



**Universidade Federal de Uberlândia**

**Instituto de Química**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Caracterização da interação da quitosana com epirrubicina por  
modelagem molecular**

Alexsandra Eliane de Souza

**Uberlândia**

**2020**

**Universidade Federal de Uberlândia**  
**Instituto de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Caracterização da interação da quitosana com epirrubicina por  
modelagem molecular**

Exame de Dissertação de Mestrado  
Apresentado ao Programa do Curso de  
Pós Graduação em Química, como  
Requisito Parcial para a Obtenção do  
Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria  
Franca

**Uberlândia**

**2020**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

|              |   |
|--------------|---|
| S729<br>2020 | <p>Souza, Alexsandra Eliane de, 1978-<br/>Caracterização da interação da quitosana com<br/>epirrubicina por modelagem molecular [recurso<br/>eletrônico] / Alexsandra Eliane de Souza. - 2020.</p> <p>Orientador: Eduardo Franca.<br/>Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de<br/>Uberlândia, Pós-graduação em Química.<br/>Modo de acesso: Internet.<br/>Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.742">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.742</a><br/>Inclui bibliografia.<br/>Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. Franca, Eduardo, 1981-, (Orient.). II.<br/>Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em<br/>Química. III. Título.</p> <p>CDU: 54</p> |
|--------------|---|

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

|                                    |  |                 |       |                       |       |
|------------------------------------|--|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Química  |                 |       |                       |       |
| Defesa de:                         | Dissertação de Mestrado Acadêmico número 316, PPQUI  |                 |       |                       |       |
| Data:                              | vinte e um de agosto de dois mil e vinte   | Hora de início: | 14:01 | Hora de encerramento: | 18:25 |
| Matrícula do Discente:             | 11812QMI001  |                 |       |                       |       |
| Nome do Discente:                  | Alexsandra Eliane de Souza   |                 |       |                       |       |
| Título do Trabalho:                | Caracterização da interação da quitosana com epirrubicina por modelagem molecular  |                 |       |                       |       |
| Área de concentração:              | Química  |                 |       |                       |       |
| Linha de pesquisa:                 | Química Teórica e Físico-Química de Macromolécula  |                 |       |                       |       |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Caracterização molecular de produtos de interesse biotecnológico: nanopartículas de quitosana (para descontaminação ambiental e regeneração celular) e complexos metálicos (com potencial atividade antitumoral e antifúngica) |                 |       |                       |       |

Reuniu-se por meio de webconferência, plataforma RNP, link de acesso <https://live-idc57.mconf.rnp.br/html5client/join?sessionToken=yhqrmlsagmktgaik>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Guedmi Ier Souza de Oliveira, do Instituto de Química da UFU; Odonório Abrahão Júnior, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Moacyr Comar Júnior, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Moacyr Comar Júnior, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Moacyr Comar Junior, Membro de Comissão**, em 25/08/2020, às 08:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Guedmiller Souza de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2020, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Odonório Abrahão Júnior, Usuário Externo**, em 25/08/2020, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2214093** e o código CRC **93A511BC**.

---

Dedico essa conquista  
Àquela que com dificuldades  
Me ensinou as primeiras letras  
Garantindo a minha educação  
Uma vez que as maiores edificações  
Tiveram seu começo pelas bases,  
À minha mãezinha,  
Edma Pereira de Souza,  
Com carinho.

---

O fracasso quebra as almas pequenas e engradece as grandes,  
Assim como o vento apaga a vela e atíça o fogo da floresta.  
(Benjamim Franklin)

---

---

## **Agradecimentos**

Agradeço a Jesus, o maior entre os mestres e pai amoroso sempre me ajudando a atravessar todos os momentos difíceis da minha vida.

Aos fundadores da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela criação de oportunidades. Meus votos de sucesso à gestão da UFU à altura da grandeza da instituição.

A todos os meus colegas de trabalho e como não poderia deixar de ser, agradeço em especial ao William Oliveira Soté, por compartilhar sua sabedoria dotada de grande bondade e seu exemplo na forma de boa vontade em ajudar os outros.

A meu orientador, Eduardo de Faria Franca.

A todos que torceram por mim:

Obrigada!

---



---

## Abstract

This work is part of the study of the interaction between the chitosan biopolymer and the epirubicin chemotherapy through the analysis of the results of simulations performed in the GROMACS program. The literature review provided the basis for the use of molecular dynamics and the choice of chitosan and epirubicin to model our systems. The procedures adopted involved the generation of the topology of molecules in the OPLS-AA (Optimized potentials for liquid simulations-all-atom) force field, which is a robust force field having the advantage, offered by the option (AA), of treating the atoms separately. All methodology used has been adjusted for this force field. First, the assignment of atom loads was made by calculating loads RESP (Restrained Electrostatic Potential). Later, the loads of negative hydrogen atoms were replaced by values consulted in the force field assigning the same load value to identical groups. The micro-species curves of epirubicin obtained in the MARVINSKETCH program provided the majority structure at pH (7.4; 9; 10). After the preparation of the PDB files of the structures it was made the calculation of molecular anchorage in the autodock program. Then three systems formed by a chitosan filament and an epirubicin molecule were modeled. The molecular dynamics calculations for these systems were aimed at characterizing how chitosan interacts with epirubicin. However, the results showed that the molecules are inert and the systems are very unstable. The discussion of the results was reinforced by calculations of the number of hydrogen bonds and the minimum distance between the chitosan and the epirubicin. In order to deepen the analysis of the results, a system with four times the chitosan mass was modelled. The results confirmed that the complex is not formed and showed the importance of performing a previous characterization by molecular dynamics, before the execution of experimental procedures.

**Keywords:** Molecular Dynamics, Chitosan, epirubicin, interaction, controlled delivery.

---

---

## Resumo

Esse trabalho consiste no estudo da interação entre o biopolímero quitosana e o quimioterápico epirrubicina através de análise de resultados de simulações efetuadas no programa GROMACS. A realização da revisão da literatura forneceu as bases que motivaram o uso da dinâmica molecular e a escolha da quitosana e da epirrubicina para modelar nossos sistemas. Os procedimentos adotados envolveram a geração da topologia das moléculas no campo de força OPLS-AA (Optimized potentials for liquid simulations-all-atom), o qual é um campo de força robusto tendo a vantagem, oferecida pela opção (AA), de tratar os átomos separadamente. Toda metodologia empregada foi ajustada para esse campo de força. Primeiramente, a atribuição de cargas dos átomos foi feita calculando cargas RESP (Restrained Electrostatic Potential). Posteriormente, as cargas de átomos de hidrogênio negativos foram substituídas por valores consultados no campo de força atribuindo o mesmo valor de carga a grupos idênticos. As curvas de microespécies da epirrubicina obtida no programa MARVINSKETCH forneceu a estrutura majoritária a pH (7,4; 9; 10). Após o preparo dos arquivos PDB das estruturas foi feito o cálculo de ancoragem molecular no programa autodock. Em seguida foram modelados três sistemas formados por um filamento de quitosana e uma molécula de epirrubicina. Os cálculos de dinâmica molecular para esses sistemas tiveram em vista a caracterização da forma como a quitosana interage com a epirrubicina. Porém, os resultados mostraram que as moléculas são inertes e os sistemas são muito instáveis. A discussão dos resultados foi reforçada por cálculos do número de ligações de hidrogênio e de mínima distância entre a quitosana e a epirrubicina. A fim de aprofundar a análise dos resultados foi feita a modelagem de um sistema com massa de quitosana quatro vezes maior. Os resultados confirmaram que o complexo não se forma e mostraram a importância da realização de uma caracterização prévia por dinâmica molecular, antes da execução de procedimentos experimentais.

**Palavras-chaves:** Dinâmica molecular, Quitosana, Epirrubicina, interação, liberação controlada.

---

---

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Estrutura dos monômeros da quitosana. A) 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose, B) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose. ....  | 13 |
| Figura 2: Comparação entre as estruturas químicas das ANTs, a) doxorrubicina (DOX), b) epirrubicina (EPI). A diferenciação pelo grupo OH encontra-se circulado de verde (DOX) e de vermelho (EPI) ....              | 16 |
| Figura 3: Esquema representando a variação de estados protonados da quitosana em diferentes valores de pH. ....   | 19 |
| Figura 4: Estrutura da DOX, elaborada no programa MarvinSketch, na sua forma neutra mostrando os hidrogênios ácidos, a porção hidrofílica e a porção hidrofóbica ....   | 20 |
| Figura 5: Estratégias avançadas para uso de quitosana em drug delivery e suas formas de administração. ....   | 22 |
| Figura 6: Esquema representando as etapas da dinâmica molecular (DM) de uma molécula de epirrubicina. ....  | 27 |
| Figura 7: Esquema representando o comportamento das NPs em função do pH ....  | 32 |
| Figura 8.: Representação da estrutura da EPI numerada ....  | 34 |
| Figura 9.: Estrutura da QT utilizada nas simulações com destaque para os grupos N-acetil, amina, amina protonada e ligação glicosídica, (representação CPK, utilizando programa VMD) ....                           | 36 |
| Figura 10: Estrutura da EPI otimizada destacando as cargas RESP dos átomos de hidrogênio. ....  | 37 |
| Figura 11.: Estrutura da epirrubicina utilizada nas simulações (310K) com o grupo amino protonado circulado, (representação CPK, utilizando programa VMD) ....  | 40 |
| Figura 12.: O primeiro sistema simulado (S-1), segundo o arquivo PDB da pose de menor energia da ancoragem molecular (representação Licorice, utilizando programa VMD) ....   | 41 |
| Figura 13.: O segundo sistema simulado (S-2), obtido do arquivo PDB da segunda classificação no ranking de energia da ancoragem molecular (representação Licorice, utilizando programa VMD) ...                     | 41 |
| Figura 14.: O terceiro sistema simulado (S-3), obtido do arquivo PDB da terceira classificação no ranking de energia da ancoragem molecular (representação Licorice, utilizando programa VMD). ....                 | 42 |
| Figura 15.: O sistema (S-4) no qual há quatro filamentos de quitosana ao redor da molécula de epirrubicina (representação CPK, utilizando programa VMD) ....  | 43 |
| Figura 16.: RMSD da EPI em solução aquosa contendo íons cloreto. ....   | 44 |
| Figura 17: Sobreposição entre as cadeias, A) EPI e EPI-1, B) EPI e EPI-2, programa HyperChem ...  | 45 |
| Figura 18: Esquema representativo do equilíbrio de protonação da EPI. A) Espécie majoritária em $\text{pH} < 7,4$ , B) Espécie majoritária em $\text{pH} = 9$ , C) Espécie majoritária em $\text{pH} = 10$ ....     | 46 |
| Figura 19: Energia média de Lennard-Jones (B, D, F). Para os sistemas compostos por QT e EPI na proporção de (1:1), S-1, S-2, S-3 ....  | 50 |
| Figura 20: Energia média de Coulomb Para os sistemas compostos por QT e EPI na proporção de (1:1), S-1, S-2, S-3 ....   | 51 |
| Figura 21: Valor médio da área acessível ao solvente (SASA) para a quitosana nos sistemas (S-1, S-2, S-3). ....   | 53 |
| Figura 22: Valor médio da área acessível ao solvente (SASA) para a QT nos sistemas (S-4). ....  | 54 |
| Figura 23: Rg da QT nos sistemas (S-1, S-2, S-3). ....  | 55 |
| Figura 24: Raio de giro ( $R_g$ ) dos quatro filamentos de QT (S-4.1, S-4.2, S-4.3, S-4.4) do complexo (S-4). ....  | 56 |
| Figura 25: Estrutura da EPI e da QT, as setas verdes apontam os grupos passíveis de estabelecer interação de Hidrogênio. ....   | 58 |
| Figura 26: A) Gráfico de número de ligações de Hidrogênio, $O_{\text{EPI}} \dots O_{\text{QT}}$ ; B) Gráficos de cálculo de mínima distância entre a QT e a EPI, sistemas de menor massa, (S-1), (S-2), (S-3). .... | 59 |
| Figura 27: A) Cálculo de número de ligações de Hidrogênio, $O_{\text{EPI}} \dots O_{\text{QT}}$ ; B) Cálculo de mínima distância entre a QT e a EPI, sistema de maior massa (S4) ....                               | 60 |

---

---

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Dose cumulativa máxima para a DOX e EPI na forma livre e para a DOX na forma lipossomal, tendo por base o índice de DSVE/FC.....  | 16 |
| Tabela 2. Gerações de NPs para uso em nanomedicina .....  | 24 |
| Tabela 3: Diedros impróprios definidos para a EPI.....  | 37 |
| Tabela 4: Sistema simulado, epirrubicina aquosa na forma livre (EPI) .....  | 39 |
| Tabela 5: Sistemas aquosos simulados (S-1, S-2, S-3, S-4).....  | 43 |
| Tabela 6: Ranck de energia da ancoragem molecular e constante de inibição. ....   | 48 |
| Tabela 7: Valores médios e desvio padrão da energia das contribuições de Coulomb e energia de Lennard-Jones para a energia total do sistema contendo QT e EPI na proporção de (1:1) sistemas, S-1, S-2, S-3. .... | 49 |
| Tabela 8: Valor médio com os desvios padrão do número total de ligações de hidrogênio intermoleculares entre a QT e a EPI, para 20 ns de simulação.....   | 57 |

---

---

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ANTs: Antraciclinas

AA: Todos os átomos separados (all-atom)

CT: Quitosana

CT-EPI: Complexo quitosana-epirrubicina

DFT: Teoria funcional de densidade (Density Functional Theory)

DM: Dinâmica molecular

DOX: Doxorubicina

DSVE: Disfunção sistólica do ventrículo esquerdo

EPI: Epirrubicina

FC: Falência cardíaca

HCPT: Hidroxicamptotecina

HF: Hartree-Fock

NPs: Nanopartículas

OPLS-AA: Optimized potentials for liquid simulations-all-atom

PQ: Ponto quântico

PQ-DOX: Conjugado ponto quântico-doxorubicina

QT: Quitosana

QT-DPPC: Complexo quitosana-dipalmitoilfosfatidilcolina

QT-FDOX: complexo quitosana-trifluoracetato de doxorubicina

QT-PLGA: complexo quitosana-polietilenoglicol

QT-SPIONPs: complexo quitosana-óxido de ferro superparamagnético

RESP: Potencial eletrostático restrito (Restrained Electrostatic Potential)

ROs: Oxigênios citotóxicos

TIPnP: Potenciais Intermoleculares Transferíveis (Transferable Intermolecular Potentials)

TOPO II: Topoisomerase do tipo II

UA: Átomos unidos

---

---

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABSTRACT</b>                             | <b>3</b>  |
| <b>RESUMO</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                     | <b>5</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>       | <b>7</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>        | <b>11</b> |
| <b>2. MOLÉCULAS ESTUDADAS</b>               | <b>12</b> |
| 2.1. A quitosana                            | 12        |
| 2.2. A epirrubicina                         | 13        |
| 2.3. Microambiente ácido                    | 16        |
| 2.3.1 <i>Quitosana em meio ácido</i>        | 18        |
| 2.3.2 <i>Epirrubicina em meio ácido</i>     | 19        |
| <b>3. FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO</b>           | <b>20</b> |
| 3.1. Nanotecnologia                         | 22        |
| 3.2. Nanopartícula de quitosana             | 24        |
| <b>4. DINÂMICA MOLECULAR</b>                | <b>25</b> |
| 4.1. Modelagem molecular de quitosana       | 28        |
| 4.2. Modelagem molecular com antraciclina   | 29        |
| 4.3. Complexos reais quitosana-epirrubicina | 32        |
| <b>5. METODOLOGIA</b>                       | <b>34</b> |
| 5.1 <i>Estrutura inicial das moléculas</i>  | 34        |
| 5.1.1 <i>Otimização da Estrutura da EPI</i> | 36        |
| 5.1.2 <i>Determinação da carga RESP</i>     | 36        |

---

---

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>5.1.3</b> | <b><i>Protonação da EPI</i></b>  | <b>38</b> |
| <b>5.2</b>   | <b><i>Ancoragem molecular</i></b>  | <b>38</b> |
| <b>5.3</b>   | <b><i>Simulação por dinâmica molecular da EPI na forma livre</i></b>         | <b>39</b> |
| <b>5.4</b>   | <b><i>Simulação dos complexos(QT-EPI)</i></b>                                | <b>40</b> |
| <b>6</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>44</b> |
| <b>6.1</b>   | <b><i>Análise de RMSD da EPI</i></b>   | <b>44</b> |
| <b>6.2</b>   | <b><i>Estudo da estrutura da EPI em função do pH</i></b>                     | <b>46</b> |
| <b>6.3</b>   | <b><i>Análise da ancoragem molecular</i></b>                                 | <b>47</b> |
| <b>6.4</b>   | <b><i>Análise da energia total dos sistemas</i></b>                          | <b>48</b> |
| <b>6.5</b>   | <b><i>Análises da estabilidade dos complexos</i></b>                         | <b>52</b> |
| <b>6.5.1</b> | <b><i>Análise da área acessível ao solvente (SASA)</i></b>                   | <b>52</b> |
| <b>6.5.2</b> | <b><i>Análise do Raio de giro (Rg)</i></b>                                   | <b>55</b> |
| <b>6.5.3</b> | <b><i>Análise de ligação de Hidrogênio e cálculo de mínima distancia</i></b> | <b>57</b> |
| <b>7</b>     | <b>CONCLUSÃO</b>   | <b>61</b> |
| <b>8</b>     | <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>62</b> |

---

---

---

## 1. Introdução e Justificativa

Nos dias de hoje o padrão de exigências para se alcançar um critério satisfatório de caracterização dos materiais é cada vez maior de forma que se torna indispensável ao químico conhecer e utilizar a dinâmica molecular (DM) como parte principal ou integrante de seus trabalhos. Não obstante, muitos dos erros cometidos durante a realização de trabalhos experimentais poderiam ser evitados através da análise de experimentos *in silico*. Essa avaliação prévia se reflete em ganho de tempo e evita desperdício de reagentes minimizando os impactos ambientais causados pela manipulação de reagentes. No estudo e desenvolvimento de nanopartículas (NPs) a DM vem elevando o nível de detalhamento dos sistemas de forma revolucionária (Yetisgin, Cetinel, Zuvir, Kosar, 2020). Devido a esse grande potencial analítico e à necessidade de lidar com aspectos atomísticos dos sistemas escolhemos a DM para estudar a interação entre uma nanopartícula de quitosana (QT) e uma epirrubicina (EPI). Salientamos que a escolha dessas moléculas foi motivada pela adequação de suas propriedades a aplicações medicinais como o desenvolvimento de sistemas de transporte e liberação controlada de fármacos (Quiñones, Peniche, Peniche, 2018). Em especial o encapsulamento de EPI em QT pode ajudar a reduzir a toxicidade cardíaca da EPI (Chen, Nan, Wei, Wang, 2016), proteger o fármaco da degradação na corrente sanguínea (Tariq, Alam, Singh, Panda, 2016) e melhorar a sua eficiência terapêutica trazendo muitos benefícios às pessoas que precisam utilizar esse medicamento (Xu, Zuo, Chen, Wang, 2017). Entretanto, para alcançar essa meta é preciso conhecer os mecanismos envolvidos no funcionamento das NPs por isso o entendimento da interação entre a EPI e a QT pode ser o ponto de partida para o desenvolvimento de novas formulações.

Esperamos que nossos estudos de modelagem das moléculas de quitosana e epirrubicina no campo de força OPLS-AA sirvam de referência para pesquisas futuras de caracterização de complexos quitosana-epirrubicina, QT-EPI.



---

## 2. Moléculas estudadas

Os sistemas aqui estudados são constituídos pela estrutura do biopolímero quitosana e do antibiótico epirrubicina. Vejamos a seguir algumas particularidades dessas moléculas.

### 2.1. A quitosana

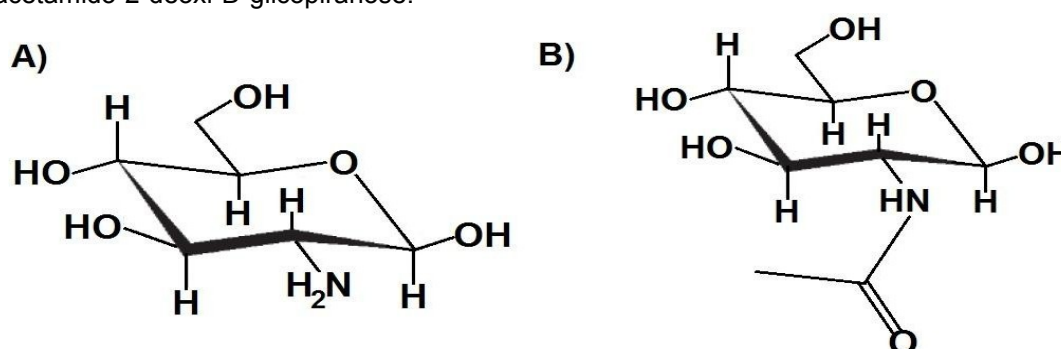
Estruturalmente, a quitosana pode ser definida como um biopolímero constituído por dois tipos de monômeros um acetilado formado por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e outro não acetilado formado por unidades 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (Sultankulov, Berillo, Sultankulova, Tokay, Saparov, 2019). Esses monômeros estão unidos entre si por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ , Figura 1. A natureza disponibilizou diversas fontes de extração da matéria prima utilizada para a produção da quitosana, através da quitina encontrada na parede de fungos, no exoesqueleto de insetos e na carapaça de crustáceos (Lopes, Junior, Scheidt, Soares, Chagas, 2017). Porém, por ser um biopolímero muito promissor para diversas aplicações à produção de quitosana interessa às indústrias distribuídas por todo o planeta. De tal forma que a conversão parcial dos grupos amida da quitosana em grupos amina, chamada de desacetilação é um dos principais métodos utilizados para atender ao aumento da demanda por esse biopolímero (Laranjeira, Fávere, 2009). A princípio poderiam ser utilizados tanto ácidos quanto bases na desacetilação da quitina, entretanto a desacetilação alcalina preserva melhor a estrutura básica da quitina, pois os ácidos interagem com as ligações glicosídicas. A N-desacetilação da quitina pode seguir por via homogênea ou heterogênea. A via homogênea, na qual a quitina é tratada com uma solução concentrada quente de NaOH durante algumas horas levam a produção de quitosana insolúvel. Enquanto pela via heterogênea a quitina é desacetilada por solução de 30g de NaOH em 45g de água a 25 °C durante 3h ou mais, seguida da dissolução em gelo a 0°C e leva à produção de quitosana solúvel com um grau de acetilação entre 48%-55%. Pois, uma vez que as unidades D-glicosamina conferem solubilidade à quitosana o predomínio dessas unidades e a distribuição dos grupos

---

N-acetil influenciam fortemente a sua solubilidade e são uma vantagem oferecida pelo método homogêneo devido à realização da desacetilação uniformemente ao longo da cadeia de quitosana (Younes, Rinaudo, 2015). A quitosana obtida da desacetilação parcial da quitina torna-se solúvel em meio ácido aquoso quando o grau médio de acetilação é inferior a 50%. De fato, este limite depende da distribuição dos grupos acetila ao longo das cadeias (Younes, Rinaudo, 2015).

Dessa forma, a quitosana pode ser caracterizada principalmente pela sua massa molecular, grau de acetilação e distribuição dos grupos N-acetil.

Figura 1: Estrutura dos monômeros da quitosana. A) 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, B) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose.



Fonte: Adaptado de (Xu, Wang, Pack, 2010).

## 2.2. A epirrubicina

O uso clínico de antraciclinas (ANTs) teve início na década de 70 e desde então, elas vêm se tornando um componente indispensável à quimioterapia (Ewer, 2015). As duas antraciclinas mais comumente utilizadas em quimioterapia são os epímeros, epirrubicina (EPI) e doxorrubicina (DOX) que se diferem quanto à epimerização axial-equatorial do grupo hidroxila C-4'.

A EPI consiste em um grupo hidrofóbico aglicona unido a um anel amino açúcar hidrofílico por uma ligação glicosídica. Seu anel amino açúcar é intensamente explorado na produção de conjugados com a EPI capazes de manter suas propriedades anti-câncer (Kmieciak, Krzyścik, Filip-Psurska, Wietrzyk, 2017). A literatura reporta que antraciclinas com vários anéis açúcares causam menos efeitos colaterais que outros antibióticos tumorais (Ferla, Airolidi, Zona, Orsato, 2011).

---

A Figura 2 mostra a relação estereoisomérica existente entre a EPI e a DOX destacando o grupo hidroxila equatorial (DOX) e hidroxila axial (EPI) nas estruturas. O mecanismo de funcionamento de ação da EPI é análogo ao da DOX, porém, devido à sua toxicidade reduzida a dose cumulativa da EPI pode ser maior em comparação à DOX. A Tabela 1 relaciona a dose cumulativa máxima das principais antraciclina tendo por índice de referência o estudo da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (DSVE) com falência cardíaca (FC). Com relação à dosagem máxima, segundo os dados da Tabela 1, a EPI na forma livre pode atingir doses cumulativas acima do dobro das recomendadas para a DOX na forma livre chegando a ser equiparada à DOX na forma lipossomal o que torna a EPI mais recomendada para o desenvolvimento de novas formulações, tendo em vista a redução da toxicidade cardíaca.

A epirrubicina é a antraciclina mais recomendada para vários tipos de câncer como o câncer de seio, ovário, bexiga, intestino e cólon de útero, a despeito das vantagens que o tratamento com EPI oferece, efeitos colaterais graves como a supressão de medula óssea e as cardiopatias limitam o uso de epirrubicina tal como o de qualquer outro antibiótico da família das antracilinas (Taghdisi, Danesh, Ramezani, Lavaee, 2016).

O cloridrato de epirrubicina se apresenta na forma de uma solução extremamente irritante para os tecidos, devendo ser administrada por via intravenosa ou intravesical. A EPI é um agente citotóxico e deve ser usado apenas com acompanhamento médico devido à gravidade dos seus efeitos colaterais como as cardiopatias as quais podem se apresentar na forma de cardiomiopatias<sup>1</sup>, diminuição dos batimentos cardíacos, insuficiência cardíaca aguda e diversas alterações no eletrocardiograma causadas por epirrubicina (Wyeth, 2019). Alertando para o fato das disfunções cardíacas devidas à perda de massa do ventrículo esquerdo associadas ao uso de EPI poderem ocorrer muitos anos após o término do tratamento prolongando os efeitos da quimioterapia (Lessard, Francis, Sawyer et. al., 2018).

---

<sup>1</sup> A cardiomiopatia é uma alteração muscular do coração que leva à redução da fração de ejeção ventricular esquerda (FVE, volume do sangue que sai do coração). (Wyeth, 2019).

---

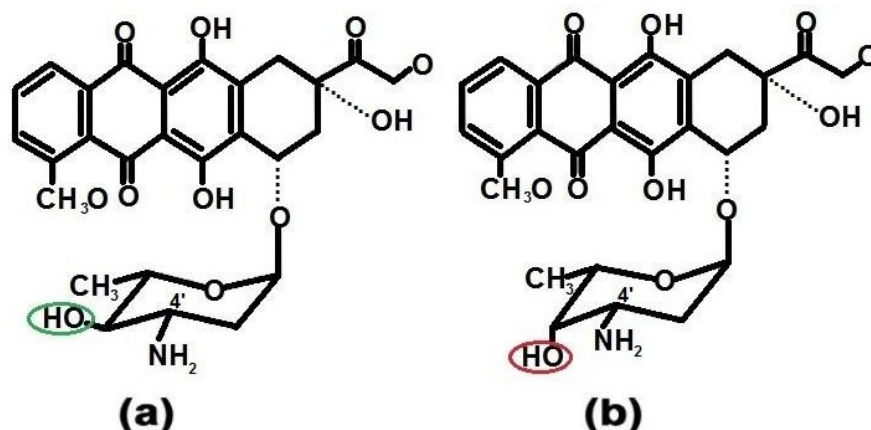
Quanto às propriedades físicas, esse medicamento é solúvel em água, metanol e cloreto de sódio (0,9%), insolúvel em acetona, benzeno, clorofórmio, éter etílico e em éter de petróleo (Alcântara, 2009). Quanto a sua ação é possível afirmar que o mecanismo geral das ANTs, acontece por intercalação ao DNA, geração de radicais livres e inibição da topoisomerase II, todos estes levando a danos ao DNA (Yang, Kemp, Henikoff, 2016, Henninger, Fritz, 2017).

As ações citotóxicas deste medicamento têm sido atribuídas à inibição da topoisomerase II (TOPO II), razão pela qual a EPI é conhecida como veneno de TOPO II, bem como à produção intracelular de radicais livres (Olinski, Jaruga, Foksinski, Bialkowski, Tujakowski, 2015).

A eficácia citotóxica da EPI responsável pela morte tanto de células de câncer, quanto de células saudáveis pode ser melhorada pelo uso combinado com formononetina. O mecanismo da terapia com formononetina e epirrubicina se baseia na geração de oxigênios citotóxicos (ROs), inibição do crescimento celular, alteração da distribuição do ciclo celular e indução de apoptose (Lo, Wang, 2013).

As advertências mostram que é difícil definir claramente qual a mínima dosagem tóxica de um agente quimioterápico, contudo, alguns princípios básicos devem ser seguidos a fim de tomar o cuidado necessário para tornar o tratamento mais seguro. Esses princípios vão desde a escolha da medicação até seu uso na quantidade certa. A opção pela EPI é recorrente e estimula a pesquisa de formulações capazes de tornar o tratamento mais eficiente com redução dos efeitos colaterais prejudiciais à saúde.

Figura 2: Comparação entre as estruturas químicas das ANT, a) doxorrubicina (DOX), b) epirrubicina (EPI). A diferenciação pelo grupo OH encontra-se circulada de verde (DOX) e de vermelho (EPI).



Adaptado de (Charak, 2011)

Tabela 1. Dose cumulativa máxima para a DOX e EPI na forma livre e para a DOX na forma lipossomal, tendo por base o índice de DSVE/FC.

| Antraciclina   | Cardiotoxicidade relativa | Índice de DSVE/FC                  |
|----------------|---------------------------|------------------------------------|
| DOX            | 1                         | 3-5 % a 400 mg/m <sup>2</sup>      |
| EPI            | 0.7                       | 0,9-11,4 % a 900 mg/m <sup>2</sup> |
| DOX lipossomal | 0.5                       | 2% a 900 mg/m <sup>2</sup>         |

Fonte: ( McGowan et. al., 2017).

### 2.3. Microambiente ácido

A quitosana e a epirrubicina são moléculas muito sensíveis à variação de pH e essa sensibilidade as tornam viáveis às aplicações que requerem moléculas capazes de responder às condições de pH do meio com alterações conformacionais. Por ser a EPI um fármaco destinado, sobretudo ao tratamento de câncer, é interessante conhecer as condições de pH do microambiente tumoral. Tecidos patológicos, tais como tecidos que sofreram enfartes, cancro, infecções, inflamações, apresentam pH diferente dos tecidos normais, em especial, o pH de tecidos tumorais é mais ácido que dos normais. Embora os valores de pH possam variar dependendo do volume do tumor, tipo e propriedade (por exemplo, se ele é metastático ou não metastático), por norma um valor de pH entre (6,5-7,2) é aceito como

---

característica de microambiente tumoral (Mattheolabakis, Rigas, Constantinides, 2012). Uma característica bem conhecida dos tumores e que torna possível o planejamento de formulações mais inteligentes que aproveitem as características desse meio é o pH ácido. Essa propriedade pode também ser associada às formulações com gradientes de pH que servem de indutores diretos para melhorar a liberação do fármaco com a possibilidade de tratar inflamações para além do tecido tumoral (Hu, Chen, Gu, 2018). Os mecanismos sensíveis à variação de pH estão baseados na diferença de pH entre os tecidos normais (~7,4) e o microambiente tumoral, pH entre (6,5-7,2), ou entre estes e compartimentos intracelulares mais ácidos, endossomos/lisossomos, pH 4-5 e 5-6, respectivamente. As formulações pH-sensíveis mais avançadas tem grande potencial para alcançar maior eficácia terapêutica, pois aproveitam essa grande diminuição de pH e o fato que vários fármacos e seus carregadores são tomados por endocitose e aprisionados nesses compartimentos, o que as tornam mais específicas ao espaço intracelular, por liberarem o fármaco apenas mais próximo do núcleo da célula (He, Li, An, Jiang, 2014). Como a variação de pH pode provocar a protonação/desprotonação de formulações com propriedade pH-dependentes, diminuindo assim a estabilidade do nanossistema e desencadeando o processo de liberação é de se esperar que a forma mais estável das biomoléculas nesse microambiente ácido seja a protonada. Devido a essas condições específicas, biomoléculas flexíveis com grupos amino protonáveis como é o caso da QT e da EPI são mais adequadas para formulações mais eficazes no microambiente ácido (Hu, Chen, Gu, 2018). Vejamos agora como as propriedades da quitosana e da epirrubicina podem contribuir para a elaboração de complexos, QT-EPI, destinados às condições ácidas dos tecidos tumorais.

---

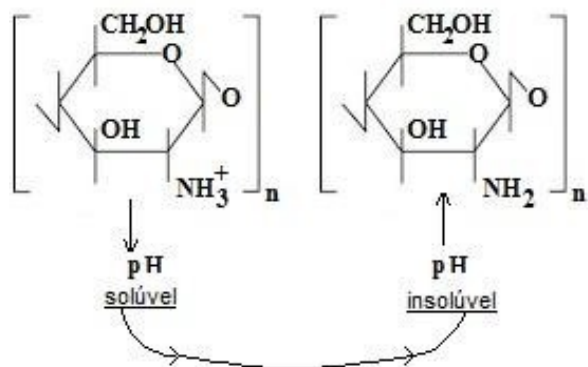
### **2.3.1 Quitosana em meio ácido**

A quitosana pode ser considerada um polissacarídeo polieletrônico (Souza, 2016). Em pH inferior a 6,2 os grupos amino da quitosana tornam-se protonados e em valores de pH acima de 6,5 os grupos amino são reativos graças ao seu caráter policatônico (Moura, 2012). A Figura 3 mostra que o aumento de pH diminui a solubilidade da quitosana devido à entrada de um próton ( $H^+$ ) no grupo ( $NH_2$ ) e a medida que o pH diminui a solubilidade diminui devido à saída de ( $H^+$ ) deixando os grupos amina mais disponíveis para reagirem. As cargas positivas da quitosana podem ser utilizadas no preparo de coloides através de interações eletrostáticas com polianiões e para promover a sua internalização nas células. Isso confere a ela a capacidade de formar complexos estáveis com polinucleotídeos aniônicos, protegendo-os da degradação e melhorando sua adsorção pela célula. Esses biopolímeros catiônicos de quitosana são usados para transportar ácidos nucleicos (DNA, RNA) destinados à vacinação genética (Pilipenko, Korzhikov-Vlakh, Sharoyko, Zhang, 2019).

O desenvolvimento de um sistema complexo de sal de amônio-quitosana quaternário com carga positiva permanente possibilitou a solubilização do fármaco DOX, em uma ampla faixa de pH melhorando a sua interação com a membrana celular das células aproveitando a mencionada sensibilidade da QT à variação de pH. O estudo da liberação de DOX em pH ácido (~4,5) por um sal de amônio-quitosana quaternário foi capaz de mostrar o papel do pH do meio fisiológico na decomposição da QT e liberação do fármaco (Soares, Souza, Silva, Ferreira, 2016).

Uma característica importante da QT empregada em nossos estudos é a sua alta densidade de carga positiva, sendo 50% protonada e 50% desprotonada. Esse estado de protonação colabora para a interação de seus complexos com as células, melhora a solubilidade da QT e favorece a liberação do fármaco em meio ácido, sendo desejável, sobretudo na elaboração de sistemas pH-sensíveis.

Figura 3: Esquema representando a variação de estados protonados da quitosana em diferentes valores de pH.



Adaptado de (Moura, 2012).

### 2.3.2 Epirrubicina em meio ácido

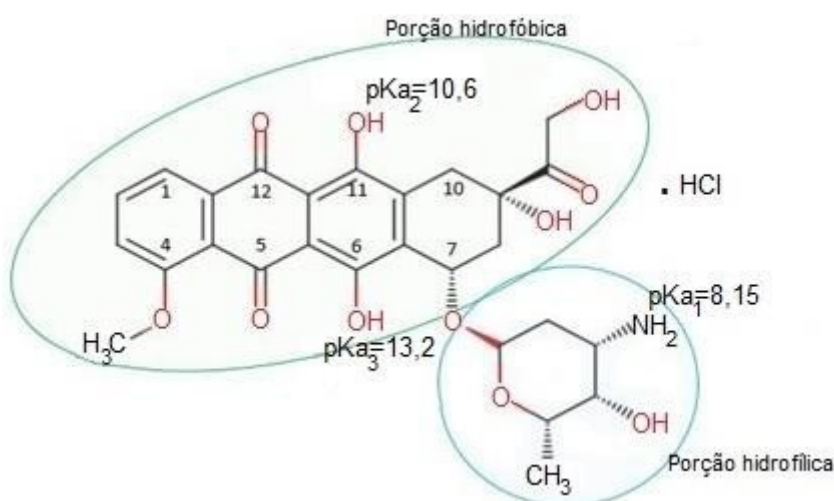
A epirrubicina é uma molécula pequena, anfifílica com 12 grupos polares e sua conformação é flexível à variação de pH do meio. Embora possua muitos grupos polares, apenas três desses grupos são considerados para efeito de variação de pH, sendo eles, o grupo amino do anel açúcar e as duas hidroxilas do anel fenol. A Figura 4 mostra o valor do pKa para o anel açúcar ( $pK_{a1}=8,15$ ), para a hidroxila ligada ao carbono (C11) do anel fenol ( $pK_{a2}=10,16$ ) e a hidroxila ligada ao carbono (C6) do anel fenol ( $pK_{a3}=13,2$ ). Enquanto o grupo amina protonável confere características básicas, os grupos hidroxila desprotonáveis do anel fenol conferem características ácidas à EPI. A presença e disposição geométrica desses grupos polares, bem como as propriedades físico-químicas das moléculas como o seu pKa, determinando o estado de ionização em função do pH, exercem influência sobre a eficácia terapêutica do fármaco. Vale salientar que em condições fisiológicas a EPI pode estar presente tanto na forma neutra, quanto na positivamente carregada (Petit, Suwalsky, Colina, Contreras, 2020).

A estabilidade do cloridrato de epirrubicina comercial em meio ácido é considerada boa, porém este também é muito sensível à variação de pH e o sal pode se decompor em pH fortemente básico (Scaramel, 2009). As protonações/desprotonações se refletem sobre as propriedades físicas, sendo que a



EPI apresenta cor laranja em meio neutro, violeta a um pH 11 e azul a pH 13 indicando que ela pode se apresentar em diferentes estados protonados. Essa alta sensibilidade à variação de pH pode potencializar a EPI no tratamento de cancer uma vez que a região do tumor apresenta pH ácido. Contudo, é possível que células mais resistentes ao fármaco apresentem pH básico. A literatura menciona o uso da EPI encapsulada em nanopartículas para transporte de fármacos tanto em sua forma neutra quanto na forma de sal (Liu, R., Li, D., He, B. et. al. 2011).

Figura 4: Estrutura da DOX, elaborada no programa MarvinSketch, na sua forma neutra mostrando os hidrogênios ácidos, a porção hidrofílica e a porção hirofóbica.



Fonte: Adaptado de (Rocha et. al, 2014).

### 3. Formas de administração

Certamente, o advento dos primeiros medicamentos manipulados em laboratórios foi um avanço importante em medicina e possibilitou o aumento da expectativa de vida das pessoas no mundo todo. Entretanto, os avanços terapêuticos oferecidos pelas antigas formulações esbarraram em limitações que precisaram ser superadas para melhorar o desempenho dos fármacos e trazer novas expectativas à sociedade. Uma limitação bastante conhecida é o fato das terapias convencionais não serem seletivas para células doentes e os tratamentos em geral serem muito traumáticos chegando a afetar a rotina dos pacientes (Chen,

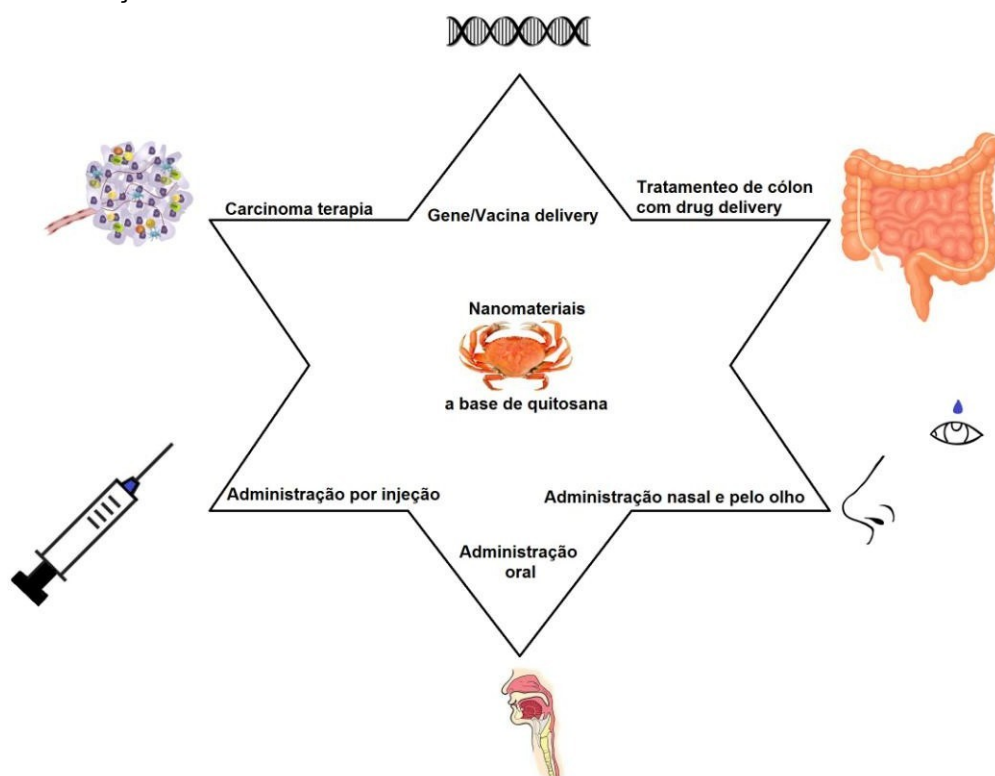
---

Qui, Zhang, 2018). Uma das razões para isso acontecer é o fato do acúmulo de fármaco no organismo elevar a sua toxicidade sistêmica (Sá, 2014). As falhas apresentadas pelos medicamentos tradicionais levaram a busca de novas formulações. De modo que atualmente, é possível controlar a concentração do fármaco mantendo as dosagens acima dos níveis terapêuticos e abaixo dos níveis tóxicos por longos períodos através do encapsulamento do fármaco em nanopartículas as quais oferecem a possibilidade de elaboração de *designs* inteligentes, possibilitando o transporte e liberação controlada por longos períodos (Yun, Lee, Park, 2015).

Uma formulação ideal deve ser capaz de chegar até os alvos específicos que se deseja tratar e se acumular no local na concentração desejada, o que é possível através do encapsulamento de fármacos em NPs (Vighi, Trifunovic, Veiga-Crespo, Rentsch, 2018). Podemos entender as NPs como estruturas compreendidas entre 1-100 nm (Velásquez, 2018).

Entre as NPs que já se encontram aprovadas para uso clínico com sucesso podemos citar as formulações lipossomais de ANTs. O tamanho das lipossomas pode ser aproveitado para vetorização passiva, pois, lipossomas com diâmetro entre (100-780 nm) são suficientemente grandes para passar do compartimento do sangue para o espaço extracelular e se acumular ao redor das células tumorais, entre (100-200 nm) os lipossomas podem extravasar para dentro do tumor concentrando ainda mais o medicamento próximo ao núcleo da célula e assim conseguir que altas dosagens atinjam diretamente o alvo sem danificar tecidos saudáveis (Abraham, Waterhouse, Mayer, Cullis, 2005). Algumas formas de administração de fármacos avançadas e a aplicação terapêutica de sistemas de *drug delivery* aparecem esquematizadas na Figura 5. Estudos demonstram que a administração de epirrubicina através de injeção comercial ocorre de forma muito rápida requerendo doses elevadas e sucessivas levando a efeitos indesejáveis. Por isso a nanotecnologia se mostra um recurso interessante para resolver essa limitação, pois permite encapsular as nanopartículas protegendo a EPI da degradação e garante a sua dosagem na concentração terapêutica por longos períodos (Tariq, Alam, Singh, Iqbal, Panda, 2015).

Figura 5: Estratégias avançadas para uso de quitosana em drug delivery e suas formas de administração.



Adaptado de (Li, Cai, Li, Li, 2018)

### 3.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia é o desenvolvimento e aplicação de estruturas em escala nanométrica as quais podem se apresentar na forma de nanopartículas (NPs) (Patra, Das, Fraceto, Campos, 2018), filmes finos (Tassel, 2013), fibras (Cavo, Serio, Kale, D'Amone, 2020), xerogeis (AL-Janabi, Bashi, 2018) e nanorobôs (Li, Jiang, Liu, Zhang, 2018). Tais materiais têm impactado a medicina nas últimas décadas devido às suas características únicas uma vez que as propriedades estruturais, propriedades elétricas, magnéticas e biológicas de materiais nessa escala se diferem daqueles fora da ordem dessa grandeza ( $10^{-9}$  m) (Wich, 2015). A nanomedicina abrange desde o diagnóstico e tratamento de falhas de órgãos, até a prevenção e cura de doenças (Behzadi, Luther, Harris, Farokhzad, 2017). Considerando que muitas doenças começam com falhas a nível celular, a

---

nanotecnologia por oferecer a possibilidade de manipular a matéria a nível atômico representa oportunidades terapêuticas nunca experimentadas (Jena, Mishra, Jena, Mishra, 2013). Porém, a manipulação de fármacos e outros materiais em escala nanométrica levam a alterações nas propriedades e na bioatividade da matéria de tal forma que é possível controlar propriedades como (Saini, 2010):

- a) A solubilidade e o tempo de retenção das NPs na corrente sanguínea.
- b) A taxa de libertação de fármacos.
- c) A entrega altamente específica de moléculas para alvos localizados no corpo.

A Tabela 2 divide o surgimento de NPs para nanomedicina em três gerações. A primeira geração é formada por NPs que surgiram na década de 50, foi muito bem sucedida na obtenção de NPs para liberação controlada via oral e transdérmica e no controle de propriedades físico-químicas. Na segunda geração (1980-2010) as formulações ganharam muita complexidade e o problema central foi à administração de fármacos tumorais. Essa geração de NPs apresentou muitos problemas como a dificuldade de ultrapassar barreiras fisiológicas chegando a tumores de difícil acesso. A partir de 2010 surge a terceira geração de NPs com a crescente complexidade desses sistemas tanto o controle de propriedades físico-químicas, quanto ultrapassar barreiras fisiológicas se tornou desafios a serem vencidos. No que lhe concerne os problemas físico-químicos envolvem principalmente a solubilidade do fármaco em água, a massa molecular de macromoléculas e controle da cinética de liberação do fármaco. Enquanto as barreiras biológicas incluem a biodistribuição do fármaco e sua toxicidade sistêmica (Yun, Lee, Park, 2015).

A alta sensibilidade desses materiais e as alterações sofridas no processo de manipulação justificam a necessidade de uma caracterização a nível atômico. Além disso, os produtos em escala nanométrica são difíceis de fabricar e seu custo de produção é caro de modo que um planejamento teórico pode ajudar muito na viabilização e realização de projetos em nanomedicina. Vale lembrar que a elaboração de um medicamento é um processo complexo que requer pesquisas continuas e uma minuciosa revisão literária.

Tabela 2. Gerações de NPs para uso em nanomedicina.

| 1ª geração   | 2ª geração  | 3ª geração  |
|--|---|---|
| Controle básico de liberação.  | Pequenos sistemas de liberação controlada.  | Modelagem de sistemas de liberação.   |
| Sucesso no controle de propriedades físico-químicas desses sistemas. | Os sistemas ainda não são capazes de vencer barreiras biológicas de difícil acesso. | Necessidade de continua superação de barreiras tanto biológicas quanto físico-químicas. |

### 3.2. Nanopartícula de quitosana

O fato de ser biocompatível, biodegradável e atóxica estimula o uso da quitosana para a elaboração de NPs com aplicação em medicina. A nível celular, uma das principais vantagens da quitosana reside na facilidade de adesão à parede das células graças às cargas positivas dos grupos aminas protonados (Velásquez, 2018). No transporte de medicamentos, biopolímeros como a QT permitem modelar formulações capazes de levar maior quantidade de medicamentos do que NPs inorgânicas com reduzida toxicidade (Horner, Knauer, Uth, 2016). Além disso, a QT pode aumentar a permeabilidade das células à molécula de fármaco, melhorando a solubilidade e a sua biodistribuição. As pesquisas reportam que NPs de QT positivamente carregadas levam a um aumento significativo da capacidade de penetração tumoral da 10-hidroxicamptotecina (HCPT) para tratamento do melanoma esse fármaco tal como a epirrubina inibe a ação da enzima topoisomerase (Guo, Li, Qiu, Liu, Qin, Houe, Wang, 2020). Destacando também o fato da superfície funcionalizada da QT com seus grupos amino e hidroxila tornarem possível a realização de enxertos e interações que podem ser aproveitadas na modelagem de nanocarregadores de fármacos com propriedades anfífilas permitindo manipular as formulações terapêuticas, sendo que estas propriedades não estariam originalmente presentes na quitosana pura (Motiei, Kashanian, Lucia, Khazaei, 2017). A literatura reporta ainda o uso de NPs de QT para o carregamento de metais pesados como o

---

cobre, pois entre todos os polímeros que poderiam ser utilizados para esse fim, a QT é mais indicada devido à sua grande afinidade por íons metálicos promovidos pelos grupos amina e hidroxila. O cobre possui eficiência anticâncer comprovada, porém, a sua alta toxicidade torna necessário o seu encapsulamento em NPs. Devido à presença de grupos  $-NH_2$  e  $-OH$  na superfície da quitosana e à alta afinidade desses grupos por íons metálicos, a quitosana pode formar complexos estáveis do tipo quitosana-prata, quitosana-zinco, quitosana-manganês, quitosana-cobre (Ai, Liao, Ren, 2017). Tal como acontece nos complexos metálicos, a QT aumenta a estabilidade de pontos quânticos (PQ) com metais no núcleo e reduz a sua toxicidade. Um exemplo disso é o preparo de uma nanopartícula de QT com ácido fólico desenvolvida para o encapsulamento de DOX conjugada a um ponto quântico (PQ-DOX). A formulação mostrou maior taxa de liberação em pH ácido em comparação com o pH fisiológico normal mostrando que esse sistema poderia ser utilizado para vencer barreiras fisiológicas no tratamento de câncer e outras doenças em locais de difícil acesso (Bajwa, Mehra, Jain, Jain, 2015). Sendo que a variação de pH do meio sempre se faz acompanhar do aumento da velocidade de liberação de fármaco (Barbosa, 2013).

Não obstante, todas as vantagens apresentadas à interação entre NPs de QT e diversas moléculas pequenas como a EPI pode impulsionar a superação dos desafios decorrentes do aumento da complexidade das NPs elevando seus benefícios a um novo patamar terapêutico.

#### ***4. Dinâmica molecular***

Considerando as dificuldades que permeiam o processo de criação de medicamentos o qual pode ser muito tedioso, demorado e caro. Devemos ver os tratamentos teóricos da química medicinal como parte integrante da interdisciplinaridade necessária às pesquisas de novos medicamentos, pois, uma compreensão científica profunda impulsiona grandes descobertas, as quais por sua vez têm muito a ganhar com abordagens que combinem bases teóricas e técnicas experimentais (Sharma, 2017). A grande importância das técnicas teóricas pode ser

---

exemplificada pelo prêmio Nobel em química de 1998 concedido a John Pople e Walter Kohn, em reconhecimento às suas contribuições no desenvolvimento da química computacional. Nesse contexto a DM desponta como uma ferramenta poderosa, principalmente por ser capaz de estabelecer uma relação entre a prática e a teoria, permitir realizar experimentos que não seriam possíveis fazer de imediato no laboratório e aprofundar questões sobre a interação entre receptor e ligante a nível molecular. Métodos teóricos frequentemente adotam protocolos que acoplam a ancoragem de biopolímeros e fármacos à DM para simulação dos complexos e análise de suas propriedades ao longo da trajetória. Sendo que a predição da trajetória é feita com base nas leis do movimento de Newton (Palermo,Vivo, 2015; Wang, Zhang, Liu, Sun, 2019). Tendo por base a segunda lei de Newton para calcular a força exercida sobre cada partícula durante o intervalo em que ela se move sob a ação dessa força é possível fazer a atualização da sua posição e velocidade por meio da Equação (I) (Whang, 2012).

$$\mathbf{F}(\mathbf{r}_{(i)}) = m_i \frac{d^2 \mathbf{x}_i}{dt^2}$$

Onde,  $m_i$  representa a massa da partícula  $i$ , localizada a posição  $\mathbf{x}_i$  no instante  $t$ .

É possível calcular também a energia potencial  $V(r)$  através da Equação (II):

$$\mathbf{F} = -\frac{dV_r}{d\mathbf{r}}$$

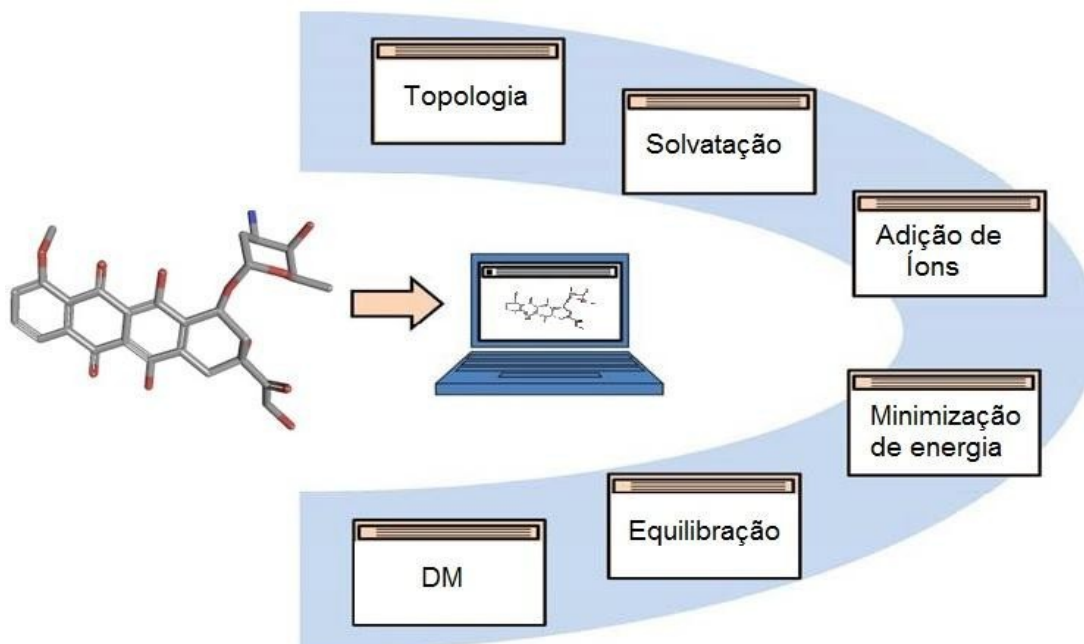
A trajetória surge através da soma de termos das equações de movimento newtonianas para as  $N$  partículas que compõem o sistema, Equação (III):

$$m_i \mathbf{a}_i = \mathbf{F}_i = \sum_{j=1, j \neq i}^N \mathbf{f}_j$$

A Figura 6 mostra os passos a serem seguidos na produção da DM de uma molécula de EPI. A sequência começa pela geração da topologia da molécula, segue para a escolha de um modelo de solvatação explícita adição de íons para neutralizar a carga do sistema, minimização de energia a qual aponta possíveis erros cometidos durante a criação da topologia, equilibração, até atingir o equilíbrio

termodinâmico, por fim a dinâmica é rodada e feita às análises para validar o modelo. O cálculo de DM aplicado pelo software GROMACS (Abraham, Hess, Spoel, 2017) tem por base a escolha de um campo de força que foi adequadamente parametrizado para descrever biomoléculas (Palermo,Vivo, 2015). Como cerca de 90% das partículas de uma DM são moléculas de água que preenchem a caixa de simulação, a escolha do modelo de solvatação explícita deve ser adequada ao campo de força escolhido já na primeira etapa da DM (Guvench, Mackerell, 2008). A este respeito, os campos de força mais aplicados para moléculas de água em sistemas biomoleculares são os modelos TIPnP (Kipper, 2013). Contudo, O resultado nunca será perfeitamente idêntico a um sistema real, pois as interações água-água reais são altamente complexas e envolvem a formação de redes de hidrogênio. De tal forma que teremos sempre uma tentativa de aproximação entre prática e teoria formando um modelo razoavelmente aceitável, dependendo da finalidade a qual se destina.

Figura 6: Esquema representando as etapas da dinâmica molecular (DM) de uma molécula de epirrubicina.



Adaptado de (Sharma, 2017).



---

#### **4.1. Modelagem molecular de quitosana**

Os trabalhos de pesquisa com química teórica e uso de DM vêm permitindo antever o impacto para as próximas décadas das NPs de QT e seus derivados repercutindo em melhorias e diversas aplicações. Um exemplo disso é dado pelo estudo por modelagem de NPs de N-octil-N-trimetil-quitosana a 310K para transporte do fármaco anti-câncer 10-hidroxycamptotecina (10-HCPT). Nesse modelo a DM ajudou a entender como a formação do complexo contribui para o aumento da solubilidade do 10-HCPT. As simulações mostraram que as contribuições de van der Waals e as forças eletrostáticas são virtualmente equivalentes para as interações não ligadas responsáveis pela formação do complexo e que as ligações de Hidrogênio tem um papel crucial na estabilização do complexo. A possibilidade de compreensão oferecida pela DM no papel das forças de ligação para a obtenção de complexos tem muito que contribuir no *design* de novas NPs para transporte de fármacos (Tayyem, Zugul, Almatarneh, 2018).

No que concerne às aplicações de QT aproveitando a sua capacidade bioadsorvente, a DM vêm abrindo o leque de possibilidade na pesquisa acadêmica. Dessa forma, a modelagem de uma QT (GA=20% e pH=6,5), para estudo de sua eficiência como adsorvente do herbicida glifosato, pode ajudar no planejamento de estratégias de tratamento de rios e seus efluentes. A metodologia de DM foi utilizada para identificar os grupos funcionais envolvidos no processo de adsorção do glifosato pela quitosana, calcular a força de interação entre essas duas moléculas, avaliar a influência do herbicida na agregação das NPs e observar diversos fenômenos relacionados a alterações estruturais de seus filamentos. Essa avaliação teórica pode servir de referencia a futuros projetos ambientais (Faria, 2015). O alto potencial quelante da QT e a sua capacidade para adsorver íons metálicos é outro foco de estudo da modelagem molecular. Assim, a metodologia da DM auxilia no entendimento de observações experimentais como a localização de sítios de interação entre os íons e a quitosana; dependencia da seletividade em relação ao pH, avaliação da influência no grau de acetilação da interação com os íons de metais pesados como  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  (Silva, 2013). Ainda com relação ao seu potencial para adsorver íons, a modelagem da CS para adsorção de íons fosfato utilizando

---

DM esclarece questões de interação entre o biopolímero e o íon. De forma análoga ao exposto para íons metálicos, os cálculos de DM se mostram muito úteis para avaliar o potencial para adsorver íons fosfato e otimizar o tratamento de hiperfosfatemia com NPs de QT (Neto, 2018). O sucesso das novas terapias depende não somente de uma boa caracterização das interações envolvidas na ação dos fármacos, mas também depende em grande parte, da elucidação de complexos mecanismos moleculares. A modelagem de NPs de quitosana permitiu descrever, usando simulações de DM, o papel dos grupos polares de fosfolípidos como o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) nas interações QT-DPPC e as interações quitosana-solvente. Foi possível obter o detalhamento das interações específicas QT-DPPC com as propriedades físico-químicas da membrana formulando um mecanismo que explique a nível molecular sua atividade biológica. Podemos concluir, nesse caso que um dos maiores méritos da caracterização por DM reside no fato da elucidação de mecanismos ser um dos maiores obstáculos o qual essa ferramenta ajuda a transpor buscando o pleno desenvolvimento de NPs para aplicações em nanomedicina (Cunha, 2013). Como exposto para íons e pequenas moléculas em geral, devemos esperar que as propriedades inerentes à QT e as ferramentas oferecidas pela DM sejam aproveitadas de forma promissora na modelagem de nanopartículas de QT para adsorção de EPI.

#### ***4.2. Modelagem molecular com antraciclina***

Nos últimos anos, as simulações de DM tem sido amplamente utilizada para estudar NPs de grande interesse medicinal. Na modelagem molecular de antraciclinas, a DM vem auxiliando na elucidação de mecanismos e no planejamento de sistemas inteligentes para a administração de fármacos. Podemos citar como exemplo a simulação de 10 sistemas para investigação do mecanismo de formação do complexo de DOX com um oligossacarídeo quitosana hidrofobicamente modificada. As NPs foram modeladas ligando 10 ácidos graxos diferentes à quitosana. As características estruturais desses ácidos graxos como comprimento da cadeia, aromaticidade, presença de anel não aromático e instaurações conduziram à

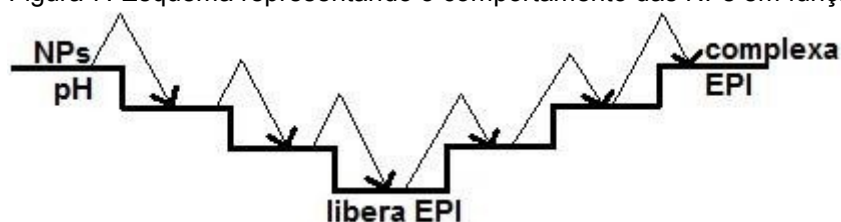
---

relação entre eficiência de encapsulamento e propriedades estruturais. O filme da DM revelou também a ocorrência de fenômenos raros como o enrolamento da cadeia do oligossacarídeo sobre a quitosana, o qual depende da estrutura de cadeia longa muito flexível do ácido graxo ligado à NPs. Bem como, o fenômeno de ocorrência de interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  através de anéis aromáticos das moléculas de DOX e do ácido graxo conectado ao oligossacarídeo quitosana. Além disso, os resultados obtidos pela análise no GROMACS foram comparados a dados experimentais e a dados disponíveis na literatura melhorando a confiabilidade dos resultados e estabelecendo uma relação intrínseca entre prática e teoria (Shan, Shen, Xu, Shi, 2014). Outro mecanismo citado pela literatura, aborda a modelagem de um decâmero de QT e uma molécula de DOX para investigação da forma como a QT interage com a DOX a diferentes estados de protonação. A DOX foi modelada de duas formas, com o grupo amino do seu anel açúcar no estado protonado e no estado desprotonado. O tratamento dessa simulação se destaca pela racionalização da interação entre a QT e a DOX, em função da variação do pH do meio. Através da análise da trajetória de 200 ns de simulação do complexo quitosana-doxorrubicina, QT-DOX, ficou notório como a repulsão eletrostática entre a DOX com carga (+1) e a QT aumenta à medida que a QT é protonada para reproduzir os valores de pH (9,5; 7,1; 6,5). Ao passo que, simulações de 100 ns da DOX sem QT confirmaram a tendência da DOX a se agregar. Portanto, a DM foi um instrumento essencial para a caracterização das interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , novamente envolvendo dois anéis aromáticos, sendo agora ambos de moléculas de DOX, causando a agregação do fármaco. O aprofundamento dessas análises culminou num mecanismo de adsorção, explicando que o aumento da tendência da DOX em se aglomerar cresce em pH ácido e a solubilidade da QT também aumenta nesse meio consequentemente, o complexo tende a se desfazer e ocorre a liberação controlada de DOX (Li, Ying, Ren, Dai, 2020). Outra pesquisa que reforça essa observação envolve um sistema muito avançado de NPs com moléculas conjugadas. Sabemos, por exemplo, que nanotubos de carbono podem ser usados para transportar DOX, porém, a baixa solubilidade dessas NPs prejudica sua administração terapêutica. Não obstante, muitas propriedades da QT dependem do seu estado de protonação, tais como a dispersão, a solubilidade e a capacidade de adsorção de moléculas pequenas. Portanto, o *design* de uma nanopartícula de QT conjugada a nanotubo de

---

carbono para transporte de DOX é uma estratégia que melhora a solubilidade do fármaco em meio fisiológico. Para entender como sistemas complexos como esse podem auxiliar no transporte e liberação de fármacos sensíveis à variação de pH, foi feito o estudo por DM de um nanotubo de carbono funcionalizado com QT para o encapsulamento de DOX. O auge desse estudo é a elaboração de um modelo mostrando que a força de interação entre a DOX e a NPs é forte a pH fisiológico (pH=7,4) e diminui à medida que o meio se torna ácido, mostrando como a repulsão de cargas aciona a liberação (Rungrun, Rungratmongkol, Poo-arporn, 2016). O comportamento das NPs em diferentes valores de pH está esquematizado na Figura 7, conforme a revisão literária, é possível concluir que descendo a escala de pH as NPs liberam EPI, enquanto subindo a escala de pH o complexo, QT-EPI se torna mais estável. Reportando à versatilidade da DM para combinar prática e teoria, citamos a modelagem molecular de doxorubicina e de N-trifluoracetato de doxorubicina (FDOX) no estudo do encapsulamento em QT. A DM serviu de suporte às análises experimentais dos complexos, QT-DOX e QT-FDOX. Assim, foi possível reconhecer diferenças determinantes na eficiência de encapsulamento encontrando os principais sítios de interação entre a QT e cada fármaco, determinando a influência do tamanho da NPs e a forma como os contatos entre a QT e a DOX ocorrem. Tendo sido constatado que as interações hidrofóbicas se dão entre o grupo amino protonado da QT e o fármaco, enquanto as interações hidrofílicas envolvem principalmente grupos hidroxila, amina desprotonada e amida da QT. Consequentemente, a natureza hidrofóbica das interações entre a DOX e a QT nos complexos, QT-DOX, aparecem como principal fator de estabilidade do sistema, enquanto o contato entre a FDOX e a QT ocorre sobretudo por ligação de Hidrogênio (Sanyakamdhorn, Agudelo, Tajmir-Riahi, 2013). Uma vez que a EPI é um epímero da DOX os trabalhos de modelagem de complexos, QT-DOX formam uma referência essencial na modelagem da EPI e estudo da interação QT-EPI.

Figura 7: Esquema representando o comportamento das NPs em função do pH.



Fonte: Autor.

### **4.3. Complexos reais quitosana-epirrubicina**

A caracterização da interação do complexo, QT-EPI, é difícil, pois, polissacarídeos como a quitosana têm a cadeia muito flexível e alterações químicas do meio provocam variações conformacionais das moléculas. Além disso, a revisão literária sobre modelagem molecular de complexos, QT-antraciclina, leva a crer que a alta densidade de carga da QT e a protonação do grupo amino da EPI em condições ácidas, pode provocar uma repulsão entre elas destruindo o complexo. Portanto, conhecer os estudos de alguns sistemas reais, QT-EPI, pode ajudar a definir melhor as diretrizes das análises por DM. Há estudos visando aproveitar as propriedades paramagnéticas do óxido de ferro e a sensibilidade da quitosana à variação de pH, no desenvolvimento de NPs superparamagnéticas as quais podem servir como agente de contraste em ressonância magnética (Yadollahpour, Asl, Rashidi, 2017), terapia de hipertermia (Rego, Mamani, Souza, Nucci, 2019), diagnóstico por imagem (Chandola, Casteleijn, Kalme, Urtti, 2016) e entrega controlada de fármaco para tratamento de tumores (Bidram, Esmaeili, Ranji-Burachaloo, Al-Zaubai, 2019). Entre estes, a caracterização experimental de NPs de óxido de ferro funcionalizadas com quitosana (QT-SPIONPs) para administração de Epirubicina mostrou que a EPI foi conjugada à QT-SPIONPs através de grupos imina ( $-C=N-$ ). Sendo que essas ligações são rompidas a pH ácido (4,4-6,4) facilitando a liberação do fármaco. Os ensaios de libertação controlada do fármaco a vários pHs, mostraram que a taxa de liberação da EPI pelas QT-SPIONPs aumenta quando o pH decrescente. Tendo sido liberada 94,06% da EPI a pH 4,6 conferindo com a acidez de organelas como os endossomos/lisossomos (Hao, Liu, Shang,

---

Zhang, 2016). Outro fator importante para a liberação da EPI foi a flexibilidade conformacional da QT (Nalluri, Popuri, Lee, Terbish, 2020).

Lembrando que, além de ser muito utilizada no tratamento de diversas categorias de tumores, a EPI é o quimioterápico mais utilizado no tratamento de carcinoma hepatocelular (HCC) (Zhang, Ding, Lv, Xu, 2015). As preocupações geradas por essa doença inspiraram a criação NPs que assegurem uma melhor eficácia do agente quimioterápico, EPI. A lógica é a mesma para entrega de fármacos em locais específicos, em geral, estando fundamentada na ligação de moléculas específicas à superfície das NPs (Yoo, Park, Yi, Lee, 2019) e no fato da utilização da asialofetuina vir sendo feita em lipossomas catiônicos para a entrega de genes hepatócitos (Motoyama, Nakashima, Aramaki, Hirayama, 2010). Nesse contexto, foi elaborada uma estratégia para uso de uma NPs de quitosana com polietilenoglicol, QT-PLGA conjugadas a asialofetuina, NPs-EPI, específica para os hepatócitos. Os desafios do grupo consistiam em preparar a EPI para uma absorção seletiva e reduzir a cardiotoxicidade do fármaco utilizando um antioxidante natural como a QT. Eles conseguiram preparar NPs que liberam 55% da EPI nas primeiras 6h, passando a um perfil de liberação lenta com duração de 3 dias. Esta dupla função do encapsulamento da EPI melhorando a atividade antitumoral e o perfil de liberação resultou na completa inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares, sendo necessário, contudo melhorar os resultados para a redução da toxicidade da EPI (Nasr, Nafee, Saad, Kazem, 2014). Em outro estudo, a QT foi modificada por uma molécula de colesterol anfifílico, 6-N-colesterol, formando NPs esféricas para transporte de moléculas hidrofóbicas. A estrutura das NPs foi constituída por moléculas de colesterol que se ligaram de modo a formar microdomínios hidrofóbicos no centro com moléculas de QT ao redor constituindo uma concha hidrofílica, a estabilidade da estrutura foi promovida tanto por ligações de Hidrogênio intermoleculares quanto intramoleculares. A taxa de liberação de EPI pelas NPs diminuiu quando o pH do meio de dissolução aumentou, devido à menor solubilidade da EPI e falta de grupos (-NH<sub>2</sub>) protonados na QT, sendo maior a taxa a (pH=5,5) do que a (pH=6,5) e caindo mais a (pH=7,4) (Mateescu, Ispas-Szabo, Assaad, 2015), o que reforça a já citada alta sensibilidade da QT à variação de pH.

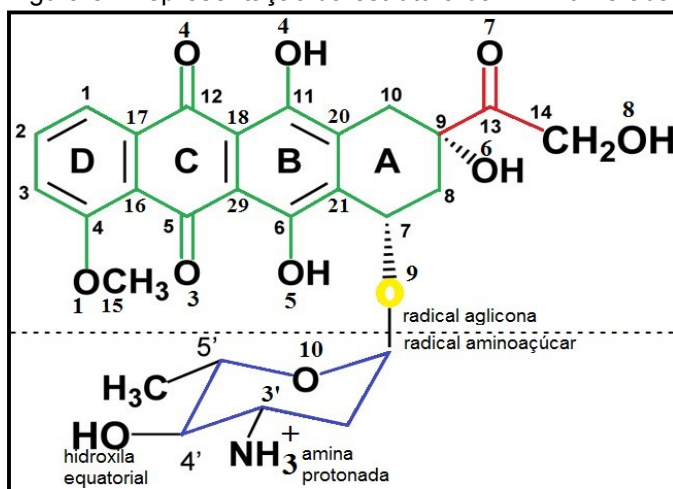
## 5. Metodologia

### 5.1 Estrutura inicial das moléculas

Foi feita a escolha do campo de força OPLS-AA (Jorgensen, Tirado-Rives, 2005) para gerar a topologia da estrutura das moléculas de epirrubicina e quitosana. Essa escolha teve em vista o detalhamento a nível atômico do comportamento dos sistemas modelados, já que a opção (AA), átomos separados, oferece maiores possibilidades para o estudo da interação entre as moléculas do que a opção (UA), átomos unidos e sendo o OPLS um campo de força robusto citado nas referências para a simulação dessas moléculas, o que se reflete sobre a confiabilidade dos resultados.

A estrutura da EPI é formada por um radical aglicona constituído por um sistema tetracíclico muito rígido, um grupo ( $\text{OCH}_3$ ) e uma ramificação hidrofílica flexível. O radical aglicona está ligado a um radical aminoaçúcar flexível e hidrofílico, através do oxigênio de um grupo éter. A numeração dos átomos da EPI em discussão nesse trabalho e as partes que compõe a estrutura da molécula podem ser consultadas na Figura 8. Essa numeração é a mesma mencionada nos resultados.

Figura 8.: Representação da estrutura da EPI numerada.



Adaptada de (Salvatorelli, Menna, Surapaneni, et. al. 2012).

---

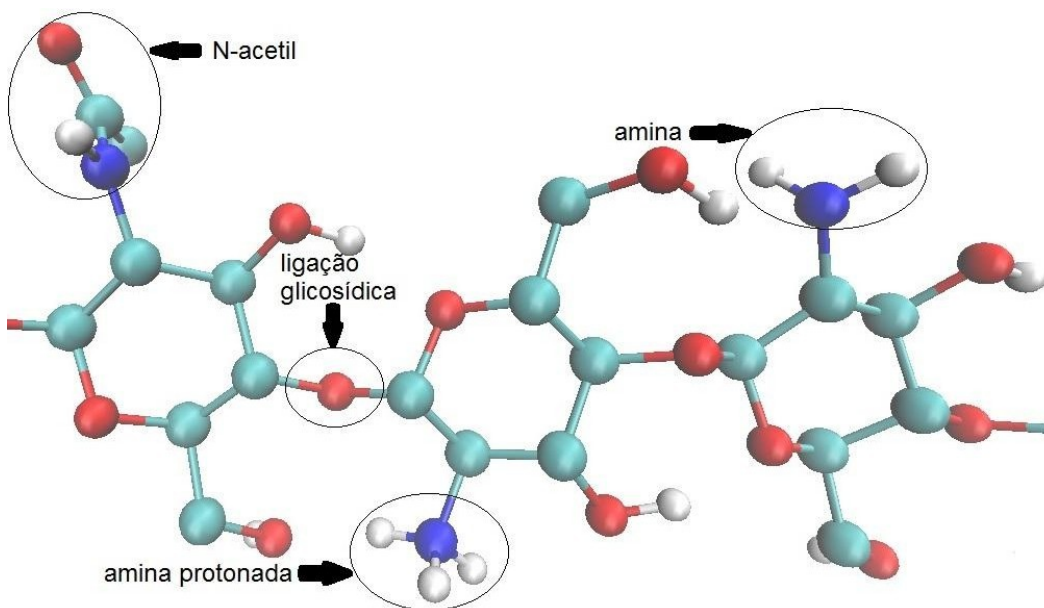
As cores da estrutura da Figura 8 indicam a anel tetracíclico (verde), a cadeia hidrofílica (vermelha), o heteroátomo (amarelo) que liga os dois radicais e o anel açúcar (azul).

O arquivo PDB da EPI foi obtido no programa *HyperChem* versão 7.51 (Microsoft, 1996; Getting Stared 2002). Toda a topologia foi calibrada para o campo de força OPLS-AA e os parâmetros inseridos estão disponíveis nos arquivos do campo de força de tal forma que foram feitas atribuições aos grupos de átomos da EPI por comparação ao banco de dados do campo de força.

Visando obter a estrutura inicial da quitosana, foi utilizado o programa GABEDIT versão 2.4.8 (Allouche, 2011). Sendo o decâmero de QT assim obtido composto por seis diferentes categorias de resíduos e modelado no campo de força OPLS-AA. Os resíduos desprotonados receberam os códigos NGUO, NGLU, NGUC, enquanto os resíduos protonados foram identificados pelos códigos NGPC, NGLP, NGPO. Após a inserção dos parâmetros de topologia (ligações, químicas, ângulos, ângulos diedrais e cargas) ter sido adicionada no OPLS-AA foram realizados simulações com a QT no vácuo e em solução aquosa para a validação dos novos parâmetros topológicos, utilizando o programa GROMACS versão 5.0.1 (Abraham, 2015). Assim sendo, a QT foi validada com base nos resultados energéticos e estruturais obtidos durante o trabalho de Neto, 2018. A estrutura obtida representa a QT a pH 6,5, (G.A)=20%, grupos amino 50% protonados. Além da presença da ligação glicosídica e dos grupos N-acetil, os resíduos centrais da QT se diferem quanto ao grupo amino que pode ser protonado ou deprotonado como mostra a Fig 9.



Figura 9.: Estrutura da QT utilizada nas simulações com destaque para os grupos N-acetil, amina, amina protonada e ligação glicosídica, (representação CPK , utilizando programa VMD).



### 5.1.1 Otimização da Estrutura da EPI

A epirrubicina foi otimizada usando o software ORCA 3.0.3 (Neese, 2012) utilizando o modelo teórico, Hartree-Fock (HF) (Slater, 1950), 6-31G\*. O protocolo teve por referência uma estrutura da doxorrubicina otimizada pelo método Ab initio, HF, na base 6-31 G de acordo com a referencia literária (Pirawattana, 2008).

### 5.1.2 Determinação da carga RESP

A distribuição de cargas da epirrubicina foi obtida pelo método RESP (Restrained Eletrostatic Potential) (Cornell, Cieplak, Bayly, 1993) com aproximação em dois níveis de cálculos quânticos e foi utilizado o pacote computacional NWCHEM (versão 6.6) (Valiev, Bylaska, Govind, 2010). Esse método se baseou no cálculo de cargas RESP de estruturas similares encontradas na literatura para as quais se utilizou o cálculo HF (Slater, 1950) e DFT (Hohenberg, Kohn, 1954). Dessa forma, o primeiro nível de cálculo quântico utilizado foi o HF (Hartree-Fock), sem correlação eletrônica e o segundo nível de cálculo foi o DFT com correlação

eletrônica. Para a metodologia HF foi utilizada a função de base 6-31 G\*(Petersson, Bennett, Tensfeldt et. al., 1988), enquanto o método DFT utilizou base B3LYP (Yanai, Tew, Hady, 2004) com polarização (Rahimi, Bahlake, Chamani, 2012). A Figura 10 mostra a atribuição de cargas para os grupos idênticos. Foi necessário definir três diedros impróprios os quais estão descritos na Tabela 3.

Figura 10: Estrutura da EPI otimizada destacando as cargas RESP dos átomos de hidrogênio.

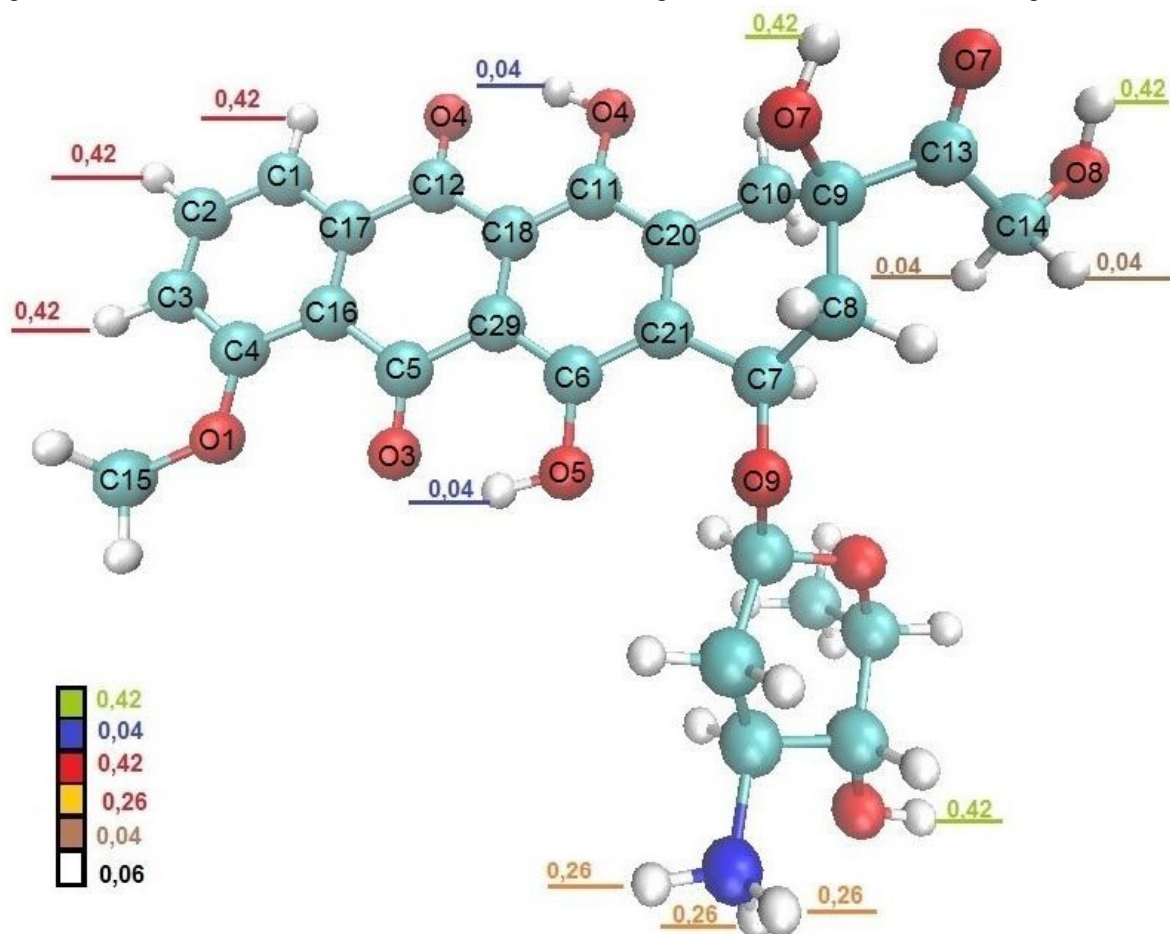


Tabela 3: Diedros impróprios definidos para a EPI.

| Diedros impróprios |     |     |     |
|--------------------|-----|-----|-----|
| O7                 | C13 | C9  | C10 |
| O3                 | C5  | C16 | C4  |
| O4                 | C12 | C17 | C1  |

---

A Tabela 3 mostra os diedros impróprios que foram utilizados no cálculo de cargas RESP da EPI, sendo o primeiro (O7 C13 C9 C10) para a extremidade da cadeia ramificação do grupo quinona e os outros dois (O3 C5 C16 C4) e (O4 C12 C17 C1) para átomos do sistema tetracíclico.

O cálculo de cargas RESP da QT foi feito pelo método DFT e função de base 6-31 G\*, utilizando o funcional B3LYP. Atribuindo, contudo, o mesmo valor de carga aos grupos idênticos para evitar efeitos geométricos que pudessem afetar o campo de força como reporta Neto, 2018.

### **5.1.3 Protonação da EPI**

De modo a avaliar a resposta da epirrubicina a diferentes valores de pH e planejar um mecanismo de acionamento apropriado ao meio ácido, foi utilizado o programa MARVINSKETCH (versão: 6.2.3) (CHEMAXON, 2014) para cálculo do pKa da EPI. A varredura foi feita na faixa de pH de 0 a 14. O programa MARVINSKETCH pertence ao pacote MarvinBeans (2014) da empresa CHEMAXON e segue as regras da IUPAC. Ele pode ser usado na predição de diversas propriedades físico-químicas das substâncias que influenciam diretamente na adsorção de fármacos como cálculo de pKa, massa molecular, área superficial polar entre outros parâmetros físico-químicos.

Os cálculos de pKa tiveram em vista estudar os estados de protonação do fármaco a diferentes valores de pH. Os resultados dos cálculos foram comparados a valores da literatura de modo a melhor ajustar a representação teórica do equilíbrio poliprótico da EPI à realidade.

## **5.2 Ancoragem molecular**

Foi realizado o atracamento molecular entre a QT e a EPI com o objetivo de avaliar a energia de interação e a constante de afinidade entre a macromolécula e o ligante. Foi utilizado o algoritmo genético Lamarckiano na busca da melhor energia de interação. Usando o ligante e a macromolécula no formato PDB, foi obtido o input (PDBQT) no programa autodock 4.2 (licença 4.2.6) (Morris, Huey, Lindstrom, 2009)

---

com as coordenadas necessárias para a execução do autodock 4.2 (Ravi, 2016) e autogrid 4.2 (Marzaro, 2014). Toda QT foi tratada como rígida e toda a EPI foi tratada como flexível. O tamanho da caixa de simulação localizada no centro do decamer de QT foi 90X68X126, as coordenadas-xyz centrais do grid são 33.257, 30.727, 37.291, o espaçamento entre os pontos do grid é de 0.497 Å e a caixa foi colocada em toda a região de domínio da quitosana. O número da população para todos os cálculos de atracamento foi de 100 e o número máximo de avaliações foi de 2500000. O programa gerou 10740 poses aleatórias das quais as 10 poses de menor energia foram dispostas num rank em ordem de menor energia com a respectiva constante de afinidade. A fim de obter os resultados das análises em triplicata, as três poses de menor energia foram escolhidas para representar o complexo quitosana-epirrubicina (QT-EPI) e validação no GROMACS.

### ***5.3 Simulação por dinâmica molecular da EPI na forma livre***

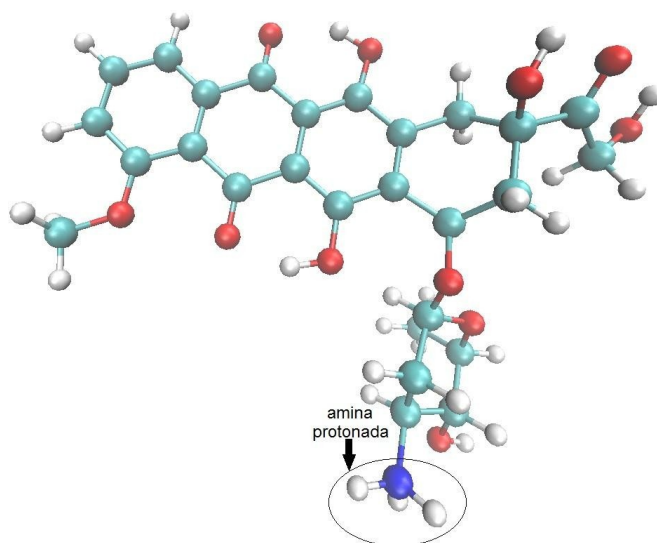
A estrutura da epirrubicina modelada nesse trabalho é mostrada na Figura 11, as setas indicam os átomos passíveis de formar interação de hidrogênio com a quitosana. Estruturalmente, o cloridrato de epirrubicina, sal cloridrato 4'-epi isômero do antibiótico antineoplásico doxorubicina tem o grupo amino protonado circulado e indicado pela seta azul, enquanto as setas verdes indicam átomos de oxigênio. A EPI foi neutralizada com íons cloreto e solvatada através de solvatação explícita, TIP4P, escolhida por oferecer a melhor distribuição eletrostática de carga com um custo computacional menor que o modelo TIP5P. O número de moléculas de solvente, carga das moléculas, número de átomos totais do sistema e o tempo de simulação pode ser vista na Tabela 4. As demais especificações do sistema simulado foram dadas anteriormente ao se tratar da descrição comum a todos os sistemas simulados.

Tabela 4: Sistema simulado, epirrubicina aquosa na forma livre (EPI).

| Sistema simulado | Nº moléculas do solvente | Carga total | Nº átomos | Tempo de simulação (ns) |
|------------------|--------------------------|-------------|-----------|-------------------------|
| EPI              | 16439                    | 1+          | 69        | 100                     |

---

Figura 11.: Estrutura da epirrubicina utilizada nas simulações (310K) com o grupo amino protonado circulado, (representação CPK , utilizando programa VMD).



A DM da EPI no vácuo foi realizada para verificar a estabilidade do composto no campo de força OPLS-AA. A comparação entre a EPI e conformômeros da referência literária foi feita após a dinâmica de 100 ns, utilizando o programa *HyperChem* versão 7.51. Os arquivos PDB das estruturas utilizadas na sobreposição foram baixados do Protein Data Bank (RCSB PDB) sob o código, EPI-1 (1qda) (Podell, Harrington, Taatjes, Koch, 1999), EPI-2 (1d15) (Williams, Williams, Ughetto, Rich , 1990).

#### **5.4 Simulação dos complexos(QT-EPI)**

Após a modelagem das moléculas em sua forma livre, foi dado prosseguimento à obtenção do complexo QT-EPI usando os arquivos PDB obtidos por ancoragem para descrever os sistemas (S1, S2, S3) formados por um filamento de QT finita e uma molécula de EPI. A fim de aprofundar os resultados da análise dos sistemas em que as moléculas se apresetam na proporção (1:1), foi descrito também um sistema formado por 4 filamentos de QT e uma molécula de EPI, denominado (S4). Esse último sistema foi desenhado no programa NWCHEM (versão 6.6) a partir do PDB do sistema (S1) o qual foi escolhido por ser o de menor energia e por permitir analisar com mais clareza a estabilidade do modelo proposto.

---

As simulações dos sistemas (S1, S2, S3, S4) foram realizadas através do pacote computacional GROMACS 2016.4 (Abraham, Hess, 2017) o qual vem com o campo de força OPLS-AA utilizado para descrever o potencial das estruturas da QT e da EPI. A posição inicial das moléculas de QT e EPI no arquivo PDB nesses três sistemas pode ser vista nas Figuras 12, 13 e 14 (VMD), contudo, é preciso ter em vista que se trata de um resultado aleatório, enquanto um sistema real é muito mais complexo tanto por estar sujeito a um número muito grande de interferentes quanto por compreender uma quantidade de moléculas acima da ordem de um mol.

Figura 12.: O primeiro sistema simulado (S-1), segundo o arquivo PDB da pose de menor energia da ancoragem molecular (representação Licorice , utilizando programa VMD).

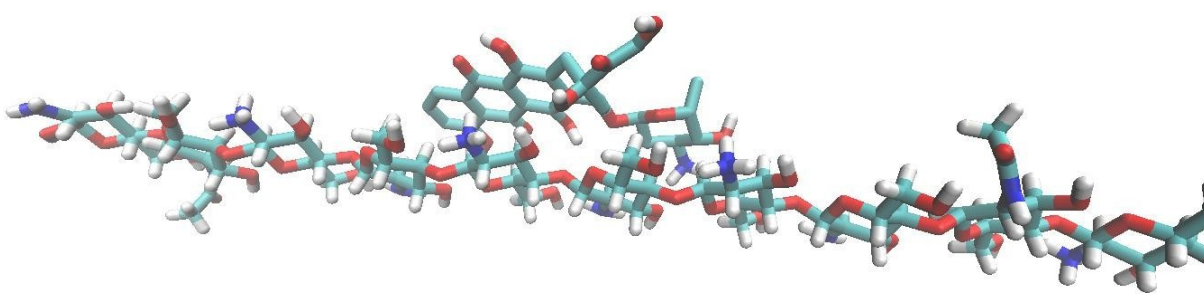
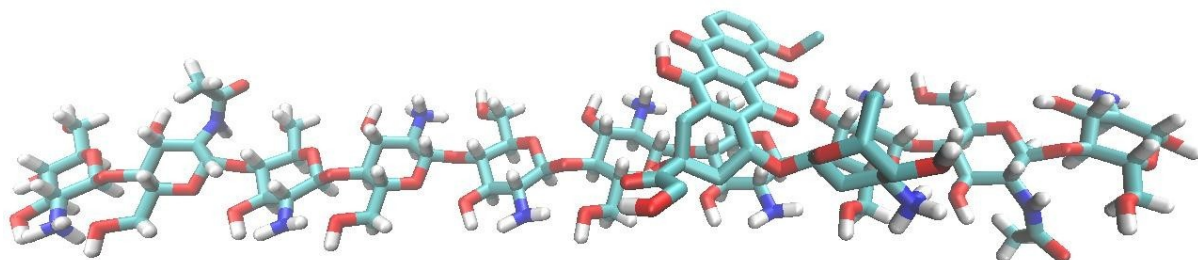
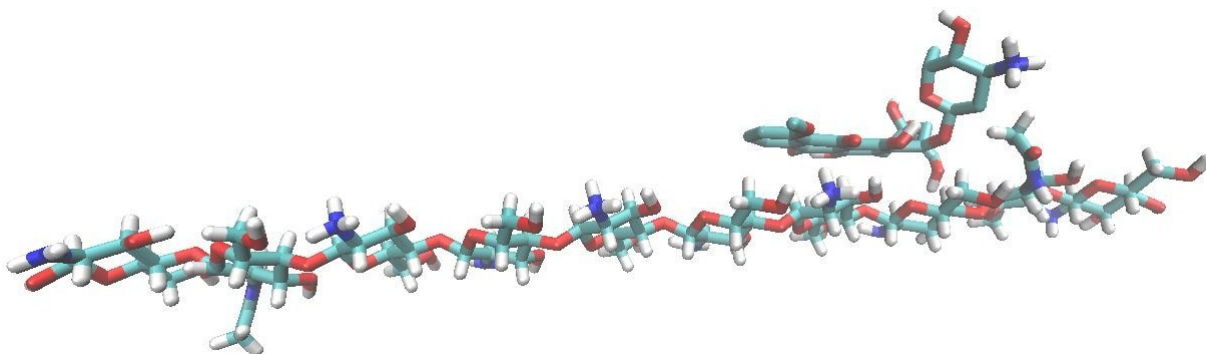


Figura 13.: O segundo sistema simulado (S-2), obtido do arquivo PDB da segunda classificação no ranking de energia da ancoragem molecular (representação Licorice , utilizando programa VMD).



---

Figura 14.: O terceiro sistema simulado (S-3), obtido do arquivo PDB da terceira classificação no ranking de energia da ancoragem molecular (representação Licorice, utilizando programa VMD).



Seguindo as etapas de preparo da dinâmica, foi definida a caixa de simulação cúbica de 5 nm de aresta. A caixa foi preenchida com água usando o modelo TIP4P. Foi utilizado o integrador md utilizando condições periódicas de contorno nas direções x, y e z.

A estrutura foi relaxada durante a minimização feita com o algoritmo steepest descent com um número máximo de 50000 passos de integração ou uma força máxima de  $1.000 \text{ KJ mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$ . O raio de corte utilizando algoritmo *Verlet* foi de 1.0 nm. Para evitar que o sistema entre em colapso durante a dinâmica final, foi realizada a equilibração. A primeira etapa da equilibração aplicou o ensemble canônico (NVT), acoplando o sistema ao termostato *de V-rescale* (Bussi, Donadio, 2007) com tempo de relaxação de 0.1ps. As equilibrações foram a 50K, 150k e 310K. A segunda etapa da equilibração aplicou o ensemble isotérmico-isobárico (NPT) à pressão de 1bar. Nessa segunda etapa o sistema foi acoplado ao barostado de Parrinello-Rahman via escalonamento isotrópico com tempo de relaxação de 2.0 ps. O algoritmo *LeapFrog* (Hockney, Goel, Eastwood, 1974) com intervalo de integração de 2 fs foi utilizado em ambas as etapas da equilibração. As restrições de posições foram feitas com o algoritmo LINCS (Hess, 1997). As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo algoritmo PME (Particle Mesh Ewald) (Darden, York, 2012).

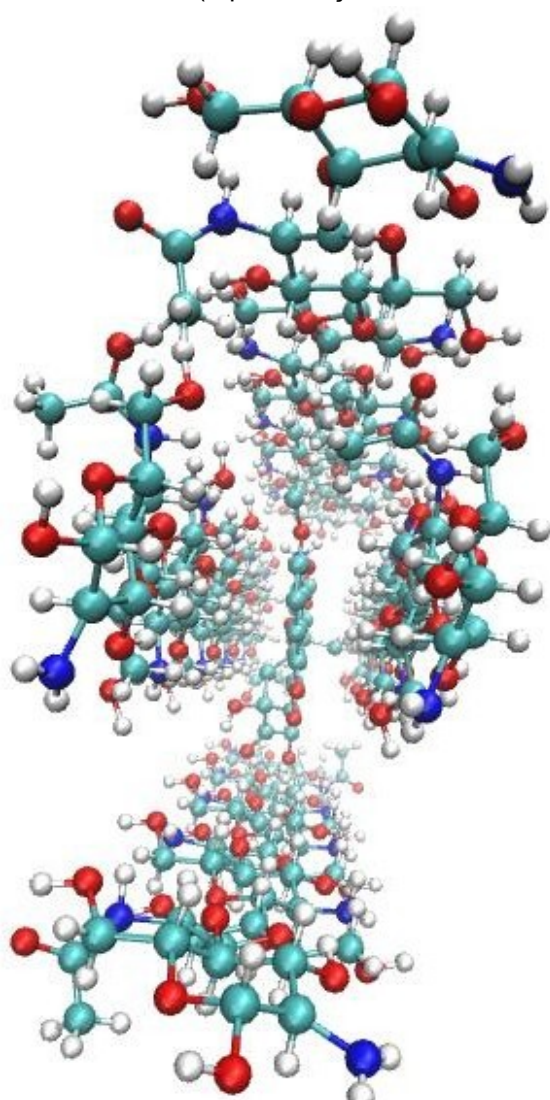
A quantidade de íons adicionada, o número de moléculas do solvente e o tempo de simulação dos sistemas podem ser vista na Tabela 5.



Tabela 5: Sistemas aquosos simulados (S-1, S-2, S-3, S-4)

| Sistema | Nº moléculas do solvente | Íons Cl | Nº átomos | Tempo de simulação (ns) |
|---------|--------------------------|---------|-----------|-------------------------|
| S-1     | 15223                    | 5       | 16463     | 20                      |
| S-2     | 14594                    | 5       | 16463     | 20                      |
| S-3     | 16127                    | 5       | 16463     | 20                      |
| S-4     | 21430                    | 17      | 6836      | 100                     |

Figura 15.: O sistema (S-4) no qual há quatro filamentos de quitosana ao redor da molécula de epirrubicina (representação CPK, utilizando programa VMD).





O modelo no qual a QT e a EPI seguiram a proporção de (4:1), (S4), é mostrado na Figura 15, onde colocamos quatro replicas do decâmero de QT diametralmente opostas ao redor da EPI.

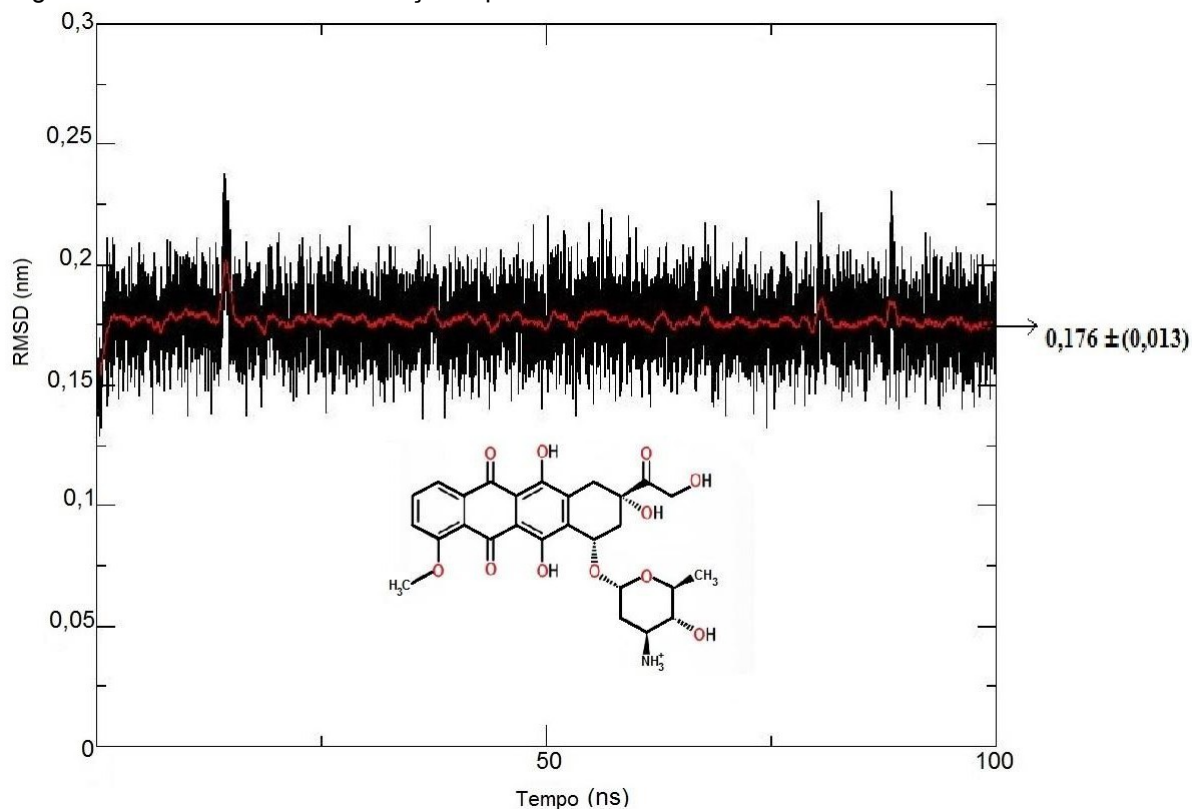
Ao final da simulação as análises permitiram discutir a interação entre a EPI e a QT no modelo proposto.

## 6 Resultados e discussão

### 6.1 Análise de RMSD da EPI

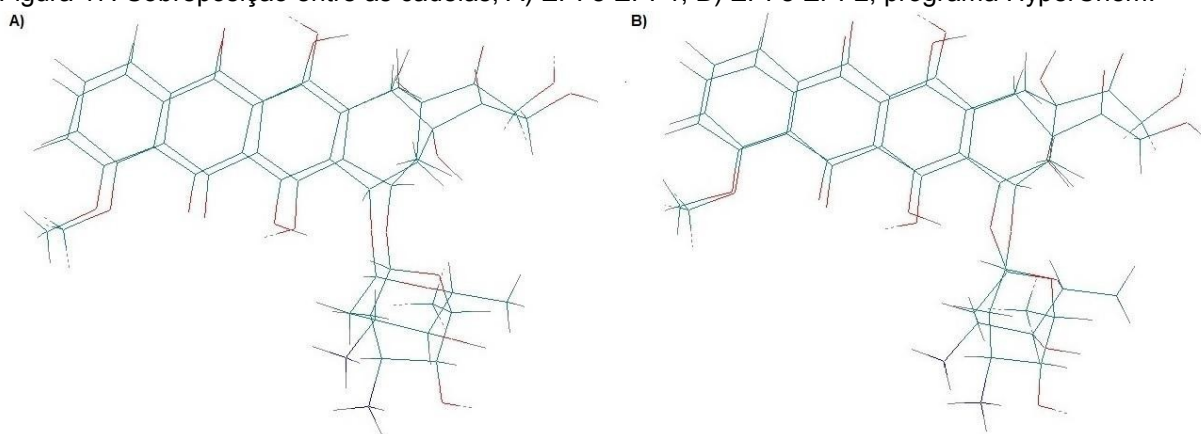
O cálculo da raiz quadrada do desvio quadrático médio das distâncias entre os átomos da EPI no campo de força OPLS-AA permitiu analisar a estabilidade estrutural dessa molécula para fins de modelagem de um complexo QT-EPI.

Figura 16.: RMSD da EPI em solução aquosa contendo íons cloreto.



De acordo com a Figura 16, a EPI em solução aquosa apresentou baixa mobilidade estrutural além de uma leve e sistemática flutuação para as medidas de RMSD em torno de 0,176 nm ( $\pm 0,013$ ), o que demonstra a estabilidade conformacional da EPI em solução aquosa durante a dinâmica. Embora esse resultado mostre que a EPI modelada nesse trabalho é muito estável, podemos ver através da imagem da molécula na Figura 17 que ela não é formada exclusivamente por partes rígidas, sendo esperado que sofra variações conformacionais ao interagir com outras moléculas. Essa flexibilidade estrutural influencia muito o comportamento biológico da molécula e foi constatada ao sobrepormos a estrutura da EPI as duas epirrubicinas da referência literária as quais encontravam se ligadas às bases do DNA.

Figura 17: Sobreposição entre as cadeias, A) EPI e EPI-1, B) EPI e EPI-2, programa HyperChem.

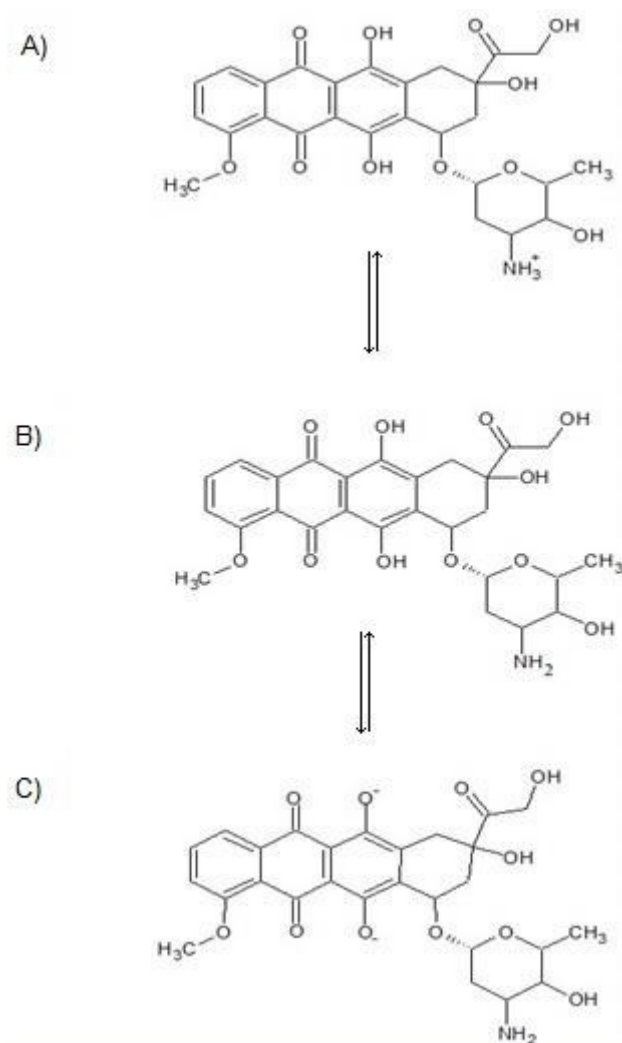


A Figura 17 mostra; A) a sobreposição entre a EPI modelada e a EPI-1, enquanto em B) aparece a sobreposição entre a EPI e a EPI-2. Embora todas as estruturas sobrepostas sejam epirrubicina há uma significativa flexibilidade estrutural na molécula, de modo que a diferença de RMSD entre EPI e EPI-1 foi de 1,34 (Å), entre EPI e EPI-2 foi de 1,37 (Å). Diante desses resultados, podemos descrever a estrutura modelada como estável, porém, constituída de partes flexíveis, além do característico sistema tetracíclico, o qual justifica em boa parte as semelhanças entre os conformômeros.

## 6.2 Estudo da estrutura da EPI em função do pH

A estrutura da EPI é muito sensível à variação de pH do meio o que leva às variações conformacionais. Uma vez que as variações estruturais se refletem sobre as propriedades físico-químicas é importante conhecer o estado de protonação da EPI, dentro da faixa de pH que se pretende trabalhar. As espécies majoritárias obtidas através das curvas de microespécies da EPI foram identificadas e relacionadas entre si no esquema representativo do equilíbrio poliprótico da EPI, Figura 18, a fim de prever as mudanças estruturais no meio a qual confere com cálculos da literatura (Rocha et. al., 2014).

Figura 18: Esquema representativo do equilíbrio de protonação da EPI. A) Espécie majoritária em  $\text{pH} < 7,4$ . B) Espécie majoritária em  $\text{pH} = 9$  C) Espécie majoritária em  $\text{pH} = 10$ .



---

Em condições fortemente básicas o grupo fenol do cromóforo (hidrofóbico) fica desprotonado, a espécie **C** é a majoritária predominando em pH=10,0. Enquanto em pH=9,0 a espécie majoritária é neutra e poderia estar presente em porções finais do intestino delgado (pH 8,0 a 9,4). À medida que a acidez do meio aumenta, prevalece a espécie com porção aminoglicosídica (hidrofílica) carregada positivamente devido à protonação do grupo amino. Em pH≤5,0; característico dos tecidos tumorais, praticamente todas as moléculas de EPI assumem a forma da estrutura (A). A posição dos hidrogênios ácidos corresponde à prevista pela literatura, quando comparada ao isômero DOX. A elaboração do esquema representativo do equilíbrio poliprótico da EPI concorda bem conhecida versatilidade estrutural da droga capaz de responder à variação de pH do meio sendo ideal para uso em liberação sensível à variação de pH. Além de oferecer a possibilidade de potencializar seus efeitos terapêuticos. Esses dados são importantes para orientar quanto a melhor forma de administração do fármaco e com base nesses estudos optamos por usar a EPI na forma da estrutura (A) por ser a encontrada no meio ambiente tumoral.

### ***6.3 Análise da ancoragem molecular***

O estudo da ancoragem molecular teve em vista selecionar as poses mais exergônicas através do menor valor de energia livre de ligação para obter os arquivos de input da dinâmica molecular. O resultado da ancoragem pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6: Ranck de energia da ancoragem molecular e constante de inibição.

| Poses em<br>ordem de energia | Energia de Interação<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) | Constante de inibição<br>Ki (mM) |
|------------------------------|---|----------------------------------|
| 1                            | -4,15   | 0,911                            |
| 2                            | -3,38   | 3,32                             |
| 3                            | -2,99   | 6,42                             |
| 4                            | -2,50   | 14,75                            |
| 5                            | -2,40   | 17,28                            |
| 6                            | -2,27   | 21,85                            |
| 7                            | -2,15   | 26,55                            |
| 8                            | -1,99   | 34,63                            |
| 9                            | -1,86   | 43,18                            |
| 10                           | -1,73   | 54,32                            |

Conforme esses resultados foram possíveis organizar as 10 conformações de menor energia em um ranck com a energia de interação e a constante de inibição de cada pose. Os valores da constante de inibição (Ki) que retrata a afinidade da QT pela EPI não foram muito significativos, por isso, escolhemos as poses 1, 2 e 3 para caracterizar o complexo por serem as de mais baixa energia e por visarmos à modelagem de sistema estáveis. Entretanto, uma vez que esse é um resultado aleatório, a caracterização da estabilidade desses complexos e da forma como a QT interage com a EPI foi feita através da análise da simulação realizada no programa GROMACS.

#### **6.4 Análise da energia total dos sistemas**

O balanço das forças atrativas e repulsivas sobre o sistema foi investigado através da análise da energia de Coulomb e Lennard Jones, onde um aumento na energia foi atribuído à repulsão e uma diminuição na energia foi atribuído à atração entre o ligante e a macromolécula. A Tabela 7 traz os dados da energia de Coulomb e Lennard Jones para análise da estabilidade dos sistemas (S1,S2,S3).

Tabela 7: Valores médios e desvio padrão da energia das contribuições de Coulomb e energia de Lennard-Jones para a energia total do sistema contendo QT e EPI na proporção de (1:1) sistemas, S-1, S-2, S-3.

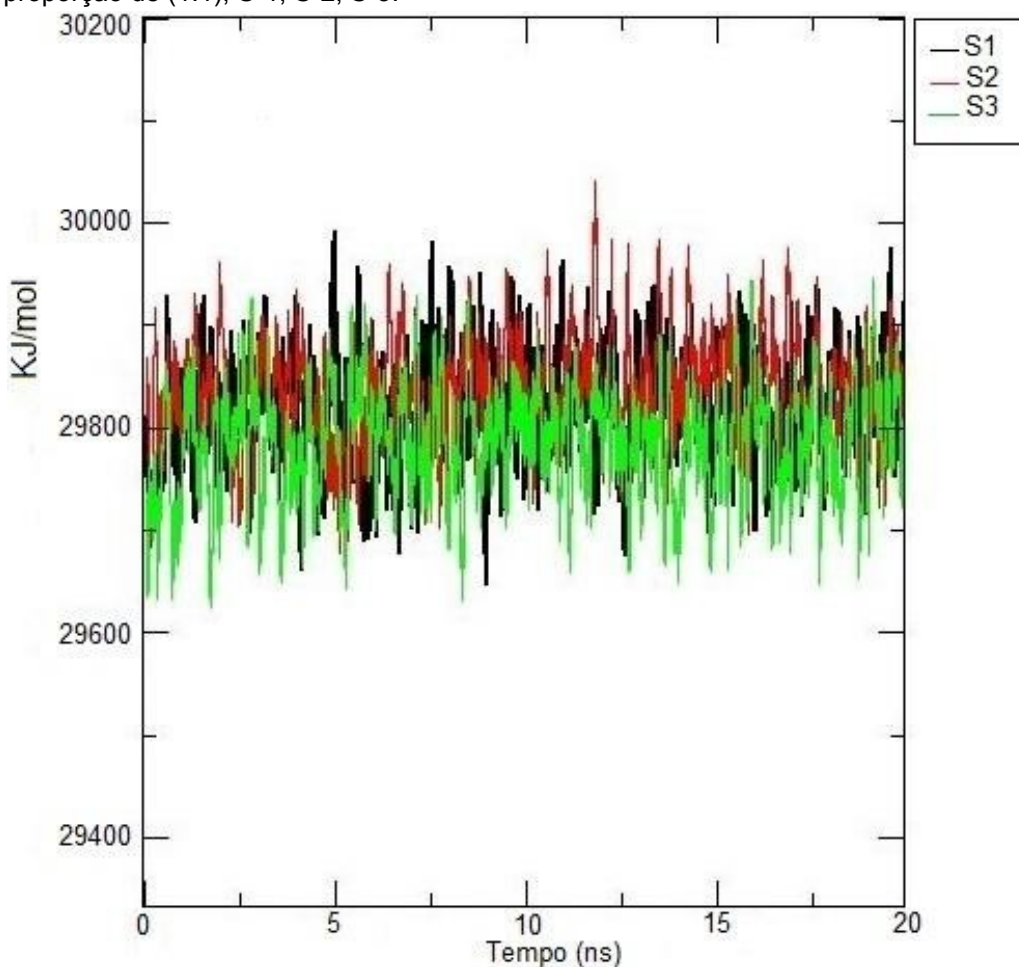
| <b>Sistema (CS-EPI)</b> | <b><math>E_{col}</math> (KJ/mol)</b> | <b><math>E_{LJ}</math> (KJ/mol)</b> | <b><math>E_{total} = E_{col} + E_{LJ}</math><br/>(KJ/mol)</b> |
|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|
| <b>S-1 (1:1)</b>        | <b>-200255±762,48</b>                | <b>29821,6±467,19</b>               | <b>-170433±1229,67</b>  |
| <b>S-2 (1:1)</b>        | <b>-200289±758,37</b>                | <b>29834,7±468,69</b>               | <b>-170454±1227,06</b>  |
| <b>S-3 (1:1)</b>        | <b>-200057±758,02</b>                | <b>29790,9±465,55</b>               | <b>-170266±1223,57</b>  |

A Tabela 7 mostra que os sistemas (S-1, S-2, S-3) apresentaram um valor negativo muito alto para a energia de Coulomb e um valor positivo para a energia de Lennard Jones muito menor em módulo ao ser comparada à energia de Coulomb. Como esperado isso ocorre porque as interações Coulombianas são de longo alcance e tendem a se sobressair às interações de Lennard Jones. Além disso, os valores positivos da energia de Lennard Jones indicam que o complexo está dissociado e conforme vimos na introdução isso é esperado devido à alta densidade de carga da QT levar a uma repulsão de cargas entre a QT e a EPI. O saldo das energias de  $E_{col}$  e  $E_{LJ}$  foi utilizado para contabilizar a energia total do sistema, a qual serve de parâmetro para avaliar a estabilidade termodinâmica durante a simulação.

A tendência da energia de Lennard-Jones para os sistemas (S-1, S-2, S-3), pode ser acompanhada pelas curvas que aparecem no gráfico da Figura 19.

---

Figura 19: Energia média de Lennard-Jones (B, D, F). Para os sistemas compostos por QT e EPI na proporção de (1:1), S-1, S-2, S-3.

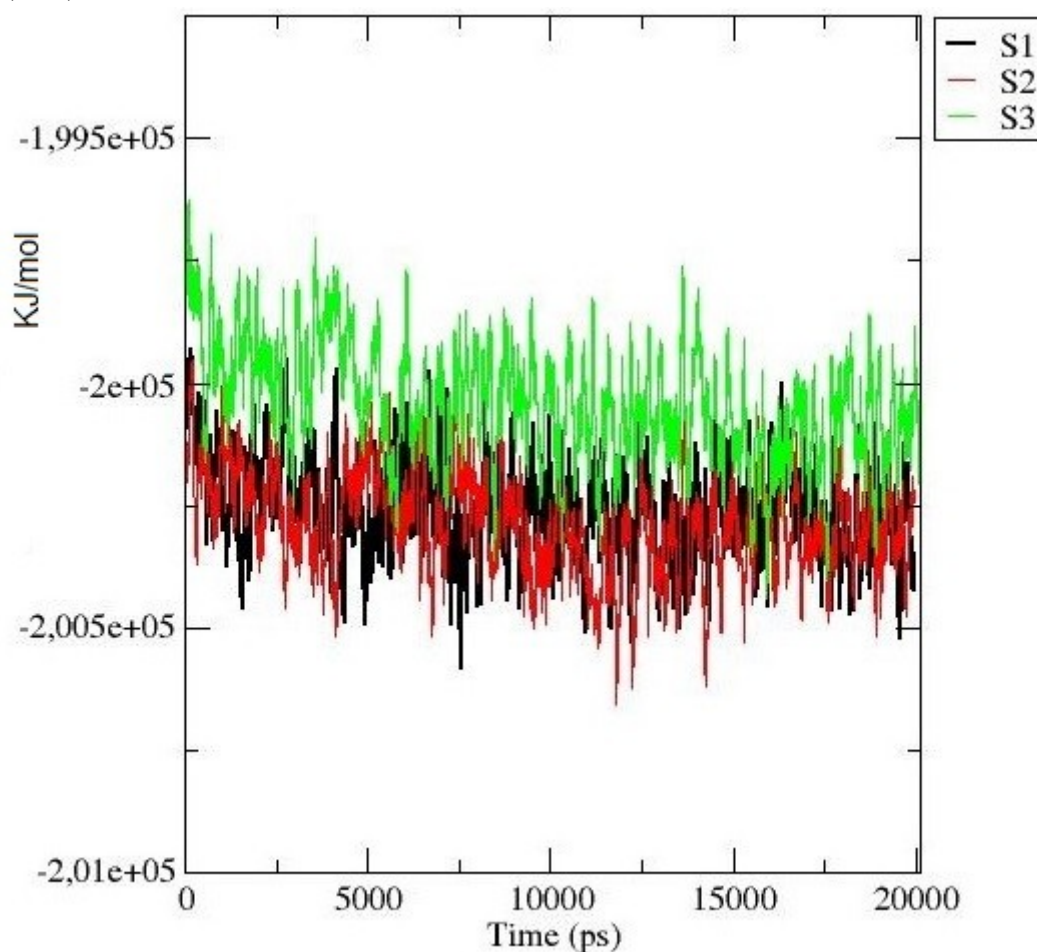


As curvas da energia de Lennard-Jones para os três sistemas mostrados na Figura 19 praticamente se sobrepõem, mostrando que a pequena diferença de valores que aparecem na Tabela 7 não é significativa. Além disso, a energia de Lennard-Jones praticamente não varia durante os 20 ns de simulação para os sistemas (S-1, S-2, S-3).

As curvas que aparecem no gráfico da Figura 20 permitem analisar a tendência da energia de Coulomb para os sistemas (S-1, S-2, S-3).

---

Figura 20: Energia média de Coulomb Para os sistemas compostos por QT e EPI na proporção de (1:1), S-1, S-2, S-3.



A Figura 20 mostra que em média a energia de Coulomb dos três sistemas analisados se mantém constante durante a simulação e os valores encontram-se muito próximos para os sistemas S1 e S3. O valor da energia de Coulomb do sistema S3 é mais alto que nos sistemas S1 e S2, mostrando que esse sistema é termodinamicamente mais instável.

O saldo da energia de Coulomb e Lennard-Jones foi negativo, entretanto, essa análise não foi suficiente para caracterização dos sistemas, portanto, esse resultado foi complementado pelas análises a seguir.



---

## **6.5    *Análises da estabilidade dos complexos***

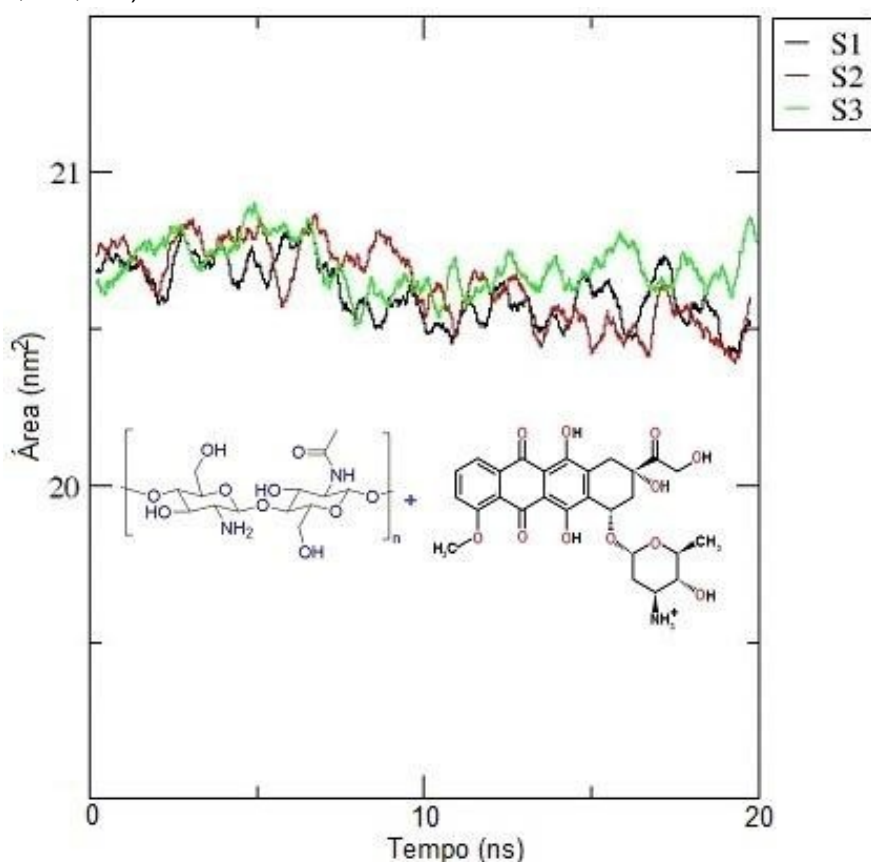
Os parâmetros estruturais analisados a seguir tem por objetivo mostrar o comportamento da QT e a estabilidade dos complexos, QT-EPI. Para tanto, os resultados foram reunidos em tópicos separados para análise dos parâmetros área acessível ao solvente (sigla em inglês, solvent-accessible surface area SASA) e o raio de giro ( $R_g$ ).

Enquanto optamos por incluir no mesmo tópico a análise da mínima distância entre as moléculas e de ligação de hidrogênio, pois notamos a importância de estabelecer uma correlação entre elas para caracterizar a forma como a EPI interage com a QT. No entanto, a conclusão sobre o comportamento dos sistemas constitui a síntese dos resultados das análises na totalidade.

### **6.5.1    *Análise da área acessível ao solvente (SASA)***

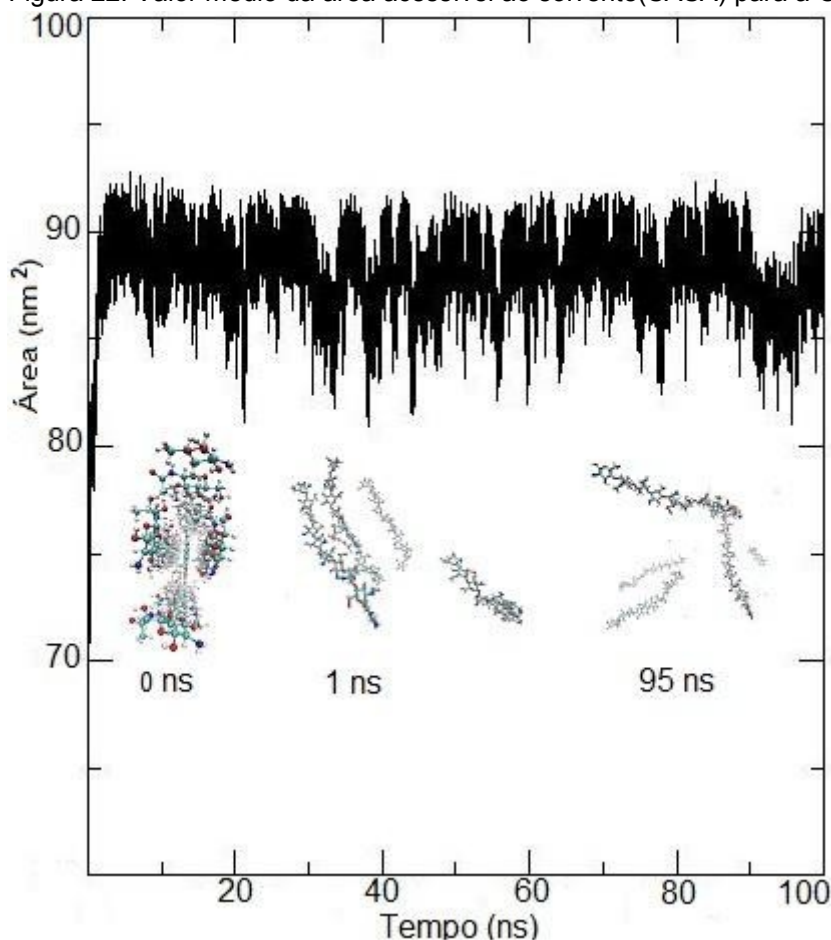
Julgamos necessário efetuar o cálculo de SASA da quitosana nos complexos para quantificar a variação da área na qual um contato entre a QT e o solvente ocorre e discutir como o comportamento dos sistemas justifica essa variação.

Figura 21: Valor médio da área acessível ao solvente(SASA) para a quitosana nos sistemas (S-1, S-2, S-3).



Acompanhando os resultados dos cálculos de superfície acessível ao solvente dos sistemas (S-1, S-2, S-3) que aparecem na Figura 21 vemos que em média os valores de SASA se mantiveram aproximadamente constantes nos primeiros 7 ns da dinâmica, entre 7-12 ns o valor de SASA de cada sistema (S1, S2, S3) diminui em menos de (0,1 nm<sup>2</sup>), mantendo se aproximadamente constante durante os 8 ns finais da dinâmica. Podemos considerar que a área acessível ao solvente foi estável e apenas flutuou um pouco em torno dos valores médios de cada sistema simulado durante os 20 ns da trajetória. Diante disso, ao se considerar cada um dos sistemas analisados o valor médio da área foi de (20.61±0,36) para S-1; (20,64±0,37) para S-2; (20,65±0,36) para S-3, ou seja, as médias comparadas são razoavelmente semelhantes entre si. Esses resultados indicam que a QT não interage com a e EPI.

Figura 22: Valor médio da área acessível ao solvente(SASA) para a QT nos sistemas (S-4).

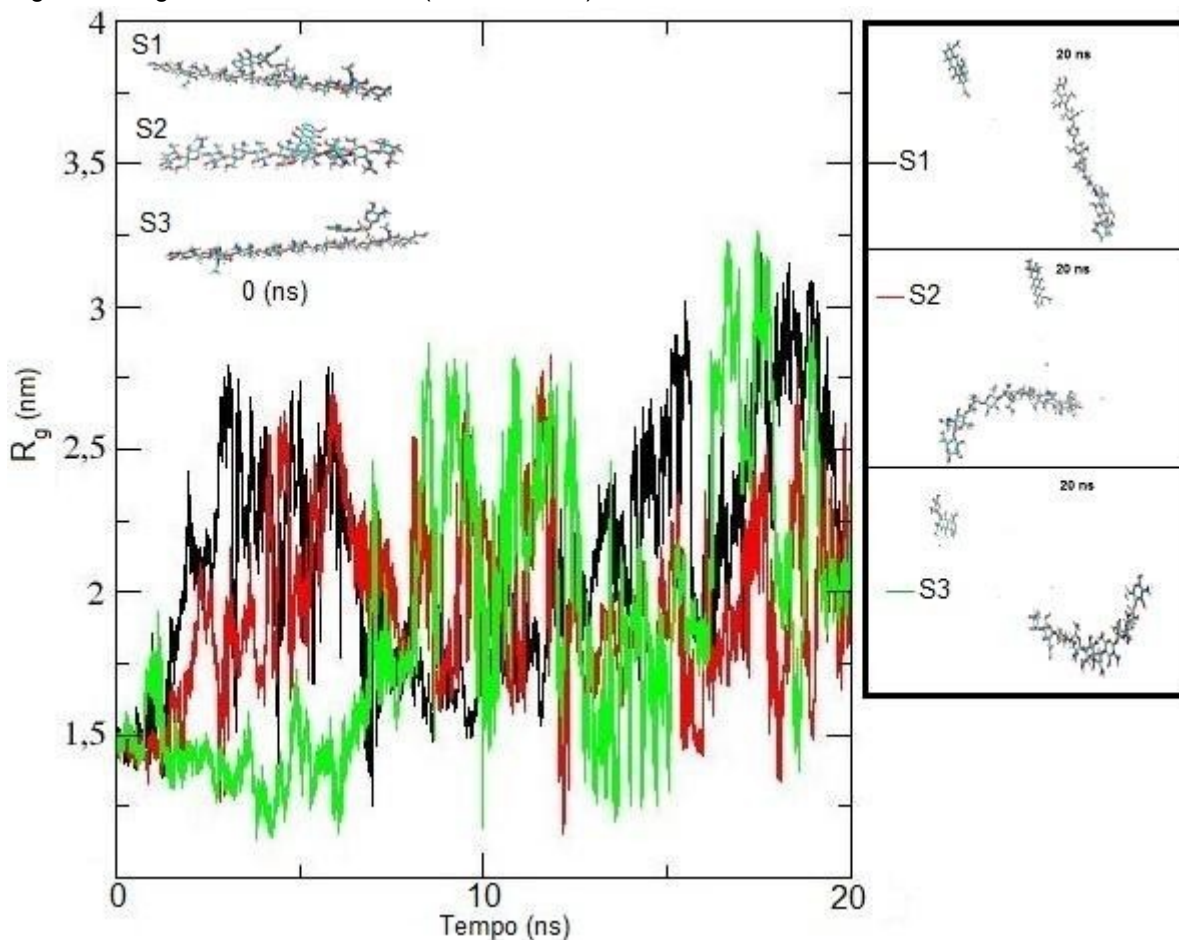


De acordo com os resultados da Figura 22, o valor inicial da área acessível ao solvente do sistema S-4, 75 nm<sup>2</sup>, atinge um platô em 1 ns de simulação, passando então a flutuar muito pouco em torno do valor médio de 90 nm<sup>2</sup>. Conforme vemos nas imagens do sistema que acompanham o gráfico, os decâmeros de QT estavam inicialmente muito organizados próximos à EPI, porém, durante o primeiro 1 ns de simulação as moléculas do sistema se afastaram deixando a QT mais exposta ao solvente. Observamos no filme da dinâmica que desse instante em diante os filamentos de QT não se aproximam mais da EPI e as moléculas apenas se dispõem aleatoriamente no espaço. O aumento de 15 nm<sup>2</sup> do valor de SASA e a ausência de contato entre as moléculas durante a simulação mostra que a QT e a EPI continuam não interagindo no sistema S4, tal como aponta os resultados para os sistemas (S1, S2, S3).

### 6.5.2 Análise do Raio de giro ( $R_g$ )

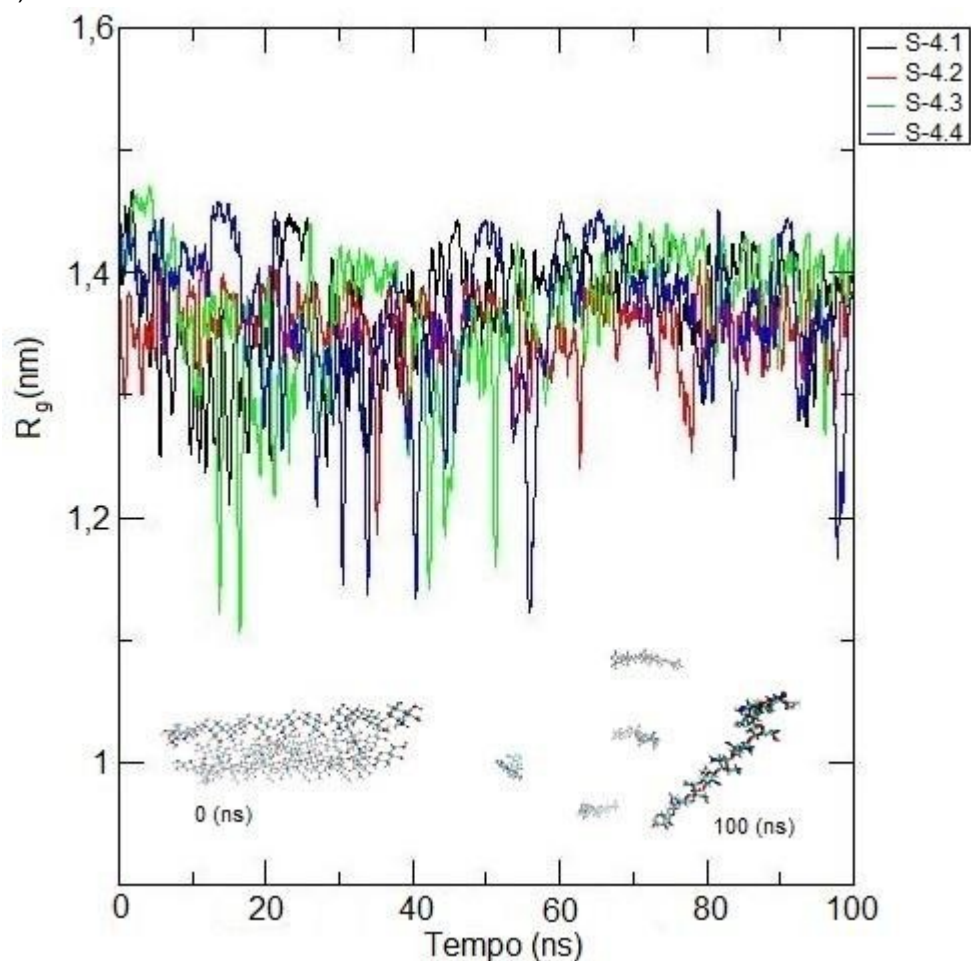
Uma vez que o raio de giro se refere à rotação da quitosana relativa a seu centro de massa e a seu grau de compactação, consideramos esse  $R_g$  um dos parâmetros mais importantes para discutir a estabilidade do complexo QT-EPI.

Figura 23:  $R_g$  da QT nos sistemas (S-1, S-2, S-3).



O valor médio de  $R_g$  apresentado pelos sistemas (S1, S2, S3) foi, respectivamente de  $(2,11 \pm 0,40)$  para o sistema (S1),  $(1,92 \pm 0,29)$  para (S2) e  $1,9608 \pm 0,4942$  para (S3), como mostra a Figura 23. Sendo que o valor inicial de (1,5 nm) aumenta até atingir cerca de (3,3 nm) durante a simulação. As imagens dos sistemas a (0 ns) e a (20 ns) vistas na legenda mostram que o complexo inicial se desfaz o que justifica o aumento do  $R_g$ .

Figura 24: Raio de giro ( $R_g$ ) dos quatro filamentos de QT (S-4.1,S-4.2, S-4.3,S-4.4) do complexo (S-4).



Na Figura 24 o valor inicial do  $R_g$  é (1,4 nm) e esse valor flutua muito ao longo da dinâmica. A análise mostra que o sistema (S4) translada durante a simulação levando, portanto, ao afastamento das moléculas. As imagens do sistema (S4) no gráfico confirmam que o complexo não se forma.

### 6.5.3 *Análise de ligação de Hidrogênio e cálculo de mínima distancia*

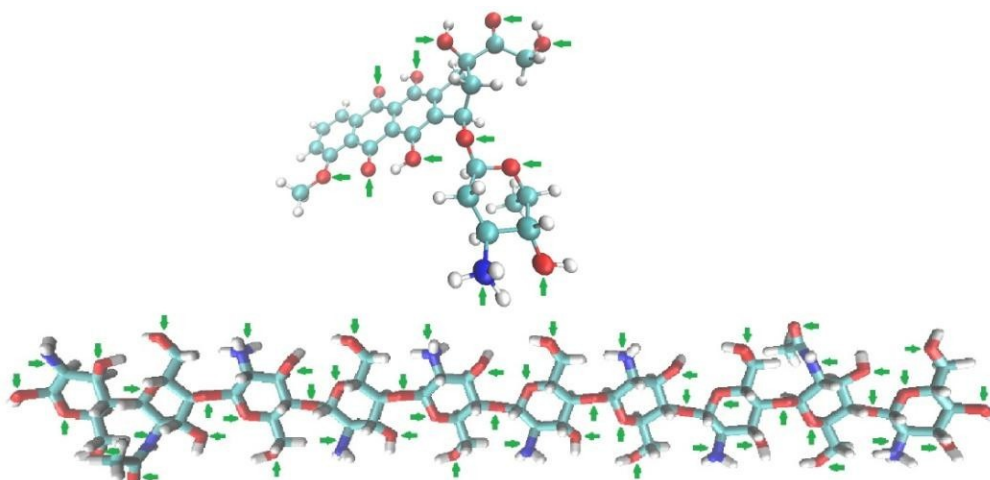
Uma vez que a revisão bibliográfica mostra que a QT pode interagir com EPI por ligação de hidrogênio e estando presentes muitos grupos polares na estrutura dessas moléculas, foi importante caracterizar o número de ligações de Hidrogênio presentes nesses sistemas para entendermos o comportamento dos complexos modelados.

Tabela 8: Valor médio com o desvio padrão do número total de ligações de hidrogênio intermoleculares entre a QT e a EPI, para 20 ns de simulação.

| <b>Sistemas</b>   | <b>O<sub>QT</sub>..... O<sub>água</sub></b> | <b>O<sub>EPI</sub> ..... O<sub>água</sub></b> | <b>O<sub>EPI</sub>..... O<sub>QT</sub></b> |
|-------------------|---|---|--|
| <b>N ligações</b> |   | <b>N ligações</b>                             | <b>N ligações</b>                          |
| EPI               | -   | 12,95±1,84                                    | -  |
| S1; (20 ns)       | 44,36±4,16                                  | 12,61±1,90                                    | 0,20±0,54                                  |
| S2; (20 ns)       | 45,36±4,20                                  | 13,11±1,96                                    | 0,11±0,38                                  |
| S3; (20 ns)       | 45,36±4,27                                  | 13,00±1,88                                    | 0,09±0,41                                  |
| S-4.1; (100 ns)   | 45,30±4,06                                  | 12,91±1,89                                    | 0,03±0,20                                  |
| S-4.2; (100 ns)   | 45,49±4,00                                  | 12,91±1,89                                    | 0,02±0,16                                  |
| S-4.3; (100 ns)   | 45,42±4,18                                  | 12,91±1,89                                    | 0,01±0,15                                  |
| S-4.4 (100 ns);   | 45,56±4,09                                  | 12,91±1,89                                    | 0,03±0,23                                  |

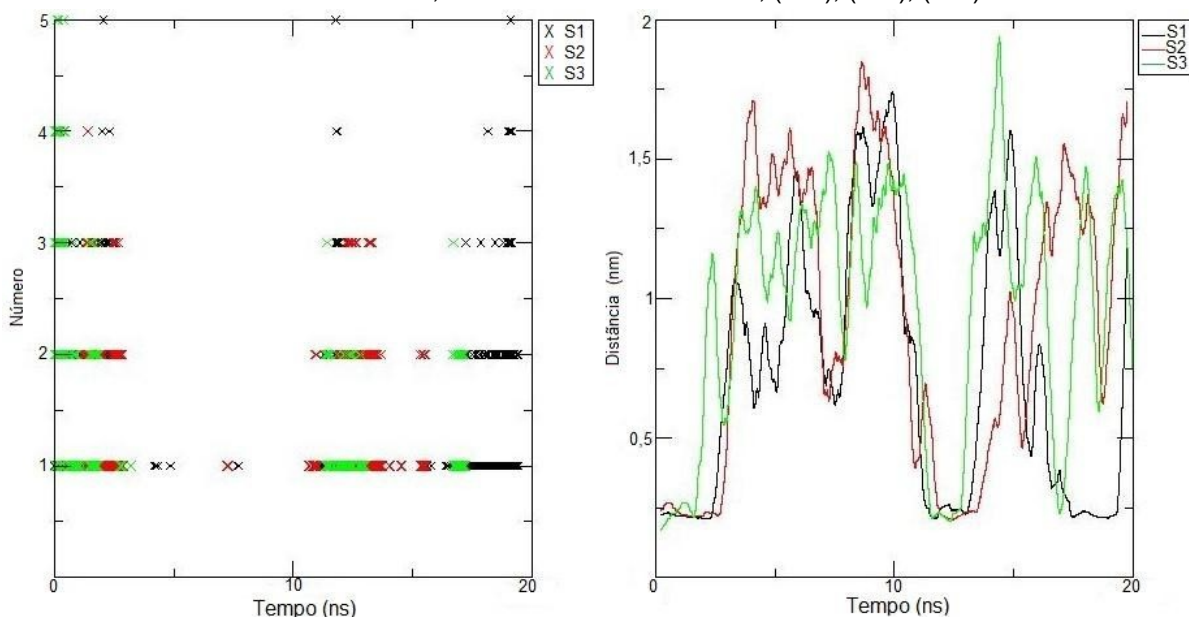
---

Figura 25: Estrutura da EPI e da QT, as setas verdes apontam os grupos passíveis de estabelecer interação de Hidrogênio.



A Figura 25 mostra que a EPI possui 12 grupos passíveis de interagir por ligação de Hidrogênio e a Tabela 8 mostra que há em média 12 ligações de Hidrogênio entre a EPI e a água, mas entre a EPI e a QT esse número fica próximo de zero. Entretanto, há 52 grupos polares em destaque na estrutura da QT, porém, a Tabela 8 indica que em média há 45 ligações de Hidrogênio entre a QT e a água. Isso mostra que a QT tem maior afinidade pela água que pela EPI, portanto, é esperado que a aproximação entre elas não se mantivesse por muito tempo ou até mesmo que o movimento aleatório das partículas do solvente possa empurrar a EPI em direção a QT sem a QT e a EPI estarem interagindo. Por isso a melhor forma de entendermos o que aconteceu entre a QT e a EPI a nível molecular é através da análise dos gráficos da Figura 26.

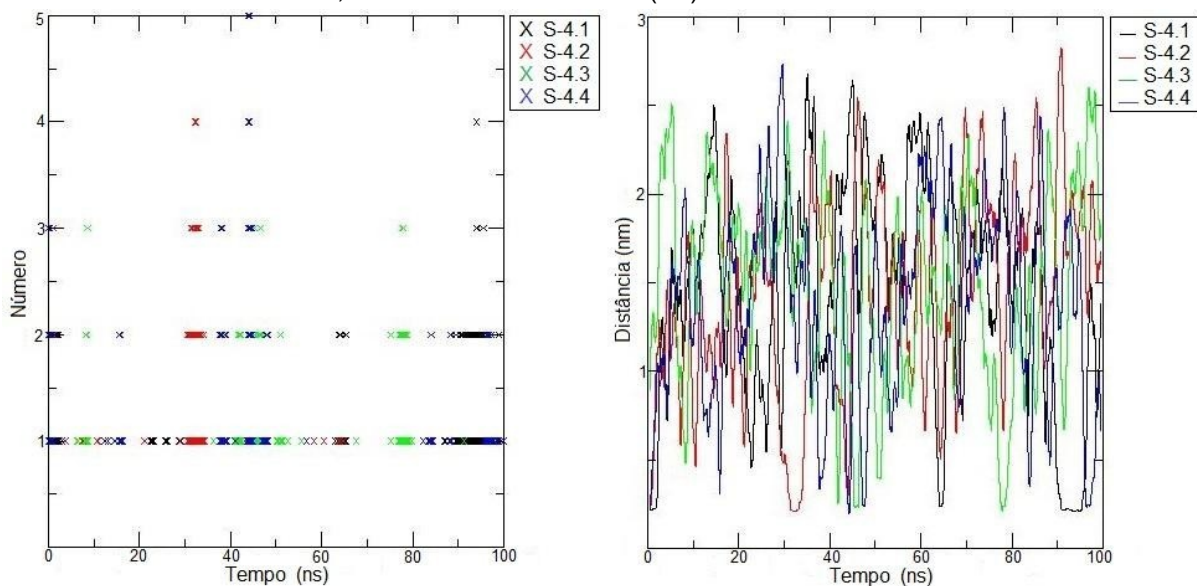
Figura 26: A) Gráfico de número de ligações de Hidrogênio,  $O_{EPI} \cdots O_{QT}$ ; B) Gráficos de cálculo de mínima distancia entre a QT e a EPI, sistemas de menor massa, (S-1), (S-2), (S-3).



Ao confrontarmos os gráficos de número de ligação de Hidrogênio com o gráfico de mínima distância, observamos que há três intervalos (0-4; 11-14; 16-20 ns) em especial durante os quais a distância entre as moléculas é a menor e se mantem constante o bastante para ocorrer formação do complexo, esses intervalos coincidem com aqueles no gráfico de número de ligações de Hidrogênio em que há ligações presentes. O filme da dinâmica molecular mostra que ocorre contato entre a QT e a EPI em alguns instantes compreendidos entre esses intervalos, porem, esse contato não se mantém devido à instabilidade dos sistemas. Por isso a análise de um sistema contendo um número maior de moléculas de QT foi importante para discutir o comportamento dos sistemas constituídos por QT 50% protonada com (GA=20%) e a EPI com grupo amino protonado.



Figura 27: A) Cálculo de número de ligações de Hidrogênio,  $O_{EPI} \dots O_{QT}$ ; B) Cálculo de mínima distancia entre a QT e a EPI, sistema de maior massa (S4).



O resultado apresentado na Figura 27 confirma a instabilidade do complexo uma vez que a mínima distância entre a QT e a EPI não se mantém por um intervalo de tempo apreciável e de acordo com o gráfico de número de ligações a presença de ligações de hidrogênio foi escassa ao longo da dinâmica. Além disso, o filme mostrou que as moléculas se afastam tão logo a dinâmica começa e todos os resultados analisados mostraram que os complexos modelados nesse trabalho se comportam como sistemas inertes.

---

## 7 Conclusão

Os estudos mostraram que os principais agentes de mudanças quando a EPI deixa a forma livre e constitui o complexo, QT-EPI, são as variações conformacionais e o seu estado de protonação. Analogamente, a grande flexibilidade e o estado de protonação da QT também foram fatores relevantes no estudo da interação.

Consequentemente, a realização das análises estruturais foi extremamente importante para entender como as variações conformacionais das moléculas e a repulsão de cargas levaram os complexos iniciais a se desfazerem liberando a EPI. Assim como o filme da dinâmica confirmou que as moléculas se aproximavam, mas o complexo não se formava, pois, a afinidade da QT pela água foi maior que a afinidade pela EPI. Em função da repulsão de cargas prevista na revisão literária, ao quadruplicarmos o número de filamentos de QT não ocorreu mais contato entre a EPI e a QT durante nenhum instante da dinâmica. De onde podemos concluir que prevaleceram os aspectos de um comportamento aleatório das moléculas nos sistemas em estudo.

Em termos práticos, isso significa que a EPI protonada e a QT (GA=20% e pH=6,5) não interagem, portanto, não são promissoras para a síntese de uma NPs com alta eficiência de encapsulamento. Recomendamos através desse trabalho, o aprofundamento dos estudos da interação para a EPI e a QT em outros estados de protonação.

---

## 8 Referências

- Abraham, M., Hess, B., Spoel, D. V., Spoel, E., **GROMACS Groningen Machine for Chemical Simulations**, User Manual, Version 2016.4, 2017.  
Disponível em:  
file:///C:/Users/leca%20e%20maezinha/Downloads/manual-2016.4.pdf
- Abraham, S. A., Waterhouse, D. N., Mayer, L. D., Cullis, P. R., Madden, T. D., Bally, M. B., **The Liposomal Formulation of Doxorubicin**, Methods In Enzymology, VOL. 391, p. 71, 2005.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91004-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91004-5)
- Ai, J. W., Liao, W., Ren, Z. L.; **Enhanced anticancer effect of copper-loaded chitosan nanoparticles against osteosarcoma**", RSC Adv., 7, p. 15971–15977, 2017.  
<https://doi.org/10.1039/C6RA21648J>
- Alcântara, A. M. P., **Desenvolvimento de métodos para a determinação simultânea de antineoplásicos em superfícies e luvas visando a aplicação na monetarização da exposição ocupacional**, (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Alfenas, MG, 2009.
- AL-Janabi, A. A. H. S., Bashi, A. M.; **Development of a new synthetic xerogel nanoparticles of silver and zinc oxide against causative agents of dermatophytoses**, 0954-6634 (Print) 1471-1753, 2018.  
<https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1506079>
- Allouche, A., **Gabedit-A graphical user interface for computational chemistry softwares**; Computer Science Journal of Computational Chemistry, 2011.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.21600>
- Bajwa, N., Mehra, N. K., Jain, K., Jain, N. K.; **Targeted anticancer drug delivery through anthracycline antibiotic bearing functionalized quantum dots**, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal, 2015.  
<https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1102740>
- Barbosa, H. F. G. ; **Síntese, caracterização e estudo da auto-associação em solução aquosa de derivados anfifílicos zwitteriônicos de quitosana**, (Dissertação de mestrado em Química Ambiental) – UNESP, São José do Rio Preto, SP, 2013.
- Behzadi, S., Luther, G. A., Harris, M. B., Farokhzad, O. C., Mahmoudi, M., **Nanomedicine for safe healing of bone trauma: Opportunities and challenges**, Biomaterials, V.146, p.168–182, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.005>

---

Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M., **Canonical sampling through velocity rescaling**, J. Chem. Phys., V.126, 2007.  
<https://doi.org/10.1063/1.2408420>

Cavo, M., Serio, F., Kale, N. R., D'Amone, E., Gigli, G., Mercato, L. L.; **Electrospun nanofibers in cancer research: from engineering of in vitro 3D cancer models to therapy**, Biomater. Sci., 8, p.4887–4905, 2020.  
<https://doi.org/10.1039/D0BM00390E>

Chandola, C., Casteleijn, M. G., Kalme, S., Urtti, A., Neerathilingam, M., **Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging**, Journal of Biosciences, 2016.  
<https://doi.org/10.1007/s12038-016-9632-y>

Charak, S., Jangir, D. K., Tyagi, G., Mehrotra, R., **Interaction studies of Epirubicin with DNA using spectroscopic techniques**, Journal of Molecular Structure, V.1000, n.1, p. 150–154, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.06.013>

CHEMAXON, MarvinSetch version 6.2.3 ChemAxon Ltd. Budapest Hungria, [www.chemaxon.com](http://www.chemaxon.com) , 2014.

Chen, H., Nan, W. B., Wei, X., Wang, Y., Lv, F., Tang, H., Li, Y., Zhou, C., Lin, J., Zhu, W., Zhang, Q.; **Toxicity, pharmacokinetics, and in vivo efficacy of biotinylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for tumor therapy**, Artificial Cells, And Biotechnology, 45(6), p.1-8, 2016.  
<https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1202260>

Chen, L., Qui, H., Zhang, L., Li, H., Shao, J., Chen, H., Zhong, M., Shi, X., Ye, T., Li, Q., **Effects of FGFR gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-docetaxel-based chemotherapy in breast cancer patients**, BMC Cancer, v. 18, n. 1, 2018.  
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4951-z>

Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C., Kollman, P. A., **Application of RESP Charges To Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation**, J. Am. Chem. Soc., V.115, pp:9620-9631, 1993.  
<https://doi.org/10.1021/ja00074a030>

Cunha, R. A.; **Caracterização Molecular do Mecanismo de Interação de Quitosanas com Bicamadas Lipídicas Compostas de Dipalmitoilfosfatidilcolina**, (Dissertação de mestrado em Química)-UFU, Uberlândia, MG, 2013.

Darden, T., York, D., Pedersen, L., **Particle mesh Ewald: An  $N$  -log( $N$ ) method for Ewald sums in large systems**, The Journal Of Chemical, Physics, V.98, N.12, 2012.  
<https://doi.org/10.1063/1.464397>

---

Ewer, M. S., and Ewer, S. M., **Cardiotoxicity of anticancer treatments**, Nat. Rev. Cardiol., V.12, N.10, p. 547–558, 2015.  
<https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.65>

Faria, R. R.; **Simulação Computacional da Interação de Quitosana Com o Herbicida Glifosato Para Descontaminação Ambiental**, (Dissertação de mestrado em Química) UFU, Uberlândia, 2015.

Ferla, B. L., Airoidi, C., Zona, C., Orsato, A., Cardona, F., Merlo, S., Sironi, E., D'Orazio, G., Nicotra, F., **Natural glycoconjugates with antitumor activity**, Cite this: Nat. Prod. Rep., 28, p. 630-648, 2011.  
<https://doi.org/10.1039/C0NP00055H>

Getting Stared, **HyperChem Release 7for Windows**, Reference Volumes 1 & 2, Modules, CDK, and Computational Chemistry. Hypercube, Inc., 2002.  
Disponível em:  
[http://www.chemistry-software.com/pdf/hyperchem\\_getting\\_started.pdf](http://www.chemistry-software.com/pdf/hyperchem_getting_started.pdf)

Guo, H., Li, F., Qiu, H., Liu, J., Qin, S., Houe, Y., Wang, C., **Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles for Chemotherapy of Melanoma Through Enhancing Tumor Penetration**, Pharmacol, 2020.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00317>

Guvench, O., MacKerell, A. D., **Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations, Chapter 4**, Methods in Molecular Biology, V.443, 2008.

Hao, W., Liu, D., Shang, Y., Zhang, J., Xu, S., Liu, H., **pH-triggered Copolymer Micelles as Drug Nanocarrier for Intracellular Delivery**, RSC Adv., 2016.  
<https://doi.org/10.1039/C6RA00673F>

Hamed, I., Ozogul, F., Regenstein, J. M., **Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitoooligosaccharides): A review**, Trends in Food Science & Technology, V.48 , p. 40-50 Contents, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>

He, X., Li, J., An, S., Jiang, C., **pH-sensitive drug-delivery systems for tumor targeting**, Ther. Deliv., V.4, N.12 ,p. 1499–1510, 2014.  
<https://doi.org/10.4155/tde.13.120>

Henninger, C., Fritz, G., **Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and, and the heartbreakers, Cell Death and disease**, v. 8, 2564, 2017.  
<https://doi.org/10.1038/cddis.2016.418>

Hess, B., **LINCS: A Linear Constraint Solver For Molecular Simulations**, Journal of Computational Chemistry, V. 18, N. 12, pp:1463-1472, 1997.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)

---

Hockney, R. W., Goel, S. P., Eastwood, J. W., **Quiet High-Resolution Computer Models of a Plasma**, Journal Of Computational Physics, V.14, pp:148-158, 1974.

Hohenberg, P., Kohn, W., **Inhomogeneous Electron Gas**, Phys. Rev., V.136, N 3B, B864-B71, 1964.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9991\(74\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0021-9991(74)90010-2)

Horner, S., Knauer, S., Uth, C., Jost, M., Schmidts, V., Frauendorf, H., Thiele, C. M., Avrutina, O., Kolmar, H., **Nanoscale Biodegradable Organic–Inorganic Hybrids for Efficient Cell Penetration and Drug Delivery**, Angew. Chem., V.55, pp.1 – 6, 2016.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201606065>

Hu, Q., Chen, Q., Gu, Z., **Advances in Transformable Drug Delivery Systems**, Advances in Transformable Drug Delivery Systems, Biomaterials, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.056>

Jena, M., Mishra, S., Jena, S., Mishra, S. S., **Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review**, Jena M et al. Int J Basic Clin Pharmacol, V.2, N.4, p.353-359, 2013.  
<https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp20130802>

Jorgensen, W. L., Tirado-Rives, J., **Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems**, PNAS, Department of Chemistry, Yale University, New Haven, V.102 , N.19 , pp:6665-6670, 2005.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0408037102>

Kmiecik, S. W., Krzyścik, M. A., Filip-Psurska, B., Wietrzyk, J., Boratyński, J., Goszczyński, T. M., **Methotrexate and epirubicin conjugates as potential antitumor drugs**, Postepy Hig Med Dosw (online), 71, p. 618-623, 2017.  
<https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3842>

Laranjeira, M.C.C., Fávere, V.T., **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico**, Quím. Nova, Brazil. 3:672-678, 2009.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300011>

Li, J., Cai, C., Li, J., Li, J., Li, J., Sun, T., Wang, L., Wu, H., Yu, G., **Chitosan-Based Nanomaterials for Drug Delivery; Molecules** ,23, 2661; 2018.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23102661>

Li, J., Ying, S., Ren, H., Dai, J., Zhang, L., Liang, L., Wang, Q., Shen, Q., Shen, J. W., **Molecular dynamics study on the encapsulation and release of anti-cancer drug doxorubicin by chitosan**, *International Journal of Pharmaceutics* 580 (2020) 119241  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119241>

Li, S., Jiang, Q., Liu, S., Zhang, Y., Tian, Y., Song, C., Wang, J., Zou, Y., Anderson, G. J., Han, J. Y., Chang, Y., Liu, Y., Zhang, C., Chen, L., Zhou, G., Nie, G., Yan, H., Ding, B., Zhao, Y., **A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in**

---

**response to a molecular trigger in vivo**, Nature Biotechnology, V. 36, p. 258–264, 2018.

<https://doi.org/10.1038/nbt.4071>

Liu, R., Li, D., He, B., Xu, X., Sheng, M., Lai, Y., Wang, G., Gu, Z., **Anti-tumor drug delivery of pH-sensitive poly(ethylene glycol)-poly(L-histidine-)-poly(L-lactide) nanoparticles**, Journal of Controlled Release, V.152, 49–56, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.031>

Lo, Y. L., Wang, W. ; **Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells in vitro**, Chemico-Biological Interactions 205, p.188–197, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.07.003>

Lopes, J. C., Junior, A. F. C., Scheidt, G. N., Soares, L. P., Chagas, L. F. B.; **Biomassa e extração de quitina e quitosana a partir de isolados de Cunninghamella sp.**, Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, V.38, N 1, p. 25-34, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s11750-017-0442-7>

Mattheolabakis , G., Rigas, B., Constantinides, P. P., **Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives**, Nanomedicine', 7(10), p. 1577–1590, 2012.

<https://doi.org/10.2217/nnm.12.128>

Mateescu, M. A., Ispas-Szabo, P., Assaad, E., **Controlled Drug Delivery The Role of Self-Assembling Multi-task Excipients**; Book, chapter 3, "Chitosan and its derivatives as self-assembled systems for drug delivery; Woodhead Publishing Series in Biomedicine, p. 85-125, 2015.

<https://doi.org/10.1016/B978-1-907568-45-9.00003-2>

Marzaro, G., Chilin, A., Ferrarese, A., **Autogrid-based clustering of kinases: Selection of representative conformations for docking purposes**, Mol Divers, 2014.

<https://doi.org/10.1007/s11030-014-9524-8>

McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., Yellon, D. M., **Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity**, Cardiovasc. Drugs Ther., vol. 31, no. 1, pp. 63–75, Feb. 2017.

<https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>

Microsoft, HyperChem® for Windows and NT, Publication HC50-00-04-00, 1996.  
Disponível em:

<http://test.kirensky.ru/books/book/Program%20HyperChem/CDK.pdf>

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. ,Autodock4 and Autodoc Tools4:automated docking with selective receptor flexibility. J. Computational Chemistru, V.16, 2009.

<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>



---

Motiei, M., Kashanian, S., Lucia, L. A., Khazaei, M.; **Intrinsic parameters for the synthesis and tuned properties of amphiphilic chitosan drug delivery nanocarriers**, *Journal of Controlled Release*, N 260, p: 213-225, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.010>

Motoyama, K., Nakashima, Y., Aramaki, Y., Hirayama, F., Uekama, K., Arima, H.; **In Vitro Gene Delivery Mediated by Asialofetuin-Appended Cationic Liposomes Associated with  $\gamma$ -Cyclodextrin into Hepatocytes**, Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Drug Delivery*, V. 2011, p. 1-13, 2010.

<https://doi.org/10.1155/2011/476137>

Moura, C. M., Moura, J. M., Soares, N. M., Pinto, L. A. A., **Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm**, *Chemical Engineering and Processing* V.50, p. 351–355, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.03.003>

Nalluri, L. P., Popuri, S. R., Lee, C. H., Terbish, N.; **Synthesis of biopolymer coated functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for the pH-sensitive delivery of anti-cancer drugs epirubicin and temozolomide**; *International Journal Of Polymeric Materials And Polymeric Biomaterials*, 2020.

<https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1785449>

Nasr, M., Nafee, N., Saad, H., Kazem, A.; **Improved antitumor activity and reduced cardiotoxicity of epirubicin using hepatocyte-targeted nanoparticles combined with tocotrienols against hepatocellular carcinoma in mice**; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.04.016>

Neese, F.; *The ORCA program system*, 2012. V2., 011 John Wiley & Sons Ltd., *WIREs Comput Mol Sci* 2012, 2: 73–78 doi: 10.1002/wcms.81

<https://doi.org/10.1002/wcms.81>

Neto, R. L. S.; **Parametrização e validação da quitosana no campo de força OPLS-AA para caracterizar a remoção de íons fosfato**, (Dissertação de mestrado em Química)-UFU, Uberlândia, 2018.

OLINSKI, R., JARUGA, P., FOKSINSKI, M., BIALKOWSKI, K., TUJAKOWSKI, J.; **Epirubicin-Induced Oxidative DNA Damage and Evidence for Its Repair in Lymphocytes of Cancer Patients Who Are Undergoing Chemotherapy**, *Molecular Pharmacology*, 52, p. 882–885, 2015.

<https://doi.org/10.1124/mol.52.5.882>

Palermo, G., Vivo, M.; **Computational Chemistry for Drug Discovery**, *Encyclopedia of Nanotechnology*, 2015.

[https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0\\_100975-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0_100975-1)



---

Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H. S., **Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects**, Patra et al. J Nanobiotechnol, 16:71, 2018.  
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

Petersson, G. A., Bennett, A., Tensfeldt, T. G., Allaham, M. A., Shirley, W. A., Mantzaris, J., "A complete basis set model chemistry. I. **The total energies of closedshell atoms and hydrides of the firstrow elements**, J. Chem. Phys., V.89, N.4, 15, pp. 2193-2218, 1988.  
<https://doi.org/10.1063/1.455064>

Petit, K., Suwalsky, M., Colina, J. R., Contreras, D., Aguilar, L. F., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., **Toxic effects of the anticancer drug epirubicin in vitro assayed in human erythrocytes**, Journal Pre-proof, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104964>

Pilipenko, I., Korzhikov-Vlakh, V., Sharoyko, V., Zhang, N., Schäfer-Korting, M., Rühl, E., Zoschke, C., Tennikova, T., **pH-Sensitive Chitosan-Heparin Nanoparticles for Effective Delivery of Genetic Drugs into Epithelial Cells**, Pharmaceutics, 11, 317, 2019.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070317>

Pirawattana, T., Srinophakun, T., **Simulation of doxorubicin delivery via glucosamine(ethyleneglycol) carrier**, Int. J. Mol. Sci., V.9, n.11, 2290-2305, 2008.  
<https://doi.org/10.3390/ijms9112290>

Podell, E. R., Harrington, D. J., Taatjes, D. J., Koch, T. H., **Crystal structure of epidoxorubicin±formaldehyde virtual crosslink of DNA and evidence for its formation in human breast-cancer cells**, Acta Cryst., 1999.  
<https://doi.org/10.2210/pdb1qda/pdb>

Quiñones, J. P., Peniche, H., Peniche, C.; **Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery**, Polymers, 10, 235; 2018.  
<https://doi.org/10.3390/polym10030235>

Rahimi, F., Bahlake, A., Chamani, Z., Bagheri, S., **Theoretical study on the conjugation of PLGA and PLGA-PEG Carriers to Doxorubicin and Daunorubicin**, European Journal of Experimental Biology, V.2, N.6, p. 2055-2060, 2012.  
<https://www.researchgate.net/publication/235675077>

Ravi, L., Kannabiran K., **A Handbook On Protein-Ligand Docking Tool: AutoDock4**, Department of Bio-Medical Sciences, School of Biosciences and Technology, V.4 (3), 2321-4406, Tamil Nadu, India, 2016.  
Disponível em:  
file:///C:/Users/leca%20e%20maezinha/Downloads/12724-Article%20Text-46645-1-10-20160614.pdf

---

Rego, G. N. A., Mamani, J. B., Souza, T. K. F., Nucci, M. P., Silva, H. R., Gamarra, L. F., **Therapeutic evaluation of magnetic hyperthermia using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> -aminosilane-coated iron oxide nanoparticles in glioblastoma animal model**, *einstein* (São Paulo); 17(4):1-9, 2019.

[https://doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2019AO4786](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4786)

Rocha, M. E. B, **Desenvolvimento de uma formulação lipossomal para entrega de um fármaco anticancerígeno**, (dissertação de mestrado de ciências, área de especialização, Biologia e Geologia) - Universidade do milho, Escola de Ciências, 2014.

Rungrim, C., Rungrotmongkol, T., Poo-arporn, R. P., **pH-controlled doxorubicin anticancer loading and release from carbon nanotube noncovalently modified by chitosan: MD simulations**, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.09.011>

Taghdisi, S. M., Danesh, N. M., Ramezani, M., Lavaee, P., Jalalian, S. H., Robati, R. Y., Abnous, K., **Double targeting and aptamer-assisted controlled release delivery of epirubicin to cancer cells by aptamers-based dendrimer in vitro and in vivo**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 102 ,p.152–158, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.013>

Tariq, M. , Alam, M. A. , Singh, A. T. , Iqbal, Z. , Panda, A. K. , Talegaonkar, S., **Biodegradable polymeric nanoparticles for oral delivery of epirubicin: In vitro, ex vivo, and in vivo investigations**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128, p.448–456, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.043>

Tariq, M., Alam, M. A., Singh, A. T., Panda, A. K., Talegaonkar, S.; **Improved oral efficacy of epirubicin through polymeric nanoparticles: pharmacodynamic and toxicological investigations**, *Drug Deliv*, p.1–8, 2016.

<https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1136713>

Tassel, P. R. V.; **nanotechnology in Medicine: nanofilm Biomaterials**, *Yale Journal Of Biology And Medicine*, 86 (44), p.527-536, 2013.

Tayyem, M. T., Zughul, M. B., Almatarneh, M. H. ; **Molecular dynamics simulation of N-octyl-N-quaternized chitosan derivatives as a drug carrier**, *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*, V. 17, N. 4 , 1850025, 2018

<https://doi.org/10.1142/S0219633618500256>

Sá, L. T. M., **Sistemas de liberação de fármacos particulados baseados em poliésteres obtidos por spray drying para via inalatória**, (Monografia - Especialis em tecnologias industriais farmacêuticas), Fundação Oswaldo Cruz, RJ, 2014.

Saini, R., Saini, S., Sharma, R.; **Nanotechnology: The Future Medicine**, *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* , V.3, N.1, 2010.

<https://doi.org/10.4103/0974-2077.63301>

---

Slater, J. C., A, **Simplification Of the Hartree-Fock Method**, Massachusetts Institute of Technology, V.81, N.3, PP:385-390,1950.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.81.385>

Sanyakamdhorn, S., Agudelo, D., Tajmir-Riahi, H. A., **Encapsulation of Antitumor Drug Doxorubicin and Its Analogue by Chitosan Nanoparticles**, Biomacromolecules, 14, p. 557-563, 2013.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.81.385>

Scaramel, F. S., **Avaliação da inativação de cisplatina, doxorubicina, e paclitaxel utilizando soluções de asepto 75<sup>R</sup> 0,5%, hipoclorito de sódio 10% e tiossulfato de sódio 10%**, (Dissertação de mestrado) Pós graduação em Fármaco e Medicamentos, São Paulo, SP, 2009.

Scheeren, L. E., **Nanopartículas de quitosana pH-sensíveis contendo doxorubicina: Desenvolvimento e estudo da atividade antitumoral in vitro**, (Dissertação de mestrado - programa de pós graduação em ciências farmacêuticas), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil, 2015.

Shan, P., Shen, J. W., Xu, D. H., Shi, L. Y., Gao, J., Lan, Y. W., Wang, Q., Wei, X. H., **Molecular dynamics study on the interaction between doxorubicin and hydrophobically modified chitosan oligosaccharide**, RSC Adv., 2014, 4, 23730-23739.  
<https://doi.org/10.1039/C4RA01199F>

Sharma, S. K., Sharma, E., Sharma, Y., **A review: Recent computational approaches in medicinal chemistry: Computer aided drug designing and delivery**, The Pharma Innovation Journal; 6(5): 05-10, 2017.

Silva, K. C. C., **Simulação Computacional da Interação de Nanopartícula de Quitosana Com Íons metálicos**, (Dissertação de mestrado em Química)-UFU, Uberlândia, MG, 2013.

Slater, J. C., A, **Simplification Of the Hartree-Fock Method**, Massachusetts Institute of Technology, V.81, N.3, PP:385-390,1950.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.81.385>

Soares, P. I. P., Souza, A. I., Silva, J. C., Ferreira, I. M. M., Novo, C. M. M., Borges, J. P., **Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling**, Carbohydrate Polymers, V.147, N.20, p. 304-312, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.028>

Souza, A. R. C., **Nanocompósitos Biopoliméricos de Nanopartículas de Óxidos de Ferro Obtidos Por Automontagem**, (Dissertação de mestrado) Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2016.

---

Sultankulov, B., Berillo, D., Sultankulova, K., Tokay, T., Saparov, A., **Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Biomolecules, N9, p. 470 2019.

<https://doi.org/10.3390/biom9090470>

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., Jong, W. A., **NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations**, Computer Physics Communications, V.181, pp:1477–1489, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.04.018>

Velásquez, C. L. ; **Chitosan-based nanomaterials on controlled bioactive agents delivery: a review**; J Anal Pharm Res, V.7, N.4, p. 484-489, 2018.

<https://doi.org/10.15406/japlr.2018.07.00271>

Vighi, E., Trifunovic, D., Veiga-Crespo, P., Rentsch, A., **Combination of cGMP analogue and drug delivery system provides functional protection in hereditary retinal degeneration**, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 115, n. 13, p. 2997–3006, 2018.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1718792115>

Xu, P., Zuo, H., Chen, B., Wang, R., Ahmed, A., Hu, Y., Ouyang, J.; **Doxorubicin-loaded platelets as a smart drug delivery system: An improved therapy for lymphoma**, Scientific Reports, 7:42632, 2017.

<https://doi.org/10.1038/srep44974>

Xu, Q., Wang, C. H., D. W., Pack; **Polymeric Carriers for Gene Delivery: Chitosan and Poly(amidoamine) Dendrimers**, Current Pharmaceutical Design, V.16, N 21, 2350-2368, 2010.

<https://doi.org/10.2174/138161210791920469>

Zhang, Q., Ding, J., Lv, C., Xu, W., Sun, X., Meng, X., **Epirubicin-Complexed Polypeptide Micelle Effectively and Safely Treats Hepatocellular Carcinoma**, Polymers, 7(11), p. 2410-2430; 2015.

<https://doi.org/10.3390/polym7111521>

Whang, L. ; **Molecular Dynamics-Theoretical Developments And Applications In Nanotechnology And Energy**, Southern Illinois University Carbondale, United States of America, Intechopen.com, 2012.

<https://doi.org/10.5772/2383>

Wang, L., Zhang, L., Liu, F., Sun, Y., **Molecular Energetics of Doxorubicin Pumping by Human P-Glycoprotein**, J. Chem. Inf. Model., 59, p.3889–3898, 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00429>

Wich, P. R., **Baukasten der Natur**, Nachrichten aus der Chemie, V. 63, 2015.

Disponível em: [www.gdch.de/nachrichten](http://www.gdch.de/nachrichten)

<https://doi.org/10.1002/nadc.201590046>

---

Williams, L. D., Williams, C. A., Ughetto, G., Rich, A., **Ternary interactions of spermine with DNA: 4'-epiadrinamycin and other DNA: anthracycline complexes**, *Nucleic Acids Research*, V.18, n.18, p. 5533, 1990.

<https://doi.org/10.1093/nar/18.18.5533>

Wyeth; **Farmorubicina RD**, Cloridrato de epirrubicina, 2019.

Disponível em:

[https://www.pfizer.com.br/sites/default/files/inline-files/Farmorubicina\\_RD\\_Paciente\\_09.pdf](https://www.pfizer.com.br/sites/default/files/inline-files/Farmorubicina_RD_Paciente_09.pdf)

Yadollahpour, A., Asl, H. M., Rashidi, S., **Applications of Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging: A Comprehensive Review**;

*Asian Journal of Pharmaceutics*, 11 (1), S7, 2017.

Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/320677495>

Yanai, T., Tew, D. P., Hady, N. C., **A new hybrid exchange correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP)**. *Chemical Physics Letters*, 393(1-3), 51-57.

<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.06.011>

Yang, F., Kemp, C. J., Henikoff, S., **Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters**, *Mutat Res. Author manuscript*; 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.007>

Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., Kutlu, O., **Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications**; *Molecules*, 25, 2193; 2020.

<https://doi.org/10.3390/molecules25092193>

Yoo, J., Park, C., Yi, G., Lee, D., Koo, H., **Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems**, *Cancers*, 11, 640; 2019.

<https://doi.org/10.3390/cancers11050640>

Younes, I., Rinaudo, M., **Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications**, *N* 13, p. 1133-1174; 2015.

<https://doi.org/10.3390/md13031133>

Yun, Y. H., Lee, B. K., Park, K.; **Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation**, *J Control Release.*, 10; 219: 2–7, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.005>