

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

**Avaliação de Metodologias Teóricas no Estudo de
Propriedades Termoquímicas e Mecanismos
Reacionais Envolvidos na Oxidação do Colesterol**

Gabriel Heerdt
gabheerdt@iqm.unicamp.br

Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon
morgon@iqm.unicamp.br

CAMPINAS, SP
FEVEREIRO DE 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

H36a	Heerdt, Gabriel. Avaliação de metodologias teóricas no estudo de propriedades termoquímicas e mecanismos reacionais envolvidos na oxidação do colesterol / Gabriel Heerdt. – Campinas, SP : [s,n], 2011. Orientador: Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon. Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Colesterol. 2. Autoxidação. 3. Teoria do funcional de densidade. I. Morgon, Nelson Henrique. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
------	--

Título em inglês: Evaluation of theoretical methodologies in the study of thermochemical properties and reaction mechanisms involved in the cholesterol oxidation

Palavras-chave em inglês: Cholesterol, Autoxidation, Density functional theory

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon (orientador), Prof. Dr. Rogério Custódio (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Stella Maris Resende (IQ-UFSJ)

Data da defesa: 18/02/2011

“Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro; a real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz.”

Platão

Dedico esse trabalho e agradeço:

- a minha companheira desses últimos 4 anos, Manu, pela sua paciência, respeito, segurança e carinho;
- ao meu pai Bertolinos e minha mãe Maria Lioba, tudo que conquistei foi graças a eles;
- a minhas irmãs, cunhados e sobrinhos Bettina (Claudio Henrique), Beatriz (Alana e Renan), Christine e Bruna e ao meu irmão Lucas, com quem sempre pude contar e por quem tenho muito carinho;
- ao meu orientador Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon por todos os seus ensinamentos, pelo respeito e confiança em mim depositada;
- aos Profs. Drs. Pedro A. M. Vazquez, Yoshiyuki Hase, Rogério Custódio, Roy E. Bruns, Francisco B. T. Pessine e Teresa D. Z. Atvars, pelos diversos ensinamentos e trocas de experiências;
- aos amigos do IQ/UNICAMP, em especial Maurício C. da Silva, Luciano N. Vidal e Alamgir Khan, pelas várias discussões que contribuíram no meu desenvolvimento profissional e pessoal;
- a toda comunidade do Instituto de Química da UNICAMP;
- às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP pelo apoio a minha pesquisa.

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Gabriel Heerdt

Nasc.: 09/09/1987

e-mail: gheerdt@hotmail.com

Formação Acadêmica

Curso: Bacharelado em Química

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava - PR

Período: Março de 2005 / Dezembro de 2008

Simpósios e Congressos

1. HEERDT, G.; MORGON, N. H. “Estudo de Métodos Compostos para Descrição de Propriedades Moleculares.” III SEEDMOL, 2010, Brasília-DF, modo de apresentação: painel.
2. HEERDT, G.; MORGON, N. H. “Estudo do Mecanismo de Adição de Cloreto de Hidrogênio a Dienos Conjugados.” III SEEDMOL, 2010, Brasília-DF, modo de apresentação: painel.
3. HEERDT, G.; MORGON, N. H. “Utilização de modelos empíricos no estudo de métodos de cálculos.” 33^a RASBQ, 2010, Águas de Lindóia - SP, modo de apresentação: painel.
4. HEERDT, G.; MORGON, N. H. “Estudo teórico das reações de hidrólise de acetil haletos.” 33^a RASBQ, 2010, Águas de Lindóia - SP, modo de apresentação: painel.
5. HEERDT, G.; MORGON, N. H. “Cálculos de afinidade por próton usando o método ONIOM em conjunto com os métodos compostos G3(MP2) e G3(B3LYP).” XV SBQT, 2009, Poços de Caldas-MG, modo de apresentação: painel.
6. HEERDT, G. ; MORGON, N. H. “Correção do fator de escalonamento de ZPE a partir de cálculos de afinidade por próton.” VII WFME, 2009, Joinville-SC, modo de apresentação: painel.
7. HEERDT, G. ; RODRIGUES, M. G. ; CELESTE, R. ; ALMEIDA, C. A. P. “Estudo computacional da estrutura eletrônica do corante azul de metileno.” II Simpósio de Química Aplicada e III Jornada de Pós-Graduação em Química, 2008, Guarapuava-PR, modo de apresentação: painel.
8. RODRIGUES, M. G. ; HEERDT, G. ; CELESTE, R. “Estudo computacional do isômero esmeraldina e do cluster esmeraldina-ácido fosfórico da polianilina.” II Simpósio de Química Aplicada e III Jornada de Pós-Graduação em Química, 2008, Guarapuava-PR, modo de apresentação: painel.

9. HEERDT, G. ; SILVA, E. N. ; RODRIGUES, M. G. ; GALLI, N. A. ; CELESTE, R. ; JUSTI, K. C. ; FÁVERE, V. T. ; NEVES, A. “Estudo teórico da estrutura da quitosana modificada com os ligantes HBPAMFF e BPMAMFF.” XVI SBQ-Sul, 2008, Blumenau-SC, modo de apresentação: painel.
10. HEERDT, G. ; SILVA, E. N. ; RODRIGUES, M. G. ; GALLI, N. A. ; CELESTE, R. ; JUSTI, K. C. ; NEVES, A. ; FÁVERE, V. T. “Estudo computacional da estrutura da quitosana modificada com o ligante HBPAMFF.” XVI SBQ-Sul, 2008, Blumenau-SC, modo de apresentação: painel.
11. RODRIGUES, M. G. ; HEERDT, G. ; CELESTE, R. “Estudo computacional da interação da polianilina esmeraldina em superfície de óxido de alumínio.” XVI SBQ-Sul, 2008, Blumenau-SC, modo de apresentação: painel.
12. HEERDT, G. ; RODRIGUES, M. G. ; CELESTE, R. ; ALMEIDA, C. A. P. “Estudo computacional da interação da caulinita com o corante azul de metileno.” XVI SBQ-Sul, 2008, Blumenau-SC, modo de apresentação: painel.

Artigos

Artigo Aceito para Publicação: HEERDT, G. ; MORGON, N. H. Validação Computacional de Métodos Compostos no Estudo de Propriedades Moleculares. Química Nova (Impresso), 2011.

Atuação Profissional

- Programa de Estágio Docente - UNICAMP.
Disciplina: QF-530 - Introdução à Química Quântica e Espectroscopia Molecular.
Supervisão: Prof^a Dr. Teresa Dib Zambon Atvars.
Período: 08-12/2010.
- Programa de Estágio Docente - UNICAMP.
Disciplina: QF-335 - Físico-Química.
Supervisão: Prof^o Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine.
Período: 03-07/2010.
- Secretaria de Estado da Educação do Paraná.
Vínculo: Processo Seletivo Simplificado.
Enquadramento Funcional: Professor de Química.
Carga horária semanal: 20.
Período: 05-12/2008.

Resumo

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS TEÓRICAS NO ESTUDO DE PROPRIEDADES TERMOQUÍMICAS E MECANISMOS REACIONAIS ENVOLVIDOS NA OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

O objetivo principal deste trabalho foi analisar alguns dos mecanismos reacionais de oxidação da molécula de colesterol. Para que isso fosse possível, desenvolveu-se uma metodologia de cálculos à partir da análise de diferentes funcionais de densidade, conjuntos de funções de base e método ONIOM. A metodologia que realiza cálculos no nível ONIOM2(QCISD(T)/6-311++G(2df,p):HF/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d):HF/6-31G(d)) resultou nos menores desvios médios absolutos para afinidades por próton e eletrônica, 5,38 kJ/mol e 0,107 eV, respectivamente, para as 65 moléculas utilizadas no processo de validação. Essa metodologia comparada aos métodos propostos na literatura, G3(MP2) e G3(B3), possui desvios absolutos estatisticamente inferiores e vantagem em tempo computacional. Ao aplicar-se esse nível de teoria no estudo dos mecanismos de autooxidação do colesterol, observa-se uma concordância com dados experimentais que indicam a preferência pela reação através da posição equatorial. As reações de epoxidação seguida pela hidratação, foram realizadas pela transferência de um átomo de oxigênio da molécula de peróxido de hidrogênio para o colesterol, havendo a quebra da insaturação e conseqüente formação de um triol da molécula de colesterol.

Abstract

EVALUATION OF THEORETICAL METHODOLOGIES IN THE STUDY OF THERMOCHEMICAL PROPERTIES AND REACTION MECHANISMS INVOLVED IN THE CHOLESTEROL OXIDATION

The main objective of this study was to analyze some oxidation reaction mechanisms involving cholesterol molecule. A calculation methodology considering the analysis of different density functionals, basis sets and ONIOM method. The methodology that performs calculations at the level ONIOM2(QCISD(T)/6-311++G(2df,p):HF/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d):HF/6-31G(d)) resulted in smaller absolute mean deviations for proton and electron affinities, 5.38 kJ/mol and 0.107 eV, respectively, for the 65 molecules used in the validation process. This methodology in comparison with composite methods G3(MP2) and G3(B3), has a lower absolute deviation. Another advantage is the lower computational cost. This methodology when applied to the cholesterol autoxidation mechanisms gives a good agreement with experimental data. The results indicate that the reaction proceeds through the attack at the equatorial position. The next steps involve epoxidation and hydration reactions. The oxygen is transferred from hydrogen peroxide to cholesterol molecule. The unsaturation is broken and the cholesterol triol molecule is formed.

Sumário

Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiv
1 Introdução	1
1.1 Colesterol	1
1.2 Oxidação do Colesterol	2
1.3 Métodos de Química Teórica	4
1.3.1 O Método Hartree-Fock-Roothaan	5
1.3.2 O Método de Interação de Configuração (CI)	7
1.3.3 Teoria da Perturbação de Moller-Plesset	8
1.3.4 O Método <i>Coupled-Cluster</i> (CC)	9
1.3.5 Teoria do Funcional de Densidade	10
1.3.6 Métodos Compostos	11
1.3.7 ONIOM	13
1.4 Propriedades Termodinâmicas	14
1.4.1 Afinidade por próton	14
1.4.2 Afinidade eletrônica	14
2 Objetivos	16
3 Metodologias Computacionais	17
3.1 Descrição das Variáveis	18
3.1.1 Funções de Base	18
3.1.2 Funcionais de Densidade	18
3.1.3 ONIOM I	19
3.1.4 ONIOM II	20
3.2 Metodologia de Trabalho	20
3.2.1 Funções de Base	21
3.2.2 Funcionais de Densidade	21

3.2.3	ONIOM I	22
3.2.4	ONIOM II	22
3.3	Ajuste da Metodologia de Trabalho	23
3.4	Mecanismos Reacionais	23
3.4.1	Autoxidação radicalar	23
3.4.2	Oxidação via quebra da insaturação	26
4	Resultados e Discussões	28
4.1	Validação da Metodologia de Trabalho	28
4.1.1	Funções de base tripla-zeta-valência (tripla- ζ)	28
4.1.2	Funções de base dupla-zeta-valência-a (dupla- ζ -a) para o nível alto de teoria	29
4.1.3	Funções de base dupla-zeta-valência-b (dupla- ζ -b) para o nível baixo de teoria	30
4.1.4	Funcionais de Densidade	31
4.1.5	ONIOM I	32
4.1.6	ONIOM II	32
4.2	Ajuste da Metodologia de Trabalho	33
4.2.1	Afinidade por próton	34
4.2.2	Afinidade eletrônica	34
4.3	Mecanismos Reacionais	36
4.3.1	Autoxidação Radicalar	38
4.3.2	Oxidação via quebra da insaturação	49
5	Conclusões e Perspectivas	53
A	Conjunto de Moléculas Utilizadas no Processo de Validação	55

Lista de Tabelas

4.1	Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para as funções de base tripla- ζ	29
4.2	Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para as funções de base tripla- ζ	29
4.3	Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para as funções de base dupla- ζ para o nível alto de teoria do método ONIOM	30
4.4	Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para as funções de base dupla- ζ para o nível alto de teoria do método ONIOM	30
4.5	Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para as funções de base dupla- ζ para o nível baixo de teoria do método ONIOM	30
4.6	Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para as funções de base dupla- ζ para o nível baixo de teoria do método ONIOM	31
4.7	Resultados de afinidade por próton em kJ/mol para os Funcionais de Densidade, em ordem de qualidade	31
4.8	Resultados de afinidade eletrônica em eV para os Funcionais de Densidade, em ordem de qualidade	32
4.9	Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para os níveis da variável ONIOM I	32
4.10	Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para os níveis da variável ONIOM I	33
4.11	Desvios absolutos de energias de ionização em eV para os níveis da variável ONIOM II	33
4.12	Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para todo o grupo de moléculas utilizadas na validação, resultados com valor de escalonamento de ZPE igual a 1,00	34
4.13	Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para todo o grupo de moléculas utilizadas na validação, resultados com os valores ótimos de escalonamento de ZPE	35
4.14	Desvios absolutos para as afinidades eletrônica em eV para todas as moléculas utilizadas no processo de validação, resultados sem os valores ótimos de correção de HLC	35
4.15	Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV com os valores ótimos de correção de HLC(mhartree), para as 62 moléculas utilizadas na validação	36
A.1	Afinidades por próton (kJ/mol) e elétron (eV) experimentais para o conjunto de álcoois utilizados na escolha dos melhores níveis para cada variável	55

A.2	Energias de ionização (eV) experimentais para o conjunto de álcoois insaturados utilizados no método ONIOM	56
A.3	Afinidades por próton (kJ/mol) e elétron (eV) experimentais para o conjunto de moléculas utilizados no processo de validação dos métodos compostos	57
A.4	Afinidades por próton (kJ/mol) e elétron (eV) experimentais para o conjunto de moléculas utilizados no processo de validação dos métodos compostos	58

Lista de Figuras

1.1	Estrutura da molécula de Colesterol, $C_{26}H_{47}O$, em destaque os carbonos 5, 6, 7, 20 e 25.	1
1.2	Formação de óxidos de colesterol de maior ocorrência em alimentos. ¹	3
1.3	Esquema ilustrando o método ONIOM para 3 camadas.	14
3.1	Diagrama dos níveis alto e baixo de teoria do método ONIOM I. (a) ONIOM 1; (b) ONIOM 2.	20
3.2	Diagrama dos níveis alto e baixo de teoria do método ONIOM II. (a) ONIOM 1; (b) ONIOM 2.	21
3.3	Etapa 1 para as reações de autoxidação do colesterol abordadas, formação dos 7-radical-colesteróis.	24
3.4	Etapa 2 para as reações de autoxidação do colesterol abordadas, formação dos 7-radical-peróxidos.	25
3.5	Etapa 3 das reações de autoxidação do colesterol abordadas, formação dos 7-hidroperóxidos.	25
3.6	Etapa 4 para as reações de autoxidação do colesterol, formação dos 7-hidroxicolesteróis.	26
3.7	Etapa 1 para as reações envolvendo a quebra da insaturação do colesterol, formação do 5,6-epóxi-colesterol.	26
3.8	Etapa 2 para as reações envolvendo a quebra da insaturação do colesterol e formação do triol da molécula de colesterol.	27
4.1	Definição das regiões de níveis alto e baixo de teoria a serem aplicados nos mecanismos reacionais de autoxidação.	37
4.2	Definição das regiões de níveis alto e baixo de teoria a serem aplicados nos mecanismos reacionais de oxidação via quebra da insaturação.	37
4.3	Mecanismo para a Etapa 1, ataque do radical hidroxila a molécula de colesterol.	38
4.4	Coordenada reacional para Etapa 1 onde ocorre abstração de um átomo de hidrogênio da molécula de colesterol.	39
4.5	Estado de transição para a abstração do hidrogênio α do carbono 7 da molécula de colesterol.	39
4.6	Estado de transição para a abstração do hidrogênio β do carbono 7 da molécula de colesterol.	40
4.7	Híbridos de ressonância que auxiliam no processo de estabilização do radical de colesterol formado na Etapa 1 de autoxidação.	40

4.8	Mecanismo para a Etapa 2, adição de uma molécula de oxigênio ao radical do colesterol.	41
4.9	Coordenada reacional para Etapa 2, variações de energias livres de Gibbs para as espécies envolvidas nas reações.	42
4.10	Estado de transição para a formação do radical peróxido na posição α do carbono 7 do radical da molécula de colesterol.	42
4.11	Estado de transição para a formação do radical peróxido na posição β do carbono 7 do radical da molécula de colesterol.	43
4.12	Coordenada reacional para etapa 3, formação dos hidroperóxidos, primeiros produtos de oxidação da molécula de colesterol.	44
4.13	Equilíbrio entre as formas isoméricas α e β dos hidroperóxidos do colesterol.	44
4.14	Coordenada reacional para a conversão isomérica dos produtos α e β obtidos na Etapa 3. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.	45
4.15	Mecanismo proposto para a Etapa 4, formação dos hidroxicolesteróis.	45
4.16	Coordenada reacional para Etapa 4, formação dos hidróxicolesteróis.	46
4.17	Estado de transição para a formação do 7- α -hidroxicolesterol.	47
4.18	Estado de transição para a formação do 7- β -hidroxicolesterol.	47
4.19	Equilíbrio entre as formas isoméricas α e β dos hidróxidos da molécula de colesterol.	47
4.20	Coordenada reacional para a conversão entre os isômeros obtidos como produtos da Etapa 4 de autoxidação. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.	48
4.21	Perfil reacional para o grupo de reações de autoxidação da molécula de colesterol.	48
4.22	Mecanismo de epoxidação da molécula de colesterol.	49
4.23	Coordenada de reação para a epoxidação do colesterol. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.	50
4.24	Mecanismo de hidratação do epóxido da molécula de colesterol.	51
4.25	Coordenada de reação para a hidratação do epóxido de colesterol. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.	51
4.26	Perfil reacional para formação do triol da molécula de colesterol.	52

Capítulo 1

Introdução

1.1 Colesterol

Colesterol (colest-5-en-3- β -ol), Fig. (1.1), o esterol chefe de tecidos de mamíferos e único precursor dos hormônios esteróides e sais biliares, tem recebido muita atenção principalmente no que diz respeito ao seu papel na integridade da membrana e devido a sua associação com doenças humanas.

O colesterol é uma substância de extrema importância para o funcionamento do organismo. É indispensável na produção de hormônios, na construção e restauração contínua das membranas que envolvem as células, está presente na constituição do ácido biliar que regula a digestão dos alimentos e auxilia na síntese de vitamina D e também é responsável pela permanente reconstituição dos ossos do corpo humano.

A relação entre colesterol e doenças tais como aterosclerose, cálculos biliares e câncer, tem atraído o interesse há mais de dois séculos e data a partir da obra de Vallisneri² em 1733 sobre as propriedades de cálculos biliares humanos. Uma associação entre os depósitos de colesterol e formação de placas na aorta humana foi estudada em 1847³ e diversas outras relações do colesterol com os estados patológicos foram resumidos em 1862.⁴

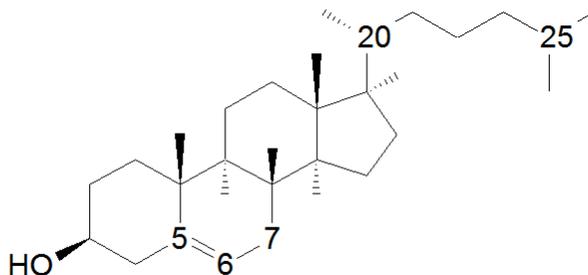


Figura 1.1: Estrutura da molécula de Colesterol, $C_{26}H_{47}O$, em destaque os carbonos 5, 6, 7, 20 e 25.

O estudo sistemático da química do colesterol e o interesse no seu metabolismo começaram no final do

século XIX. Com as novas técnicas de experimentação e os avanços em química e fisiologia, foi possível obter-se informação quanto ao metabolismo do colesterol e sua importância relacionada a assuntos médicos. A compreensão detalhada de diversos processos relacionados ao colesterol teve de aguardar a atribuição correta de sua fórmula química, em 1932,^{5,6} após um crescente número de trabalhos relativos ao colesterol, ácidos biliares, vitamina D, hormônios esteróides e triterpenóides.

Com a estrutura do colesterol bem definida, uma nova etapa dos estudos relacionados foi iniciada. A partir daí, um crescente número de trabalhos foram publicados e pode-se entender diversos processos até então não ou mal compreendidos, devido a atribuição errada da fórmula química.⁷

O colesterol é encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. Cerca de 70% do colesterol de nosso organismo é sintetizado no fígado (colesterol endógeno), e o restante adquirido pela dieta (colesterol exógeno).⁸

É um composto insolúvel em água e no sangue. Assim, para ser transportado através da corrente sanguínea liga-se a diversos tipos de lipoproteínas formando complexos. As lipoproteínas são classificadas de acordo com a sua densidade, sendo que as duas principais lipoproteínas, usadas para diagnóstico dos níveis de colesterol, são:

- LDL (*Low Density Lipoproteins*): responsáveis pelo transporte do colesterol do fígado até as células. É classificada como “colesterol ruim” uma vez que está ligada a formação de placas arterioscleróticas nos vasos sanguíneos;
- HDL (*High Density Lipoproteins*): transportam o colesterol dos tecidos até o fígado absorvendo os cristais de colesterol depositados nas paredes de artérias e veias. E portanto, o HDL é conhecido como “colesterol bom”, pois está ligado a baixos níveis de doenças cardiovasculares.

O colesterol, por si só, apresenta pequeno efeito citotóxico e aterogênico, porém, seus óxidos apresentam esses e outros efeitos em diferentes graus, podendo causar diversos malefícios a saúde humana.⁸

1.2 Oxidação do Colesterol

O estudo sistemático da oxidação química iniciada por Mauthner⁹ em 1894 foi acompanhado de perto pelos pesquisadores envolvidos no estudo da molécula do colesterol. O primeiro trabalho experimental de autoxidação do colesterol foi publicado em 1897. Tratava-se de um teste de cores para identificar grupos funcionais presentes nos produtos de oxidação do colesterol.^{10,11} A história do estudo da autoxidação do colesterol pode ser convenientemente dividida em três fases distintas:

- i uma fase inicial, dominada pelo trabalho de Lifschütz,¹¹ que incluiu muitas observações de transformações oxidativas do colesterol, feitos antes que a estrutura do colesterol fosse conhecida e

terminando com a atribuição da estrutura correta do colesterol, em 1932.

- ii uma fase intermediária envolvendo o isolamento de tecidos e identificação de produtos da oxidação do colesterol.
- iii a fase mais recente, iniciada por volta de 1960, envolvendo a aplicação de procedimentos experimentais mais avançados, principalmente a cromatografia e espectrometria de massas.

Os oxisteróis, como são conhecidos os produtos de oxidação do colesterol, são um grupo de esteróis com estrutura similar à do colesterol, contendo grupos adicionais hidroxila, cetona ou epóxido em um dos anéis ou nas cadeias laterais.¹² Mais de 80 produtos da oxidação do colesterol foram identificados,¹³ sendo mais frequentemente encontrados em alimentos: 7-cetocolesterol (7-Ceto), 25-hidroxicolesterol (25-OH), 7 α/β -hidroxicolesterol (7 α/β -OH), colesterol-5,6 α/β -epóxido (5,6 α/β -epóxido), e colestanoltriol (triol).

A oxidação do colesterol é influenciada pela presença de oxigênio, luz, temperatura, radiações, radicais livres, íons metálicos, pH, entre outros fatores.¹⁴⁻¹⁶ Esses processos podem ocorrer por via enzimática ou não. Nos seres vivos, os oxisteróis são formados por via enzimática, basicamente no fígado e nos tecidos geradores de hormônios esteróides (córtex supra-renal, gônadas).¹⁶ Nos alimentos a oxidação ocorre por meios não enzimáticos, sendo o processo de autooxidação o mais conhecido.

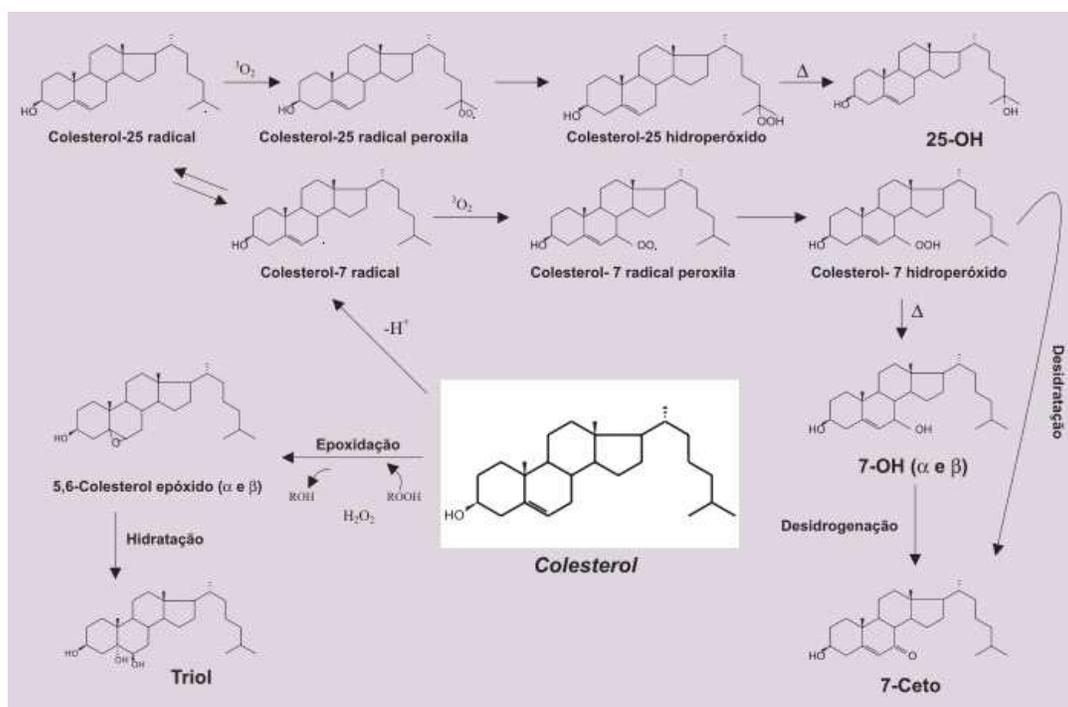


Figura 1.2: Formação de óxidos de colesterol de maior ocorrência em alimentos.¹

A autooxidação do colesterol ocorre pela reatividade tanto do carbono alílico, na posição 7 do anel B, Fig. (1.1), como dos carbonos terciários 20 e 25 da cadeia lateral.¹⁷ As reações são iniciadas, por exemplo, pela formação de um radical no carbono 7, devido a abstração do hidrogênio, que pode ocorrer por radiação ou na presença de outros radicais. Após a formação desse radical uma sequência de reações é desencadeada sendo formados alguns dos principais oxisteróis nesses processos, Fig. (1.2).

A oxidação do colesterol tem sido amplamente estudada e vários produtos da oxidação desta substância têm sido relacionados com efeitos adversos à saúde humana. Em particular têm sido relatadas algumas evidências acerca da correlação com angiotoxicidade, citotoxicidade, aterogenicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade.¹⁸⁻²³

Os óxidos de colesterol alteram várias funções relacionadas às membranas, inclusive a função dos receptores de LDL, levando a uma modificação no metabolismo dessas partículas pela diminuição da captação de LDL.²⁴ Pequenas quantidades de óxidos de colesterol apresentam efeitos tóxicos para diversos tipos de células.¹⁹ Os óxidos de colesterol, além de facilmente absorvidos pelo intestino, são capazes de inibir a síntese de colesterol, levando à morte das células, com rompimento da membrana celular e formação de infiltrados aterogênicos.²⁵⁻²⁷ Os óxidos de colesterol também são mutagênicos e cancerígenos em diferentes graus.^{25,28,29}

1.3 Métodos de Química Teórica

Falhas em explicar o mundo microscópico, a partir da Mecânica Clássica, resultaram em um novo formalismo para o estudo de sistemas em escala atômica, a Mecânica Quântica. Substituindo o conceito clássico da trajetória perfeitamente definida para uma distribuição através do espaço como uma onda, a Mecânica Quântica conseguiu desvendar problemas até então incompreendidos. Em 1927 o físico austríaco Erwin Schrödinger propôs uma equação que permite, em princípio, encontrar a função de onda (Ψ), que define o estado de um sistema, para um sistema físico qualquer.^{30,31}

$$-\frac{\hbar}{2m} \frac{\partial^2 \Psi(r, t)}{\partial r^2} + V(r, t) \Psi(r, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(r, t)}{\partial t} \quad (1.1)$$

Essa equação possui solução para sistemas contendo uma partícula de massa m , que se desloca ao longo da direção de r e que possui energia potencial $V(r, t)$. A constante \hbar é a constante de Planck dividida por 2π ($\hbar = h/2\pi$) e i o número imaginário.

A Equação de Schrödinger pode ser resolvida exatamente apenas para átomos hidrogenóides, ou seja, átomos que possuem apenas um elétron. Para avançar na resolução de problemas com maior número de partículas é necessária a utilização de técnicas de aproximação. Dentre essas técnicas estão a teoria da perturbação, o método variacional e ainda a aproximação de Born-Oppenheimer que trata do desacoplamento dos movimentos eletrônico e nuclear.³¹⁻³³

Após a proposta de Schrödinger começaram a surgir métodos aproximados para a resolução de sis-

temas físicos a partir da Eq. (1.1). O primeiro método de aproximações a surgir foi o Método de Hartree-Fock (HF).^{34,35} Nesse modelo a estrutura eletrônica de um átomo é descrita por um conjunto de funções de onda ψ aproximadas, denominadas orbitais atômicos.³⁰ A aproximação de independência das partículas e a representação das interações eletrônicas por um potencial médio limitam a precisão dos resultados obtidos com o método de Hartree-Fock. Atualmente, pode-se considerar interações instantâneas entre os elétrons através de métodos de correlação eletrônica.

1.3.1 O Método Hartree-Fock-Roothaan

O método de aproximação mais popular em Química Quântica é o método de Hartree-Fock de Orbitais Atômicos. Nesse modelo a estrutura eletrônica de um sistema qualquer é descrita por um conjunto de funções de onda ψ denominadas orbitais atômicos.^{30,34,35}

A função de onda eletrônica de um sistema contendo N elétrons pode ser fatorada na forma:^{31,36}

$$\Psi \equiv \psi_{a,\alpha}(1)\psi_{a,\beta}(2)\dots\psi_{z,\beta}(N) \quad (1.2)$$

Esta é a função de onda para um sistema de N elétrons com camadas fechadas, na qual o elétron 1 ocupa o orbital ψ_a com spin α , o elétron 2 ocupa o orbital ψ_a com spin β , e assim por diante. Entretanto, a função de onda deve ser antissimétrica e satisfazer o princípio de Pauli trocando de sinal sob a permutação de qualquer par de elétrons. Para que isso seja possível, a função de onda é escrita como uma soma de todas as possíveis permutações, com o sinal apropriado:

$$\Psi = \psi_{a,\alpha}(1)\psi_{a,\beta}(2)\dots\psi_{z,\beta}(N) - \psi_{a,\alpha}(2)\psi_{a,\beta}(1)\dots\psi_{z,\beta}(N) + \dots \quad (1.3)$$

Uma maneira mais geral de se escrever uma função de onda anti-simétrica é por meio de determinantes de Slater. John Slater mostrou que as propriedades exigidas para função de onda são observadas escrevendo-se esta função como um determinante cujos elementos são os spin-orbitais.

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_{a,\alpha}(1) & \psi_{b,\alpha}(1) & \dots & \dots & \psi_{z,\beta}(1) \\ \psi_{a,\alpha}(2) & \psi_{b,\alpha}(2) & \dots & \dots & \psi_{z,\beta}(2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \psi_{a,\alpha}(N) & \psi_{b,\alpha}(N) & \dots & \dots & \psi_{z,\beta}(N) \end{vmatrix} \quad (1.4)$$

Usando o princípio variacional, que nos garante que ao utilizar uma função de onda arbitrária o valor calculado para a energia nunca será menor que a energia exata, e preservando a ortogonalidade dos orbitais sabe-se que essas funções de onda devem satisfazer as equações de Hartree-Fock:

$$\hat{f}_1 \Psi_{a,\sigma}(1) = \varepsilon \Psi_{a,\sigma}(1) \quad (1.5)$$

onde σ representa o spin eletrônico. O operador de Fock, \hat{f}_1 , é dado por:

$$\hat{f}_1 = \hat{h}(1) + \sum_j [2\hat{J}_j(1) - \hat{K}_j(1)] \quad (1.6)$$

O primeiro termo dessa expressão refere-se ao hamiltoniano do caroço:

$$\hat{h}(1) = -\frac{\hbar}{2m_e} \nabla_1^2 - \sum_n \frac{Z_n e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{n1}} \quad (1.7)$$

O segundo é o Operador de Coulomb, dado por:

$$\hat{J}_j(1)\Psi_a(1) = \left[\int \Psi_j^*(2) \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} \Psi_j(2) d\tau_2 \right] \Psi_a(1) \quad (1.8)$$

E o último, o operador de troca:

$$\hat{K}_j(1)\Psi_a(1) = \left[\int \Psi_j^*(2) \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} \Psi_a(2) d\tau_2 \right] \Psi_j(1) \quad (1.9)$$

Embora as equações de Hartree-Fock pareçam simples, com o operador de Fock se assemelhando a um hamiltoniano, vemos dessas definições que \hat{f} depende das funções orbitais. Assim, temos que fornecer uma forma inicial para as funções orbitais, usá-las nas definições dos operadores de Coulomb e de troca e resolver as equações de Hartree-Fock. O processo é então repetido usando-se as funções orbitais recém-encontradas até que cada ciclo de cálculos deixe as energias e funções de onda inalteradas, dentro de um certo critério de convergência. Esta é a origem do termo campo autoconsistente (SCF) para este tipo de procedimento.

A dificuldade deste procedimento está na solução das equações de Hartree-Fock. Para contorná-la, é possível representar as funções orbitais como combinação linear de M orbitais atômicos ϕ_i :

$$\Psi_a = \sum_{i=1}^M c_{ia} \phi_i \quad (1.10)$$

O uso da combinação linear leva a um conjunto de equações que pode ser expresso na forma matricial, denominada equações de Hartree-Fock-Roothaan:

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\epsilon \quad (1.11)$$

em que \mathbf{F} é a matriz formada a partir do operador de Fock, cujos elementos são:

$$F_{ij} = \int \phi_i^*(1) \hat{f}_1 \phi_j(1) d\tau \quad (1.12)$$

e \mathbf{S} é a matriz das integrais de superposição:

$$S_{ij} = \int \phi_i^*(1)\phi_j(1)d\tau \quad (1.13)$$

Apesar do grande sucesso do método de Hartree-Fock-Roothaan, algumas limitações tornam seu uso restrito. Primeiramente o fato de ser necessária, porém, impraticável a utilização de um conjunto de funções de base completo. Na prática é necessário estabelecer uma boa relação entre precisão e tempo computacional. O outro fato deve-se à suposição de que a função de onda pode ser representada por um único determinante de Slater. Na verdade, um conjunto completo de determinantes pode ser usado para descrever uma função de onda antissimétrica. A diferença entre a energia exata de um sistema e a energia Hartree-Fock é chamada energia de correlação eletrônica:³⁷

$$E_{corr} = E_{exata} - E_{HF} \quad (1.14)$$

Métodos que incluem essas considerações de correlação eletrônica são conhecidos como métodos “pós Hartree-Fock”. Sendo os mais usados: Interação de Configuração (CI), *Coupled-Cluster* (CC) e Teoria da Perturbação de Moller-Plesset (MPn).

1.3.2 O Método de Interação de Configuração (CI)

Um dos métodos mais importantes para tratar da correlação eletrônica é o método de Interação de Configuração (CI). Ele baseia-se nas funções de onda HF, realizando uma combinação linear de determinantes excitados Φ_i como uma função de onda. O método CI é um método variacional pós-HF para resolver a equação de Schrödinger não-relativística dentro da aproximação de Born-Oppenheimer para sistemas quânticos de muitos elétrons.³⁸

A idéia básica do método é diagonalizar o Hamiltoniano de N elétrons numa base de M funções eletrônicas (determinantes de Slater). Ou seja, representar a função de onda exata como uma combinação linear de funções de N elétrons e usar o método variacional linear.

A aproximação HF consiste em utilizar como função de onda um único determinante onde os spin-orbitais $\psi_N^{(i)}$ são determinados pelo método variacional e são soluções das equações de HF:

$$|\Psi\rangle = |\Psi_{a,\alpha}(1), \Psi_{a,\beta}(2), \dots, \Psi_{z,\beta}(N)\rangle \quad (1.15)$$

Com os $\Psi_{z,\sigma}(N)$ é possível construir um conjunto completo de funções de N partículas, utilizando-se sistematicamente esses orbitais e usando os determinantes como base do espaço de Hilbert anti-simetrizado. Se N for o número de elétrons no sistema, K o número de spin-orbitais e $2K \geq N$, o número de elementos distintos desta base é dado por:

$$D = \binom{2K}{N} = \frac{(2K)!}{N!(2K - N)!} \quad (1.16)$$

Os determinantes desta base são formados considerando como referência o estado fundamental HF $|\Psi_0\rangle$ e todas as excitações possíveis. Um determinante é considerado mono-excitado, $|\Psi_a^r\rangle$, quando um elétron, então ocupando o spin-orbital ψ_a no estado fundamental é promovido para um spin-orbital ψ_r , até então desocupado.

A base de determinantes, com o número de elementos dado pela Eq. (1.16), forma um conjunto completo. O método CI baseia-se em construir o auto-estado Φ para o Hamiltoniano como uma combinação linear desses determinantes de Slater, ou seja, propõe-se que:

$$|\Phi\rangle = C_0|\Psi_0\rangle + \sum_{a,r} C_a^r|\Psi_a^r\rangle + \sum_{a<b,r<s} C_{ab}^{rs}|\Psi_{ab}^{rs}\rangle + \dots \quad (1.17)$$

onde os C são os parâmetros a serem determinados usando o princípio variacional e Ψ_0 é o estado HF tomado como referência para construir os determinantes com excitações.

A expansão 1.17 é a função de onda para o CI completo (*Full CI*), e no caso da expansão conter um número limitado de excitações o CI é dito truncado.

Uma correção comumente utilizada para o método CI é a inserção de um termo quadrático, isso torna o método CI *size-consistent* (correta descrição da separabilidade da função de onda), tornando os resultados do método CI mais comparáveis ao método CC de mesma ordem.

1.3.3 Teoria da Perturbação de Moller-Plesset

A teoria da perturbação supõe que o hamiltoniano do sistema \hat{H} possa ser separado em duas partes:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda\hat{H}' \quad (1.18)$$

em que λ é um coeficiente de expansão arbitrário.³⁸

O Hamiltoniano não perturbado pode ser considerado como a soma dos operadores de fock para cada elétron. A perturbação é considerada como a diferença entre a solução exata para o operador Hamiltoniano e esta soma dos operadores de Fock:

$$\hat{H}' = \hat{H} - \hat{H}_0 \quad (1.19)$$

A teoria de Moller-Plesset é uma aplicação da teoria de Rayleigh-Schrödinger, em que a expressão da função de onda Eq. (1.20) e da energia Eq. (1.21) podem ser expandidas numa série de Taylor de ordem n acompanhada pelo coeficiente de expansão λ :

$$\Psi_\lambda = \Psi_0 + \lambda\Psi_1 + \lambda_2\Psi_2 + \dots + \lambda_n\Psi_n \quad (1.20)$$

$$E_\lambda = E_0 + \lambda E_1 + \lambda_2 E_2 + \dots + \lambda_n E_n \quad (1.21)$$

Os dois primeiros termos da expansão para a função de onda ($\Psi_0 + \lambda\Psi_1$) e para a energia ($E_0 + \lambda E_1$) correspondem à função de onda Hartree-Fock e à energia Hartree-Fock, respectivamente. Portanto, a correção MP é realizada a partir da expansão de segunda ordem. A expansão definirá o tipo de cálculo MP n que será realizado.

1.3.4 O Método *Coupled-Cluster* (CC)

Como todos os métodos pós-HF, o método *Coupled-Cluster* começa a partir do método Hartree-Fock e adiciona um termo de correção para levar em consideração a correlação eletrônica. Este método é um dos mais aprimorados, confiáveis e computacionalmente acessíveis para moléculas de tamanho pequeno a médio. A idéia básica deste método consiste em dividir um sistema de muitos elétrons em vários aglomerados com poucos elétrons, os *clusters*. Então, calculam-se as interações dos elétrons de um mesmo *cluster* e, em seguida, a interação entre os diversos *clusters*.³⁸ O mecanismo matemático que permite esse tipo de abordagem é obtido escrevendo a função de onda *Coupled Cluster* como:

$$\Phi = e^T \Phi_0 \quad (1.22)$$

sendo T o operador de *cluster*:

$$T = T_1 + T_2 + \dots + T_p \quad (1.23)$$

onde as aplicações de T_1, T_2, \dots significam que:

$$T_1 \Phi_0 = \sum_{a,r} C_a^r \Phi_a^r \quad (1.24)$$

$$T_2 \Phi_0 = \sum_{a < b, r < s} C_{ab}^{rs} \Phi_{ab}^{rs} \quad (1.25)$$

Portanto a aplicação de T_1, T_2, \dots , gera configurações mono-, dupla-, ..., excitadas.

O cálculo mais simples dentro desse método inclui somente o termo T_2 no operador de *cluster* e chama-se aproximação CCD (*Coupled Cluster* com excitações duplas). Embora seja claro que as excitações duplas desempenham um papel dominante em cálculos de correlação (Teorema de Brillouin), existem problemas em que a inclusão das excitações simples é de fundamental importância. O método CCSD é um método truncado do método CC, onde a função de onda é escrita como

$$\Psi_{CCSD} = e^{T_1 + T_2} \quad (1.26)$$

Uma outra variante do método, muito difundida e implementada em diversos pacotes computacionais, seria o CCSD(T), onde o termo das excitações triplas é incluído através da Teoria de Perturbação.

Mesmo tendo em mãos métodos sofisticados, pós-HF, e funções de base extensas para descrever qualquer sistema eletrônico, a realização prática de cálculos envolvendo um grande número de partículas ainda é uma tarefa dispendiosa computacionalmente. Algumas estratégias têm tido sucesso e tornado possível a abordagem de sistemas relativamente grandes. Dentre elas destacam-se a Teoria do Funcional de Densidade, os métodos compostos e o método ONIOM.

1.3.5 Teoria do Funcional de Densidade

Em 1927, Thomas e Fermi^{39,40} propuseram uma nova abordagem para a obtenção da energia eletrônica. Ao invés de utilizar funções de onda com $3N$ coordenadas, eles utilizaram a densidade eletrônica (ρ) que é definida em 3 dimensões. Então, foi possível reduzir o número de integrais para a descrição de um sistema, reduzindo o custo de cálculo. No Modelo Thomas-Fermi (TF) parte-se do pressuposto que os elétrons estão distribuídos uniformemente no espaço e usa-se argumentos estatísticos para aproximar a distribuição dos elétrons.

O modelo TF é limitado, pois sua energia é aproximada e não representa a interação de troca. Na década de 60, Hohenberg, Kohn e Shan^{41,42} publicaram trabalhos mostrando que existe um funcional da densidade eletrônica para uma molécula no estado fundamental. As energias de troca (E_{troca}) e de correlação (E_{corr}) foram incluídas nesse modelo levando a um funcional com a seguinte forma:

$$E[\rho] = T[\rho] + V[\rho] + E_{troca}[\rho] + E_{corr}[\rho] \quad (1.27)$$

em que o termo $T[\rho]$ representa a energia cinética, $V[\rho]$ é o termo de energia potencial, $E_{troca}[\rho]$ e $E_{corr}[\rho]$ são os termos adicionados por Hohenberg, Kohn e Shan que representam as energias de troca e correlação, respectivamente.

A grande vantagem desta metodologia, em relação aos métodos CC e CI usados no cálculo da correlação eletrônica, está no ganho de tempo computacional, uma vez que reduz-se o número de coordenadas para o sistema em estudo.

Segundo a Teoria do Funcional de Densidade, o Hamiltoniano de um sistema eletrônico molecular, com M núcleos e N elétrons, na aproximação de Born-Oppenheimer e desprezando os efeitos relativísticos, é dado por:

$$H = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} + \sum_{i < j}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{|r_i - r_j|} + \sum_{A < B}^M \sum_{B=1}^B \frac{Z_A Z_B}{|R_A - R_B|} \quad (1.28)$$

ou:

$$H = T + U + V_e + V_a \quad (1.29)$$

A densidade eletrônica é definida por:

$$\rho(r) = \int \dots \int \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) * \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_2 \dots dr_N \quad (1.30)$$

Desta forma, a energia total do sistema é dada por:

$$E_0 = T_s(\rho) + E_{xc}(\rho) + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 + \int \rho(r)\nu(r)dr \quad (1.31)$$

em que $T_s(\rho)$ é o funcional de energia cinética de um sistema de elétrons que não interagem, $E_{xc}(\rho)$ é o termo de troca e correlação.

Como não se conhece a forma exata para os termos de troca e correlação são necessárias aproximações para representar a densidade eletrônica. Na aproximação LDA (*Local Spin Density*), a energia de troca-correlação é obtida a partir da descrição da densidade eletrônica como um sistema de gás de elétrons homogêneo. Um refinamento do método LDA normalmente pode ser feito ao expressar-se o funcional E_{xc} em termos do gradiente da densidade de carga total. Essa aproximação é conhecida como expansão generalizada em termos de gradientes (GGA). Alguns funcionais são conhecidos como híbridos pois misturam uma fração da energia de troca Hartree-Fock com a troca DFT. Um último e mais recente avanço da Teoria do Funcional de Densidade consiste em incorporar termos do GGA que dependam da densidade da energia cinética, sendo esse método conhecido como Meta-GGA.³⁸

1.3.6 Métodos Compostos

Uma alternativa de sucesso, que torna possível calcular com precisão propriedades de moléculas significativamente maiores, é a abordagem usando uma sequência de cálculos combinados. A série de teorias Gaussian-n, surgida na década de 80, explora essa idéia na tentativa de prever dados termoquímicos para moléculas contendo elementos dos três primeiros períodos da tabela periódica. O objetivo dessa teoria é obter um procedimento geral que possa reproduzir dados experimentais sendo aplicável a qualquer sistema molecular de uma forma inequívoca.⁴³⁻⁴⁸

As abordagens das teorias Gaussian-n procuram utilizar-se de um conjunto de métodos e funções de base com diferentes níveis de precisão na tentativa de aproximar-se dos resultados experimentais. Por exemplo, os cálculos de alto nível de correlação (QCISD(T), CCSD(T)), com conjuntos de bases de tamanho médio, podem ser combinadas com os resultados de cálculos usando um menor nível de aproximação (MP2, DFT, HF) com conjuntos de funções de base maiores, para aproximar os resultados dos cálculos mais custosos. Além disso, alguns parâmetros empíricos são adicionados a fim de corrigir deficiências remanescentes, como as provenientes da negligência de efeitos relativísticos, do conjunto de base completo e da correlação estática.

Teoria G3MP2

A teoria Gaussian-3, usando a teoria da perturbação de segunda ordem (G3MP2),⁴⁵ é uma técnica composta por uma sequência de cálculos *ab initio* realizados a fim de obter energias eletrônicas para átomos e moléculas dos três primeiros períodos da tabela periódica. As etapas realizadas pela teoria G3MP2 são:

- 1 A geometria é inicialmente otimizada no nível HF/6-31G(*d*), sendo utilizados o método restrito para estados singletos e não restrito para outras multiplicidades de spin.
- 2 A estrutura da etapa anterior é utilizada para realizar o cálculo das frequências harmônicas no nível HF/6-31G(*d*). As frequências são escalonadas por um fator de valor 0,8929, para corrigir efeitos de anarmonicidade. A energia de ponto zero (ZPE), obtida a partir das frequências harmônicas escalonadas, é usada na obtenção da energia G3MP2.
- 3 A geometria é reotimizada no nível MP2(*full*)/6-31G(*d*) a fim de inserir correlação eletrônica na otimização da estrutura.
- 4 No nível QCISD(FC,T)/6-31G(*d*) é realizado um cálculo *single point*, sendo esse o cálculo base do método.
- 5 Com o objetivo de inserir os efeitos de funções de maior momento angular, difusas e polarizadas é realizado um cálculo no nível MP2(*Full*)/GTMP2Large.

As energias obtidas são combinadas de forma aditiva com a correção de spin-órbita, ΔE_{SO} .

$$E(\text{combinada}) = E[\text{QCISD}(\text{FC}, \text{T})/6-31\text{G}(\text{d})] + E_{\text{MP2}(\text{F})/\text{GTMP2Large}} - E_{\text{MP2}(\text{F})/6-31\text{G}(\text{d})} + \Delta E_{SO} \quad (1.32)$$

A correção de spin-órbita é adicionada para átomos sendo proveniente de dados experimentais. Para algumas moléculas diatômicas os valores são obtidos a partir de cálculos mais precisos.

- 6 A correção de alto nível, *Higher Level Correction* (HLC), é adicionada com o objetivo de suprir deficiências adicionais na energia. Ela é calculada da seguinte forma:

para moléculas:

$$HLC = -An_{\beta} - B(n_{\alpha} - n_{\beta}) \quad (1.33)$$

para átomos neutros e seus íons:

$$HLC = -Cn_{\beta} - D(n_{\alpha} - n_{\beta}) \quad (1.34)$$

sendo A=9,279 mhartree, B=4,471 mhartree, C=9,345 mhartree e D=2,021 mhartree.

Por fim, a energia fundamental obtida pela teoria G3MP2 é calculada como:

$$E_0(G3MP2) = E(\text{combinada}) + E(HLC) + ZPE \quad (1.35)$$

Na validação do método G3MP2 foram realizados 299 cálculos de diferentes propriedades termoquímicas sendo 1,30 kcal/mol o desvio médio absoluto com relação aos valores experimentais.

1.3.7 ONIOM

A partir de meados da década de 70 surgiram métodos conhecidos como híbridos.⁴⁹⁻⁵¹ Esses métodos consistem na combinação de diferentes tipos de aproximações, tentando assim aproveitar a vantagem de cada uma podendo contornar suas limitações.

A primeira implementação da nova geração de métodos híbridos ficou conhecida como IMOMM (*Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*).⁵² Após o sucesso desse método, novos estudos realizaram-se para obter-se maior versatilidade nos cálculos com métodos híbridos. Surgiu então um método conhecido como ONIOM (*Our own n-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*),⁵³ que pode ser ilustrado como uma superposição de camadas de uma “cebola”.

Segundo o esquema teórico do método ONIOM, qualquer sistema molecular pode ser dividido em diferentes níveis, ligados segundo uma ordem mais conveniente ao problema em questão. Cada nível pode ser tratado sobre qualquer método e ao integrar-se os resultados obtidos sobre os níveis, produz-se uma extrapolação atingindo valores de energia mais precisos sobre todo o sistema.

Quando três níveis diferentes de aproximação são integrados o método ONIOM segue modelo apresentado na Fig. (1.3).

A equação para a energia total de um sistema contendo 3 camadas é escrita como:

$$E = E_{\text{alto,pequeno}} + E_{\text{medio,intermediario}} + E_{\text{baixo,real}} - E_{\text{medio,pequeno}} - E_{\text{baixo,intermediario}} \quad (1.36)$$

A aplicação do método ONIOM integrando métodos *ab initio*, semi-empíricos e de mecânica molecular, permite realizar cálculos de sistemas de um maior número de átomos sem um grande aumento de tempo computacional.

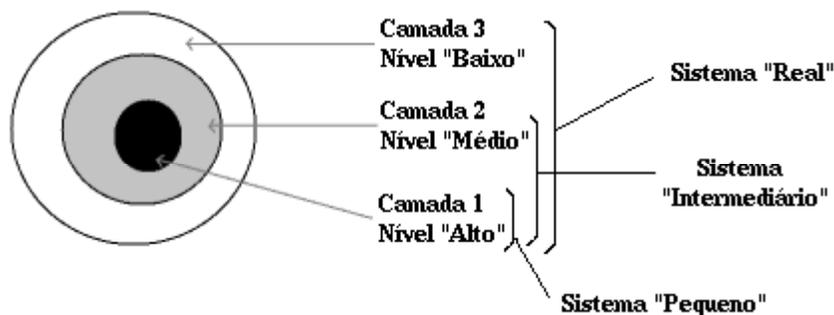


Figura 1.3: Esquema ilustrando o método ONIOM para 3 camadas.

1.4 Propriedades Termodinâmicas

O estudo de processos onde ocorre a transferência de elétrons ou prótons é muito difundido devido a importância dessas reações nas mais diversas áreas, como em processos biológicos, nanoestruturas, entre outros.⁵⁴⁻⁵⁹ Na Química Quântica essas propriedades tem sido muito utilizadas no processo de validação de métodos de cálculos, em especial, métodos compostos.⁴³⁻⁴⁸

1.4.1 Afinidade por próton

A afinidade por próton (AP) de uma molécula qualquer é definida como sendo a variação da entalpia ocorrida numa reação de desprotonação de um sistema neutro:



Experimentalmente a afinidade por próton pode ser obtida de diversas maneiras. A mais simples é a utilização do ciclo de Born-Haber, que define uma escala absoluta para a AP. Outras técnicas experimentais utilizadas para determinação de AP são: HPMS (*High-Pressure Mass Spectrometry*), SIFT (*Selected-Ion Flow Tube*), FIMS (*Flame-Ion Mass Spectrometry*) e ICR (*Ion Cyclotron Resonance*).^{60,61}

1.4.2 Afinidade eletrônica

A afinidade eletrônica (AE) é definida como sendo a variação da entalpia ocorrida numa reação em que um ânion (X^-) perde um elétron ficando neutro (X):



A maneira mais efetiva de se determinar afinidade por elétron de uma espécie química é baseada no efeito fotoelétrico. A espectroscopia fotoelétrica TOF (*Time Of Flight*) têm sido utilizada para determinar valores experimentais de AE com desvios na faixa de ± 1 kJ/mol.^{62,63}

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo geral deste projeto de mestrado consiste na avaliação de metodologias de cálculos para o estudo de propriedades moleculares e mecanismos reacionais envolvidos nos processos de oxidação da molécula de colesterol. Para tanto, objetivos secundários são relevantes nesse estudo:

- a avaliação de diferentes métodos de Teoria do Funcional de Densidade, conjuntos de funções de base e método ONIOM na descrição de afinidades por próton e elétron e energia de ionização para um conjunto de moléculas;
- o ajuste das correções energéticas previstas para os métodos compostos propostos, escalonamento de ZPE (λ) e de alto nível (*Higher Level Correction*), a fim da redução do desvio em relação aos dados experimentais, ou seja, adequação do método para representação ótima do conjunto de moléculas usadas na validação;
- validação do procedimento frente a comparação com métodos compostos similares descritos na literatura, avaliando-se a relação custo/benefício, e verificando a viabilidade da implementação de uma nova metodologia;
- aplicação da metodologia obtida no estudo de mecanismos reacionais de oxidação do colesterol por via radicalar e por quebra de insaturação, sendo formados nesses processos alguns dos principais produtos de oxidação da molécula de colesterol.

Capítulo 3

Metodologias Computacionais

Os pacotes computacionais *GAUSSIAN03*⁶⁴ e *NWCHEM 5.1.1*⁶⁵ foram utilizados para realizar os cálculos desse trabalho. Sendo que o programa *NWCHEM 5.1.1* foi utilizado apenas nos cálculos que envolviam funcionais de densidade que não estão presentes no *GAUSSIAN03*. Para construção das estruturas moleculares e visualização das geometrias otimizadas utilizou-se o programa *MOLDEN*⁶⁶.

O estudo, como um todo, está dividido em três partes:

- 1 Avaliação de diferentes funcionais de densidade, conjuntos de funções de base, dupla e tripla-zeta-valência, e cortes do método ONIOM para descrição de afinidades por próton e elétron e energia de ionização .

Nessa etapa foram determinados os melhores níveis para cada variável a partir do método de comparação de médias lsd (*least square difference*), sendo utilizados 10 monoálcoois, escolhidos aleatoriamente dentre os álcoois presentes no grupo de moléculas em estudo (Apêndice A), para o estudo das propriedades em questão;

- 2 Ajuste dos termos de correção empírica, a fim de corrigir a metodologia proposta para representação ótima das afinidades por próton e elétron do grupo de moléculas em estudo.

Escalonamento da energia de ponto zero (λ) e correção de alto nível (*High Level Correction* - HLC) são as correções empíricas inseridas como termos da energia do estado fundamental para as moléculas em questão. As mesmas estão presentes nos métodos compostos G3MP2 e G3MP2//B3LYP (G3B3), métodos da literatura usados para comparação com os métodos aqui propostos. Para melhor descrição possível dos mecanismos reacionais um grupo de 62 moléculas semelhantes às presentes nos mecanismos foram utilizados nessa etapa (Apêndice A).

3 O método composto, com os melhores níveis de cada variável e devidamente corrigido para sistemas análogos aos encontrados nos mecanismos reacionais, é aplicado no estudo de reações de autoxidação da molécula de colesterol por via radicalar e também por quebra da insaturação. O método QST3,^{67,68} bem como a teoria do estado de transição,⁶⁹ foram utilizados no intuito de caracterizar estados de transição e calcular entalpias reacionais.

Na primeira etapa as variáveis foram testadas isoladamente, ou seja, a medida que se comparava diferentes funcionais de densidade, por exemplo, mantinham-se fixos os conjuntos de funções de base e os cortes do método ONIOM. Esse procedimento, conhecido como univariado, torna o estudo mais objetivo, porém perde-se informação quanto à interdependência das variáveis.

3.1 Descrição das Variáveis

Para se obter os melhores resultados com relação aos dados experimentais⁷⁰ (Apêndice A) foram testadas as variáveis seguintes.

3.1.1 Funções de Base

A fim de se obter um valor ótimo de energia, e assim consequentemente propriedades dependentes da mesma com resultados mais próximos aos experimentais, um conjunto de funções de base que consiga descrever de forma eficiente a distribuição eletrônica das estruturas se faz necessário. As funções de base dupla e tripla-zeta-valência (dupla- ζ e tripla- ζ) utilizadas nos cálculos foram:

- **dupla- ζ** : 6-31G(*d*); cc-pVDZ;
- **tripla- ζ** : GTLarge; 6-311++G(2*df*,*p*); aug-cc-pVTZ.

3.1.2 Funcionais de Densidade

A boa descrição da distribuição eletrônica em torno do núcleo é crucial para a melhora nos resultados das propriedades. Para tanto, foram testados 25 funcionais de densidade na descrição das propriedades energéticas mencionadas. Também utilizou-se os métodos Hartree-Fock (HF), MP2 e QCISD(T). A seguir são apresentados todos os métodos DFT separados de acordo com a geração a que pertencem:

- **GGA**: HCTH; HCTH93; HCTH147;

- **Híbrido GGA:** B1LYP; B3LYP; B3P86; B3PW91; B972; B98; BHandH; BHandHLYP; O3LYP; PBE1PBE; X3LYP;
- **Meta GGA:** tHCTH;
- **Híbrido Meta GGA:** BMK; B1B95; mPW1LYP; mPW1PBE; mPW1PW91; mPW3PBE; M06; M06-2X; tHCTHhyb; VSXC.

3.1.3 ONIOM I

No método ONIOM I verificou-se a viabilidade da utilização do método ONIOM. A estrutura foi tratada em dois níveis de teoria, alto e baixo, sendo que em todos os casos no nível baixo de teoria utilizou-se o método HF. A escolha do método HF deve-se ao fato dele ser um método *ab initio* pouco custoso computacionalmente. Os cálculos foram realizados para os mesmos 10 monoálcoois citados anteriormente. A seguir são apresentados os três níveis para esse método:

- **Sem ONIOM:** sempre utilizou-se o método e a base do nível alto de teoria em toda a estrutura. A descrição de toda a molécula com o nível mais alto de teoria envolve um tempo computacional maior, porém, verifica-se, ao comparar com o cortes da metodologia ONIOM, a importância de se ter informação da função de onda nesse nível de teoria para as propriedades energéticas em questão. Ao realizar-se os cortes na molécula para descrição com a metodologia ONIOM tem-se informação da função de onda com o nível mais baixo de teoria apenas;
- **ONIOM 1:** as estruturas foram tratadas em dois níveis de teoria, sendo que a hidroxila e o carbono diretamente ligado a ela e os átomos de hidrogênio eventualmente ligados a esses átomos foram tratados com o nível de teoria mais alto. O restante da molécula foi tratado com o nível baixo de teoria, Fig. (3.1-a);
- **ONIOM 2:** da mesma forma que para o ONIOM1 dois níveis de teoria foram utilizados para tratar as moléculas em estudo. A hidroxila, o carbono diretamente ligado a ela e os carbonos ligados a ele, bem como os hidrogênios utilizados para completar valência desses átomos foram tratados com o nível alto de teoria e o restante da molécula com o nível baixo, Fig. (3.1-b).

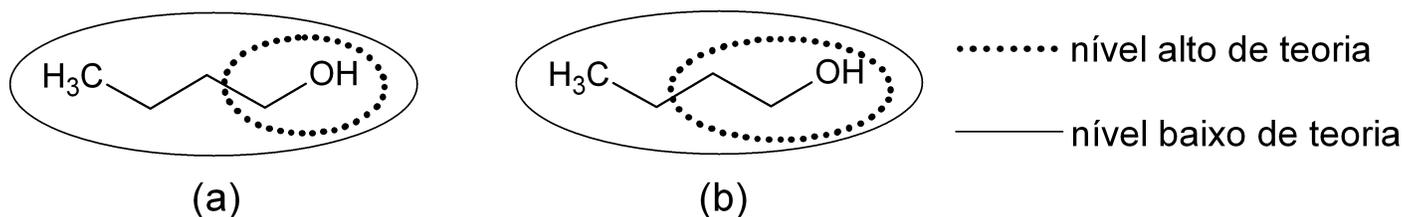


Figura 3.1: Diagrama dos níveis alto e baixo de teoria do método ONIOM I. (a) ONIOM 1; (b) ONIOM 2.

3.1.4 ONIOM II

Alguns dos mecanismos reacionais estudados ocorrem no carbono 7, vizinho a insaturação da molécula de colesterol. Nesses processos reacionais formam-se radicais e pode haver a transferência de densidade eletrônica da insaturação para o carbono 7. O objetivo é de estabilizar os intermediários da produção dos oxisteróis através da formação de híbridos de ressonância. Uma vez que esse processo de transferência de carga pode ocorrer, faz-se necessário uma boa descrição da região em questão.

Para analisar a importância da descrição dos átomos da insaturação no nível mais alto de teoria estudou-se a energia de ionização, em 7 monoálcoois com duplas ligações próximas ao grupo funcional. Duas conformações foram testadas:

- **ONIOM 1:** apenas a hidroxila, o carbono diretamente ligado a ela e eventuais átomos de hidrogênio para completar valência dos mesmos, foram tratados com nível alto de teoria. O restante dos átomos, incluindo os pertencentes a dupla ligação, foram descritos a partir do nível mais baixo de teoria, Fig. (3.2-a);
- **ONIOM 2:** a hidroxila, o carbono a ela ligado, os átomos de carbono pertencentes a dupla ligação e também os hidrogênios que completam a valência são descritos com o nível mais alto de teoria. O restante dos átomos são tratados pelo nível de cálculo mais baixo, Fig. (3.2-b).

3.2 Metodologia de Trabalho

Para a obtenção de melhores resultados, sem a necessidade de um gasto de tempo computacional excessivo, alguns caminhos foram traçados para o estudo. Nas etapas de refinamento, ou seja, etapas de redução do número de níveis de cada variável, utilizou-se apenas 10 álcoois escolhidos de forma aleatória.

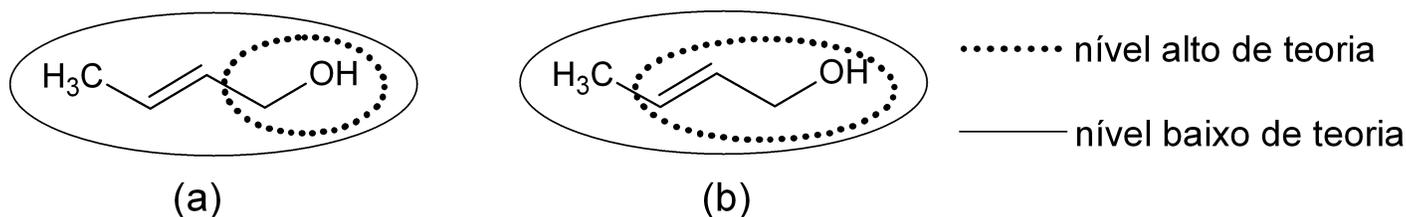


Figura 3.2: Diagrama dos níveis alto e baixo de teoria do método ONIOM II. (a) ONIOM 1; (b) ONIOM 2.

As variáveis estudadas foram testadas isoladamente, por exemplo, enquanto testava-se as funções de base mantiveram-se fixos os níveis para a variável ONIOM e para a variável funcionais de densidade. O procedimento adotado é descrito a seguir.

3.2.1 Funções de Base

Os estudos das funções de base dupla- ζ e tripla- ζ seguiram uma mesma metodologia, enquanto uma das variáveis era testada as outras eram mantidas fixas. As funções dupla- ζ mantidas fixas sempre foram a 6-31G(*d*), para os níveis de teoria alto e baixo do ONIOM, e a tripla- ζ foi a 6-311++G(2*df*,*p*). O procedimento adotado é:

1. Otimização ONIOM2(Método/dupla- ζ :HF/dupla- ζ)
2. Frequência ONIOM2(Método/dupla- ζ :HF/dupla- ζ)
3. Energia ONIOM2(QCISD(T)/dupla- ζ :HF/dupla- ζ)
4. Energia ONIOM2(Método/tripla- ζ :HF/dupla- ζ)

Dois funcionais foram utilizados, HCTH147 e B3LYP, para comprovar a não dependência das funções de base com o funcional. Os parâmetros utilizados para escolher as melhores funções de base foram afinidades por próton e por elétron. Os cálculos dessas propriedades foram realizados sem considerar as correções de escalonamento de ZPE e HLC, pois somente dessa maneira é possível analisar com clareza qual método é o mais adequado para este estudo.

3.2.2 Funcionais de Densidade

Da mesma forma que no estudo das funções de base mantiveram-se fixas todas as variáveis, menos a do estudo em questão. As etapas de cálculo são demonstradas a seguir:

1. Otimização ONIOM2(Método/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
2. Frequência ONIOM2(Método/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
3. Energia ONIOM2(QCISD(T)/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
4. Energia ONIOM2(Método/6-311++G(2*df*,*p*):HF/6-31G(*d*))

As mesmas propriedades termodinâmicas foram utilizadas nessa etapa e também foram deixadas de fora dos cálculos as correções de escalonamento de ZPE e HLC.

3.2.3 ONIOM I

Para verificar a viabilidade do uso do método ONIOM o mesmo grupo de 10 álcoois foi utilizado. Como já descrito, 3 níveis dessa variável foram testados sendo que todas as outras variáveis foram mantidas fixas com exceção do método de nível alto de teoria onde utilizou-se os funcionais HCTH147 e B3LYP. Abaixo as etapas consideradas:

1. Otimização ONIOM(Método/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
2. Frequência ONIOM(Método/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
3. Energia ONIOM(QCISD(T)/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
4. Energia ONIOM(Método/6-311++G(2*df*,*p*):HF/6-31G(*d*))

3.2.4 ONIOM II

Adotou-se o mesmo procedimento, porém a propriedade estudada foi energia de ionização (EI). A propriedade foi escolhida devido ao fato de não ser encontrado valores de afinidades por próton e elétron para as moléculas desta etapa (Apêndice A). Os cálculos realizados foram os seguintes:

1. Otimização ONIOM(Método/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
2. Frequência ONIOM(Método/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
3. Energia ONIOM(QCISD(T)/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*))
4. Energia ONIOM(Método/6-311++G(2*df*,*p*):HF/6-31G(*d*))

Os funcionais B3LYP e HCTH147 foram utilizados e as correções empíricas não foram consideradas.

3.3 Ajuste da Metodologia de Trabalho

Após obtidos os melhores níveis para cada variável testada, o método composto proposto foi ajustado para representação ótima das propriedades termoquímicas em questão.

Nos cálculos de afinidades por próton a correção de alto nível (HLC) é igual a zero. O número de elétrons α e β é o mesmo para produtos e reagentes, logo a correção é cancelada. Sendo assim, optou-se pelo ajuste do valor de escalonamento da energia de ponto zero nos cálculos de AP. A otimização é realizada ponto a ponto e o objetivo é encontrar o escalonamento que resulte no menor desvio médio absoluto para as AP.

Já nos cálculos de afinidades eletrônicas têm-se diferentes números de elétrons β , no caso da 1^o AE. Conseqüentemente o valor de HLC entra como um termo diferente de zero para as energias dos estados fundamentais. Portanto, a otimização da correção de alto nível é realizado com o objetivo de reduzir ao máximo o desvio médio absoluto para AE. Sendo a otimização também realizada ponto a ponto e utilizando-se o valor ótimo do escalonamento da energia de ponto zero.

3.4 Mecanismos Reacionais

Os mecanismos gerais de oxidação do colesterol abordados nesse estudo foram propostos inicialmente por Maerker em 1987.¹⁷ Desde então diversos trabalhos tem concentrado seus estudos nas causas das reações ao invés do mecanismo como um todo.⁷¹⁻⁷³ Sendo este um dos motivos pelos quais esse estudo concentra-se na avaliação dos mecanismos para explicação das causas de seus acontecimentos ou não.

Dividiu-se os estudos dos mecanismos em duas partes:

1. Mecanismos radicalares ocorridos no carbono 7 da molécula de colesterol.
2. Mecanismos ocorridos pela quebra da insaturação da molécula de colesterol.

A metodologia aplicada para o estudo de ambos os processos reacionais foi a mesma. Isso é possível pois no processo de validação da metodologia foram empregadas moléculas que representam os grupos presentes nos dois conjuntos de mecanismos reacionais abordados.

3.4.1 Autoxidação radicalar

Nesse estudo propõe-se a utilização do radical hidroxila para desencadear todo o processo de formação dos oxisteróis, a escolha desse radical deve-se a sua simplicidade e também a existência do mesmo em quantidade significativa no plasma sanguíneo,⁷⁴ um dos locais onde pode ocorrer o processo de autoxidação. Todos os mecanismos foram estudados em fase gasosa.

As reações de oxidação da molécula de colesterol via autooxidação por processo radicalar abordadas no trabalho consistem das seguintes etapas:

Etapa 1

Essa etapa consiste da ativação da molécula de colesterol que desencadeia todos os processos de formação dos oxisteróis. O radical hidroxila captura um hidrogênio ligado ao carbono 7 para a formação do 7-radical-colesterol, como pode ser observado na Fig. (3.3). No carbono 7 da molécula do colesterol existem 2 hidrogênios, α e β , ou seja, axial e equatorial, respectivamente. Logo, existem duas possibilidades de desencadeamento de reação, a primeira onde formam-se produtos da oxidação do colesterol na posição α e a segunda na posição β . O caminho reacional preferencial ocorre na posição menos impedida estericamente e diversos estudos mostram que existe impedimento estérico maior na posição axial sendo preferencial a reação na posição equatorial.⁷⁵

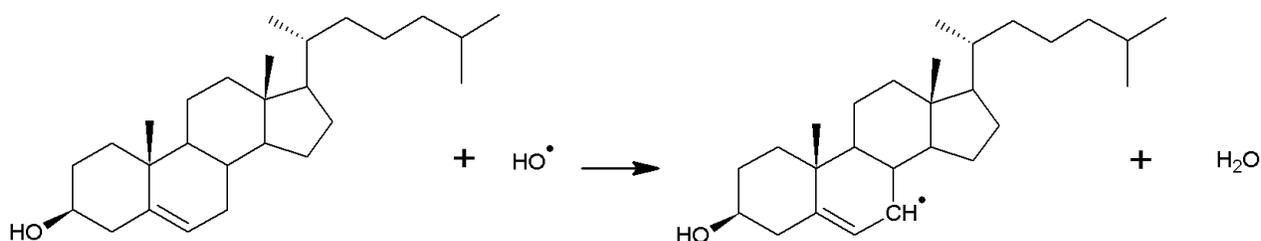


Figura 3.3: Etapa 1 para as reações de autooxidação do colesterol abordadas, formação dos 7-radical-colesteróis.

Etapa 2

Ao ser transformado em radical o colesterol torna-se uma molécula com potencial reacional muito grande, reagindo facilmente com moléculas estáveis para a formação de outros radicais. O processo que produz os óxidos de colesterol prossegue com a reação do 7-radical-colesterol e o oxigênio molecular triplete, forma-se então o 7-radical-peróxido de acordo com a reação apresentada na Fig. (3.4). Dependendo da etapa 1 para que o radical peróxido seja α ou β .

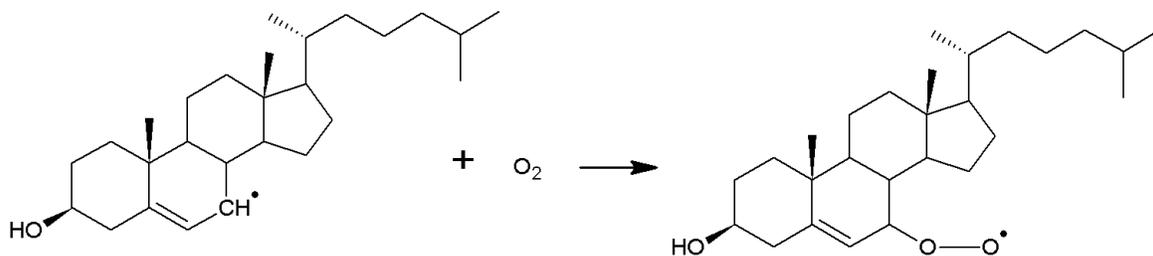


Figura 3.4: Etapa 2 para as reações de autoxidação do colesterol abordadas, formação dos 7-radical-peróxidos.

Etapa 3

O radical peróxido, α ou β , é altamente reativo e pode capturar um hidrogênio de algum composto presente no meio em que a reação desencadeia-se. Nessa etapa pode ocorrer a ativação de mais uma molécula de colesterol, pois o radical peróxido pode abstrair um hidrogênio do carbono 7 do colesterol iniciando outro processo reacional. Nesse estudo representou-se apenas a abstração de um átomo de hidrogênio livre, sem sequer obter estado de transição para esse processo. A captura desse hidrogênio pelo 7-radical-peróxido forma os 7- α/β -hidroperóxido, sendo esses os primeiros produtos de oxidação do colesterol obtidos no processo reacional estudado, conforme a Fig. (3.5).

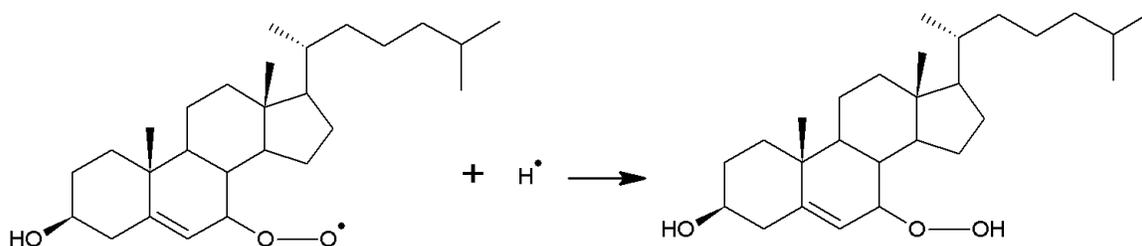


Figura 3.5: Etapa 3 das reações de autoxidação do colesterol abordadas, formação dos 7-hidroperóxidos.

Etapa 4

O hidroperóxido é uma molécula que possui uma ligação entre dois átomos de oxigênio relativamente fraca. Sendo essa molécula instável em temperaturas pouco elevadas. Sua instabilidade faz com que a molécula sofra decomposição formando os 7- α/β -hidroxicolesterol, segundo a reação na Fig. (3.6). Os hidroxicolesteróis formados nessa etapa são muito estáveis e a formação dos mesmos é muito favorável. Tanto que o 7- β -hidroxicolesterol é o principal produto de oxidação do colesterol dentre todos os detectados até então, sendo utilizado para medida do grau de oxidação do colesterol.

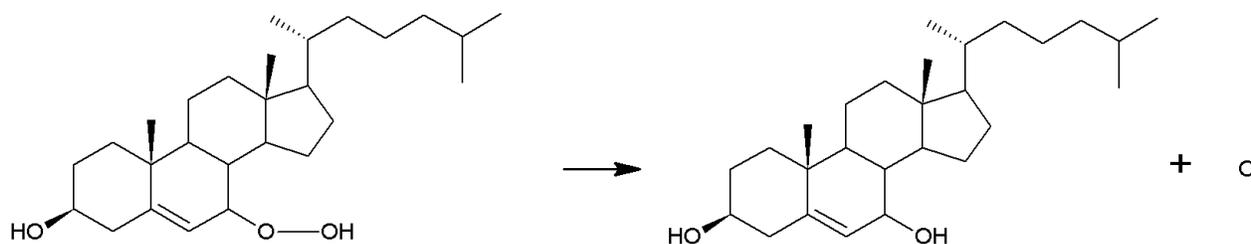


Figura 3.6: Etapa 4 para as reações de autoxidação do colesterol, formação dos 7-hidroxicolesteróis.

3.4.2 Oxidação via quebra da insaturação

Diferentemente da autoxidação esse processo não é radicalar. Nesse estudo propõem-se a obtenção dos estados de transição e consequente caracterização dos perfis reacionais para a reação de epoxidação seguida da hidratação.

Esse processo consiste das seguintes etapas:

Etapa 1

Formação de um epóxido pela quebra da insaturação entre os carbonos 5 e 6 da molécula de colesterol. A epoxidação ocorre com a transferência de um átomo de oxigênio da molécula de peróxido de hidrogênio para o colesterol, havendo nesse processo a quebra da insaturação e consequente ligação dos carbonos 5 e 6 com o átomo de oxigênio doado pelo peróxido, conforme pode ser observado na Fig. (3.7).

Nessa etapa existe a possibilidade de que o hidroperóxido formado na etapa 3 do mecanismo apresentado anteriormente, doe um átomo de oxigênio para a formação do epóxido. Optou-se nesse estudo demonstrar o mecanismo mais simples que envolve a molécula de peróxido de hidrogênio.

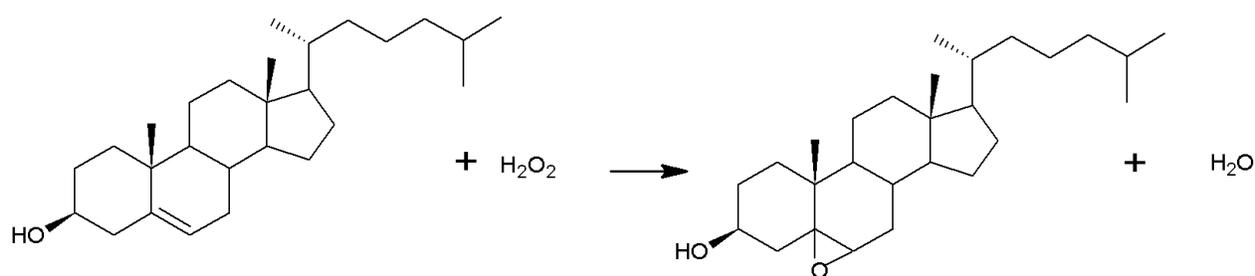


Figura 3.7: Etapa 1 para as reações envolvendo a quebra da insaturação do colesterol, formação do 5,6-epóxi-colesterol.

Etapa 2

Após a formação do epóxido, molécula instável que reage facilmente sofrendo ataque de nucleófilos, há o processo de hidratação. Uma molécula de água é adicionada a um dos carbonos do grupo epóxido, na sequência ocorre a transferência de um átomo de hidrogênio para o oxigênio do carbono vizinho. A partir dessas duas etapas forma-se então um triol, três grupos álcoois, da molécula de colesterol. Observa-se na Fig (3.8) a reação referente a esta etapa.

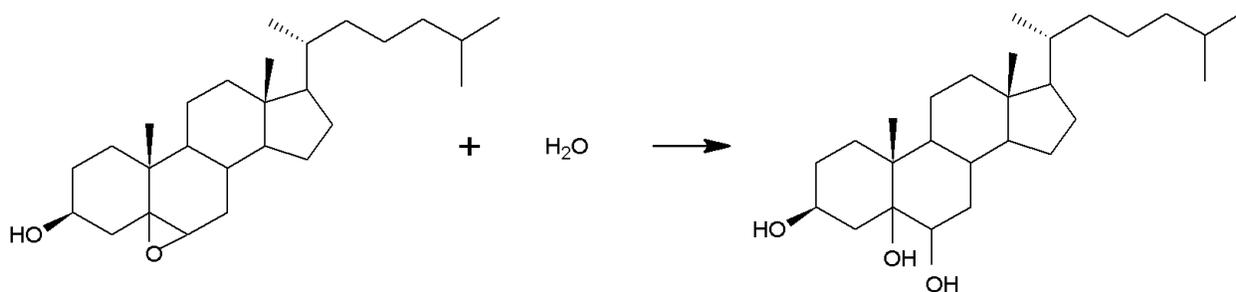


Figura 3.8: Etapa 2 para as reações envolvendo a quebra da insaturação do colesterol e formação do triol da molécula de colesterol.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1 Validação da Metodologia de Trabalho

Em todos os resultados foram aplicados métodos estatísticos afim de analisar diferenças significativas ou não entre os resultados obtidos, podendo assim confirmar qual fornece os melhores valores.

Os métodos de comparação de médias mais conhecidos e utilizados atualmente são Tukey, Duncan e lsd. Para esse estudo o método lsd (*least square difference*) foi utilizado para comparar médias. Como vantagem esse método tem a característica de ser mais simples que os demais, por isso sua escolha. Uma desvantagem em relação aos demais é sua característica de ser menos criterioso, logo, médias podem ser consideradas equivalentes erroneamente. O método de comparação de médias lsd é definido como:

$$lsd = t_{\alpha} \sqrt{\frac{2 * MS_{erro}}{n}} \quad (4.1)$$

onde t_{α} é o valor tabelado de t de *student* para 95% de confiança, MS_{erro} a diferença entre os somatórios das variâncias individuais e das variâncias metodológicas.

Além disso, o tempo computacional foi levado em conta, já que o objetivo também foi o de se estabelecer uma relação ótima entre custo computacional e a qualidade dos resultados.

4.1.1 Funções de base tripla-zeta-valência (tripla- ζ)

Quando testados os conjuntos de funções de base tripla- ζ obteve-se os resultados apresentados na Tabela 4.1 para afinidades por próton.

Aplicando-se o teste de comparação de médias lsd para AP tem-se:

$$MS_{total} = 603,92; MS_{trat} = 0,069$$

$$a(n - 1) = 3(10 - 1) = 27$$

Tabela 4.1: Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para as funções de base tripla- ζ

Método	6-311++G(2df,p)	aug-cc-pVTZ	GTLarge
B3LYP	5,11 \pm 4	4,74 \pm 4	5,31 \pm 3
HCTH147	5,15 \pm 4	4,79 \pm 3	4,64 \pm 3
Média	5,13 \pm 4	4,77 \pm 4	4,98 \pm 3
Tempo relativo*	0,38	1,00	0,74

*O tempo relativo é obtido considerando o maior tempo como 100% e o restante uma porcentagem relacionada. Os tempos referentes aos funcionais utilizados são somados para obtenção dos tempos relativos.

$$MS_{erro} = \frac{MS_{total} - MS_{trat}}{a(n-1)} = 22,37$$

$$lsd = t_{0,025;27} \sqrt{\frac{2 * MS_{erro}}{n}} = 2,052 * \sqrt{\frac{2 * 22,37}{10}} = 4,34$$

onde MS_{total} é o somatório de todas as variâncias, MS_{trat} o somatório das variâncias dos tratamentos, a o número de tratamentos e n o número de repetições em cada tratamento, no caso são três funções de base ($a=3$) e dez moléculas ($n=10$). Somando o valor obtido de 4,34 kJ/mol com o menor desvio absoluto entre os tratamentos, tem-se um intervalo (4,77-9,11 kJ/mol) onde os desvios são considerados equivalentes a 95% de confiança. Logo, concluimos que para os resultados de AP as funções de base tripla- ζ são consideradas equivalentes estatisticamente.

Tabela 4.2: Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para as funções de base tripla- ζ

Método	6-311++G(2df,p)	aug-cc-pVTZ	GTLarge
B3LYP	0,41 \pm 0,06	0,40 \pm 0,06	0,42 \pm 0,06
HCTH147	0,41 \pm 0,06	0,34 \pm 0,04	0,42 \pm 0,06
Média	0,41 \pm 0,06	0,37 \pm 0,05	0,42 \pm 0,06
Tempo relativo	0,38	1,00	0,65

Para AE, resultados apresentados na Tabela 4.2, o valor obtido para o teste de lsd foi de 0,07 eV. Tanto para os desvios absolutos de AP quanto AE pode-se concluir que não existem diferenças entre as funções de base tripla- ζ , isso porque nenhum desvio encontra-se fora dos intervalos obtidos. Assim, o tempo computacional entra como critério para escolha da melhor função de base. Observa-se uma vantagem da função 6-311++G(2df,p) com relação as demais funções de base tripla- ζ .

4.1.2 Funções de base dupla-zeta-valência-a (dupla- ζ -a) para o nível alto de teoria

As diferentes funções de base dupla- ζ testadas nesse trabalho foram utilizadas nas regiões de níveis alto e baixo de teoria do método ONIOM, portanto foram definidas as melhores com relação aos desvios

médios absolutos e tempos computacionais para cada nível de teoria. Na Tabela 4.3 tem-se os resultados de AP para as funções de base dupla- ζ -a para o nível alto de teoria.

Tabela 4.3: Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para as funções de base dupla- ζ para o nível alto de teoria do método ONIOM

Método	6-31G(<i>d</i>)	cc-pVDZ
B3LYP	5,11 \pm 4	11,74 \pm 5
HCTH147	5,15 \pm 4	14,23 \pm 5
Média	5,13 \pm 4	12,99 \pm 5
Tempo relativo	0,39	1,00

Na Tabela 4.4 são apresentados os resultados de AE quando comparadas as funções de base dupla- ζ no nível alto de teoria.

Tabela 4.4: Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para as funções de base dupla- ζ para o nível alto de teoria do método ONIOM

Método	6-31G(<i>d</i>)	cc-pVDZ
B3LYP	0,41 \pm 0,06	0,32 \pm 0,06
HCTH147	0,41 \pm 0,06	0,35 \pm 0,07
Média	0,41 \pm 0,06	0,34 \pm 0,07
Tempo relativo	0,55	1,00

Os valores de lsd obtidos para AP e AE, respectivamente, são iguais a 5,58 kJ/mol e 0,08 eV. Sendo assim, conclui-se que a base 6-31G(*d*) possui resultados significativamente melhores para AP, além de um tempo computacional menor.

4.1.3 Funções de base dupla-zeta-valência-b (dupla- ζ -b) para o nível baixo de teoria

Para o nível menor de teoria do método ONIOM as mesmas funções de base dupla- ζ foram testadas. Na Tabela 4.5 são mostrados os desvios médios absolutos obtidos para AP quando em teste as funções dupla- ζ -b.

Tabela 4.5: Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para as funções de base dupla- ζ para o nível baixo de teoria do método ONIOM

Método	6-31G(<i>d</i>)	cc-pVDZ
B3LYP	5,11 \pm 4	6,79 \pm 4
HCTH147	5,15 \pm 4	7,23 \pm 4
Média	5,13 \pm 4	7,01 \pm 4
Tempo relativo	0,31	1,00

A comparação entre as funções de onda dupla- ζ -b quando calculada a propriedade AE é apresentada na Tabela 4.6

Tabela 4.6: Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para as funções de base dupla- ζ para o nível baixo de teoria do método ONIOM

Método	6-31G(<i>d</i>)	cc-pVDZ
B3LYP	0,41 \pm 0,06	0,39 \pm 0,06
HCTH147	0,41 \pm 0,06	0,39 \pm 0,06
Média	0,41 \pm 0,06	0,39 \pm 0,06
Tempo relativo	0,20	1,00

Os valores de lsd obtidos, quando comparadas as funções dupla- ζ utilizadas no nível mais baixo de teoria do método ONIOM, são 5,40 kJ/mol para AP e 0,08 eV para AE e deixam claro que os desvios médios absolutos não podem ser considerados diferentes. Analisando o tempo de processamento observa-se que a função de base 6-31G(*d*) leva uma expressiva vantagem e por isso mostra ser a mais adequada.

4.1.4 Funcionais de Densidade

Na Tabela 4.7 são apresentados os desvios médios absolutos para AP em cada método testado. O valor de lsd calculado a partir desses dados é igual a 4,43 kJ/mol. Já o menor erro encontrado, para o método O3LYP, é de 4,75 kJ/mol. Assim conclui-se que as médias aceitas são aquelas cujos valores estão entre 4,75 - 9,18 kJ/mol.

Tabela 4.7: Resultados de afinidade por próton em kJ/mol para os Funcionais de Densidade, em ordem de qualidade

Método	Desvios	Método	Desvios	Método	Desvios
O3LYP	4,75 \pm 4	M06	6,18 \pm 3	B3PW91	7,81 \pm 4
B1LYP	4,85 \pm 4	mPW3PBE	6,42 \pm 3	HCTH	7,96 \pm 4
B3LYP	5,11 \pm 4	B98	6,50 \pm 3	BHandH	8,28 \pm 3
HCTH147	5,15 \pm 4	mPW1LYP	7,16 \pm 4	B972	8,63 \pm 4
HCTH93	5,40 \pm 3	PBE1PBE	7,34 \pm 3	B3P86	9,32 \pm 3
tHCTH	5,64 \pm 3	B1B95	7,42 \pm 4	BHandHLYP	10,19 \pm 4
VSXC	5,64 \pm 4	mPW1PW91	7,50 \pm 4	MP2	10,28 \pm 4
X3LYP	5,74 \pm 4	tHCTHhyb	7,63 \pm 3	BMK	13,31 \pm 4
M06-2X	5,96 \pm 4	mPW1PBE	7,73 \pm 4	HF	23,31 \pm 4

Os resultados obtidos para a AE quando comparados os funcionais de densidade são mostrados na Tabela 4.8.

Para a comparação dos desvios absolutos pelo método lsd foram utilizados apenas os métodos aceitos na etapa anterior, ou seja, os resultados de AP. O valor de lsd obtido para esses métodos foi de 0,07 eV. Desta forma, são aceitos como sendo equivalentes desvios médios absolutos com valor máximo de 0,44 eV.

Tabela 4.8: Resultados de afinidade eletrônica em eV para os Funcionais de Densidade, em ordem de qualidade

Método	Desvios	Método	Desvios	Método	Desvios
MP2**	0,28 ± 0,07	HCTH93	0,45 ± 0,06	mPW1PW91	0,51 ± 0,06
HCTH*	0,37 ± 0,06	tHCTH	0,47 ± 0,06	B3PW91	0,51 ± 0,06
mPW1LYP*	0,38 ± 0,06	M06	0,48 ± 0,05	B1B95	0,52 ± 0,06
VSXC*	0,39 ± 0,08	mPW3PBE	0,48 ± 0,06	BHandH	0,53 ± 0,06
X3LYP*	0,40 ± 0,06	B98	0,48 ± 0,06	B3P86**	0,53 ± 0,06
B3LYP*	0,41 ± 0,06	M06-2X	0,49 ± 0,06	B972	0,53 ± 0,06
HCTH147*	0,41 ± 0,06	tHCTHhyb	0,50 ± 0,06	BMK**	0,54 ± 0,09
B1LYP*	0,42 ± 0,06	PBE1PBE	0,51 ± 0,06	BHandHLYP**	0,55 ± 0,06
O3LYP*	0,43 ± 0,08	mPW1PBE	0,51 ± 0,06	HF**	0,70 ± 0,06

*Métodos aceitos nas comparações dos desvios absolutos de AP e AE.

**Métodos rejeitados na comparação dos desvios absolutos para AP.

Como pode ser observado, dos 27 métodos testados apenas 8 foram aceitos em ambos os testes de comparação aplicados.

4.1.5 ONIOM I

Os resultados para AP, considerando-se como teste os níveis da variável ONIOM I, são apresentados na Tabela 4.9. Com o valor de lsd 4,29 kJ/mol para AP pode-se concluir que não há diferença entre as variações para o método ONIOM I. O tempo computacional significativamente mais baixo quando utilizadas as variações ONIOM1 e ONIOM2 indicam a versatilidade da utilização do método ONIOM nesse estudo.

Tabela 4.9: Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para os níveis da variável ONIOM I

Método	ONIOM1	ONIOM2	Sem ONIOM
B3LYP	5,69 ± 4	5,11 ± 4	6,66 ± 3
HCTH147	7,15 ± 4	5,15 ± 4	6,76 ± 3
Média	6,42 ± 4	5,13 ± 4	6,71 ± 3
Tempo relativo	0,31	0,57	1,00

O mesmo pode ser observado quando comparados os resultados para AE, Tabela 4.10. Com o valor de lsd igual a 0,08 eV para a AE, conclui-se a respeito da capacidade do método ONIOM em descrever, de maneira equivalente a quando não utilizado os cortes do método ONIOM, as propriedades em questão.

4.1.6 ONIOM II

Ao estudar as diferentes conformações da variável ONIOM II, foi verificado se a presença da dupla ligação no nível alto de teoria do método ONIOM resultaria em desvios absolutos estatisticamente diferentes para EI. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.10: Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV para os níveis da variável ONIOM I

Método	ONIOM1	ONIOM2	Sem ONIOM
B3LYP	0,45 ± 0,06	0,41 ± 0,06	0,49 ± 0,07
HCTH147	0,49 ± 0,06	0,41 ± 0,06	0,47 ± 0,07
Média	0,47 ± 0,06	0,41 ± 0,06	0,48 ± 0,07
Tempo relativo	0,32	0,56	1,00

Com o valor de lsd de 0,18 eV, pode-se concluir que há diferença entre as variações para o método ONIOM II. Logo concluímos que é necessário descrever os átomos envolvidos na dupla ligação com um nível de teoria mais alto, devido a sua posição relativa à propriedade em questão. Sendo assim, nos cálculos para a molécula de colesterol onde serão estudadas as reações ocorridas no carbono vizinho a uma dupla ligação, a mesma será incluída na camada alta do método ONIOM.

Tabela 4.11: Desvios absolutos de energias de ionização em eV para os níveis da variável ONIOM II

Método	ONIOM1	ONIOM2
B3LYP	0,86 ± 0,5	0,09 ± 0,09
HCTH147	0,88 ± 0,5	0,12 ± 0,09
Média	0,87 ± 0,5	0,11 ± 0,09

4.2 Ajuste da Metodologia de Trabalho

Nessa etapa foram consideradas as correções de escalonamento de ZPE e HLC para que possa ser determinado o melhor método composto com todas as correções previstas. Para comprovar que os métodos estudados são viáveis comparou-se os resultados obtidos com os métodos compostos G3(MP2) e G3MP2/B3LYP (G3B3). A energia final obtida com as correções empíricas é dada pela seguinte equação:

$$E_0 = E[QCISD(T)/6 - 31G(d)] + E[DFT/6 - 311 + +G(2df, p)] - E[DFT/6 - 31G(d)] + ZPE * \lambda + HLC \quad (4.2)$$

Sendo que o termo HLC é:

$$HLC = -An_\beta - B(n_\alpha - n_\beta) \quad (4.3)$$

4.2.1 Afinidade por próton

Na Tabela 4.12 são apresentados os resultados de desvios absolutos de afinidades por próton para as 62 moléculas utilizadas no processo de validação da metodologia.

Tabela 4.12: Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para todo o grupo de moléculas utilizadas na validação, resultados com valor de escalonamento de ZPE igual a 1,00

Método	Desvios	Tempo realtivo
B1LYP	6,05 ± 4	0,91
B3LYP	5,96 ± 4	0,80
HCTH	6,12 ± 4	0,99
HCTH147	7,32 ± 4	0,92
mPW1LYP	5,63 ± 3	0,77
O3LYP	6,43 ± 4	0,73
VSXC	8,36 ± 5	1,00
X3LYP	5,74 ± 4	0,81

Mesmo sem a otimização do valor de escalonamento da energia de ponto zero, observa-se que os resultados concordam muito bem com os valores experimentais, uma vez que, em média tem-se uma incerteza de aproximadamente 8 kJ/mol para os dados experimentais utilizados nesse trabalho.

Comparando-se os tempos computacionais necessários para realizar-se os cálculos de afinidades por próton, percebe-se uma pequena vantagem do método proposto com o funcional O3LYP com relação aos demais. Comparando-se com os métodos G3, tem-se uma redução de aproximadamente 10 vezes no tempo computacional. Esse resultado era esperado uma vez que nas teorias G3 não está sendo utilizado o método ONIOM.

Na Tabela 4.13 tem-se os resultados obtidos após otimizados os valores de escalonamento de ZPE. Com a otimização, realizada ponto a ponto, observa-se um redução significativa dos desvios com relação aos dados experimentais.

Ao realizar-se o processo de otimização do valor de escalonamento de ZPE observa-se uma redução média de 1,12 kJ/mol nos desvios médios absolutos, o que sugere que o método de otimização é válido para os devidos fins.

Para comparação das médias obtidas com os valores ótimos de escalonamento de ZPE usou-se novamente o método lsd. Com valor obtido de 2,11 kJ/mol são aceitas médias entre 5,08 - 7,19 kJ/mol, ou seja, podemos concluir que os desvios médios absolutos obtidos com os métodos G3 não são equivalentes aos métodos propostos.

4.2.2 Afinidade eletrônica

Os cálculos de afinidades eletrônicas, realizados para o grupo de moléculas que valida a metodologia, têm seus resultados apresentados na Tabela 4.14. Nessa Tabela estão sendo apresentados os valores sem

Tabela 4.13: Desvios absolutos de afinidades por próton em kJ/mol para todo o grupo de moléculas utilizadas na validação, resultados com os valores ótimos de escalonamento de ZPE

Método	Escalonamento	Desvios
B1LYP	1,06	5,39 ± 3
B3LYP	1,06	5,38 ± 3
HCTH	1,07	5,08 ± 3
HCTH147	1,14	5,22 ± 3
mPW1LYP	0,99	5,52 ± 3
O3LYP	1,11	5,11 ± 3
VSXC	1,17	5,20 ± 3
X3LYP	1,03	5,41 ± 3
G3MP2	0,8929*	8,29 ± 4
G3B3	0,9600*	8,53 ± 4

*Valores propostos pelos autores.^{45,46}

a correção de alto nível, mas está sendo considerada nessa etapa a correção de escalonamento de ZPE.

Tabela 4.14: Desvios absolutos para as afinidades eletrônica em eV para todas as moléculas utilizadas no processo de validação, resultados sem os valores ótimos de correção de HLC

Método	Desvios	Tempo relativo
B1LYP	0,419 ± 0,07	0,81
B3LYP	0,416 ± 0,07	0,70
HCTH	0,417 ± 0,07	0,80
HCTH147	0,441 ± 0,07	0,88
mPW1LYP	0,399 ± 0,07	0,79
O3LYP	0,441 ± 0,07	0,93
VSXC	0,444 ± 0,07	1,00
X3LYP	0,405 ± 0,07	0,94

Sem a correção de HLC observa-se que os desvios com relação aos dados experimentais são relativamente grandes, sendo que as incertezas experimentais são de 0,1 eV em média. Na Tabela 4.15 são apresentados os valores ótimos para as constantes A e B da correção de HLC e os respectivos desvios absolutos após a otimização desses valores.

Com o valor de lsd calculado sendo igual a 0,044 eV temos um intervalo entre 0,066-0,110 eV onde as médias são consideradas iguais, logo, podemos considerar que apenas os funcionais B3LYP, HCTH e O3LYP têm desvios médios absolutos equivalentes aos desvios obtidos com os métodos G3.

Novamente os tempos relativos aos métodos G3 foram expressivamente superiores se comparados aos métodos propostos. Quanto aos funcionais de densidade testados em geral tem-se uma vantagem do funcional B3LYP no tempo de processamento dos cálculos.

Observa-se uma redução média de 0,31 eV ao adicionar-se a correção de alto nível, o que a torna um importante termo na energia final para os métodos compostos propostos.

Tabela 4.15: Desvios absolutos de afinidades eletrônicas em eV com os valores ótimos de correção de HLC(mhartree), para as 62 moléculas utilizadas na validação

Método	A	B	Desvios
B1LYP	8,78	4,33	0,112 ± 0,07
B3LYP	8,70	4,28	0,107 ± 0,07
HCTH	8,72	4,26	0,110 ± 0,07
HCTH147	9,31	4,58	0,119 ± 0,07
mPW1LYP	8,47	4,17	0,112 ± 0,07
O3LYP	9,47	4,66	0,106 ± 0,07
VSXC	8,84	4,35	0,122 ± 0,07
X3LYP	8,33	4,31	0,112 ± 0,07
G3MP2	9,279*	4,471*	0,081 ± 0,08
G3B3	10,041*	4,995*	0,066 ± 0,07

*Valores propostos pelos autores.^{45,46}

4.3 Mecanismos Reacionais

Conforme os resultados obtidos nas etapas anteriores a metodologia de cálculos utilizada para o estudo dos mecanismos reacionais é a seguinte:

- 1 Otimização das estruturas de reagentes, produtos e estados de transição no nível ONIOM(B3LYP/6-31G(d):HF/6-31G(d));
- 2 Cálculo de frequência no mesmo nível de teoria sendo que o termo de energia de ponto zero é escalonado pelo fator 1,06;
- 3 Cálculo *single point* no nível ONIOM(QCISD(T)/6-31G(d):HF/6-31G(d)), deste cálculo é proveniente a energia que serve como base para o método composto;
- 4 Cálculo *single point* no nível ONIOM(B3LYP/6-311++G(2df,p):HF/6-31G(d)).

À partir desses cálculos obtém-se a energia combinada com as devidas correções conforme apresentado na Eq. (4.4)

$$E_0 = E(3) + E(4) - E(1) + ZPE * 1,06 + [-8,70.10^{-3} * n_{\beta} - 4,28.10^{-3} * (n_{\alpha} - n_{\beta})] \quad (4.4)$$

De acordo com os resultados para a variável ONIOM I, concluiu-se que apenas os carbonos que participam diretamente das reações necessitam ser descritos com nível alto de teoria. Porém, o estudo

da variável ONIOM II comprovou a necessidade da utilização da insaturação vizinha ao carbono 7 no nível alto de teoria, uma vez que espécies ressonantes podem ajudar na estabilização dos radicais formados. Dessa forma, na Fig. (4.1) é ilustrado o corte realizado na molécula de colesterol para que fossem realizados os cálculos dos mecanismos reacionais de autooxidação no carbono 7.

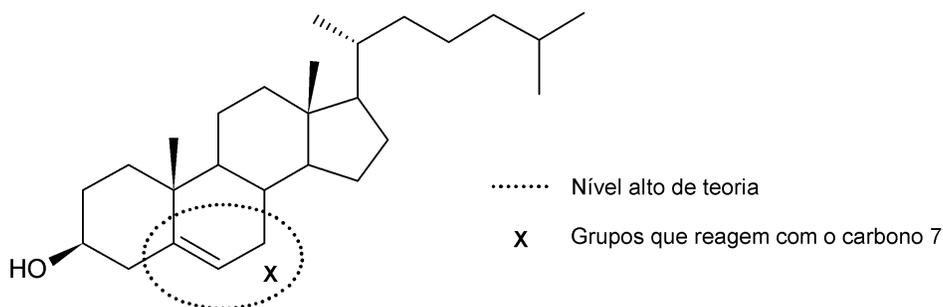


Figura 4.1: Definição das regiões de níveis alto e baixo de teoria a serem aplicados nos mecanismos reacionais de autooxidação.

De maneira análoga, é ilustrado na Fig. (4.2) como realizou-se a divisão dos níveis de teoria para o estudo dos mecanismos reacionais de oxidação da molécula de colesterol via quebra da insaturação.

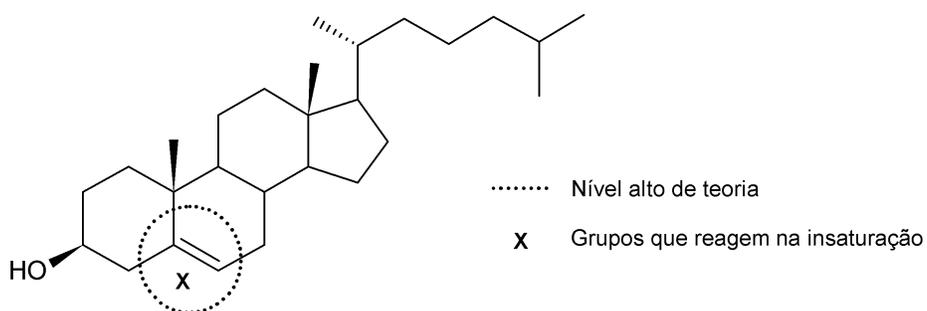


Figura 4.2: Definição das regiões de níveis alto e baixo de teoria a serem aplicados nos mecanismos reacionais de oxidação via quebra da insaturação.

4.3.1 Autoxidação Radicalar

Com a obtenção dos estados de transição para as reações radicalares estudadas, foi possível verificar as barreiras de energia e comparar as reações ocorridas nas posições α e β . A seguir são apresentados os resultados para cada uma das etapas reacionais estudadas.

Etapa 1

A primeira etapa compreende a abstração de um hidrogênio da molécula de colesterol para formação de um radical no carbono 7 do colesterol. De maneira geral, tem-se o mecanismo apresentado na Fig. (4.3).

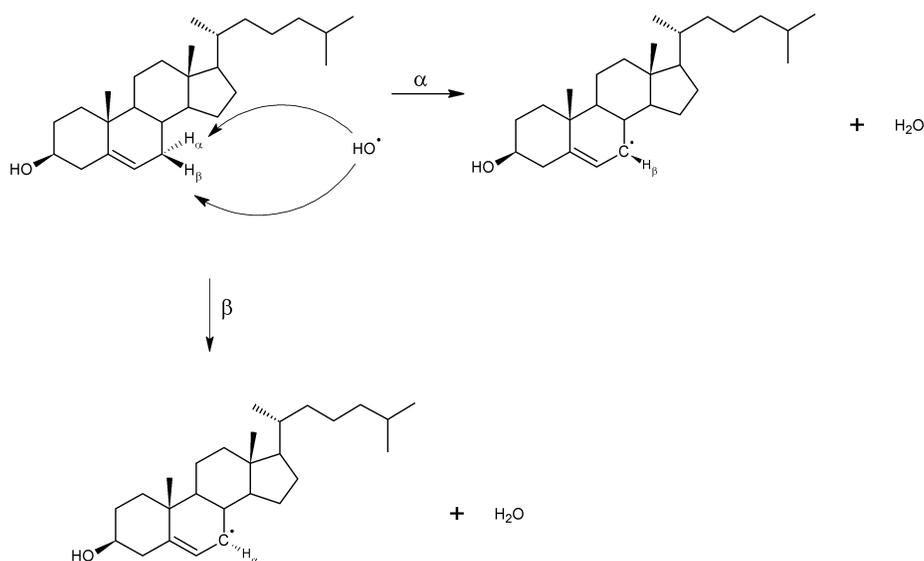


Figura 4.3: Mecanismo para a Etapa 1, ataque do radical hidroxila a molécula de colesterol.

A formação do radical colesterol é determinante para que o processo de oxidação se desencadeie. Nessa etapa tem-se a opção de ocorrer a abstração do hidrogênio α ou β , sendo apresentado na Fig. (4.4) as barreiras energéticas para cada uma das reações.

Como dito anteriormente, a posição equatorial (β), é mais favorecida devido ao menor impedimento estérico. Isso pode ser observado, de acordo com a Fig. (4.4), pelas energias relativas para as espécies envolvidas na reação. Observando o estado de transição para a posição α , Fig. (4.5), pode-se verificar que a aproximação do radical hidroxila ocorre pela parte inferior do anel, local onde existem grupos metila que impedem de certa forma a reação. Já na posição β , Fig. (4.6), a aproximação do radical é frontal e como pode ser observado não há impedimento nessa região.

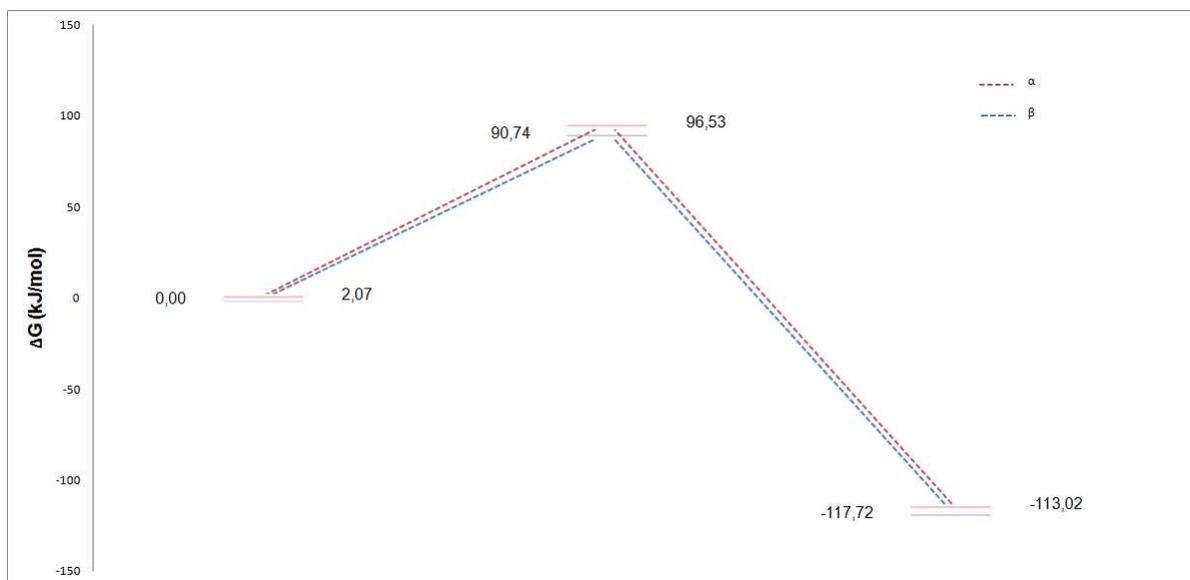


Figura 4.4: Coordenada reacional para Etapa 1 onde ocorre abstração de um átomo de hidrogênio da molécula de colesterol.

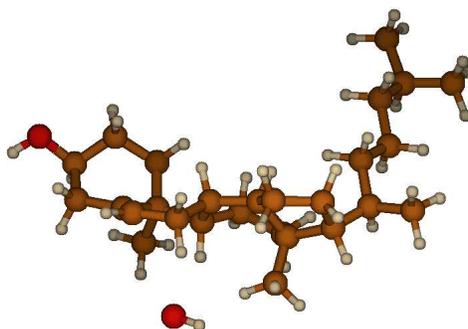


Figura 4.5: Estado de transição para a abstração do hidrogênio α do carbono 7 da molécula de colesterol.

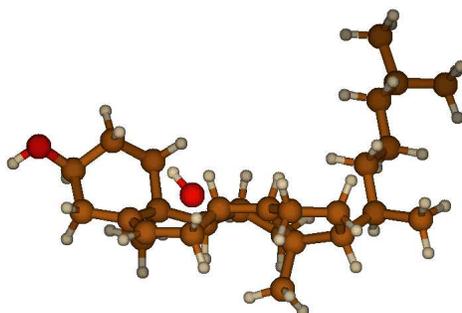


Figura 4.6: Estado de transição para a abstração do hidrogênio β do carbono 7 da molécula de colesterol.

Observa-se que a reação é espontânea à partir da análise das energias livres de Gibbs, ΔG aproximadamente igual a -115 kJ/mol para as duas reações. Isso pode ser explicado pela estabilidade do radical de colesterol ocorrida através do processo de ressonância. O modelo apresentado na Fig. (4.7) mostra as espécies híbridas de ressonância que auxiliam na estabilização do radical colesterol.

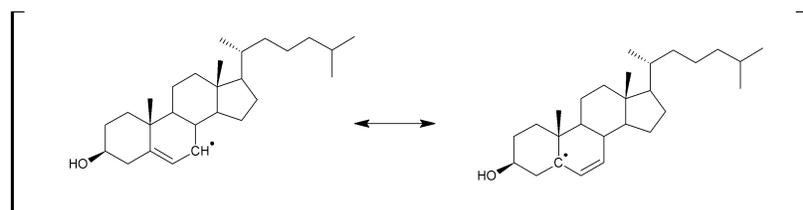


Figura 4.7: Híbridos de ressonância que auxiliam no processo de estabilização do radical de colesterol formado na Etapa 1 de autoxidação.

As frequências imaginárias, características dos estados de transição, foram utilizadas para dar certeza de que a estrutura obtida representava de maneira correta o estado de transição para a reação em questão. Os valores de $1234,36i$ e $1104,47i$ foram obtidos para os estados de transição α e β , respectivamente.

Etapa 2

Na segunda etapa, temos o processo que envolve a formação do radical peróxido. O mecanismo apresentado na Fig. (4.8) ilustra o que ocorre nessa etapa.

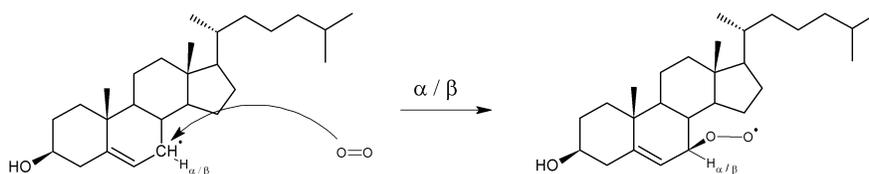


Figura 4.8: Mecanismo para a Etapa 2, adição de uma molécula de oxigênio ao radical do colesterol.

É importante salientar que apenas o oxigênio no seu estado fundamental tripleto reage nesse processo. O oxigênio singlete desencadeia outros processos reacionais com a molécula de colesterol, principalmente envolvendo a hidroxila do mesmo.

Ocorrendo o ataque por parte da molécula de oxigênio, há uma transferência do radical para o átomo de oxigênio mais externo, essa estrutura não possui híbridos de ressonância uma vez que o radical está mais distante da insaturação.

De maneira similar a primeira etapa podemos ter o processo ocorrendo pela posição α ou β . Na Fig. (4.9) são apresentadas as barreiras energéticas para as reações ocorrendo em cada uma das posições.

Observa-se aqui uma larga vantagem da posição equatorial sobre a axial. O aumento da diferença energética entre as reações α e β pode ser explicado devido a nessa etapa ocorrer a entrada de um grupo que sofre maior repulsão na posição mais impedida, uma vez que na etapa 1 havia apenas a aproximação do radical hidroxila.

Os valores negativos para os ΔG sugerem novamente que o processo é favorável termodinamicamente. As frequências imaginárias 1708,03i e 1437,77i para os estados de transição α e β , respectivamente, caracterizam os mesmos.

Da mesma forma que ocorre para a primeira etapa das reações de autoxidação, a aproximação pela parte inferior, quando ocorrida a reação na posição α , torna a reação mais impedida e menos favorável energeticamente com relação a posição β , onde a aproximação da molécula de oxigênio é frontal. Isso pode ser observado nos estados de transição para as reações α e β mostrados nas Figuras 4.10 e 4.11, respectivamente.

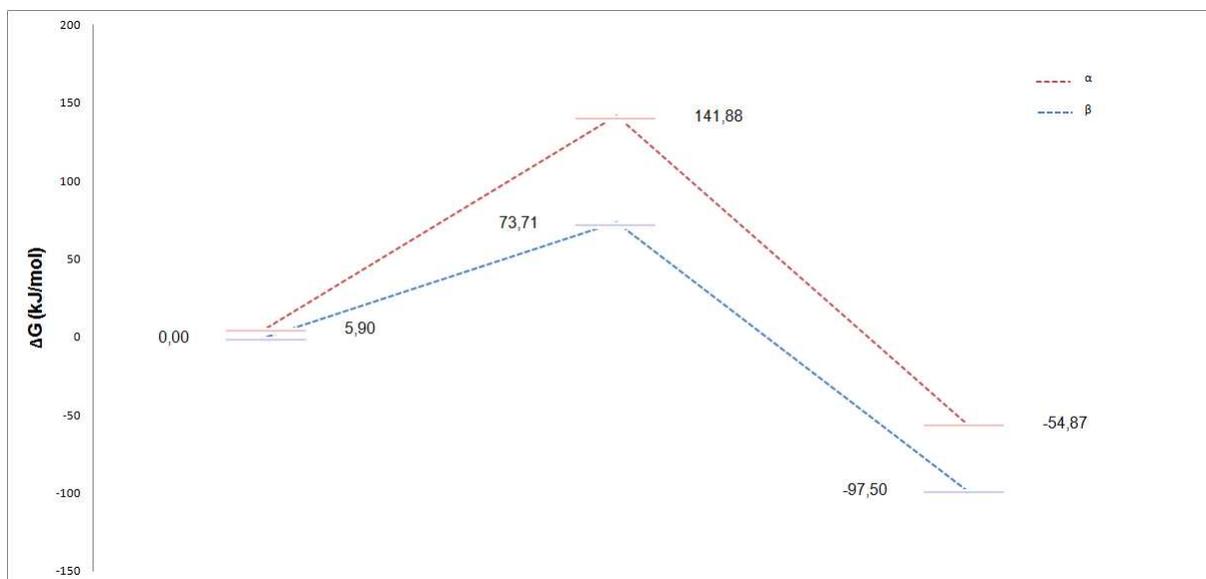


Figura 4.9: Coordenada reacional para Etapa 2, variações de energias livres de Gibbs para as espécies envolvidas nas reações.

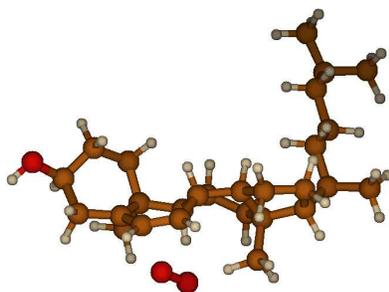


Figura 4.10: Estado de transição para a formação do radical peróxido na posição α do carbono 7 do radical da molécula de colesterol.

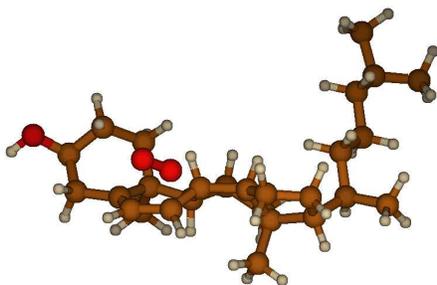


Figura 4.11: Estado de transição para a formação do radical peróxido na posição β do carbono 7 do radical da molécula de colesterol.

Etapa 3

Nessa etapa não foram obtidos os estados de transição já que ocorre apenas a ligação de um átomo de hidrogênio ao radical peróxido.

Essa reação forma os primeiros oxisteróis do processo de autoxidação. À partir deste ponto os derivados do colesterol perdem caráter radicalar, havendo sempre a formação de algum produto de oxidação da molécula de colesterol.

Pode ser observado na Fig. (4.12) a coordenada de reação para a etapa em questão.

As variações de energias reacionais, -22,36 kJ/mol e -22,03 kJ/mol, para α e β , respectivamente, demonstram a estabilização ocorrida na formação dos hidroperóxidos. Observa-se também a expressiva vantagem sendo mantida pelo procedimento que ocorre na posição β em relação a α .

Os hidroperóxidos formados podem eventualmente sofrer o processo de conversão para o isômero complementar α ou β , Fig. (4.13).

O perfil reacional para esse processo de conversão interna é apresentado na Fig. (4.14).

Conforme observado nas etapas e também evidenciado experimentalmente, percebe-se claramente a maior estabilidade do produto formado na posição equatorial em relação a axial.

Não existem evidências experimentais que mostrem a ocorrência das reações de conversão isomérica.⁷ Isso pode ser explicado devido ao fato da barreira de transição ser relativamente grande. O valor de 146,43 kJ/mol, necessários para que β atinja o estado de transição, é de uma ordem de grandeza muito elevada para rearranjos internos, ou seja, mudanças de geometria que dependem apenas da molécula em questão.⁷⁵

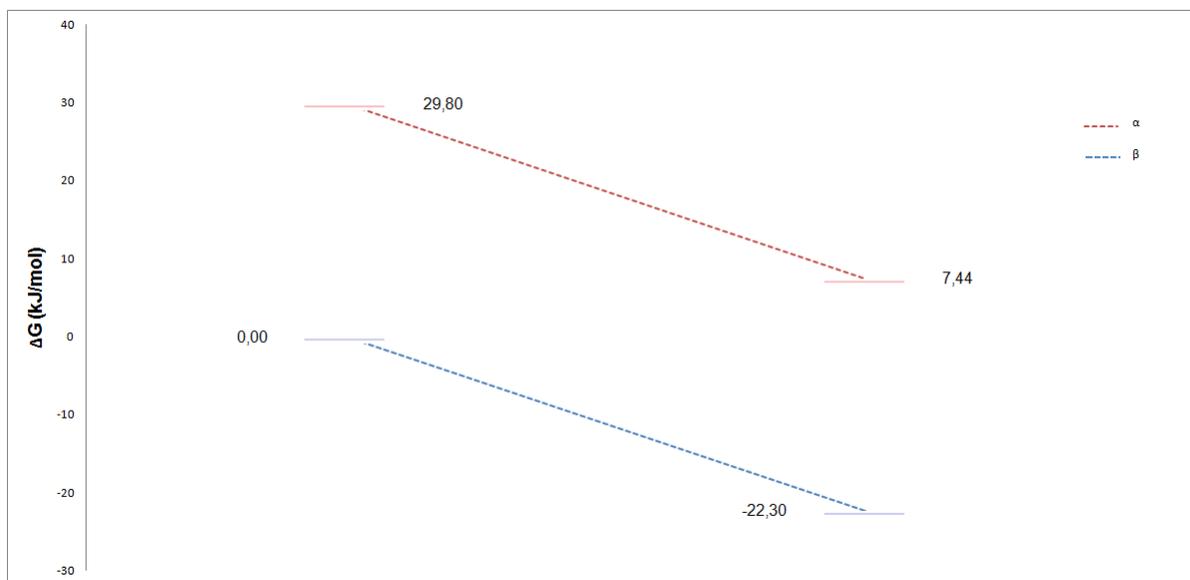


Figura 4.12: Coordenada reacional para etapa 3, formação dos hidroperóxidos, primeiros produtos de oxidação da molécula de colesterol.

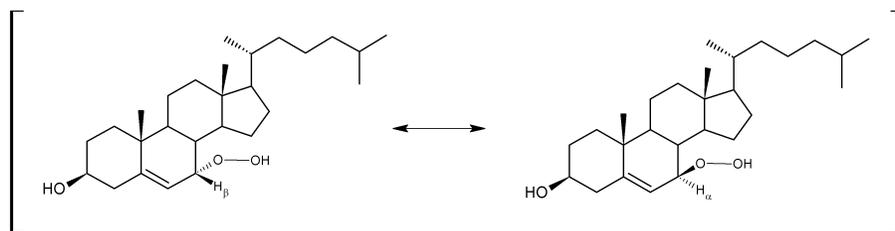


Figura 4.13: Equilíbrio entre as formas isoméricas α e β dos hidroperóxidos do colesterol.

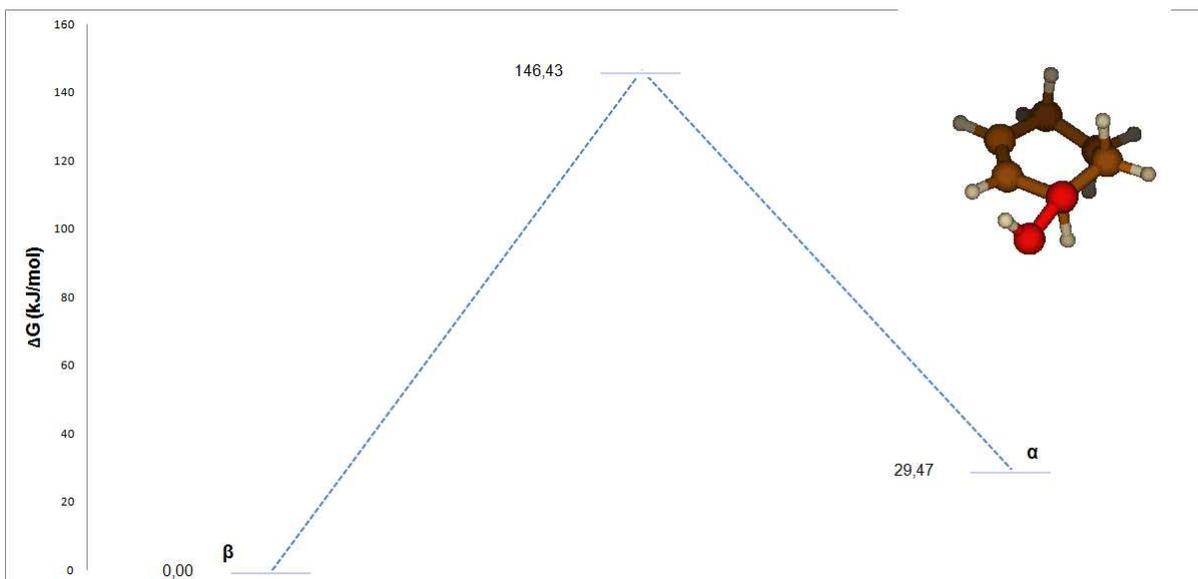


Figura 4.14: Coordenada reacional para a conversão isomérica dos produtos α e β obtidos na Etapa 3. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.

Etapa 4

Os hidroperóxidos são instáveis e decompõem-se a álcoois conforme o mecanismo apresentado na Fig. (4.15).

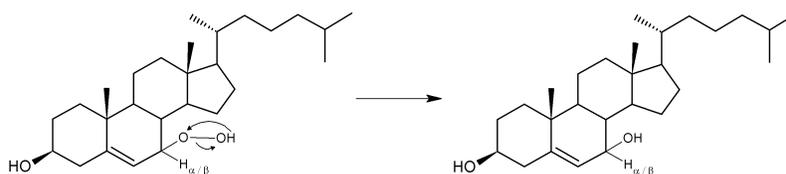


Figura 4.15: Mecanismo proposto para a Etapa 4, formação dos hidroxicolesteróis.

A instabilidade dos hidroperóxidos é explicada pela ligação fraca O-O. Os produtos formados pela quebra dessa ligação são muito estáveis, favorecendo ainda mais a decomposição dos hidroperóxidos.

O perfil reacional segue a mesma tendência dos perfis já apresentandos, ou seja, preferência pela posição menos impedida, equatorial. Na Fig. (4.16) podem ser observadas as barreiras de energia para as espécies envolvidas na etapa em questão.

As moléculas produzidas nessa etapa são muito estáveis. Em análises quantitativas de oxidação

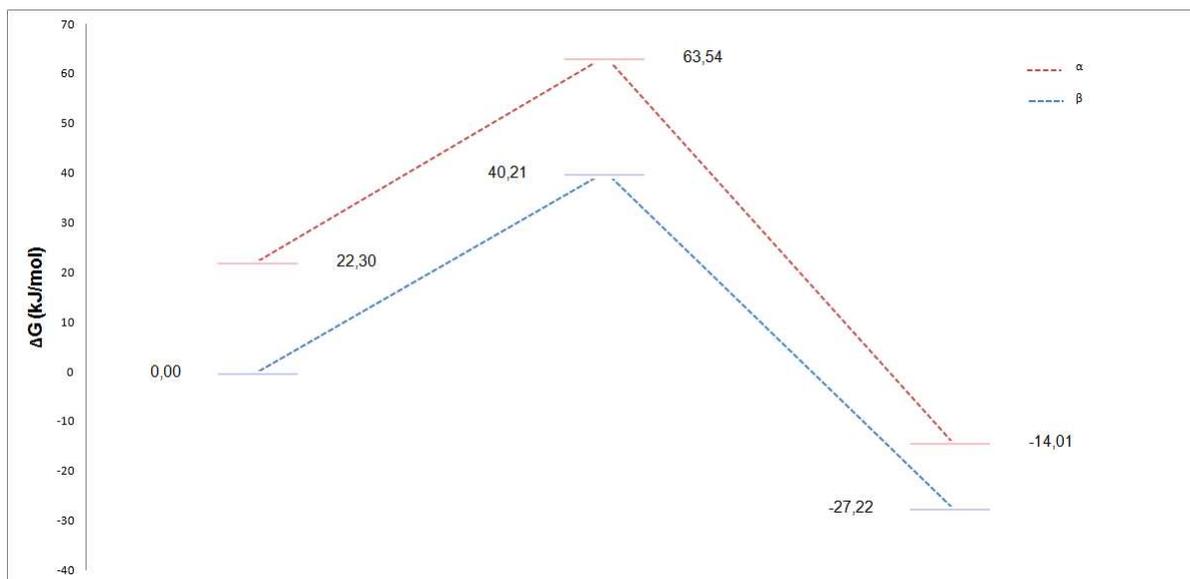


Figura 4.16: Coordenada reacional para Etapa 4, formação dos hidróxicolesteróis.

do colesterol o produto 7- β -hidroxicolesterol é utilizado como base para medir o grau de oxidação de colesterol, isso porque, ele é o oxisterol mais abundante originado do processo de autooxidação.

As frequências de valor 478,87i e 433,80i servem para caracterizar os estados de transição obtidos na formação dos hidroxicolesteróis.

As geometrias moleculares obtidas para os estados de transição da Etapa 4 de autooxidação são apresentadas nas Figuras 4.17 e 4.18 para as reações acontecendo nas posições α e β , respectivamente.

Os oxisteróis formados nessa etapa, podem sofrer conversão isomérica da mesma maneira que os produtos da Etapa 3, Fig. (4.19).

As energias relativas envolvidas nesse processo de conversão podem ser observadas na coordenada para a reação mostrada na Fig. (4.20)

A mesma característica da Etapa 3 é observada para esse processo de conversão. O valor de ΔG igual a 151,36 kJ/mol no sentido de β para α , desfavorece o acontecimento da conversão em qualquer um dos sentidos.

Para todas as etapas reacionais apresentadas pode ser comprovada a preferência pela reação e formação dos produtos de autooxidação β . Dessa forma, podemos concluir que o estudo está de acordo com as evidências experimentais e a metodologia de cálculos descreve satisfatoriamente as reações.

O perfil reacional para todas as etapas de autooxidação é apresentado na Fig. 4.21, nele é possível observar com mais clareza a larga vantagem da posição β com relação a α .

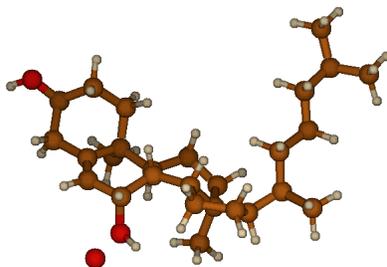


Figura 4.17: Estado de transição para a formação do 7- α -hidroxicolesterol.

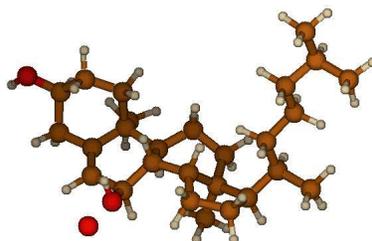


Figura 4.18: Estado de transição para a formação do 7- β -hidroxicolesterol.

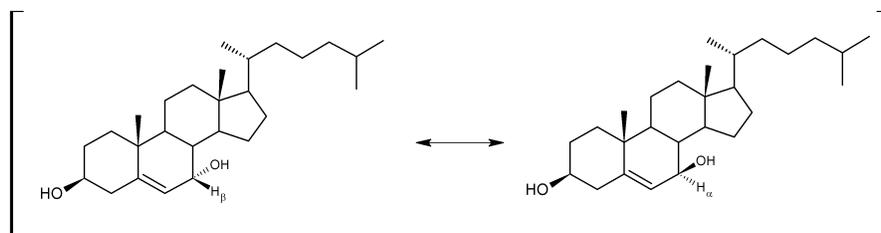


Figura 4.19: Equilíbrio entre as formas isoméricas α e β dos hidróxidos da molécula de colesterol.

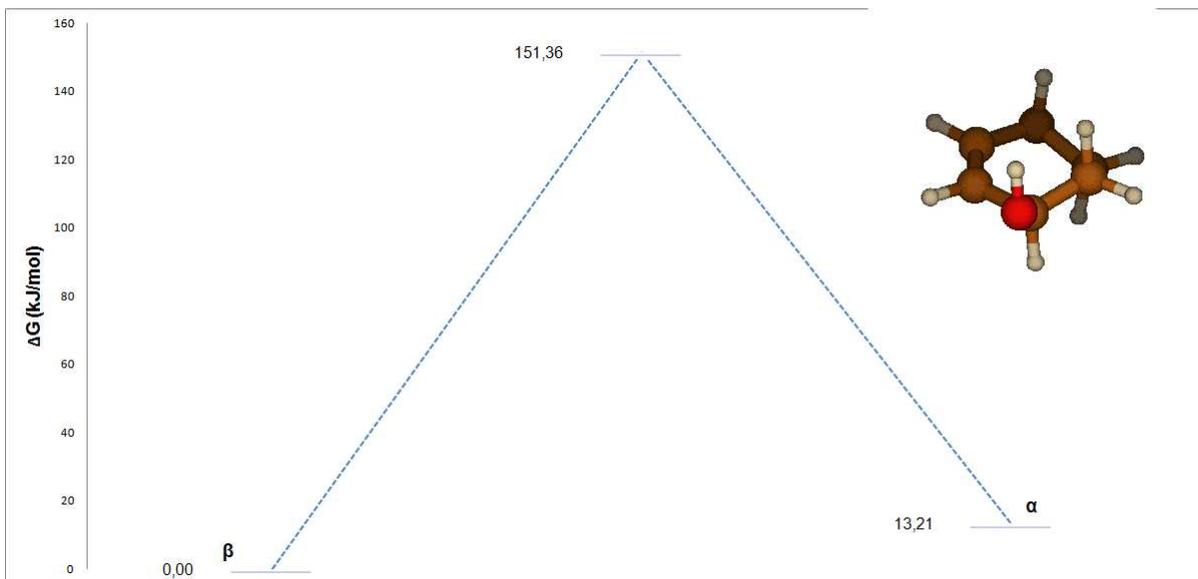


Figura 4.20: Coordenada reacional para a conversão entre os isômeros obtidos como produtos da Etapa 4 de autoxidação. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.

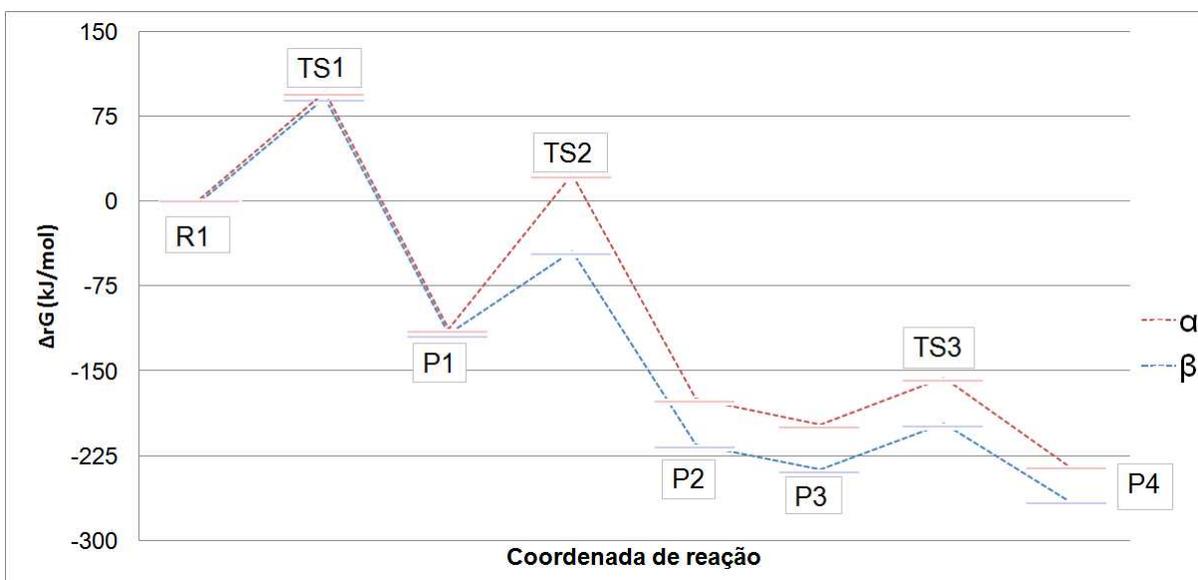


Figura 4.21: Perfil reacional para o grupo de reações de autoxidação da molécula de colesterol.

4.3.2 Oxidação via quebra da insaturação

O processo de formação de oxisteróis via quebra da insaturação entre os carbonos 5 e 6 envolve duas etapas: primeiro a epoxidação e segundo a hidratação.

Etapa 1

De maneira geral as reações de adição a alcenos são sempre favoráveis e seguem um mecanismo tal como apresentado na Fig. (4.22).

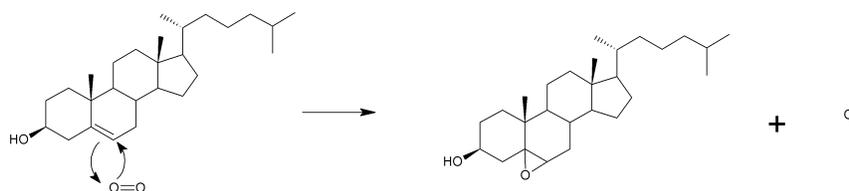


Figura 4.22: Mecanismo de epoxidação da molécula de colesterol.

A quebra da insaturação, seguida pela adição de novos grupos, tende a estabilizar as moléculas e as reações ocorrem de maneira rápida. Esse tipo de perfil reacional pode ser observado para a epoxidação da molécula de colesterol e ele é apresentado na Fig. (4.23).

A velocidade de reação é controlada pela barreira energética necessária para se alcançar o estado de transição e como pode ser observado, essa barreira é relativamente pequena para o caso de adição a insaturação da molécula de colesterol.

O valor negativo para a variação da energia livre de Gibbs comprova a espontaneidade esperada para as reações de adição a insaturações. A frequência imaginária de valor 895,32i, para o estado de transição, mais uma vez serve para caracterizar o estado de transição obtido.

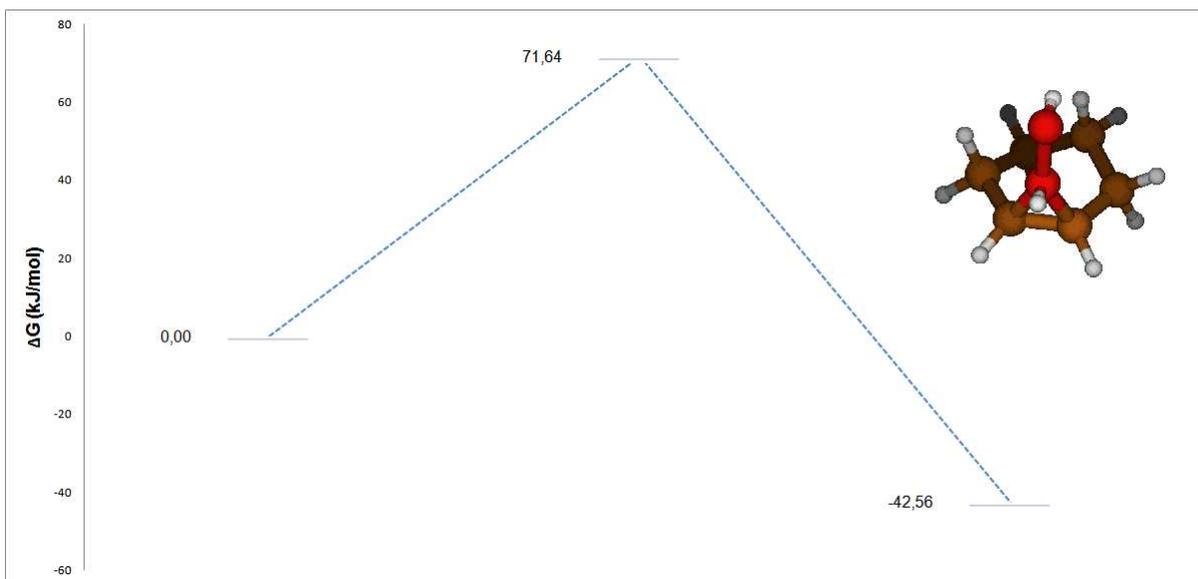


Figura 4.23: Coordenada de reação para a epoxidação do colesterol. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.

Etapa 2

Essa etapa consiste da hidratação do epóxido formado na Etapa 1. Os epóxidos são moléculas muito reativas devido ao ângulo de ligação formado, logo, reagem rapidamente sofrendo adição de água para a formação de um triol conforme mecanismo geral apresentado na Fig. (4.24)

Optou-se pelo estudo da reação ocorrida numa única etapa, ou seja, adição da molécula de água e transferência de um átomo de hidrogênio de uma só vez. O perfil energético para esta reação é apresentado na Fig. (4.25) e como pode ser observado, essa é uma reação muito favorável no sentido da quebra do anel e formação do triol da molécula de colesterol.

O valores para as variações de energia livre de Gibbs comprovam a espontaneidade da reação.

O produto obtido preferencialmente nessa reação é proveniente do ataque da molécula de água que vem a formar a molécula trans, ou seja, os grupos hidroxila estão o mais afastado possível evitando uma maior repulsão entre eles.

O perfil reacional como um todo para o segundo grupo de reações de oxidação da molécula de colesterol estudado é apresentado na Fig. 4.26.

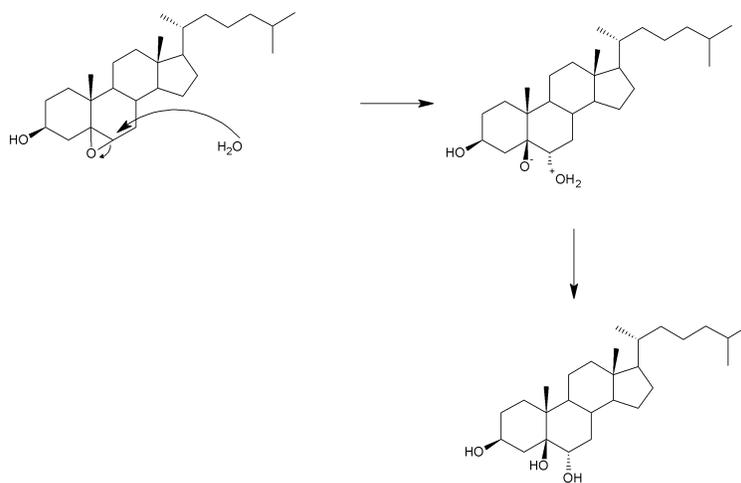


Figura 4.24: Mecanismo de hidratação do epóxido da molécula de colesterol.

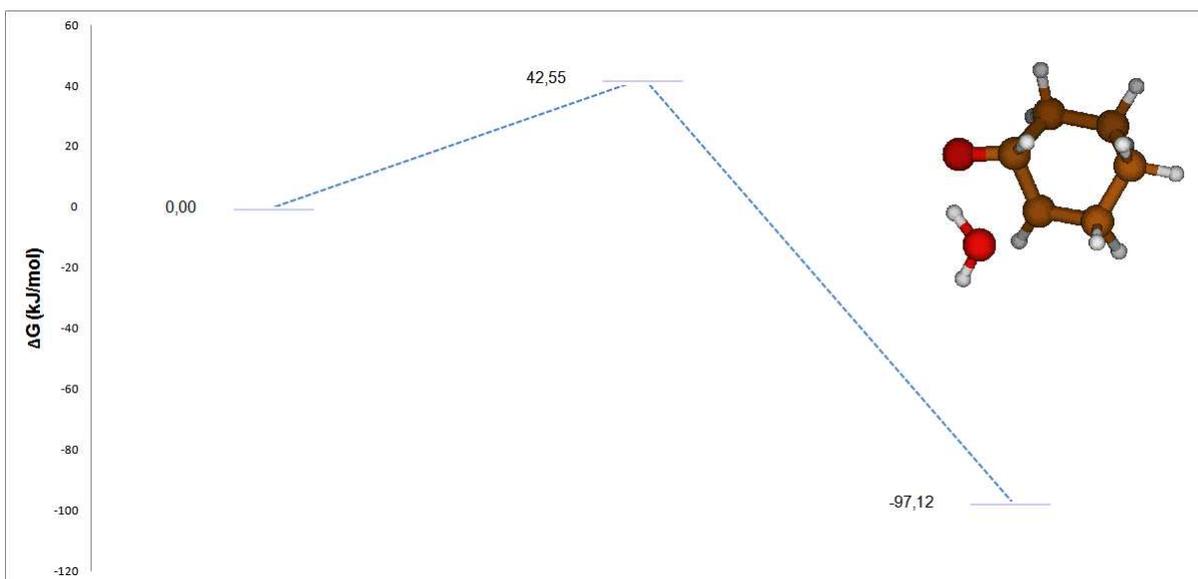


Figura 4.25: Coordenada de reação para a hidratação do epóxido de colesterol. Na parte superior direita é apresentado o estado de transição simplificado para a reação.

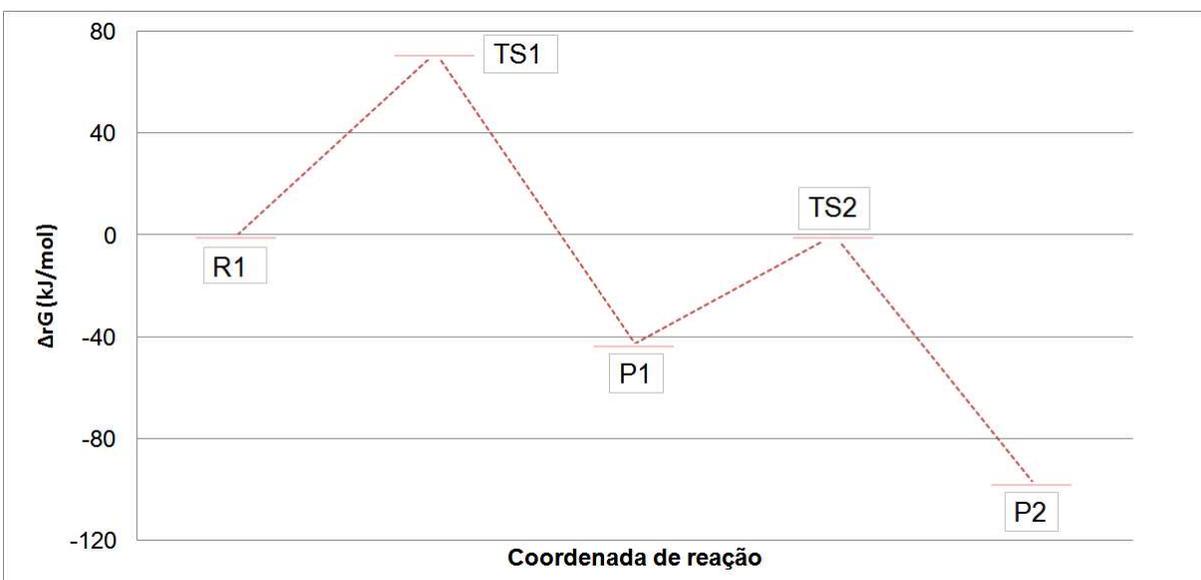


Figura 4.26: Perfil reacional para formação do triol da molécula de colesterol.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

Os resultados das avaliações das diferentes funções de base deixam claro que as funções de base de Pople, 6-31G(*d*) e 6-311++G(2*df*,*p*), mostraram-se mais adequadas, principalmente pelo tempo computacional sem prejuízo ao valor da propriedade calculada. Pode-se concluir que os cálculos com ONIOM conseguem descrever tão satisfatoriamente as propriedades em questão quanto os cálculos sem ONIOM, com uma redução de tempo computacional muito significativa. Quando estudados os sistemas insaturados conclui-se que a presença dos átomos envolvidos na insaturação na camada alta é importante. Com relação aos tipos de funcionais de troca-correlação testados foi possível observar vantagem de alguns funcionais em relação a outros, mas principalmente uma enorme vantagem do método DFT quando comparado aos métodos HF e MP2 (no caso da AP).

Ao inserir-se as correções empíricas previstas obtém-se uma melhora significativa nos resultados. Para AP pode-se concluir que os desvios obtidos com os métodos propostos são significativamente melhores que os obtidos com as teorias G3. Já nos cálculos de AE reduz-se o número de funcionais aceitos para apenas 3, B3LYP, HCTH e O3LYP, uma vez que os resultados das teorias G3 se mostraram melhores que os funcionais restantes.

Conclui-se que a conformação ONIOM2(QCISD(T)/6-311++G(2*df*,*p*):HF/6-31G(*d*)//B3LYP/6-31G(*d*):HF/6-31G(*d*)) resulta em desvios médios absolutos menores para AP e AE, 5,38 kJ/mol e 0,107 eV, respectivamente, e vantagem em tempo computacional sendo mais adequado para descrever as reações de oxidação da molécula de colesterol.

Quanto às reações de autooxidação pode-se concluir, em concordância com os dados experimentais, que a formação dos produtos de oxidação β é mais favorável devido às menores barreiras energéticas,

provenientes do menor impedimento estérico da posição equatorial. As reações de equilíbrio entre os isômeros α e β indicam claramente a dificuldade de haver uma transformação interna. Logo, pode-se concluir que a etapa crucial que define se o oxisterol será α ou β é a Etapa 1.

A oxidação proveniente da quebra da insaturação entre os carbonos 5 e 6 da molécula de colesterol é bastante favorável. O triol obtido como produto final possui geometria trans como mais estável.

De maneira geral, podemos concluir que o método composto devidamente validado foi aplicado com sucesso no estudo dos mecanismos reacionais. A um custo computacional relativamente baixo para os sistemas em questão pode-se obter resultados de qualidade.

Os produtos obtidos das reações estudadas podem sofrer outros processos oxidativos, e os mesmos poderiam ser estudados para que todo o ciclo de oxidação da molécula de colesterol pudesse ser caracterizado.

Quanto as metodologias empregadas, outros termos poderiam ser utilizados para correção da energia do estado fundamental. O termo que insere a correção para o limite da função de base poderia ser aplicado sem grande esforço computacional com o método ONIOM.

Apêndice A

Conjunto de Moléculas Utilizadas no Processo de Validação

Primeiramente, foram utilizados 10 monoálcoois nas etapas em que foram escolhidos os melhores níveis de cada variável. As moléculas utilizadas são apresentadas na Tabela A.1.

Foram utilizados também 7 monoálcoois insaturados afim de determinar se a presença da insaturação na camada alta do método ONIOM é importante ou não. As moléculas são apresentadas na Tabela A.2.

Na etapa final de validação, onde foram otimizados os valores de escalonamento de ZPE e da correção de HLC, foram utilizadas as moléculas da primeira etapa acima e mais 45 moléculas, apresentadas nas Tabelas A.3 e A.4.

Somando tem-se um total de 62 moléculas utilizadas nos processos de validação.

Tabela A.1: Afinidades por próton (kJ/mol) e elétron (eV) experimentais para o conjunto de álcoois utilizados na escolha dos melhores níveis para cada variável

Álcool	afinidade por próton	afinidade por elétron
etanol	$1582 \pm 8,4$	$1,75 \pm 0,10$
1,1-dimetil-etanol	$1566 \pm 8,4$	$1,91 \pm 0,10$
1-pentanol	$1568 \pm 8,4$	$1,89 \pm 0,13$
3-pentanol	$1560 \pm 8,4$	$1,95 \pm 0,15$
3-metil-2-butanol	$1559 \pm 8,4$	$1,93 \pm 0,15$
2-etil-1-butanol	$1561 \pm 8,4$	$1,93 \pm 0,12$
2-hexanol	$1560 \pm 8,4$	$1,94 \pm 0,12$
2-metil-2-pentanol	$1558 \pm 8,4$	$1,97 \pm 0,15$
2-heptanol	$1558 \pm 8,4$	$1,96 \pm 0,12$
1-nonanol	1561 ± 13	$1,93 \pm 0,16$

Tabela A.2: Energias de ionização (eV) experimentais para o conjunto de álcoois insaturados utilizados no método ONIOM

Álcool	energia de ionização
2,1-butenol	$9,13 \pm 0,04$
2-metil-2,1-propenol	$9,28 \pm 0,05$
1,2-butenol	$8,6 \pm 0,10$
2-metil-1,1-propenol	$8,27 \pm 0,05$
1,3-pentenol	$9,40 \pm 0,05$
1,2-dimetil-1,1-propenol	$8,15 \pm 0,20$
1-ciclopentenol	$9,60 \pm 0,05$

Tabela A.3: Afinidades por próton (kJ/mol) e elétron (eV) experimentais para o conjunto de moléculas utilizados no processo de validação dos métodos compostos

Álcool	afinidade por próton	afinidade por elétron
1-propanol	1574 ± 8,4	1,85 ± 0,10
2-propanol	1572 ± 8,4	1,88 ± 0,10
1-butanol	1570 ± 8,4	1,96 ± 0,10
2-butanol	1565 ± 8,4	1,95 ± 0,10
2-metil-1-propanol	1567 ± 8,4	1,87 ± 0,11
2-pentanol	1562 ± 8,4	1,92 ± 0,12
2-metil-1-butanol	1564 ± 8,4	1,90 ± 0,12
3-metil-1-butanol	1566 ± 8,4	1,91 ± 0,15
2-metil-2-butanol	1561 ± 8,4	1,93 ± 0,15
2,2-dimetil-1-propanol	1559 ± 8,4	1,95 ± 0,13
1-hexanol	1565 ± 8,4	1,89 ± 0,13
3-hexanol	1556 ± 8,4	1,98 ± 0,12
2-metil-1-petanol	1561 ± 8,4	1,93 ± 0,12
3-metil-1-petanol	1563 ± 8,4	1,91 ± 0,12
4-metil-1-petanol	1564 ± 8,4	1,93 ± 0,14
3-metil-2-petanol	1557 ± 8,4	1,97 ± 0,12
4-metil-2-petanol	1557 ± 8,4	1,97 ± 0,12
2-metil-3-petanol	1555 ± 8,4	2,00 ± 0,15
3-metil-3-petanol	1556 ± 8,4	1,98 ± 0,15
2,3-dimetil-1-butanol	1560 ± 8,4	1,94 ± 0,12
3,3-dimetil-1-butanol	1561 ± 8,4	1,99 ± 0,13
2,3-dimetil-2-butanol	1556 ± 8,4	1,98 ± 0,12
3,3-dimetil-2-butanol	1554 ± 8,4	1,98 ± 0,04
1-heptanol	1564 ± 8,4	1,86 ± 0,13
4,4-dimetil-2-pentanol	1553 ± 8,4	2,02 ± 0,12
1-octanol	1563 ± 13	1,88 ± 0,13
1-decanol	1560 ± 8,4	1,94 ± 0,12
ciclopentanol	1602 ± 19	1,50 ± 0,10
1-metil-ciclopentanol	1559 ± 8,4	1,95 ± 0,12
trans-2-metil-ciclopentanol	1558 ± 8,4	1,96 ± 0,12
Cetona	afinidade por próton	afinidade por elétron
ciclohexanona	1533 ± 8,4	1,53 ± 0,01
ciclopentanona	1540 ± 18	1,62 ± 0,20
3-pentanona	1518 ± 9,6	1,43 ± 0,13
3-metil-2-butanona	1545 ± 11	1,27 ± 0,18
propanona	1543 ± 8,4	1,76 ± 0,02

Tabela A.4: Afinidades por próton (kJ/mol) e elétron (eV) experimentais para o conjunto de moléculas utilizados no processo de validação dos métodos compostos

Radicais	afinidade por próton	afinidade por elétron
radical-etil	616 ± 2	$0,95 \pm 0,12$
radical-isopropil	$671,4 \pm 2$	$0,69 \pm 0,12$
radical-n-propil	703 ± 2	$-0,07 \pm 0,12$
radical-terc-butil	711 ± 4	$0,65 \pm 0,12$
radical-2-butil	766 ± 4	$-0,121 \pm 0,09$
radical-isobutil	755 ± 4	$0,05 \pm 0,12$
Alcenos	afinidade por próton	afinidade por elétron
propeno	$1698 \pm 8,4$	$0,56 \pm 0,19$
1-buteno	$1724 \pm 8,4$	$0,60 \pm 0,10$
2-buteno	$1701 \pm 8,4$	$0,57 \pm 0,10$
2-metil-1-buteno	$1687 \pm 8,4$	$0,66 \pm 0,15$

Referências Bibliográficas

- [1] Tenuta, A. F.; Aizpurúa, I. C. M.; Moura, A. F. P.; Kitahara, S. E. M. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2003**, *39*, 319.
- [2] Vallisneri, A. *Opire Fisico-Mediche Stampate e Manoscrite* **1733**, *3*, 594-597.
- [3] Vogel, J. *The Pathological Anatomy of the Human Body* **1847**, 350-351.
- [4] Flint, A. *Am. J. Med. Sci.* **1862**, *44*, 305.
- [5] Heilbron, I. M.; Simpson, J. C. E.; Spring, F. S. *J. Chem. Soc.* **1933**, 626.
- [6] Windaus, A. *Z. Physiol. Chem.* **1932**, *213*, 147.
- [7] Smith, L. L. *Cholesterol Autoxidation*; Plenum Press: New York, 1981.
- [8] Ferderbar, S. *Determinação dos óxidos de colesterol em pacientes diabéticos e intolerantes à glicose*, Thesis, USP, 2004.
- [9] Mauthner, J. *Monatsh.* **1894**, *15*, 85.
- [10] Darmstaedter, L.; Lifschütz, I. *Ber.* **1898**, *31*, 1122.
- [11] Lifschütz, I. *Deutsch. Med. Woch.* **1897**, *23*, 44.
- [12] Hur, S. J.; Park, G. B.; Joo, S. T. *Food Control* **2007**, *18*, 939.
- [13] Tai, C. Y.; Chen, Y. C.; Chen, B. H. *J. Food Drug Anal.* **2000**, *8*, 1.
- [14] Bösiinger, S.; Luf, W.; Brandll, E. *Int. Dairy J.* **1993**, *3*, 1.
- [15] Paniangvait, P.; King, A. J.; Jones, A. D.; German, B. G. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 1159.
- [16] Smith, L. L. *Lipids* **1996**, *31*, 1996.
- [17] Maerker, G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1987**, *64*, 388.
- [18] Maerker, G.; Jr, J. U. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1986**, *63*, 767.

- [19] Peng, S.; Hu, B.; Morin, R. J. *J. Clin. Anal.* **1991**, *5*, 144.
- [20] Toschi, T. G.; Carboni, M. F. *J. Food Sci.* **1992**, *4*, 223.
- [21] Addis, P. B.; Carr, T. P.; Hassel, C. A.; Huang, Z. Z.; Warner, G. J. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5662.
- [22] Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M.; Boatella, J. *Food Chem. Toxic.* **1996**, *34*, 193.
- [23] Linseisen, J.; Wolfram, G. *Fett/Lipid* **1998**, *100*, 211.
- [24] Brown, A. J.; Jessupe, W. *Atherosclerosis* **1999**, *142*, 1.
- [25] Pearson, A. M.; Gray, J. I.; Wolzak, A. M.; Horenstein, N. A. *Food Technol.* **1983**, *37*, 121.
- [26] Kubom, S. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *12*, 63.
- [27] Kubom, S. *Nutr. Rev.* **1993**, *51*, 33.
- [28] Gray, J. I.; Morton, I. D. *J. Hum. Nutr.* **1981**, *35*, 5.
- [29] Ladikos, D.; Lougovois, V. *Food Chem.* **1990**, *35*, 295.
- [30] Souza, A. A.; Faria, R. F. *Elementos de Química Quântica*; Editora Átomo: Campinas, 2007.
- [31] Atkins, P.; Paula, J. *Físico-Química*; LTC Editora S.A.: Rio de Janeiro, 2004.
- [32] Levine, I. N. *Quantum Chemistry*; Prentice-Hall Inc.: New Jersey, 4th ed.; 1991.
- [33] D. A. McQuarrie, J. D. S. *Physical Chemistry : A Molecular Approach*; University Science Books: USA, 1st ed.; 1997.
- [34] Hartree, D. R. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* **1928**, *24*, 1.
- [35] Fock, V. Z. *Physik* **1930**, *61*, 1.
- [36] Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry : Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*; Dover Publication, INC.: Mineola, New York, 1st ed.; 1996.
- [37] Castro, M. A.; Canuto, S. *O Método de Hartree-Fock. In: Morgon, N. H.; Coutinho, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*; Livraria da Física: São Paulo, 2007.
- [38] Viana, J. D. M.; Fazzio, A.; Canuto, S. *Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos*; Livraria da Física: São Paulo, 2004.

- [39] Thomas, L. H. *Proc. Comb. Phil. Soc.* **1927**, *23*, 542.
- [40] Fermi, E. *Rend. Accad. Lincei* **1927**, *6*, 602.
- [41] Hohenberg, P.; Khon, W. *Phys. Rev. B* **1964**, *136*, 864.
- [42] Khon, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, 1133.
- [43] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 5622.
- [44] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 7764.
- [45] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 4703.
- [46] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Pople, J. A. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *313*, 600.
- [47] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Rassolov, V. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 84108.
- [48] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Rassolov, V. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 124105.
- [49] Warshel, A.; Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5612.
- [50] Warshel, A.; Levitt, M. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 1970.
- [51] Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 1970.
- [52] Maseras, F.; Morokuma, K. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1170.
- [53] ans S Humbel, M. S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. *Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19357.
- [54] Bensasson, R. V.; Zoete, V.; Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 805.
- [55] Librando, V.; Alparone, A.; Tomaselli, G. *J. Molec. Model.* **2008**, *12*, 1038.
- [56] Higashi, N.; Tanimoto, K.; Nishioka, M.; Ishikawa, K.; Taya, M. *J. Biochem.* **2008**, *144*, 77.
- [57] Morgan, J. E.; Gennis, R. B.; Maeda, A. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *48*, 355.
- [58] Bhattacharya, S. K.; Kshirsagar, A. *Eur. Phys. J. D* **2008**, *48*, 355.
- [59] Reinard, M. S.; Johnston, M. V. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 389.

- [60] Gal, J.; Maria, P.; Racznaska, E. D. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 699.
- [61] Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keith, R. L. *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*; HaperCollins College Publishers: New York, 1993.
- [62] Metz, R. B.; Weaver, A.; Bradforth, S. E.; Kitsopoulos, T. N.; Neumark, D. M. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1377.
- [63] Wang, X.; Woo, H.; Wang, L. *J. Phys. Chem.* **2006**, *110*, 5047.
- [64] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. "Gaussian 03, Revision C.02", Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [65] Valiev, M.; Bylaska, E. J.; Govind, N.; Kowalski, K.; Straatsma, T. P.; van Dam, H. J. J.; Wang, D.; Nieplocha, J.; Apra, E.; Windus, T. L.; de Jong, W. A. *Comput. Phys. Commun.* **2010**, *181*, 1477 <http://www.nwchem-sw.org/index.php>.
- [66] Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. *J. Comput. -Aided Mol. Design* **2000**, *14*, 123-134 <http://www.caos.kun.nl/schaft/molden>.
- [67] Peng, C.; Schlegel, H. B. *Israel J. of Chem.* **1993**, *33*, 449.
- [68] Peng, C.; Ayala, P. Y.; Schlegel, H. B.; Frisch, M. J. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 49.
- [69] Ochterski, J. W. "Thermochemistry in Gaussian", Pittsburgh PA, 2000 <http://www.gaussian.com/g-whitepap/thermo.htm/>.
- [70] <http://webbook.nist.gov//chemistry/>.
- [71] Otaequi-Arrazola, A.; Menéndez-Carrenõ, M.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3289-3303.

- [72] Brown, A. J.; Jessup, W. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 111-122.
- [73] Hovenkamp, E.; Demonty, I.; Plat, J.; Lütjohann, D.; Mensink, R. P.; Trautwein, E. A. *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 37-49.
- [74] de Andrade Júnior, D. R.; de Souza, R. B.; dos Santos, S. A.; de Andrade, D. R. *J. bras. pneumol.* **2005**, *31*, 60.
- [75] F. A. Carey, R. J. S. *Advanced Organic Chemistry*; Plenum Press: New York , London, 2 ed.; 1984.