveis em doses de 0,1; 1,0 e 1000µg por quilo e não foram observadas mudanças significativas em toxicidade geral, mudanças comportamentais e mortalidade, bem como em parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos em todos os grupos. Esses resultados em conjunto indicam que a violaceína causa estresse oxidativo e desbalanço na maquinaria de defesa antioxidante das células de EAT, culminando em morte celular apoptótica, sendo este o primeiro relato, segundo os autores, da atividade antitumoral da violaceína *in vivo* que ocorre na ausência de toxicidade para os principais órgãos. Dessa forma a violaceína pode representar uma adição significativa na luta contra cânceres humanos onde há formação de ascite maligna peritoneal, a qual representa a principal causa de morbidade e mortalidade nesse tipo de tumor.

Queiroz *et al.* (2012) referem que em patologias como o câncer há alterações no processo denominado morte celular programada (programmed cell death). Esse processo intrínscio envolve diferentes modos de morte celular, relacionados diretamente com o processo cancerígeno. A violaceína induz apoptose de células da leucemia HL60 (células de leucemia promielocítica humana) como comprovado em outros trabalhos, porém células de leucemia TF1 (células de eritroleucemia – forma rara de leucemia mielóide humana), menos diferenciadas, são mais resistentes a apoptose induzida pela violaceína. Nessas células a violaceína apresenta ação antiproliferativa operando por um

mecanismo diferente. O composto leva a uma reprogramação dinâmica das células pela ativação de quinases que promovem o estresse do retículo endoplasmático e atuam através de um programa de suicídio celular que difere da apoptose e da autofagia, já que mecanismos anti-autofágicos e anti-apoptóticos são ativados. A morte celular ocorre devido à linearização do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi e os núcleos assumem forma de ferradura. Segundo os autores, detalhes do mecanismo bioquímico exato de ação da violaceína ainda requerem mais estudos.

Com o objetivo de aumentar a solubilidade, além de trazer melhoras na biodisponibilidade da violaceína são encontrados trabalhos que relatam sua inclusão em nanopartículas poliméricas formando sistemas de liberação da violaceína como agente antitumoral.

Azevedo (2005) descreve a formulação da violaceína em sistemas de liberação controlada em micro e nanoesferas poliméricas utilizando polímeros biodegradáveis: poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA, 50:50). A ação da violaceína livre foi comparada com a ação da violaceína encapsulada através da avaliação da viabilidade das células V79 (células de fibroblastos de Hamster chinês) e HL60 (células de leucemia promielocítica humana). A incorporação da violaceína pelas microesferas mostrou-se viável, sendo que a violaceína apresentou-se distribuída por toda a matriz. Segundo o autor, o sistema apresentou potencial como indutor de diferenciação celular e apoptose.

Martins *et al.* (2010) descrevem a preparação de nanopartículas de poli-D,L-(ácido láctico-co-glicólico) 50:50, com incorporação da violaceína na matriz polimérica e recobrimento da nanopartícula com ácido ascórbico. Os autores

relatam que a escolha do ácido ascórbico para recobrimento deve-se ao fato de que células tumorais apresentam maior absorção desse composto em relação às células normais, o que pode ser usado para melhorar a especificidade de compostos antitumorais combinados em sistemas poliméricos de distribuição de drogas. O sistema apresentado incorporou a violaceína e manteve o recobrimento de ácido ascórbico, mantendo bons parâmetros físico-químicos de estabilidade. Na análise *in vitro* da citotoxicidade desse sistema com células HL60 (células de leucemia promielocítica humana), o complexo apresentou um aumento significativo na atividade tumoral. O recobrimento da superfície com ácido ascórbico não apresentou efeitos antagonistas na atividade da violaceína.

Outra forma de aumentar a solubilidade e melhorar a biodisponibilidade da violaceína relatada em diversos trabalhos é a formação do complexo de inclusão entre a violaceína e a β -ciclodextrina.

Azevedo *et al.* (2000a) analisaram a formação de um complexo de inclusão entre a violaceína e a ciclodextrina, com o objetivo de aplicar essa formulação como uma droga antitumoral explorando a viabilidade do carreador em diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia antitumoral da violaceína. A análise foi realizada por medidas de coeficiente de difusão e dicroísmo circular induzido. Foi observada a ocorrência de complexos violaceína/ β -ciclodextrina com diferentes estequiometrias, formando complexos 1:1 e 1:2 (violaceína/ β -ciclodextrina). Cálculos teóricos usando o campo de força MM⁺ HyperChem, mostrou que duas moléculas de β -ciclodextrina podem facilmente acomodar uma molécula de violaceína.

Analisando os complexos obtidos Azevedo *et al.* (2000b) compararam a citotoxicidade da violaceína livre e nos complexos de inclusão 1:1 e 1:2 em células V79 (células de fibroblastos de Hamster chinês) e observaram que a violaceína livre e em complexos 1:1 apresentaram o mesmo nível de citotoxicidade, porém houve um decréscimo significativo em complexos 1:2. De forma geral a violaceína nos complexos de inclusão apresentou melhor solubilidade que a violaceína livre.

A ação da violaceína no complexo com a β -ciclodextrina não foi avaliada somente em sua atividade antitumoral, Durán *et al.* (2003) analisaram o efeito da inclusão da violaceína na β -ciclodextrina para prevenir ulceração gástrica em camundongos. Em lesões gástricas induzidas por indometacina a violaceína livre, administrada oral e previamente, reduziu significativamente as lesões e os complexos formados nas estequiometrias 1:1 e 1:2, em ambos os casos, potencializaram a ação protetiva da violaceína. Em úlceras induzidas por HCl-etanol, a violaceína livre e na estequiometria 1:2, inibiram o dano gástrico em quase 85%, enquanto o complexo de inclusão 1:1 resultou em quase desaparecimento da atividade anti-úlceras da violaceína. Os autores concluíram que, de forma geral, o complexo com estequiometria 1:2 apresentou propriedades gastro-protetivas similares ou melhores que a violaceína. Segundo Durán *et al.*, o mecanismo de ação da prevenção da ulceração gástrica deve estar relacionado a um aumento dos mecanismos de defesa da mucosa e proteção contra danos peroxidativos.

Gimenez *et al.* (2005) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de um sistema supramolecular composto por violaceína complexada com β -ciclodextrina associada a nanopartículas de ouro protegidas por tióis em relação a células

V79 (células de fibroblastos de Hamster chinês) e HL60 (células de leucemia promielocítica humana). O sistema sem a presença da violaceína não apresentou qualquer efeito citotóxico para nenhuma das células avaliadas. A inclusão da violaceína no sistema permitiu sua transferência em meio aquoso, sendo que manteve sua toxicidade nas células de leucemia HL60, porém com redução de sua atividade em células V79 normais. A morte celular causada pela violaceína, tanto livre quanto no sistema descrito ocorre por apoptose, por ativação de caspases que ativam o receptor do fator de necrose tumoral (TNF). Segundo os autores, em relação a aplicações *in vivo* do sistema em questão, ainda é prematuro sugerir o efeito e a estabilidade do complexo.

6.2. DISTÂNCIAS INTERATÔMICAS E ÂNGULOS ENTRE OS ÁTOMOS DA VIOLACEÍNA

A partir da otimização da molécula foram obtidas as distâncias interatômicas e os ângulos entre os átomos componentes da molécula de violaceína em suas posições otimizadas.

Na Figura 37 encontram-se os átomos numerados.

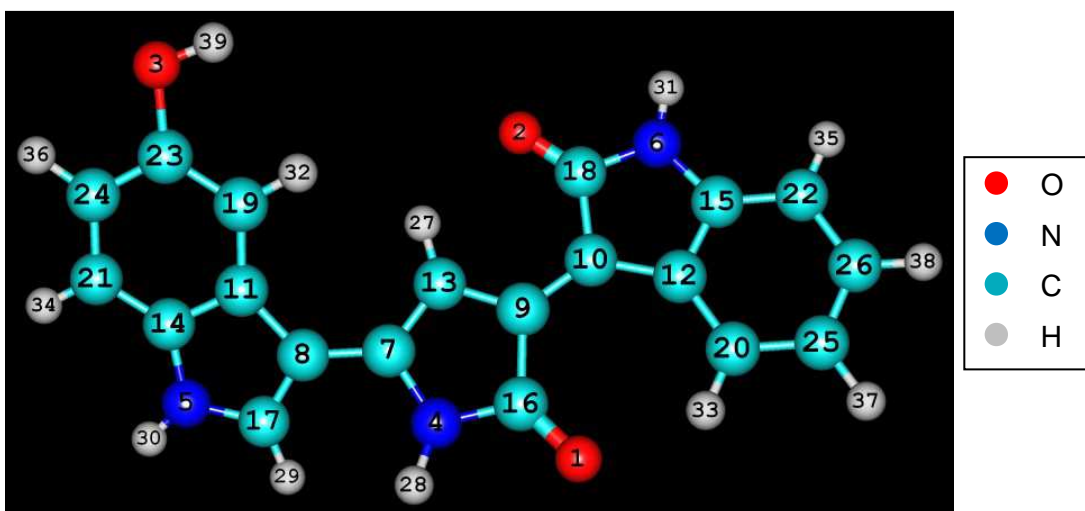


Figura 37 – Numeração dos átomos da molécula de violaceína

Nas Tabelas 3 e 4, respectivamente, encontram-se as distâncias interatômicas e os ângulos formados pelos átomos da molécula de violaceína

Tabela 3 – Distâncias interatômicas da molécula de violaceína otimizada

Ligação	Átomos	Distância (nm)
(1-16)	O-C	1.230
(2-18)	O-C	1.235
(3-23)	O-C	1.388
(3-39)	O-H	0.973
(4-7)	N-C	1.411
(4-16)	N-C	1.403
(4-28)	N-H	1.013
(5-14)	N-C	1.398
(5-17)	N-C	1.375
(5-30)	N-H	1.011
(6-15)	N-C	1.399
(6-18)	N-C	1.397
(6-31)	N-H	1.013
(7-8)	C-C	1.439
(7-13)	C-C	1.384
(8-11)	C-C	1.459
(8-17)	C-C	1.399
(9-10)	C-C	1.389
(9-13)	C-C	1.434
(9-16)	C-C	1.521
(10-12)	C-C	1.461
(10-18)	C-C	1.518
(11-14)	C-C	1.424
(11-19)	C-C	1.410
(12-15)	C-C	1.429
(12-20)	C-C	1.409
(13-27)	C-H	1.077
(14-21)	C-C	1.400
(15-22)	C-C	1.391
(17-29)	C-H	1.082
(19-23)	C-C	1.397
(19-32)	C-H	1.087
(20-25)	C-C	1.402
(20-33)	C-H	1.083
(21-24)	C-C	1.393
(21-34)	C-H	1.088
(22-26)	C-C	1.406
(22-35)	C-H	1.088
(23-24)	C-C	1.414
(24-36)	C-H	1.086
(25-26)	C-C	1.403
(25-37)	C-H	1.087
(26-38)	C-H	1.088

Tabela 4 – Ângulos entre átomos da molécula de violaceína otimizada

Ligação	Átomos	Ângulo (°)
(1-16-4)	O-C-N	123.7
(1-16-9)	O-C-C	131.5
(2-18-6)	O-C-N	124.1
(2-18-10)	O-C-C	130.1
(23-3-39)	C-O-H	109.4
(3-23-19)	O-C-C	122.3
(3-23-24)	O-C-C	116.1
(7-4-16)	C-N-C	111.0
(7-4-28)	C-N-H	125.4
(4-7-8)	N-C-C	121.4
(4-7-13)	N-C-C	108.5
(16-4-28)	C-N-H	120.8
(4-16-9)	N-C-C	104.8
(14-5-17)	C-N-C	109.6
(14-5-30)	C-N-H	125.4
(5-14-11)	N-C-C	107.4
(5-14-21)	N-C-C	130.3
(17-5-30)	C-N-H	124.9
(5-17-8)	N-C-C	109.7
(5-17-29)	N-C-H	120.5
(15-6-18)	C-N-C	111.7
(15-6-31)	C-N-H	126.2
(6-15-12)	N-C-C	108.9
(6-15-22)	N-C-C	128.4
(18-6-31)	C-N-H	122.1
(6-18-10)	N-C-C	105.8
(8-7-13)	C-C-C	130.0
(7-8-11)	C-C-C	128.0
(7-8-17)	C-C-C	125.7
(7-13-9)	C-C-C	109.8
(7-13-27)	C-C-H	126.1
(11-8-17)	C-C-C	106.2
(8-11-14)	C-C-C	107.0
(8-11-19)	C-C-C	134.1
(8-17-29)	C-C-H	129.7
(10-9-13)	C-C-C	127.0
(10-9-16)	C-C-C	127.3
(9-10-12)	C-C-C	133.5
(9-10-18)	C-C-C	120.5
(13-9-16)	C-C-C	105.7
(9-13-27)	C-C-H	124.0
(12-10-18)	C-C-C	106.0
(10-12-15)	C-C-C	107.6
(10-12-20)	C-C-C	134.3

Tabela 4 (continuação) – Ângulos entre átomos da molécula de violaceína otimizada

Ligação	Átomos	Ângulo (°)
(14-11-19)	C-C-C	118.9
(11-14-21)	C-C-C	122.4
(11-19-23)	C-C-C	118.7
(11-19-32)	C-C-H	121.2
(15-12-20)	C-C-C	118.1
(12-15-22)	C-C-C	122.7
(12-20-25)	C-C-C	119.5
(12-20-33)	C-C-H	119.6
(14-21-24)	C-C-C	117.9
(14-21-34)	C-C-H	121.5
(15-22-26)	C-C-C	117.9
(15-22-35)	C-C-H	121.1
(23-19-32)	C-C-H	120.1
(19-23-24)	C-C-C	121.6
(25-20-33)	C-C-H	120.9
(20-25-26)	C-C-C	121.1
(20-25-37)	C-C-H	119.3
(24-21-34)	C-C-H	120.5
(21-24-23)	C-C-C	120.5
(21-24-36)	C-C-H	120.9
(26-22-35)	C-C-H	121.0
(22-26-25)	C-C-C	120.8
(22-26-38)	C-C-H	119.3
(23-24-36)	C-C-H	118.6
(26-25-37)	C-C-H	119.6
(25-26-38)	C-C-H	119.9

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

AHMED W. A., AHMED W.Y.W., ZAKARIA Z.A., YUSOF N. Z. – **Application of Bacterial Pigments as Colorant: The Malaysian Perspective** – Springer Berlin Heidelberg – Shah Alam – Selangor – Malaysia, 2012, 85p.

ALBERTÍ M., FAGINAS LAGO N. PIRANI F. – **Benzene water interaction: From gaseous dimers to solvated aggregates** – Chemical Physics (2012) 399: 232-239.

ALMEIDA J. M. - **Confinamento: uma abordagem de primeiros princípios**, 2012 – tese para obtenção do título de doutor em Nanociências e Materiais Avançados – Universidade Federal do ABC.

ALVES, L. P., PILLA V., MUNIN E. – **Influência do solvente na agregação de corantes** – Encontro de Pós-Graduação e Iniciação Científica – Universidade Camilo Castelo Branco, 2013. Disponível em: <unicastelo.br/epginic/arquivos/anais/epg/engenharia/419%20-%20EPG252.pdf> Acesso em: 12.11.2014.

AMORIM R. G. – **Cálculos de Primeiros Princípios para o BaO**, 2005 - dissertação para obtenção do título de mestre em Física – Departamento de Física - Universidade Federal de São Carlos.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER C. R., ANTONIO R. V., CRECZYNSKI-PASA T. B., BARARDIII C. R. M., SIMÕES C. M. O. - **Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by Chromobacterium violaceum** – Mem Inst Oswaldo Cruz; 98(6); 843-848, set 2003.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER C. R., KRATZ J.M., ANTONIO R. V., CRECZYNSKI-PASA T. B., BARARDI C. R. M., SIMÕES C. M. O. – **In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays** – Mutation Research (2006) 603: 97–103.

ANTONISAMY P., IGNACIMUTHU S. - **Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*** - Phytomedicine (2010) 17: 300–304.

ANTONISAMY P., KANNAN P., IGNACIMUTHU S. – **Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum* in Wistar rats** - Fundamental & Clinical Pharmacology (2009) 23: 483–490.

ASHCROFT N. W., MERMIN N. D. – **Física do Estado Sólido** – Cengage Learning, São Paulo – Brasil, 2011, 870p.

ATKINS P. W., JONES L. – **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente** – Artmed – Porto Alegre, Brasil, 2010, 925p.

AZEVEDO M. B. M., ALDERETE J., LINO A. C. S., LOH W., FALJONI-ALARIO A., DURÁN N. – **Violacein/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex Formation Studied by Measurements of Diffusion Coefficient and Circular Dichroism** – Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry (2000a) 37: 67-74.

AZEVEDO M. B. M., ALDERETE J., RODRIGUEZ J. A., SOUZA A. O., RETTORI D., TORSONI M. A., FALJONI-ALARIO A., HAUN M., DURÁN N. - **Biological Activities of Violacein, a New Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β -Cyclodextrin** – Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry (2000b) 37: 93-101.

AZEVEDO M. M. M. - **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas**, 2005 – tese para obtenção do título de doutor em Ciências – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

BARRETO E. S., TORRES A. R., BARRETO M. R., VASCONCELOS A. T. R., ASTOLFI-FILHO S., HUNGRIA M. - **Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon** - J Ind Microbiol Biotechnol (2008) 35: 783–790.

BARRIGÓN A. C. – **A first-principles time-dependent density functional theory scheme for the computation of the electromagnetic response of nanostructures**, 2004 – A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Physical Sciences – Universidad de Valladolid.

BECKE, A. D. - **Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior** - Phys. Rev. (1988) A 38: 3098.

BLÖCHL P. E., KÄSTNER J., FÖRST C. J. - **Electronic Structure Methods: Augmented Waves, Pseudopotentials and the Projector Augmented Wave Method** in YIP, S. (Ed) – Handbook of Materials Modeling - Springer Netherlands – Dordrecht – The Netherlands, 2005, 2965p.

BRITO M. A. - **Estudando Interações Fármaco-Receptor com o Protein Data Bank (PDB) e Programas Gratuitos** - Rev. Virtual Quim.: 3 (6), 2011, 467-483.

BROMBERG N., DREYFUSS J. L., REGATIERI C. V., PALLADINO M. V., DURÁN N., NADER H. B., HAUN M., JUSTO G. Z. - **Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor** - Chemico-Biological Interactions (2010) 186: 43–52.

BUENO M. A., OLIVEIRA B. G. – **A influência da ligação de hidrogênio em reações químicas: reação de Prileschajew** - Quim. Nova: 38 (1), 2015, 1-7.

CAPELLE K. – **A Bird's-Eye View of Density-Functional Theory** – Brazilian Journal of Physics (2006) 36 (4A): 1318-1343.

CARVALHO D. D., COSTA F. T. M., DURÁN N., HAUN M. - **Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells** - Toxicology in Vitro (2006) 20: 1514–1521.

CASCELLA M., LIN I-C., TAVERNALLI I., ROTHLSBERGER U. - **Dispersion Corrected Atom-Centered Potentials for Phosphorus** - J. Chem. Theory Comput. (2009) 5: 2930–2934.

CAZOTO L. L. - **Atividade Antimicrobiana da Violaceina em Linhagens Isoladas de Mastite Bovina**, 2008 – monografia para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu.

CHEN G., SWEN L.R., SWEN D. L., STAUFF D. L., O'LOUGHLIN C. T., JEFFREY P. D., BASSLER B. L., HUGHSON F. M. – **A Strategy for Antagonizing Quorum Sensing** - Molecular Cell (2011) 42: 199-209.

CLARDY J. E WALSH C. – **Lessons from natural molecules** – Nature (2004) 432: 829-837.

CPMD – Car-Parrinello Molecular Dynamics. Disponível em: <www.cpmd.org/>
Acesso em: 30.09.2013

DANTAS C., TAULER R., FERREIRA M. M. C. - **Exploring in vivo violacein biosynthesis by application of multivariate curve resolution on fused UV–VIS absorption, fluorescence, and liquid chromatography–mass spectrometry data** – Anal Bioanal Chem (2012) 405: 1293-1302.

DUARTE H. A., ROCHA W. R. – **Teoria do Funcional da Densidade** in MORGON N. H., COUTINHO K. – Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular – Editora Livraria da Física – São Paulo – Brasil, 2007.

DURÁN M., PONEZI A. N., FALJONI-ALARIO A., TEIXEIRA M. F. S., JUSTO G. Z., DURÁN N. – **Potencial applications of violacein: a microbial pigment** – Med Chem Res (2011) 21: 1524-1532.

DURÁN N., JUSTO G. Z., FERREIRA C. V., MELO P. S., CORDI L., MARTINS D. – **Violacein: properties and biological activities** – Biotechnol Appl Biochem (2007) 48: 127-133.

DURÁN N., JUSTO G. Z., MELO P. S., AZEVEDO M. B. M., SOUZA BRITO A. R. M., ALMEIDA A. B. A., HAUN, M. - **Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with β -cyclodextrin** - Canadian Journal of Physiology and Pharmacology (2003) 81(4): 387-396.

ENOMOTO K. – **Violacein as a new pigment for cosmetics** – Academic Forum – Cosme Tech 2013. Disponível em: <summer2013.tems-system.com/exhiSearch/ADCOForum/eng/DetailsForAD?id=jXebhOXcUHA%3D&type=5> Acesso em 28.11.2014.

FERREIRA C. V., BOS C. L., VERSTEEG H. H., JUSTO G. Z., DURÁN N. E PEPPELENBOSCH M. P. - **Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death** - Blood (2004) 104(5): 1459-1464.

FREITAS, L. C. G. - **Prêmio Nobel de Química em 1998: Walter Kohn e John A. Pople.** – Quím. Nova (1999) 22 (2): 293-298.

GAUSSIAN 09 User's Reference – **Density Functional (DFT) Methods.** Disponível em: <http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/k_dft.htm> Acesso em: 12.01.2015.

GIMENEZ I. F., ANAZETTI M. C., MELO P. S., HAUN M., AZEVEDO M. M. M., DURÁN N., ALVES O. L. – **Cytotoxicity on V79 and HL60 Cell Lines by Thiolated- β -Cyclodextrin-Au/Violacein Nanoparticles** – J. Biomed. Nanotech. (2005) 1(3): 1-7.

HAFNER J., WOLVERTON C., CEDER G. (guest editors) – **Toward Computacional Materials Design: The Impact of Density Functional Theory on Materials Research** – MRS Bulletin (2006) 31: 659-668.

HOMEM-DE-MELLO P., MENNUCCI B., TOMASI J., SILVA A. B. F. - **Cationic dye dimers: a theoretical study** - Theor Chem Acc (2007) 118:305–314.

HOSHINO T. - **Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core** - Appl Microbiol Biotechnol (2011) 91:1463–1475.

HUNGRIA M., ASTOLFI-FILHO S., CHUEIRE L.M.O., NICOLÁS M.F., SANTOS E.B.P., BULBOL M.R., SOUZA-FILHO A., NOGUEIRA ASSUNÇÃO E., GERMANO M.G., VASCONCELOS A.T.R. - **Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon** - The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology (2005) 41: 17–23.

JENSEN F. – **Introduction to Computacional Chemistry** (2^a ed.) – John Wiley & Sons – West Sussex - England, 2013, 624p.

JUSTO G. Z. E FERREIRA C. V. – **Coagulation and Cancer Therapy: The Potencial of Natural Compounds** – Current Genomics (2005) 6: 461-469.

KISS F. D. – **Efeitos de dimensão nas propriedades físicas e processos de adsorção em nanopartículas de prata**, 2010 – tese para obtenção do título de doutor em Ciências - Instituto de Física – Universidade de São Paulo.

KOCH W., HOLTHAUSEN M. C. – **A Chemist's Guide to Density Functional Theory** (2^a ed – 4^a reimpressão) – WILEY-VCH – Weinheim, Federal Republic of Germany, 2007, 293p.

KODACH L. L., BOS C. L., DURÁN N., PEPPELENBOSCH M. P., FERREIRA C.V., HARDWICK J. C.H. - **Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells** - Carcinogenesis (2006) 27(3): 508–516.

KOLLMAN P. A., ALLEN L. C. – **The Theory of the Hydrogen Bond** – Chemical Reviews (1972) 72(3): 283-303.

LEACH A. R. - **Molecular Modelling: Principles and Applications** (2^a ed.) – Pearson – Harlow – England, 2001.

LEAL A. M. S. – **Avaliação do caráter oxidante da violaceína**, 2011 – dissertação para obtenção do título de mestre em Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

LEE C., YANG W., PARR R. G. - **Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density** - Phys. Rev. (1988) B 37: 785.

LEWARS E. G. – **Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics** – Springer Science & Business Media – Ontario – Canada, 2010, 664p.

LIMA A., GRACETTO A., BIONDO C. E. G., BATISTELA V., HIOKA N., SEVERINO D., MACHADO A. E. H., RODRIGUES M. R., OLIVEIRA H. P. M. - **Efeito do Solvente sobre as Propriedades Espectroscópicas do Azul de Metileno** - XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2007. Disponível em: inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/exatas/inic/INICG00047_01C.pdf Acesso em: 12.11.2014.

LIN I-C., COUTINHO-NETO M. D., FELSENHEIMER C., VON LILIENFELD O. A., TAVERNELLI I., ROTHLSBERGER U. - **Library of dispersion-corrected atom-centered potentials for generalized gradient approximation functionals: Elements H, C, N, O, He, Ne, Ar, and Kr** – Physical Review (2007a) B 75, 205131.

LIN I-C., VON LILIENFELD O. A., COUTINHO-NETO M. D., TAVERNELLI I., ROTHLSBERGER U. - **Predicting Noncovalent Interactions between Aromatic Biomolecules with London-Dispersion-Corrected DFT** - J. Phys. Chem. B (2007b) 111: 14346-14354.

LODISH H., BERK A., KAISER C. A., KRIEGER M., BRETSCHER A., PLOEGH H., AMON A., SCOTT M. P. – **Biologia Celular e Molecular** (7^a ed) – Artmed – Porto Alegre – Brasil, 2014, 1241p.

LOPES J. F. – **Estudo Teórico das Interações da Cisplatina e Análogos em Solução**, 2009 - tese para obtenção do título de doutor em Ciências - Química – Instituto de Ciências Exatas – Universidade Federal de Minas Gerais.

LOPES S. C. P., BLANCO Y. C., JUSTO G. Z., NOGUEIRA P. A., RODRIGUES F.L. S., GOELNITZ U., WUNDERLICH G., FACCHINI G., BROCCHI M., DURÁN N., COSTA F. T. M. - **Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits *Plasmodium* Growth In Vitro and In Vivo** - Antimicrob. Agents Chemother. (2009) 53(5): 2149–2152.

MADIGAN M. T., MARTINKO J. M., DUNLAP P. V., CLARK D. P. – **Microbiologia de Brock** (12^a Ed.) – Artmed – Porto Alegre – Brasil, 2010, 1128p.

MANTOAN, R., NEUWEILLER J. M., SEVERINO D., PRADO F. M., DI MASCIOS P., BAPTISTA M. S., SHIDA C. S., DURÁN N., NANTES I. L. - **Caracterização Fotoquímica da Violaceína**. – XI Congresso de Iniciação Científica (Universidade de Mogi das Cruzes), 2008. Disponível em: <umc.br/_img/_diversos/pesquisa/pibic_pvic/XI_congresso/projetos/caracterizacao_fotoquimica_violaceina.pdf> Acesso em: 12.11.2014.

MARTINEZ C. R., IVERSON B. L. – **Rethinking the term “pi-stacking”** - Chem, Sci., (2012) 3: 2191-2201.

MARTINS D., FRUNGILLO L., ANAZZETTI M. C., MELO P. S., DURÁN N. - **Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly-D,L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein** – International Journal of Nanomedicine (2010) 5: 77-85.

MATTHEWS R. P., WELTON T., HUNT P. A. - **Competitive pi interactions and hydrogen bonding within imidazolium ionic liquids** - Phys. Chem. Chem. Phys. (2014) 16: 3238--3253

MEDEIROS, E. S.; PATERNO, L. G. E MATTOSO, L. H. C. – **Nanotecnologia** *in* DURAN, N; MATTOSO, L. H. C. E MORAIS, P. C. – Nanotecnologia: introdução, preparação e exemplos de aplicação – Artliber Editora - São Paulo – Brasil, 2006, 208p.

MOMEN A. Z. M. R., HOSHINO T. – **Biosynthesis of Violacein: Intact Incorporation of the Tryptophan Molecule on the Oxindole Side, with Intramolecular Rearrangement of the Indole Ring on the 5-Hydroxindole Side** – Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000) 64(3): 539-549.

MORENO R. R. M., TEIXEIRA L. S. G. - **Entendendo Estrutura Molecular com a Molécula de Hidrogênio Ionizada** - Química Nova(1999) 22(6): 882-888.

MORGON N. H., CUSTODIO R. – **Teoria do Funcional da Densidade** – Química Nova (1995) 18(1): 44-55.

MÜLLER R. M., JUNGHANNS J. A. H. – **Drug Nanocrystals/ Nanosuspensions for the Delivery of Poorly Soluble Drugs** *in* TORCHILIN V. P. (editor) – Nanoparticulates as Drug Carriers – Imperial College Press – London – England, 2006, 724p.

NAKAMURA Y., ASADA C., SAWADA T. - **Production of Antibacterial Violet Pigment by Psychrotropic Bacterium RT102 Strain** - Biotechnology and Bioprocess Engineering (2003) 8: 37-40.

NETZ P.A., ORTEGA G.C. - **Fundamentos de Físico-Química: Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas** – Artmed – Porto Alegre – Brasil, 2008, 296p.

OLIVEIRA A. F., SEIFERT G., HEINE T., DUARTE H. A. - **Density-functional based tight-binding: an approximate DFT method** – J. Braz. Chem. Soc. (2009) - 20(7): 1193-1205.

PELOI L. S. - **Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica**, 2007 – dissertação para obtenção do título de mestre em Química – Universidade Estadual de Maringá.

PERDEW J. P. – **Climbing the ladder of density functional approximations** – MRS Bulletin (2013) 38: 743-750.

PERDEW J. P., RUZSINSZKY A. – **Fourteen Easy Lessons in Density Functional Theory** – International Journal of Quantum Chemistry (2010) 110: 2801-2807.

PURUSHOTHAM U., SASTRY G. N.- **A Comprehensive Conformational Analysis of Tryptophan, Its Ionic and Dimeric Forms** - J. Comput. Chem. (2014) 35: 595–610.

QUEIROZ K. C. S., MILANI R., RUELA-DE-SOUSA R. R., FUHLER G. M., JUSTO G. Z., ZAMBUZZI W. F., DURÁN N., DIKS S. H., SPEK C. A., FERREIRA C. V., PEPPELENBOSCH M. P. - **Violacein Induces Death of Resistant Leukaemia Cells via Kinome Reprogramming, Endoplasmic Reticulum Stress and Golgi Apparatus Collapse** - PLOS ONE (2012) 7(10): 1-8.

RAMBO C. R., COSTA C. M., CARMINATTI C. A., RECOUVREUX D. O. S., D'ACAMPORA A. J., PORTO L. M. - **Osteointegration of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-valerate) scaffolds incorporated with violacein** - Materials Science and Engineering (2012) C 32: 385–389.

REIS C. A. G. – **Aplicação de uma nova proposta de discretização das equações Griffin-Wheeler-Hartree-Fock na geração de bases Gaussianas para cálculos de átomos e moléculas**, 2009 – dissertação para obtenção do título de mestre em Química – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

REIS Jr. F. B., MENDES I. C., TEIXEIRA K. R. S., REIS V. M. – **Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microorganismos do Solo.** – Embrapa Cerrados – Planaltina – Distrito Federal, 2002, 33p.

RETTORI D. – **Estudos Físico-Químicos e Biológicos da violaceína: Um pigmento produzido pela *Chromobacterium violaceum*,** 2000 – tese para obtenção do título de doutor em Físico-Química – Universidade Estadual de Campinas.

RODRIGUES J. A. R. – **Ligações hidrogênio fortes em ácidos dicarboxílicos e diaminas aromáticas** – Química Nova: 23(6), 2000, 812-817.

SABATINI R. – **Non-local correlation in Density Functional Theory** – tese de doutorado apresentada ao SISSA - International School for Advanced Studies – Trieste – Itália, 2012.

SANTOS H. F., COURA P. Z., DANTAS S. O., BARONE P. M. V. B. (org) – **Escola Brasileira de Estruturas Eletrônicas** – Ed. Livraria da Física – Juiz de Fora – Brasil, 2003, 324p.

SILVA, U. R. – **Influência da formação de agregados e de nanopartículas de ouro nas propriedades microscópicas de corante rodamina 6G,** 2010 – dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências – Universidade Federal de Alagoas.

SINNOKROT M. O., SHERRILL C. D. - **High-Accuracy Quantum Mechanical Studies of π - π Interactions in Benzene Dimers** – J. Phys. Chem. A (2006) 110: 10656-10668.

SOARES, R. R. S. – **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a terapia fotodinâmica,** 2006 – dissertação para obtenção do título de mestre em Química – Universidade Estadual de Maringá.

SURYAWANSHI R. K., PATIL C. D., BORASE H. P., NARKHEDE C. P., STEVENSON A., HALLSWORTH J. E., PATIL S. V. - **Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens** - International journal of cosmetic science, 2014. Disponível em: <labroots.com/user/publications/detail-search/ipi/Pubmed/id/25354759/title/towards-an-understanding-of-bacterial-metabolites-prodigiosin-and-violacein-and-their-potential-for-use-in-commercial-sunscreens> Acesso em 28.11.2014.

TAPAVICZA E., LIN I. C., VON LILIENFIELD O. A., TAVERNALLI I., COUTINHO-NETO M. D., ROTH LISBERGER U. – **Weakly Bonded Complexes of Aliphatic and Aromatic Carbon Compounds Described with Dispersion Corrected Density Functional Theory** – J. Chem. Theory Comput. (2007) 3: 1673-1679.

TONETTO B. C. - **Estudo da utilização dos nanotubos de carbono na remoção ou detecção de defensivos agrícolas: um estudo de primeiros princípios**, 2011 – dissertação para obtenção do título de mestre em Nanociências – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria (Unifra).

TROULLIER N., MARTINS J. L. – **Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations** – Physical Review B (1991) 43(3): 1993-2006.

TRZESNIAK, D. R. F. - **Modelagem quântica de inibidores enzimáticos**, 2002. - dissertação para obtenção do título de mestre em Física - Instituto de Física - Universidade de São Paulo.

TSUZUKI S. – **Interactions with Aromatic Rings** – Intermolecular Forces and Clusters I – *Structure and Bonding* (2005) 115: 149-193.

TUSZYNSKI J. A., KURZYNSKI M. – **Introduction to Molecular Biophysics** – CRC Press – Boca Raton – United States of America, 2003, 584p.

VÁZQUEZ M. I. N., CHIÑAS E. M., MARTINEZ F.M. C., RUVALCABA R. M. – **Algunos Aspectos Básicos de La Química Computacional** – UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) – Ciudad de México, México, 2006, 75p.

VON LILIENFELD O. A., TAVERNELLI I., ROTH LISBERGER U. - **Optimization of Effective Atom Centered Potentials for London Dispersion Forces in Density Functional Theory** – Physical Review Letters (2004) 93(15): 153004.

WANG H., WANG F., ZHU X., YAN Y., YU X., JIANG P., XING X. H. – **Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities** - Biochemical Engineering Journal (2012) 67: 148–155.