



Universidade Federal do ABC

**Bacharelado em Química**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

Lucas Roberto Randow de Almeida

**Azul de Metileno e Cobalaminas em terapia  
fotodinâmica: Uma abordagem quântica sobre a ação  
fotossensibilizante**

Santo André  
2018

Lucas Roberto Randow de Almeida

**Azul de Metileno e Cobalaminas em terapia  
fotodinâmica: Uma abordagem quântica sobre a ação  
fotossensibilizante**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Bacharelado em Química da Universidade Federal  
do ABC como um dos requisitos para a obtenção do  
título de Bacharel em Química.

Orientação: Profa. Dra. Paula Homem de Mello

Santo André  
2018

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, pelo apoio ao longo dos anos, suporte e consideração.

Aos meus pais, pelo esforço, preocupação e dedicação desde sempre.

À minha orientadora Paula Homem de Mello, que acreditou no meu potencial, dando-me independência e incentivo para concluir este trabalho. Além disso, revigorou minha esperança em prosseguir na carreira científica e me desenvolver, de modo a agir com mais relevância para o mundo em que vivemos.

Aos meus amigos, por terem participado dos altos e baixos, momentos felizes e mau-humor rotineiro, proporcionando sempre de maneira tragicômica, alegria no meio desse período de graduação.

À minha namorada Andréa, por ser a melhor companheira e mulher do mundo, tendo me apoiado ao longo de tantos anos, com muito carinho, paciência, compreensão e amor inefável.

À Universidade Federal do ABC, que causou profunda mudança e amadurecimento pessoal na minha vida, com construção de conhecimentos e infra-estrutura.

Ao CNPq, CAPES e Fapesp, pelo incentivo e apoio financeiro.

## RESUMO

Com a necessidade por métodos menos invasivos e eficazes, a terapia fotodinâmica (PDT) surgiu como alternativa relevante na medicina para o tratamento de células tumorais. Através das propriedades químicas e eletrônicas que fazem o Azul de Metileno (corante catiônico) um fotossensibilizador (FS) adequado para a PDT, este estudo baseia-se na análise comparativa entre as propriedades que são cruciais para que um composto seja ou não considerado um FS, tomando como moléculas de interesse os derivados de cobalamina Cianocobalamina (CNCbl), Metilcobalamina (MeCbl) e Adenosilcobalamina (AdoCbl). Com a simulação computacional realizada através do software *Gaussian 09* pelos métodos PM6, TD-DFT (time-dependent-density functional theory), diversas propriedades foram calculadas para esses compostos, dentre as quais o espectro de absorção e a Energia de Dissociação de Ligação (BDE), que indicaram a possibilidade de ação fotossensibilizadora para esses compostos. Como estudos posteriores, deve-se avaliar a ação dos intermediários de reação da fotólise das cobalaminas, aspectos cinéticos e termodinâmicos do mecanismo pelo qual ocorre a PDT, bem como da associação entre esses compostos com compostos fluoróforos, a fim de se obter comprimento de onda de absorção mais adequado para incidência do feixe de luz na terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: *Terapia Fotodinâmica, fotossensibilizador, azul de metileno, cobalamina, química computacional, PM6, TD-DFT.*

## ABSTRACT

With the need to obtain less invasive and more effective methods, Photodynamic Therapy (PDT) became as a relevant alternative to tumor cells treatment in medicine. Through the chemical and electronic properties that makes Methylene Blue (cationic dye) as a suitable photosensibilizer (FS) for PDT, this study has been based on the comparative analysis of the main properties for compounds that could be considered a FS, using cobalamin derivatives as Cyanocobalamin (CNCbl), Methylcobalamin (MeCbl) and Adenosylcobalamin (AdoCbl). The computational simulation consisted of quantum chemistry calculation performed with *Gaussian 09* with PM6 and TD-DFT methods. Absorption spectra and Bond Dissociation Energies (BDE), among other properties, indicated the potential of employment of these compounds as photosensibilizers. As further studies: evaluation of photolysis intermediates of cobalamins, kinetic and thermodynamic properties of reaction mechanisms responsible for PDT, as well as the combination of cobalamines with fluorophores, in order to obtain better maximum absorption wavelengths to PDT light incidence.

*Keywords: Photodynamic Therapy, photosensibilizers, Methylene Blue, Cobalamin, computational chemistry, PM6, TD-DFT.*

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DFT - Density Functional Theory (Teoria do Funcional de Densidade)

TD-DFT - Time-Dependent Density Functional Theory (Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo)

GGA - Generalized Gradient Approximation (aproximação do gradiente generalizado)

HF - Hartree-Fock

HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital molecular ocupado de maior energia)

LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Orbital molecular desocupado de menor energia)

MLCT - Metal Ligand Charge Transfer (Transferência de carga metal-ligante)

LMCT - Ligand Metal Charge Transfer (Transferência de carga ligante-metal)

PDT - Photodynamic Therapy - Terapia Fotodinâmica

MB - Methylene Blue - Azul de Metileno

Cbl - Cobalamina

AdoCbl - Adenosilcobalamina

MeCbl - Metilcobalamina

CNCbl - Cianocobalamina

FS - Fotossensibilizador

DMB - Dimetilbenzimidazol

B3LYP - Becke 3-parameter Exchange Functional and Lee Yang Parr Correlation Functional

PM6 - *Parametrization Method 6*

IC - *Internal Conversion* / Conversão Interna

ISC - *Intersystem Crossing* / Cruzamento Intersistema

BDE - *Bonding Dissociation Energy* / Energia de Dissociação de Ligação

ESP - Electrostatic Surface Potential / Potencial Eletrostático de Superfície

MP2 - Møller–Plesset

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT).....	9
1.1.1. MECANISMOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	11
1.2. AZUL DE METILENO.....	12
1.3. COBALAMINAS.....	13
3. OBJETIVOS.....	16
4. METODOLOGIA.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÕES.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
8. APÊNDICE.....	30

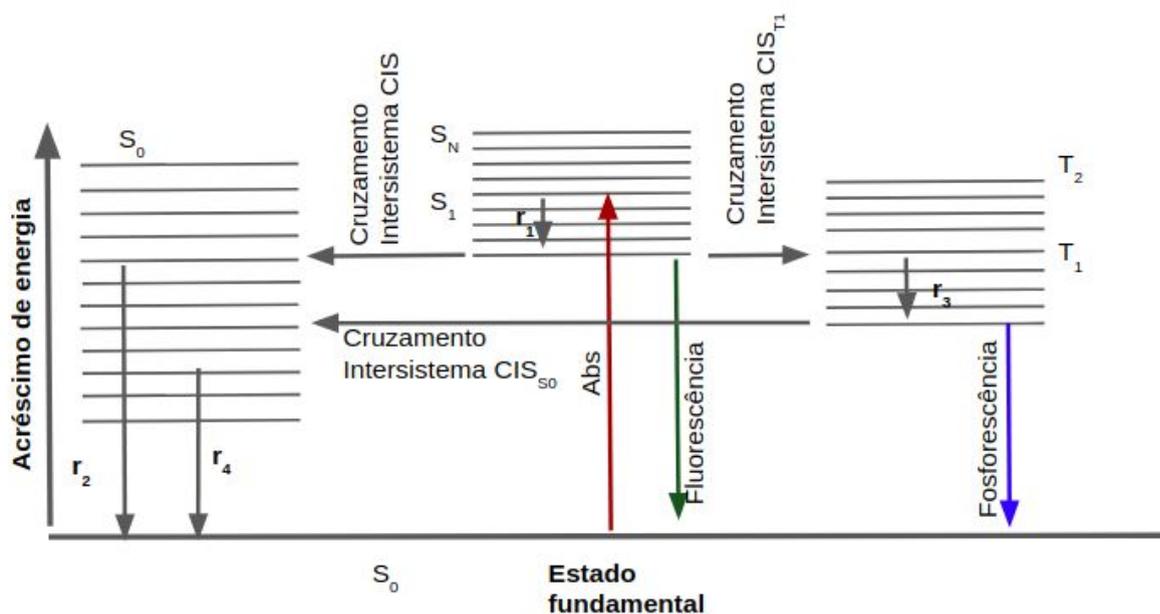
## 1. INTRODUÇÃO

Este trabalho foi direcionado a fim de investigar, através dos cálculos químico-quânticos, a propriedade fotossensibilizante (FS) das cobalaminas à luz do fotossensibilizador Azul de Metileno (MB), já reconhecido para esta finalidade. A compreensão da ação do agente fotossensibilizador e seus respectivos mecanismos é dada por meio do embasamento teórico da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) e também do método semi-empírico PM6. As estruturas selecionadas das cobalaminas para o estudo foram: Cianocobalamina (CNCbl), Metilcobalamina (MeCbl) e Adenosilcobalamina (AdoCbl). Os efeitos do solvente foram incluídos com o modelo contínuo de solvatação IEFPCM (Integral Equation Formalism of Polarizable Continuum Model). Foram realizados cálculos pelo método TD-DFT a fim de se obter espectros de absorção. Vale ressaltar também a importância dos cálculos da Energia de Dissociação de Ligação (BDE), que exprimem a influência dos fatores termodinâmicos na ação das cobalaminas como FS. Nas próximas seções, serão apresentados os fundamentos da Terapia Fotodinâmica e da aplicação dos compostos selecionados.

## 1.1. TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

A PDT é um tratamento relevante e com resultados promissores no tratamento de células tumorais. Sua administração é dada através de um agente fotossensibilizador (FS), via administração local preferencialmente. O FS é aplicado e concentrado na região de células tumorais e, através da incidência de um feixe de luz controlado, exclusivamente essas células em questão sofrerão a citotoxicidade causada pelos radicais produzidos pela interação com o FS (geralmente oxigênio singleto). A Terapia Fotodinâmica é dedicada à aplicação em regiões tóxicas e superficiais, podendo ser utilizada repetidas vezes, sem que interfira em outros tratamentos (como a própria quimioterapia). É um procedimento considerado menos invasivo, com uso também em procedimentos para o epitélio.[1][2]

Com o avanço da tecnologia, pode-se aprimorar técnicas relacionadas à emissão de luz, direcionando o foco para tratamentos terapêuticos. A terapia fotodinâmica (PDT) tem sido usada pela medicina em diversas sub-áreas. [2] A interação da luz com os fotossensibilizadores na PDT segue o mecanismo proposto por Jablonski, vide diagrama abaixo (Figura 1).



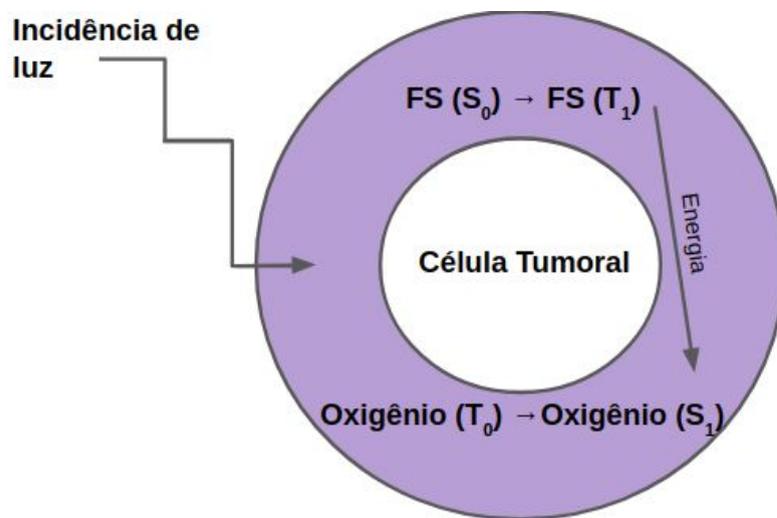
**Figura 1:** Processos fotoquímicos que ocorrem na molécula pela absorção de fóton.

Após a absorção de um fóton (estímulo) pela molécula que se encontrava em seu estado fundamental S<sub>0</sub>, há uma transição eletrônica para um estado mais energético. Transições rotacionais e vibracionais também podem ocorrer concomitantemente à transição eletrônica. Após excitação eletrônica para o estado excitado S<sub>1</sub> (absorção), a molécula passa normalmente, por um processo de relaxação vibracional que chega ao estado de mais baixa energia de S<sub>1</sub>, liberando energia para o sistema em forma de calor, chamado de R<sub>1</sub> (transição sem radiação). Além do processo descrito acima, a molécula pode alcançar nível de excitação vibracional S<sub>0</sub> degenerado com S<sub>1</sub>, também sem radiação, realizando uma conversão interna (IC). A relaxação oriunda dessa transição é chamada de R<sub>2</sub>.

Ainda mais, pode ocorrer uma transição com mudança de spin (para tripleto, possuindo elétron desemparelhado nesse estado eletrônico), passando de S<sub>1</sub> para T<sub>1</sub>, no chamado cruzamento intersistema (ISC). Em seguida, pode passar por relaxação vibracional R<sub>3</sub>, encontrando-se ainda num nível T<sub>1</sub> porém de menor energia. Há também ainda a possibilidade de outra ISC ocorrer, sofrendo relaxação R<sub>4</sub>, chegando novamente à S<sub>0</sub>. Os fenômenos conhecidos como fluorescência e fosforescência são observados nas transições de S<sub>1</sub> para S<sub>0</sub> e de T<sub>1</sub> para S<sub>0</sub>, respectivamente. Na fluorescência a transição (radiativa) ocorre entre estados de mesmo spin, com tempo de vida curto ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  s), enquanto a fosforescência (também radiativa), com tempo considerado longo ( $10^{-4}$  a  $10^2$  s), é uma transição que ocorre entre estados de spins diferentes.[3]

Para ser um fotossensibilizador adequado à PDT, os processos fotoquímicos (Figura 2) necessários são: , o FS sofre excitação de s<sub>0</sub> para o estado s<sub>1</sub> excitado (via absorção de luz); em sequência, passa ao estado excitado t<sub>1</sub>, via cruzamento intersistema (ICS) por uma relaxação não-radiativa, com tempo de vida maior que s<sub>1</sub>; ao voltar para s<sub>0</sub>, em decaimento, pode transferir energia ao sistema bioquímico (oxigênio molecular ou outros compostos do meio celular) envolvido na PDT, foco de ação nos tecidos e células tumorais.

Ao longo do tempo, foi verificada a efetividade e maior capacidade de acúmulo de mitocôndrias de células tumorais em matrizes/corantes catiônicos, por conta do potencial negativo da membrana celular ser mais elevado que de células saudáveis, sendo esta propriedade crucial para essa aplicação. [4][5][6][7]

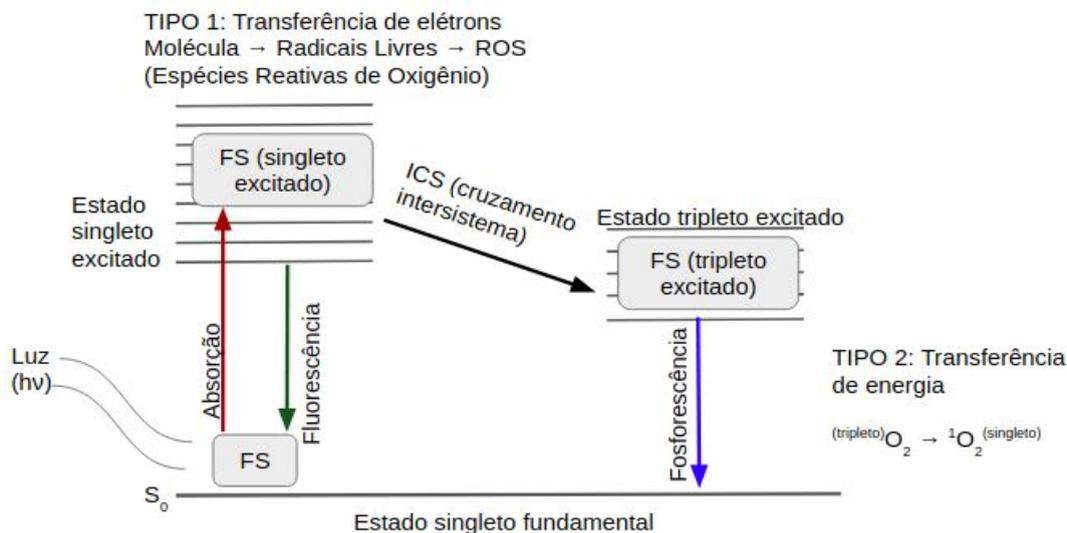


**Figura 2:** Processo da terapia fotodinâmica na célula, em que FS é o fotossensibilizador,  $S_0$  corresponde ao estado singlete fundamental,  $S_1$  ao estado singlete excitado,  $T_0$  é o estado tripleto fundamental e o  $T_1$  como estado tripleto excitado, conforme representados na reação.

### 1.1.1. MECANISMOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Para que ocorra a ação descrita dos fotossensibilizadores, são conhecidos dois mecanismos pelos quais o processo pode acontecer. Num primeiro mecanismo, observa-se a formação de um radical, uma molécula intermediária na rota fotodinâmica, o qual recebe elétron ou átomo de hidrogênio transferido diretamente do agente fotossensibilizador, agindo em sequência com oxigênio; Este, por sua vez, é excitado ao estado singlete  $s_1$ , que formará outros intermediários extremamente reativos (chamados de íons-radicais), como o  $O_2^-$  por exemplo, ou derivados de peróxidos, atacando as membranas lipoprotéicas. [8]

No segundo mecanismo observado no processo da PDT, há transferência de energia do FS (que encontra-se em estado excitado) com a molécula de radical gerada no primeiro mecanismo (oxigênio singlete). Os mecanismos são chamados respectivamente de mecanismo de transferência de elétron e mecanismo de transferência de energia; ambos são representados abaixo:

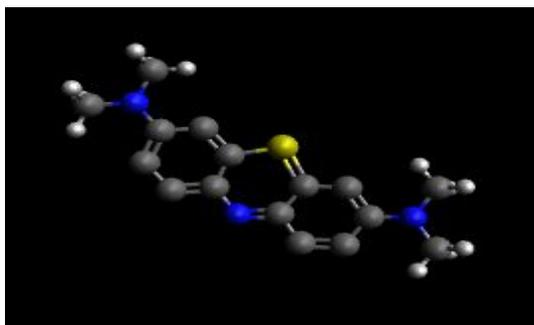


**Figura 3:** Mecanismos de Transferência de Elétron (TIPO 1) e de Transferência de Energia (TIPO 2), que ocorrem na terapia fotodinâmica.

## 1.2. AZUL DE METILENO

O azul de metileno (MB, Figura 4), pertencente ao conjunto de fenotiazínicos, possui rendimento quântico de formação de oxigênio singlete da ordem de 0,5 e baixo potencial de redução. [9] Possui baixa toxicidade, com absorção na região UV-vis (máximo em 664 nm), região útil da PDT. É um corante que possui uma estrutura básica de caráter hidrofílico, porém quando metilado apresenta hidrofobicidade. Possui tendência a formar agregados na presença de agentes agregadores como polieletrólitos, ou em função de solventes que favorecem a formação de agregados, como por exemplo, a água, dependendo da concentração de MB em solução. A formação de agregados altera a eficiência da fotossensibilização, diminuindo a quantidade de oxigênio singlete gerada na presença de um estímulo luminoso [10]

O fenômeno de auto-agregação pode ser minimizado pela inclusão na estrutura de substituintes carregados positiva ou negativamente, em virtude da repulsão eletrostática, aumentando a hidrofiliidade do corante.



**Figura 4:** Estrutura química do Azul de Metileno.

Importante ressaltar que a fototoxicidade e fotodinâmica do MB já foi verificada em diversos outros estudos e observada experimentalmente atuante em células tumorais, tais como linfomas e adenocarcinomas.[11] [12]

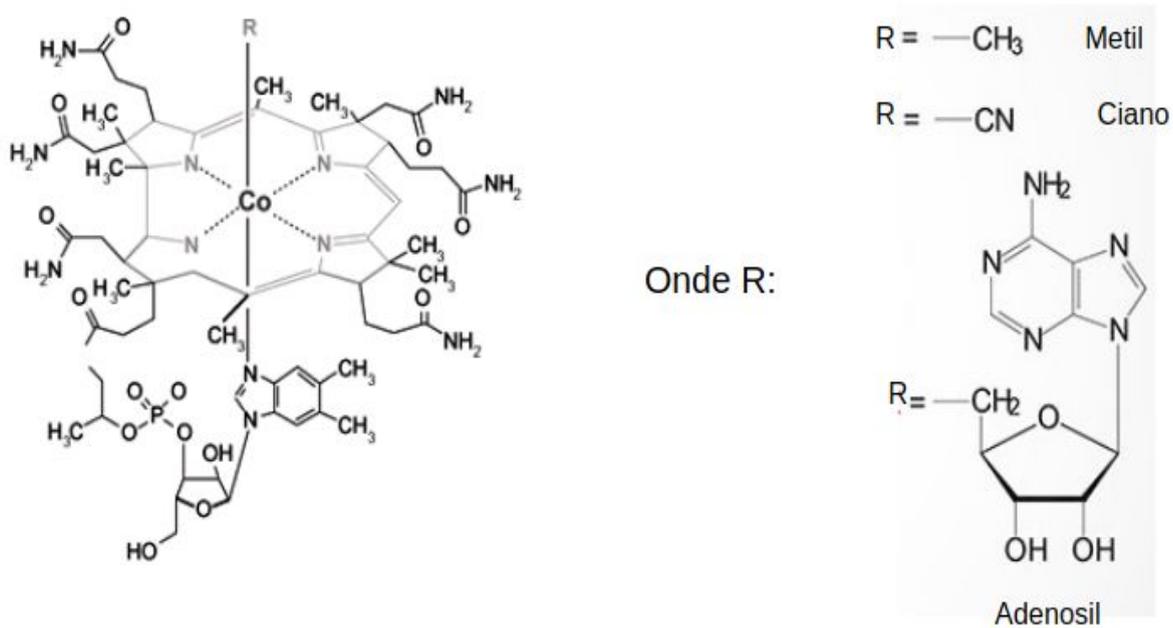
No caso do Azul de Metileno (MB), estudos como o de [13] apresentam dados concretos de que esse corante catiônico apresenta atividade *in vivo*, sob incidência controlada de luz, na ação contra diversos tipos de tumor, muito além das já conhecidas técnicas de coloração para histologia e citologia.[14][15]

Por tratar-se de um corante comum e de fácil obtenção, além dos diversos tipos de feixe de luz que podem ser aplicáveis sob o mesmo, o MB assume adequadamente o papel de fotossensibilizador para a PDT. Possui banda de absorção presente em 550 a 700 nm e absorvidade molar máxima de  $85,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em 664 nm.

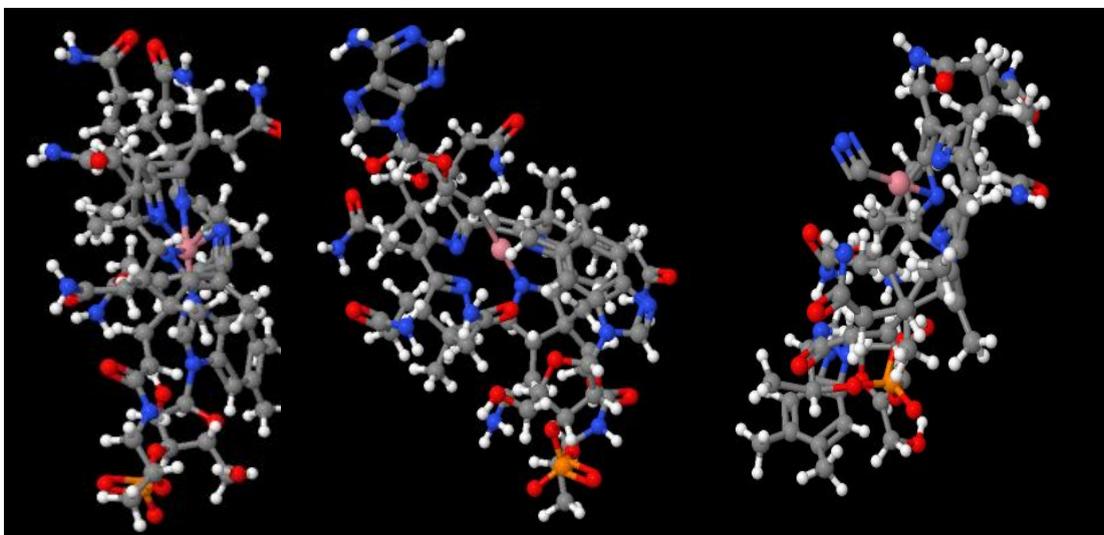
### 1.3. COBALAMINAS

As cobalaminas são complexos de cobalto, com coordenação de quatro nitrogênios em um anel de corrina (estrutura semelhante à da porfirina). Ao todo são sete amidas nas cadeias laterais incorporadas no anel, quatro propinamidas e três acetamidas, além do átomo central de cobalto estar coordenado com o átomo de nitrogênio do grupo dimetilbenzimidazol (DMB) axial da cadeia. Os derivados das cobalaminas variam numa gama de ligantes como por exemplo os grupos metila, ciano e outros, com a formação de organometálicos Metilcobalamina (MeCbl) e Adenosilcobalamina (AdeCbl), respectivamente (Figura 5). Esses organometálicos corrinoídes possuem papel importante como cofatores naturais, participando de reações enzimáticas como catalisadores. [16]

A referência à vitamina B12 é dada ao conjunto de compostos que compreendem a estrutura acima citada, com as variações axiais exemplificadas e outras. [17]



(a)



(b)

**Figura 5:** (a) Estrutura química geral para as cobalaminas estudadas; (b) Estruturas geradas via Avogadro das cobalaminas na sequência MeCbl, AdoCbl e CNCbl.

Na forma *in vivo*, as cobalaminas apresentam-se na forma de Cianocobalaminas (CNCbl), passando por processo de clivagem à MeCbl e AdoCbl.[18] As moléculas CNCbl, MeCbl e AdoCbl são consideradas neutras em pH fisiológico. [19]. Com relação aos cofatores de B12 (com os grupos alquil na camada superior do anel de corrina), o mecanismo de dissociação da ligação Co-C é dado mediante à natureza da forma oriunda de cobalamina e sua respectiva enzima. Essa diferença estrutural apenas no ligante presente no cobalto acaba alterando características essenciais no processo biológico que a clivagem segue e posterior formação de subprodutos, bem como quimicamente para o processo de atuação da terapia fotodinâmica.

As propriedades das cobalaminas já são objeto de estudo de diversas áreas da ciência há muito tempo, podendo se destacar principalmente na nutrição (como suplemento alimentar) e também na dermatologia, no tratamento de várias condições cutâneas como vitiligo, estomatite aftosa, dermatite atópica e acne. [20]

Com relação ao tratamento de tumores, as cobalaminas atuam nas células tumorais mediante uma associação às mesmas e, com a ligação do complexo à membrana da célula, as enzimas intracelulares promovem uma alteração na cadeia da cobalamina (via ligação 5-OH' do anel de ribose presente), favorecendo a forma conhecida como *transcobalamina*, num processo de clivagem oxidativa. [21]

Como no processo de PDT deve ocorrer a incidência de um feixe de luz controlado sob o fotossensibilizador, vale a compreensão do processo de fotólise. O primeiro processo de fotólise de cobalaminas foi reportado por volta de 1964.[22][23] Esse processo é extremamente relevante para compreensão da atuação das cobalaminas como fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica. A metilcobalamina apresenta-se como dependente fotoquimicamente de comprimentos de onda excitativos, enquanto a adenosilcobalamina é essencialmente independente no *range* visível. [24]

A fotólise dos derivados de alquil-Cbl de estudo, MeCbl e AdoCbl, envolve os singletos dos EE (estados excitados) menos energéticos em que a ligação Co-Carbono e sua dissociação via incidência de luz forme pares radicalares (PRs) alquil/Cbl(II). Para fazer uma análise inicial, vamos tomar os potenciais de energia da superfície que estão associados aos EE. No caso das alquil-Cbl, podemos inferir que a fotólise da ligação Co-C está intimamente ligada ao processo de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT).

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal utilizar métodos computacionais semi-empíricos e DFT para a validação da ação das cobalaminas como fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica, no tratamento de células tumorais, em comparação com o corante Azul de Metileno.

Simultaneamente, objetivou-se:

- a) a compreensão dos métodos de simulação DFT e PM6;
- b) avaliação das propriedades físico-químicas mais relevantes para a atividade do FS;
- c) a obtenção de geometrias otimizadas/estruturas de menor energia das cobalaminas estudadas, bem como das frequências relacionadas às mesmas;
- d) o cálculo das cargas de Mulliken/Potencial Eletrostático, resultando na distribuição da carga atômica ao longo das moléculas;
- e) o cálculo das energias dos orbitais HOMO e LUMO, para obtenção do TD-DFT.
- f) a compreensão dos mecanismos radicalares na ação do FS em terapia fotodinâmica.

A principal motivação para a escolha do grupo das cobalaminas (dentre tantos outros) como objeto de estudo foi, além da escassez de registros experimentais e de simulação sobre a ação do mesmo como fotossensibilizador em PDT, as cobalaminas representam um importante papel biológico no organismo, essencial para a síntese de DNA, produção de energia celular, tratamento de Alzheimer, artrite reumatóide e diversas outras aplicações [25][26]

### 3. METODOLOGIA

Serão estudados neste trabalho os compostos Azul de Metileno (derivado de fenotiazina) e derivados de Cobalaminas utilizando métodos computacionais. Como teoria base, estudou-se o comportamento dos compostos pela Teoria do Funcional de Densidade (DFT), método de Mecânica Quântica que possui ferramentas relevantes para a interpretação de resultados experimentais e projeção de modelos, no estudo de energias, frequências, geometrias, orbitais, espectros eletrônicos, modos vibracionais, etc. A DFT é importante na modelagem de sistemas e reações para todos os âmbitos da química e materiais, além também de sistemas biológicos e interações farmacológicas. [27] [28]

O desenvolvimento da DFT passa pela proposta de novos funcionais de troca e correlação (*vide*, por exemplo, Tabela 1), que é justamente a parte não conhecida para a resolução da equação de Schrödinger pela DFT.

**Tabela 1:** Exemplos de funcionais de troca e correlação da DFT

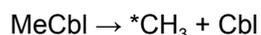
VWN5	LDA (Densidade Local)
BLYP	GGA (Aproximação do Gradiente Generalizado)
HCTH	
BP86	
TPSS	
M06-L	meta-GGA (Energia Cinética incluída)
B3LYP	Funcionais híbridos (com diferentes porcentagens de troca Hartree-Fock)
B97/2	
MPW1K	
MPWB1K	
M05-2X	
M06-2X	

A DFT pressupõe essencialmente que as propriedades do estado fundamental podem ser determinadas como um funcional da densidade do elétron (Teorema de Hohenberg-Kohn). Desse modo, é possível avaliar as propriedades de sistemas contendo muitos elétrons fazendo o uso dos chamados funcionais, que dependem da densidade eletrônica. Para a obtenção dos espectros eletrônicos de compostos deve ser utilizada a forma dependente do tempo, a TD-DFT. O funcional

mais utilizado na área de química é o B3LYP e foi o escolhido para as simulações dos espectros de absorção deste trabalho. Além disso, foi utilizada a função de base 6-311G(d,p) [29].

No entanto, tendo em vista o elevado número de elétrons das cobalaminas, graças ao elevado número de átomos e à presença do metal de transição Cobalto, não foi possível alcançar os critérios de convergência *default* do Gaussian para a otimização de geometria. Então, neste trabalho, as otimizações de Geometria, energias e respectivos cálculos de propriedades eletrônicas foram baseadas no método *Parametrization method* PM6 (JP Stewart), um dos métodos semi-empíricos implementados no *Gaussian 09*, com inputs gerados no Gaussview. Porém, para elementos acima do terceiro período, podem haver instabilidades nas funções de onda; esse fato é mais comum para metais de transição do que para elementos mais leves. Nesse caso, é necessário um algoritmo específico para que haja o procedimento SCF quadraticamente convergente (SCF=YQC).

Geometrias otimizadas via BP86 ou via PM6 de alquil-Cbl apresentaram maior concordância com os resultados experimentais.[30] Para os cálculos de energias de ligação dispersivas (BDE) o método mais adequado com as observações experimentais ainda é o B3LYP. O cálculo das BDE é importante pois exprime a clivagem homolítica da ligação Co-C do MeCbl e AdoCbl, representado no processo abaixo, com o exemplo do MeCbl:



em que há formação do radical  $\cdot\text{CH}_3$  e além disso, ocorre uma mudança no estado de oxidação do Cobalto, passando de 3+ para 2+. Na maioria dos estudos relacionados às cobalaminas, simulações computacionais foram realizadas com modelos truncados, sem a influência de um grupo substituinte presente no anel de corrina. Além disso, o ligante DMB presente na estrutura foi simplificado em diversos casos para ligantes axiais mais compactos como o imidazol, por exemplo. Alguns estudos foram registrados para valores de BDE correspondentes: Rovira e Biarnés (Método Car-Parrinello e funcionais B86-troca/P86-correlação, BDE = 31,7kcal.mol<sup>-1</sup>) e Doelker *et al.* (Método IMOMM e BP86/[LANL2DZ-P,6-31G(d)] e MM3, BDE = 36,0kcal.mol<sup>-1</sup>) [31] [32] Os efeitos de dispersão são diretamente relacionados com as BDE das alquil-cobalaminas [33] [34], mas que não foram diretamente incluídos nas simulações realizadas aqui.

Todos os cálculos foram realizados via cluster de alto desempenho Titânio da Universidade Federal do ABC.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela simulação computacional no Gaussian 09 fornecem ferramentas para analisar a adequabilidade da CNCbl, MeCbl e AdoCbl como fotossensibilizadores para PDT, mediante dados já conhecidos do MB. Observando em termos do Azul de Metileno, essa molécula é consagrada para o uso em PDT por conta de: possuir absorção intensa em 620-660 nm [35]; mínima toxicidade, sem fator carcinogênico e/ou mutagênico; composição constante; alta reatividade, gerando oxigênio singleto suficiente em seu estado excitado tripleto; solúvel em água; e de fácil eliminação pelo organismo e outras propriedades. Portanto, em termos de modelagem e simulação molecular, o MB propõe geometria adequada para interação e geração de oxigênio singleto, com menores energias de ligação, dipolos e potencial eletrostático, absorção em região adequada para a PDT, Gap entre HOMO e LUMO menor (atividade fotodinâmica mais eficiente).

Apesar das otimizações de geometria para MB, MeCbl e CNCbl terem conduzido a mínimos na superfície de energia potencial pelo método semi-empírico PM6, devido ao tamanho do ligante adenosil e sua complexidade, não foi atingida a convergência para a AdoCbl.. Portanto, para efeitos de estudo do presente trabalho, foi realizado apenas os cálculos de frequência com o PM6 e cálculo do espectro de absorção com a TD-DFT da molécula de AdoCbl (partindo da geometria das outras cobalaminas com a adição do grupo adenosil, sem otimização da estrutura), deixando como objetivo futuro, avaliar o melhor método para a otimização da geometria da adenosilcobalamina.

É importante ressaltar a relevância dos cálculos num meio em que ocorra a solvatação das moléculas, aproximando-se ainda mais da realidade em que a PDT ocorre. Para tanto, foi utilizado o método de solvatação *Integral Equation Formulation of Polarizable Continuum Model* (IEFPCM), que foi desenvolvido por Tomasi *et al.* É amplamente utilizado em métodos de simulação para solvatação, utilizando um modelo contínuo, calculando a energia molecular livre na solução como soma de três termos principais:

$$G_{sol} = G_{es} + G_{dr} + G_{cav}$$

em que a Energia Livre da Solução ( $G_{sol}$ ) é a somatória das Energias Livres Eletrostática ( $G_{es}$ ), de Repulsão e Dispersão ( $G_{dr}$ ) e a Energia de Cavitação ( $G_{cav}$ ), esta última é definida pela sobreposição das chamadas esferas de van der Waals centralizadas nas posições atômicas ou

grupos de átomos. Na Tabela 2 são apresentados, além da energia de solvatação, o dipolo das moléculas estudadas.

**Tabela 2:** Energia total (u.a.), energia total em solução aquosa - IEFPCM (u.a.), energia de solvatação (kcal.mol<sup>-1</sup>) e dipolo (Debye) das moléculas MB, CNCbl, MeCbl, AdoCbl calculados com método PM6

Molécula	Energia Total (u.a.)	Energia Total em solução aquosa (u.a.)	Energia de solvatação (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Dipolo (Debye)	Dipolo em solução aquosa (Debye)
MB	-694,25	-694,29	-26,90	4,19	7,63
CNCbl	-11264,79	-11163,72	68393,25	8,43	11,05
MeCbl	-11241,95	-11246,56	-3100,23	2,85	5,10
AdoCbl	-19686,11	-19686,86	-504,37	10,78	15,14

As geometrias foram comparadas nos dois ambientes químicos (fase gasosa e solução aquosa, GP e AS respectivamente). Observando os valores da Tabela 2, as energias apresentadas pelo método PM6 não sofreram alteração significativa com a mudança de solvatação para o MB. A variação das cobalaminas representou muito mais expressividade e deve-se à competição de transferência de carga entre o meio aquoso e o grupo ligante com o cobalto presente na estrutura das CNCbl, MeCbl e AdoCbl. Particularmente, a maior diferença entre os valores é verificada na CNCbl, sendo atribuída essa variação entre CNCbl e as alquil-Cbl por conta da ligação axial envolvendo Co-C. A ligação  $\sigma$  entre Co-C<sub>CN</sub> é mais forte do que a ligação Co-C<sub>Me</sub>, além do fato de que o caráter iônico da CNCbl é maior que das alquil-Cbl, conferindo um complexo mais sensível à variação do ambiente químico.

Em relação aos valores de momento de dipolo calculados, houve alteração significativa, sendo que a GP apresenta valores menores. Os valores são maiores para as Cbl do que para o MB (cerca de 4 Debye proporcionalmente entre os meios).

De modo a evidenciar os efeitos do solvente em relação ao dipolo e as propriedades eletrônicas, foram catalogadas também as variações nas cargas de Mulliken (Tabela 3 para o MB; para as cobalaminas verificar apêndices).

**Tabela 3:** Cargas de Mulliken para as estruturas das cobalaminas de estudo, comparando com as estruturas solvatadas

Fase Gasosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken	Solução Aquosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken
1 C -1.153277	1 C -0.409401
2 C 1.797371	2 C 5.670581
3 C -0.519906	3 C 5.194589
4 C 1.239356	4 C -5.793226
5 C 0.387690	5 C -2.006021
6 S -0.067360	6 S 2.302228
7 C -1.425196	7 C -3.505199
8 C 1.506650	8 C -2.428694
9 N -1.554744	9 N 4.106827
10 C -0.243843	10 C -3.291135
11 N -0.488879	11 N -2.783291
12 C 0.178104	12 C -0.762933
13 C 0.154740	13 C -0.993420
14 C 1.031357	14 C 1.049831
15 C -0.180901	15 C 2.642513
16 C -0.427440	16 C -2.258524
17 C 0.355056	17 C 3.457087
18 N 0.156545	18 N -0.865320
19 C 0.159224	19 C -0.946292
20 C 0.094688	20 C -1.280182

21 H 0.210414	21 H 0.182517
22 H 0.239852	22 H 0.326087
23 H 0.239903	23 H 0.327992
24 H 0.255964	24 H 0.279169
25 H 0.261914	25 H 0.334744
26 H 0.262035	26 H 0.338497
27 H 0.263605	27 H 0.234548
28 H 0.283638	28 H 0.374731
29 H 0.283723	29 H 0.369892
30 H 0.268771	30 H 0.337701
31 H 0.294092	31 H 0.397330
32 H 0.294074	32 H 0.395590

A análise populacional de Mulliken é o método mais usado para o cálculo das cargas atômicas, baseada na Teoria de Orbitais Moleculares. Como pode-se verificar, há pequena variação de carga entre as estruturas em fase gasosa e na solvatação aquosa para as moléculas de CNCbl e de MeCbl, ocorrendo-a essencialmente ao redor das ligações Co-C<sub>CN</sub> e Co-C<sub>Me</sub> e do anel de corrina da estrutura. Mais relevantemente, observa-se uma altíssima alteração nas cargas referentes à AdoCbl, na mesma parte da molécula de ligação entre o Co-C<sub>Ado</sub>. Esse fato ocorre pois a estrutura de heteroátomos do adenosil é pouco influenciada pelo efeito da solvatação (baixa solubilidade em água), além do que ocorrem efeitos estéricos e eletrônicos *trans*, uma vez que o N-ligante nucleofílico axial (presente no anel de heteroátomos do adenosil) reduz a força de ligação *trans* axial Co-C; desse modo, o átomo de cobalto que liga-se ao carbono presente diretamente no adenosil passa a acumular a maior parte das cargas oriundas do solvente (maior densidade) juntamente com o orbital  $\sigma$  antiligante da ligação Co-C. Esse fato é auxiliado por conta da base coordenada DMB presente na estrutura da cobalamina que é responsável de modo mecânico pela labilização da ligação Co-C através da distorção do macrociclo de corrina, [37] além de enfraquecer e promover um alongamento da ligação Co-C.

Os cálculos de TD-DFT forneceram argumentos para avaliar os espectros de absorção (Tabela 4). As simulações foram realizadas com 40 estados singletos. A transição HOMO  $\rightarrow$  LUMO é

a principal para as moléculas de interesse, pois é a mais intensa e próxima da região visível, vide comprimentos de onda de absorção. De modo equivalente à intensidade dos espectros experimentais, pode-se verificar que proporcionalmente ao dipolo de transição, tem-se a força do oscilador [38]. Ao observamos maiores picos, vemos as maiores transições, representadas pelos valores de HOMO e LUMO. Quanto mais próximo for esse Gap entre HOMO e LUMO ao esperado para a janela da PDT (entre 500 e 600 nm), melhor atividade fotodinâmica a molécula possui.

**Tabela 4:** Comprimento de onda (em nm) de absorção, Energia (eV), força do oscilador (F), orbitais envolvidos na transição e dipolo de transição em cada eixo cartesiano para as moléculas MB, CNCbl, MeCbl e AdoCbl, calculados pelo método TD-DFT (B3LYP6-311G(d)) em fase gasosa

Molécula	$\lambda$ (nm)	Energia (eV)	F (Força do oscilador)	Orbitais	Dipolo de Transição X	Dipolo de Transição Y	Dipolo de Transição Z
<b>Azul de Metileno</b>	498	4,656	0,0252	74-75	0,722	4,379	0,989
<b>Cianocobalamina</b>	284	4,353	0,0007	254-255	-17,900	9,907	-12,098
<b>Metilcobalamina</b>	285	4,349	0,0033	262-263	-19,784	1,711	-10,626
<b>Adenosilcobalamina</b>	311	4,316	0,0270	375-376	-22,57	-7,301	12,466

**Tabela 5:** Comprimentos de onda relacionados com as geometrias.

Geometria	Método	Lambda de Absorção (nm) GP	Lambda de Absorção (nm) literatura
Azul de Metileno (MB)	TD-DFT	498	664
Cianocobalamina (CNCbl)	TD-DFT	284	361
Metilcobalamina (MeCbl)	TD-DFT	285	375
Adenosilcobalamina (AdoCbl)	TD-DFT	298	377

É relevante observar que os máximos de absorção das moléculas de cobalamina estão verificados próximos da região inicial do espectro visível (~300nm), distanciando-se da região mais útil de estudo do UV-Vis para a PDT (500~600 nm), como o MB se encontra. Para que haja otimização das Cbl na absorção em região adequada, é sugerida como ação posterior a este trabalho, a associação com outro composto a fim de que haja um deslocamento batocrômico (deslocamento da banda de absorção para um comprimento de onda maior), com uma ação de abaixamento de energia entre os orbitais  $\pi^*$ . Essa adaptação química para as Cbl já foi verificada no estudo de SHELL *et al.*, com expansão do range fotoquímico através da associação com fluoróforos a fim de se obter melhor fotólise das alquil-cobalaminas.

Avaliando o MB, a transferência de carga ocorre da parte mais extrema da molécula em direção ao centro, representando uma transição HOMO  $\rightarrow$  LUMO, muito influenciado pela ação dos heteroátomos presentes no anel central.

Experimentalmente, as transições observadas nas cobalaminas são do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , com a participação de orbitais do tipo d, excitações eletrônicas representadas por transições do tipo MLCT, ocorrendo no anel de corrina da molécula correspondente de cobalamina, sendo representadas pelas energias de HOMO  $\rightarrow$  LUMO. Essas transições são responsáveis pela fotólise da molécula e consequentes mecanismos de formação de radical livre para a ação da PDT.

Tirando a CNCbl, as alquil-Cbl possuem outras regiões moleculares nas quais ocorrem transições eletrônicas. De maneira sugestiva, para um trabalho posterior, deve-se avaliar qual o efeito das outras regiões axiais e respectivas transições eletrônicas desses ligantes na ação como FS, bem como de estados intermediários dessas moléculas que surgem mediante às reações enzimáticas no ambiente biológico.

Para o cálculo das energias de ligação de dissociação (BDE, *bond dissociation energy*), foi realizado um cálculo de *single-point energy*, para a verificação da energia relacionada apenas com o Cobalto, a fim de se encontrar os valores de BDE respectivos das reações de fotólise das cobalaminas, conforme equação abaixo. Essa fotólise é importante para a ação enzimática no organismo, bem como da ação fotossensibilizadora:

$$\text{BDE}_{\text{Co-C}} = \text{E}[\text{Co(II)}] + \text{E}[\text{R}\cdot] - \text{E}[\text{Co(III)R}]$$

Da literatura, sabe-se que essa ligação alquil-Cbl varia entre 30-44 kcal.mol<sup>-1</sup>. [39]

**Tabela 6:** Energias de Dissociação de Ligação das moléculas de estudo calculadas via

*Single-Point Energy*

Molécula	Energia de Dissociação de Ligação, BDE (kcal/mol)
CNCbl	32,38
MeCbl	34,40
AdoCbl	27,11

Os valores registrados são muito próximos dos valores da literatura [40]. Portanto, as diferenças geométricas entre as moléculas não influenciam de modo relevante na fotólise dos compostos. Porém, de acordo com os cálculos de solvatação, observa-se que a ligação Co-C<sub>Ado</sub> é enfraquecida e as cargas são concentradas no átomo de cobalto, fazendo com que a AdoCbl possua menor BDE e mais facilidade em participar da fotólise do que as outras cobalaminas. Mesmo assim, todas as cobalaminas de estudo apresentaram BDE moderadas energias de dissociação e, com os processos enzimáticos de participação das mesmas, as BDE correspondentes são adequadas para o processo fotólise e por consequência, participação útil na PDT.

## 5. CONCLUSÕES

Devido ao caráter mais iônico da ligação Co-C<sub>CN</sub>, a cianocobalamina apresentou maiores alterações energéticas mediante solvatação, porém os maiores valores de dipolo foram apresentados pela adenosilcobalamina, uma vez que o grupo adenosil atua eletronicamente, termodinamicamente à concentração de cargas na ligação Co-C<sub>Ado</sub>, também explicado pelo efeito *trans*.

Ainda além, pode-se observar que houve uma média de 23,1% de diferença entre os comprimentos de absorção em relação aos valores da literatura, baseados no cálculo do TD-DFT. Em relação às bandas mais intensas (que representam a transição HOMO → LUMO), a transição mais próxima da região desejada em PDT e de maior intensidade (maior força do oscilador) foi a da AdoCbl.

As Energias de Dissociação de Ligação (BDE) foram calculadas, resultando em valores 12,3% menores do que os valores da literatura.

O funcional utilizado foi adequado para o cálculo das propriedades eletrônicas, porém não para as otimizações de geometria. Mesmo o PM6 apresentou restrições quanto a este passo fundamental no estudo de moléculas. Assim, é desejável realizar um estudo conformacional, talvez utilizando métodos clássicos, comparando com estruturas definidas por cristalografia.

Os cálculos realizados nas fases gasosa e solução aquosa puderam evidenciar, de modo simplificado, a propriedade como FS das cobalaminas estudadas (CNCbl, MeCbl, AdoCbl), de maneira semelhante, uma vez que atendem a grande maioria dos requisitos elencados para atuação como fotossensibilizador, com baixa toxicidade (já possuem papéis biológicos e metabolização enzimática) e alta reatividade (energias de ligação BDE moderadas, passíveis de fotólise), promovendo, possivelmente o mecanismo do tipo 1 de PDT. Para o mecanismo do tipo 2, seria necessário que as moléculas tivessem absorção em região próxima da excitação do oxigênio molecular, o que não acontece.

De modo geral, o estudo deve ser direcionado à uma investigação sobre melhores compostos em associação com as cobalaminas para que se atinja um valor mais adequado de absorção para a efetividade da PDT. Além disso, avaliar posteriormente os intermediários enzimáticos das reações das alquil-cobalaminas no ambiente celular, avaliando também fatores termodinâmicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W.M. SHARMAN, C.M. ALLEN, J.E. VAN LIER, Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, 4, 507-517, 1999.
- [2] DOLMANS D., D. FUKUMURA, R.K. JAIN, Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3, 380-387, 2003.
- [3] HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LCT. 2005.
- [4] KANDELA I. K. , BARLETT J. A. , INDIG G. L. , *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002, 1, 309–314.
- [5] DON A. S., HOGG J. H., *Trends Mol. Med.* 2004, 10, 372–378.
- [6] MORGAN J., OSEROFF A. R., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 49, 71–86.
- [7] MODICA-NAPOLITANO J. S., JOYAL L., ARA G., OSEROFF A. R. , APRILLE J. R., *Cancer Res.* 1990, 50, 7876–7881.
- [8] MACHADO, A.E.H., *Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas*. *Química Nova*, 23, 237-243, 2000.
- [9] REDMOND, R., *Photochemistry and Photobiology*, 1999.
- [10] WAINWRIGHT et al., 1997; FALJONI ALÁRIO, 2003; SEVERINO et al., 2003
- [11] WALKER, I., Gorman, S.A., Cox, R.D., Vernon, D.I., Griffiths, J., e Brown, S.B. A comparative analysis of phenothiazinium salts for the photosensitization of murine fibrosarcoma (RIF-1) cells in vitro. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3, 653-659, 2004.
- [12] MELLISH, K.J., Cox, R.D., Vernon, D.I., Griffiths, J., e Brown, S.B. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochemistry and Photobiology*, 75, 392-397, 2002.
- [13] TARDIVO J.P. *et.al.*, Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas, 2005
- [14] TUIE EM, KELLY JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J Photochem Photobiol B* 1993;21:103—24.
- [15] OCA, ORTIZ, RIVAROLA, MILLA, *Physicochemical Properties and Photodynamic Activity of Novel Derivatives of Triarylmethane and Thiazine*, 2013
- [16] HANNIBAL L., *Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency*, 2009

- [17] SYSEL, HORNE, STEINER, SUCHODOLSKI, BAUER, Pharmacokinetics of Intravenous Nitrosylcobalamin, an Antitumor Agent, in Healthy Beagle Dogs: A Pilot Study, 2012.
- [18] BANERJEE R., RAGSDALE S.W., The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes, 2003.
- [19] R. OBEID, N. SERGEY, S. FEDOSOV, E. NEXO, Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency, 2015.
- [20] BRESCOLL J., DAVELUY S., A review of vitamin B12 in dermatology, 2015.
- [21] US Patent 7232805, Cobalamin conjugates for anti-tumor therapy.
- [22] HOGENKAMP HP. Structure and Chemical Reactions of the Cobamide Coenzymes. Ann. N. Y. Acad.Sci. 1964; 112:552–564.
- [23] BERNHAUER K, MUELLER O, WAGNER F. New Chemical and Biochemical Developments in the Vitamin B12 Field. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1964.
- [24] J. SHIANG, A. WALKER, Time-Resolved Spectroscopic Studies of B12 Coenzymes: The Photolysis of Methylcobalamin Is Wavelength Dependent, 1998.
- [25] O'LEARY F., SAMMAN S.; Vitamin B12 in Health and Disease, 2010.
- [26] BARI N.M., KHAN Z.G., PATIL D.D., Analytical Methodologies for Determination of Methylcobalamin: An Overview, 2016
- [27] KOHN W., BECKE A.D., PARR R.G., J. Phys. Chem. 1996, 100, 12974.
- [28] DUARTE H.A., Quím. Nova 2001, 24(4), 501.
- [29] KOZLOWSKI, Photolytic Properties of Cobalamins, 2016.
- [30] HAJIME H., Which DFT Functional Performs Well in the Calculation of Methylcobalamin? Comparison of the B3LYP and BP86 Functionals and Evaluation of the Impact of Empirical Dispersion Correction, 2011.
- [31] ROVIRA, C.; BIARNÉS, X.; KUNC, K. Inorg. Chem. 2004, 43, 6628–6632.
- [32] DOELKER, N.; MORREALE, A.; MASERAS, F. J. BIOL. Inorg. Chem. 2005, 10, 509–517.
- [33] SIEGBAHN ET AL, S. L. J. Chem. Theor. Comput. 2010, 6, 2040–2044.
- [34] CHEN *et al*, S. L.; P. E. M. J. Phys. Chem. B 2011, 115, 4066–4077.
- [35] WAINWRIGHT, M. e GIDDENS, R.M. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. Dyes and Pigments, 57, 245-257, 2003.

[36] SHELL T.A., LAWRENCE D. S.; Vitamin B12: A Tunable, Long Wavelength, Light-Responsive Platform for Launching Therapeutic Agents, 2017

[37] MCCLEVERTY J. A., MEYER T.J., Comprehensive Coordination Chemistry II: From Biology to Nanotechnology, 2003

[38] KONAN, Y.N., GURNY R., ALLEMANN E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 66, 89-106, 2002.

[39] DOLPHIN, D.; B12, John Wiley & Sons, New York, 1982.

[40] BANERJEE R.; Chemistry and Biochemistry of B12, 1999.

## 7. APÊNDICE

**Tabela 6:** Cargas de Mulliken para as estruturas das cobalaminas de estudo, comparando com as estruturas solvatadas

CNCbl		AdoCbl		MeCbl	
Fase Gasosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken	Solução Aquosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken	Fase Gasosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken	Solução Aquosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken	Fase Gasosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken	Solução Aquosa: Nº átomo / Átomo / Carga Mulliken
1 Co 0.825895	1 Co 1.231832	1 Co 0.609872	1 Co 8.965610	1 Co -0.011516	1 Co 0.644327
2 C 0.271270	2 C 0.378118	2 C 0.214494	2 C 0.378249	2 N -0.180167	2 N -0.311583
3 C 0.326512	3 C 0.439000	3 C 0.285894	3 C 0.403848	3 N -0.767893	3 N -0.384482
4 C -0.046243	4 C -0.016799	4 C -0.109671	4 C -0.258066	4 N -1.003773	4 N -0.421293
5 H 0.000000	5 H 0.000000	5 H 0.000000	5 H 0.000000	5 N -0.197007	5 N -0.311409
6 C 0.184883	6 C 0.271087	6 C 0.188918	6 C 1.056325	6 C 0.258864	6 C 0.141589
7 C -0.427740	7 C -0.532007	7 C -0.445842	7 C -1.309547	7 C 0.376072	7 C 0.163478
8 C 0.656323	8 C 0.896938	8 C 0.671060	8 C 1.560184	8 C -0.054757	8 C -0.192695
9 C 0.427502	9 C 0.548675	9 C 0.382429	9 C 0.478635	9 H 0.000000	9 H 0.194265
10 C -0.138341	10 C -0.176416	10 C -0.086801	10 C -0.199431	10 C 0.230895	10 C 0.142236
11 H 0.000000	11 H 0.000000	11 H 0.000000	11 H 0.000000	11 C -0.172476	11 C -0.050640
12 C 1.120430	12 C 1.678383	12 C 0.998148	12 C 2.334522	12 C 0.364119	12 C 0.047532

13 C -1.230204	13 C -1.810937	13 C -0.888820	13 C -2.359241	13 C 0.442457	13 C 0.182718
14 H 0.000000	14 H 0.000000	14 H 0.000000	14 H 0.000000	14 C -0.132751	14 C -0.214137
15 C 0.987743	15 C 1.468767	15 C 0.634748	15 C 2.097859	15 H 0.000000	15 H 0.163594
16 C 0.356487	16 C 0.479582	16 C 0.250805	16 C 0.436450	16 C 1.043450	16 C 0.283182
17 C -0.050168	17 C -0.059211	17 C 0.410173	17 C 1.971974	17 C -1.266655	17 C -0.532438
18 H 0.000000	18 H 0.000000	18 C -0.236823	18 C -1.427603	18 H 0.000000	18 H 0.198620
19 C 0.656738	19 C 0.945459	19 C -0.093323	19 C 1.098389	19 C 1.058806	19 C 0.253309
20 C -0.343357	20 C -0.486201	20 C 0.190821	20 C 0.256942	20 C 0.358663	20 C 0.124669
21 C 0.108851	21 C 0.135017	21 C 0.076610	21 C 0.113627	21 C -0.055225	21 C -0.181275
22 C 0.329181	22 C 0.457986	22 H 0.000000	22 H 0.000000	22 H 0.000000	22 H 0.188339
23 C 0.078937	23 C 0.085578	23 C -0.051853	23 C 0.033067	23 C 0.763493	23 C 0.145144
24 H 0.000000	24 H 0.000000	24 H 0.000000	24 H 0.000000	24 C -0.488445	24 C -0.157885
25 C -0.029158	25 C -0.021185	25 C -0.050545	25 C -0.022532	25 C 0.279692	25 C 0.148692
26 H 0.000000	26 H 0.000000	26 H 0.000000	26 H 0.000000	26 C 0.312936	26 C 0.120843
27 C -0.068198	27 C -0.115172	27 H 0.000000	27 H 0.000000	27 C 0.098861	27 C -0.149216
28 H 0.000000	28 H 0.000000	28 H 0.000000	28 H 0.000000	28 H 0.000000	28 H 0.207188

29 H 0.000000	29 H 0.000000	29 N -0.083943	29 N -0.989068	29 C 0.025305	29 C -0.070620
30 H 0.000000	30 H 0.000000	30 N -1.152667	30 N -2.349678	30 H 0.000000	30 H 0.143615
31 N -0.117338	31 N -0.148868	31 N -0.627026	31 N -2.203118	31 C -0.048238	31 C -0.524441
32 N -1.006554	32 N -1.478315	32 N 0.312871	32 N -0.940925	32 H 0.000000	32 H 0.169132
33 N -0.925865	33 N -1.395235	33 C -0.037298	33 C -0.046344	33 H 0.000000	33 H 0.229223
34 N -0.017191	34 N -0.015469	34 H 0.000000	34 H 0.000000	34 H 0.000000	34 H 0.168587
35 C -0.069666	35 C -0.126941	35 H 0.000000	35 H 0.000000	35 C -0.032600	35 C -0.544199
36 H 0.000000	36 H 0.000000	36 H 0.000000	36 H 0.000000	36 H 0.000000	36 H 0.192438
37 H 0.000000	37 H 0.000000	37 C -0.344770	37 C -0.408403	37 H 0.000000	37 H 0.160614
38 H 0.000000	38 H 0.000000	38 H 0.000000	38 H 0.000000	38 H 0.000000	38 H 0.208915
39 C -0.334141	39 C -0.426684	39 H 0.000000	39 H 0.000000	39 C -0.338686	39 C -0.483657
40 H 0.000000	40 H 0.000000	40 C 1.414470	40 C 2.012340	40 H 0.000000	40 H 0.181289
41 H 0.000000	41 H 0.000000	41 O -0.848060	41 O -1.240821	41 H 0.000000	41 H 0.184606
42 C 1.529318	42 C 2.033128	42 N -0.369235	42 N -0.467014	42 C 1.541050	42 C 0.641462
43 O -0.923137	43 O -1.253578	43 H 0.000000	43 H 0.000000	43 O -0.934429	43 O -0.599263

44 N -0.464404	44 N -0.589065	44 H 0.000000	44 H 0.000000	44 N -0.467888	44 N -0.577676
45 H 0.000000	45 H 0.000000	45 C 0.134494	45 C 0.342775	45 H 0.000000	45 H 0.280371
46 H 0.000000	46 H 0.000000	46 H 0.000000	46 H 0.000000	46 H 0.000000	46 H 0.275851
47 C 0.113248	47 C 0.154875	47 H 0.000000	47 H 0.000000	47 C 0.144338	47 C -0.227009
48 H 0.000000	48 H 0.000000	48 C -0.221038	48 C -0.251871	48 H 0.000000	48 H 0.162385
49 H 0.000000	49 H 0.000000	49 H 0.000000	49 H 0.000000	49 H 0.000000	49 H 0.167882
50 C -0.204087	50 C -0.260689	50 H 0.000000	50 H 0.000000	50 C -0.202303	50 C -0.401160
51 H 0.000000	51 H 0.000000	51 C 1.356172	51 C 1.843862	51 H 0.000000	51 H 0.186888
52 H 0.000000	52 H 0.000000	52 O -0.838170	52 O -1.175347	52 H 0.000000	52 H 0.171675
53 C 1.488021	53 C 1.994784	53 N -0.366125	53 N -0.508857	53 C 1.459200	53 C 0.613546
54 O -0.914873	54 O -1.224897	54 H 0.000000	54 H 0.000000	54 O -0.908323	54 O -0.586342
55 N -0.430343	55 N -0.605712	55 H 0.000000	55 H 0.000000	55 N -0.424409	55 N -0.584012
56 H 0.000000	56 H 0.000000	56 C 0.043380	56 C 0.125484	56 H 0.000000	56 H 0.268078
57 H 0.000000	57 H 0.000000	57 H 0.000000	57 H 0.000000	57 H 0.000000	57 H 0.289366
58 C 0.000940	58 C -0.058096	58 H 0.000000	58 H 0.000000	58 C 0.003631	58 C -0.472587
59 H 0.000000	59 H 0.000000	59 H 0.000000	59 H 0.000000	59 H 0.000000	59 H 0.172156
60 H 0.000000	60 H 0.000000	60 C -0.036589	60 C -0.040300	60 H 0.000000	60 H 0.206597

61 H 0.000000	61 H 0.000000	61 H 0.000000	61 H 0.000000	61 H 0.000000	61 H 0.164461
62 C -0.050888	62 C -0.129702	62 H 0.000000	62 H 0.000000	62 C -0.079655	62 C -0.522032
63 H 0.000000	63 H 0.000000	63 H 0.000000	63 H 0.000000	63 H 0.000000	63 H 0.168639
64 H 0.000000	64 H 0.000000	64 C -0.422628	64 C -0.379799	64 H 0.000000	64 H 0.170959
65 H 0.000000	65 H 0.000000	65 H 0.000000	65 H 0.000000	65 H 0.000000	65 H 0.183894
66 C -0.336503	66 C -0.410201	66 H 0.000000	66 H 0.000000	66 C -0.323654	66 C -0.478257
67 H 0.000000	67 H 0.000000	67 C 1.498221	67 C 2.059606	67 H 0.000000	67 H 0.191891
68 H 0.000000	68 H 0.000000	68 O -0.811356	68 O -1.242362	68 H 0.000000	68 H 0.182246
69 C 1.497725	69 C 2.038109	69 N -0.438349	69 N -0.569113	69 C 1.473099	69 C 0.635278
70 O -0.887384	70 O -1.249763	70 H 0.000000	70 H 0.000000	70 O -0.847626	70 O -0.573294
71 N -0.445203	71 N -0.589024	71 H 0.000000	71 H 0.000000	71 N -0.480180	71 N -0.588944
72 H 0.000000	72 H 0.000000	72 C 0.077570	72 C 0.168470	72 H 0.000000	72 H 0.281629
73 H 0.000000	73 H 0.000000	73 H 0.000000	73 H 0.000000	73 H 0.000000	73 H 0.271161
74 C 0.156940	74 C 0.161452	74 H 0.000000	74 H 0.000000	74 C 0.107930	74 C -0.222672
75 H 0.000000	75 H 0.000000	75 C -0.205123	75 C -0.196577	75 H 0.000000	75 H 0.156444
76 H 0.000000	76 H 0.000000	76 H 0.000000	76 H 0.000000	76 H 0.000000	76 H 0.153901

77 C -0.209191	77 C -0.278849	77 H 0.000000	77 H 0.000000	77 C -0.233921	77 C -0.416610
78 H 0.000000	78 H 0.000000	78 C 1.354892	78 C 1.924622	78 H 0.000000	78 H 0.179061
79 H 0.000000	79 H 0.000000	79 O -0.881355	79 O -1.262875	79 H 0.000000	79 H 0.176341
80 C 1.573607	80 C 2.010505	80 N -0.358012	80 N -0.534342	80 C 1.602664	80 C 0.605360
81 O -0.917544	81 O -1.246976	81 H 0.000000	81 H 0.000000	81 O -0.963758	81 O -0.562432
82 N -0.556712	82 N -0.586096	82 H 0.000000	82 H 0.000000	82 N -0.439489	82 N -0.590118
83 H 0.000000	83 H 0.000000	83 C -0.073367	83 C -0.104415	83 H 0.000000	83 H 0.275247
84 H 0.000000	84 H 0.000000	84 H 0.000000	84 H 0.000000	84 H 0.000000	84 H 0.298138
85 C -0.089133	85 C -0.137858	85 H 0.000000	85 H 0.000000	85 C -0.097884	85 C -0.507570
86 H 0.000000	86 H 0.000000	86 H 0.000000	86 H 0.000000	86 H 0.000000	86 H 0.173301
87 H 0.000000	87 H 0.000000	87 C -0.028525	87 C 0.030137	87 H 0.000000	87 H 0.158390
88 H 0.000000	88 H 0.000000	88 H 0.000000	88 H 0.000000	88 H 0.000000	88 H 0.163534
89 C -0.090129	89 C -0.144724	89 H 0.000000	89 H 0.000000	89 C -0.081149	89 C -0.495538
90 H 0.000000	90 H 0.000000	90 H 0.000000	90 H 0.000000	90 H 0.000000	90 H 0.169331
91 H 0.000000	91 H 0.000000	91 C 0.015273	91 C -0.593494	91 H 0.000000	91 H 0.162366

92 H 0.000000	92 H 0.000000	92 C -2.172039	92 C -1.495474	92 H 0.000000	92 H 0.163092
93 C 0.121116	93 C 0.147329	93 C 1.125773	93 C 1.141429	93 C 0.096922	93 C -0.228155
94 H 0.000000	94 H 0.000000	94 C -1.120504	94 C 1.142561	94 H 0.000000	94 H 0.147097
95 H 0.000000	95 H 0.000000	95 O -0.355662	95 O -1.314487	95 H 0.000000	95 H 0.157893
96 C -0.207744	96 C -0.276848	96 N 1.264150	96 N -0.708099	96 C -0.199380	96 C -0.409769
97 H 0.000000	97 H 0.000000	97 C 1.793600	97 C 0.743417	97 H 0.000000	97 H 0.176084
98 H 0.000000	98 H 0.000000	98 C 0.557713	98 C 0.695290	98 H 0.000000	98 H 0.181583
99 C 1.439040	99 C 1.991896	99 C -0.135594	99 C 1.226412	99 C 1.430276	99 C 0.614317
100 O -0.908749	100 O -1.271203	100 O -0.756151	100 O -1.846053	100 O -0.909172	100 O -0.587879
101 N -0.398551	101 N -0.611442	101 N 0.694325	101 N 1.270887	101 N -0.378216	101 N -0.586069
102 H 0.000000	102 H 0.000000	102 C 0.050450	102 C 0.165634	102 H 0.000000	102 H 0.272064
103 H 0.000000	103 H 0.000000	103 H 0.000000	103 H 0.000000	103 H 0.000000	103 H 0.300229
104 C 0.018270	104 C 0.007809	104 H 0.000000	104 H 0.000000	104 C 0.023888	104 C -0.444911
105 H 0.000000	105 H 0.000000	105 H 0.000000	105 H 0.000000	105 H 0.000000	105 H 0.161975

106 H 0.000000	106 H 0.000000	106 C -0.086724	106 C -0.003475	106 H 0.000000	106 H 0.185468
107 H 0.000000	107 H 0.000000	107 H 0.000000	107 H 0.000000	107 H 0.000000	107 H 0.170890
108 C -0.097555	108 C -0.130122	108 H 0.000000	108 H 0.000000	108 C -0.056304	108 C -0.524658
109 H 0.000000	109 H 0.000000	109 H 0.000000	109 H 0.000000	109 H 0.000000	109 H 0.206241
110 H 0.000000	110 H 0.000000	110 C 0.031113	110 C 0.043693	110 H 0.000000	110 H 0.155927
111 H 0.000000	111 H 0.000000	111 H 0.000000	111 H 0.000000	111 H 0.000000	111 H 0.166563
112 C 0.021758	112 C 0.027846	112 H 0.000000	112 H 0.000000	112 C 0.028446	112 C -0.267142
113 H 0.000000	113 H 0.000000	113 C -0.216448	113 C -0.155040	113 H 0.000000	113 H 0.156127
114 H 0.000000	114 H 0.000000	114 H 0.000000	114 H 0.000000	114 H 0.000000	114 H 0.162134
115 C -0.190792	115 C -0.261560	115 H 0.000000	115 H 0.000000	115 C -0.239273	115 C -0.444658
116 H 0.000000	116 H 0.000000	116 C 1.302443	116 C 1.906572	116 H 0.000000	116 H 0.211620
117 H 0.000000	117 H 0.000000	117 O -0.821635	117 O -1.159181	117 H 0.000000	117 H 0.170870
118 C 1.487401	118 C 1.917527	118 N -0.583263	118 N -0.849676	118 C 1.455016	118 C 0.632874

119 -0.990954	O	119 -1.248479	O	119 0.000000	H	119 0.000000	H	119 -0.909787	O	119 -0.597023	O
120 N -0.663295		120 -0.857899	N	120 -0.245470	C	120 -0.289692	C	120 -0.654234	N	120 -0.445537	N
121 H 0.000000		121 H 0.000000		121 0.000000	H	121 0.000000	H	121 0.000000	H	121 H 0.271123	
122 C -0.271380		122 -0.301424	C	122 0.000000	H	122 0.000000	H	122 -0.279333	C	122 -0.419260	C
123 H 0.000000		123 H 0.000000		123 1.262683	C	123 1.943352	C	123 0.000000	H	123 H 0.180718	
124 H 0.000000		124 H 0.000000		124 -0.705050	O	124 -1.153837	O	124 0.000000	H	124 H 0.161991	
125 C 1.587971		125 C 2.045335		125 -0.357697	N	125 -0.545738	N	125 1.526127	C	125 C 0.607606	
126 -0.857316	O	126 -1.243616	O	126 0.000000	H	126 0.000000	H	126 -0.951323	O	126 -0.578171	O
127 N -0.538441		127 -0.604756	N	127 0.000000	H	127 0.000000	H	127 -0.316768	N	127 -0.587278	N
128 H 0.000000		128 H 0.000000		128 0.092195	C	128 0.162033	C	128 0.000000	H	128 H 0.271393	
129 H 0.000000		129 H 0.000000		129 0.000000	H	129 0.000000	H	129 0.000000	H	129 H 0.319816	
130 C 0.125781		130 C 0.204913		130 0.000000	H	130 0.000000	H	130 0.149989	C	130 -0.179630	C
131 H 0.000000		131 H 0.000000		131 0.636757	C	131 0.877790	C	131 0.000000	H	131 H 0.157115	

132 H 0.000000	132 H 0.165457				
133 C 0.662896	133 C 0.844179	133 C -0.146250	133 C -0.204115	133 C 0.677675	133 C 0.247948
134 H 0.000000	134 H 0.123383				
135 C -0.155119	135 C -0.172963	135 H 0.000000	135 H 0.000000	135 C -0.132347	135 C -0.572386
136 H 0.000000	136 H 0.205240				
137 H 0.000000	137 H 0.000000	137 P 2.900481	137 P 3.959309	137 H 0.000000	137 H 0.171303
138 H 0.000000	138 H 0.000000	138 O -1.054984	138 O -1.385976	138 H 0.000000	138 H 0.166770
139 P 3.107977	139 P 3.894097	139 O -0.971490	139 O -1.428472	139 N -0.714543	139 N -0.253092
140 O -1.124641	140 O -1.346790	140 O -1.137269	140 O -1.594942	140 C 0.576984	140 C 0.126326
141 O -1.097685	141 O -1.385896	141 O -1.152502	141 O -1.614099	141 H 0.000000	141 H 0.180325
142 O -1.305492	142 O -1.661000	142 C 0.418725	142 C 0.890955	142 N -0.631909	142 N -0.398681
143 O -1.193222	143 O -1.560009	143 H 0.000000	143 H 0.000000	143 C 0.091947	143 C -0.179215
144 C 0.732005	144 C 0.928949	144 C 0.166423	144 C 0.252831	144 H 0.000000	144 H 0.165806

145 H 0.000000	145 H 0.000000	145 H 0.000000	145 H 0.000000	145 C 0.029561	145 C 0.031086
146 C 0.185447	146 C 0.433972	146 C 0.505980	146 C 0.655506	146 C 0.245475	146 C 0.089078
147 H 0.000000	147 H 0.000000	147 H 0.000000	147 H 0.000000	147 C -0.060973	147 C -0.243905
148 C 0.454669	148 C 0.513606	148 C 0.072516	148 C 0.295239	148 H 0.000000	148 H 0.160946
149 H 0.000000	149 H 0.000000	149 H 0.000000	149 H 0.000000	149 C 0.143585	149 C 0.044713
150 C 0.283088	150 C 0.318255	150 C 0.181762	150 C 0.461055	150 C -0.023441	150 C 0.043021
151 H 0.000000	151 H 0.000000	151 H 0.000000	151 H 0.000000	151 C -0.070764	151 C -0.478244
152 C 0.338230	152 C 0.476136	152 H 0.000000	152 H 0.000000	152 H 0.000000	152 H 0.164956
153 H 0.000000	153 H 0.000000	153 O -0.389424	153 O -0.671290	153 H 0.000000	153 H 0.164746
154 H 0.000000	154 H 0.000000	154 O -0.211993	154 O -0.325936	154 H 0.000000	154 H 0.162097
155 O -0.715774	155 O -0.906027	155 H 0.000000	155 H 0.000000	155 C -0.092760	155 C -0.488350
156 O -0.205994	156 O -0.370569	156 O -0.183003	156 O -0.206527	156 H 0.000000	156 H 0.168156
157 H 0.000000	157 H 0.168818				

158 -0.233041	O 158 O -0.284915	158 N -0.531745	158 N -0.688838	158 H 0.000000	158 H 0.160772
159 H 0.000000	159 H 0.000000	159 C 0.457798	159 C 0.521891	159 C 0.818021	159 C 0.251216
160 N -0.630098	160 N -0.878244	160 H 0.000000	160 H 0.000000	160 H 0.000000	160 H 0.149374
161 C 0.529420	161 C 0.680983	161 N -0.530157	161 N -1.031076	161 C 0.279616	161 C 0.042220
162 H 0.000000	162 H 0.000000	162 C 0.009983	162 C -0.222580	162 H 0.000000	162 H 0.156998
163 N -0.487977	163 N -0.637192	163 H 0.000000	163 H 0.000000	163 C 0.539709	163 C 0.115518
164 C 0.037823	164 C 0.062296	164 C 0.055666	164 C 0.199193	164 H 0.000000	164 H 0.180508
165 H 0.000000	165 H 0.000000	165 C 0.200716	165 C 0.109141	165 C -0.068201	165 C -0.146245
166 C 0.046796	166 C 0.085543	166 C -0.043177	166 C 0.139434	166 H 0.000000	166 H 0.179494
167 C 0.255030	167 C 0.362168	167 H 0.000000	167 H 0.000000	167 C 0.632471	167 C 0.226162
168 C -0.037699	168 C -0.087684	168 C 0.047965	168 C -0.000173	168 O -0.789180	168 O -0.504241
169 H 0.000000	169 H 0.000000	169 C -0.048461	169 C -0.097516	169 O -0.274309	169 O -0.564393
170 C 0.069794	170 C 0.157252	170 C -0.035440	170 C -0.082173	170 H 0.000000	170 H 0.350280

171 C -0.102774	171 C -0.186820	171 H 0.000000	171 H 0.000000	171 O -0.298921	171 O -0.335735
172 C -0.060094	172 C -0.106557	172 H 0.000000	172 H 0.000000	172 H 0.000000	172 H 0.298758
173 H 0.000000	173 H 0.000000	173 H 0.000000	173 H 0.000000	173 P 3.196767	173 P 1.793871
174 H 0.000000	174 H 0.000000	174 C -0.024646	174 C -0.069561	174 O -1.153613	174 O -0.693803
175 H 0.000000	175 H 0.000000	175 H 0.000000	175 H 0.000000	175 O -1.122322	175 O -0.720794
176 C -0.080278	176 C -0.127596	176 H 0.000000	176 H 0.000000	176 O -1.243235	176 O -0.883746
177 H 0.000000	177 H 0.000000	177 H 0.000000	177 H 0.000000	177 O -1.501559	177 O -0.962254
178 H 0.000000	178 H 0.000000	178 N -0.861044	178 N -1.216816	178 C 0.542038	178 C -0.010619
179 H 0.000000	179 H 0.000000	179 C 1.046977	179 C 1.244906	179 H 0.000000	179 H 0.164603
180 C 0.418957	180 C 0.749706	180 H 0.000000	180 H 0.000000	180 H 0.000000	180 H 0.115973
181 N -0.735754	181 N -1.164674	181 N -0.886924	181 N -1.218367	181 C -0.123598	181 C -0.488869
		182 C 0.657990	182 C 0.961219	182 H 0.000000	182 H 0.177413
		183 C -0.551388	183 C -0.697955	183 H 0.000000	183 H 0.169420

		184 1.259521	C	184 1.747160	C	184 0.000000	H	184 H 0.168664
		185 -0.377224	N	185 -0.689858	N			
		186 0.351461	C	186 0.704798	C			
		187 0.000000	H	187 0.000000	H			
		188 -0.639325	N	188 -0.878626	N			
		189 -0.405827	N	189 -0.603908	N			
		190 0.000000	H	190 0.000000	H			
		191 0.000000	H	191 0.000000	H			
		192 0.702376	C	192 1.055959	C			
		193 0.000000	H	193 0.000000	H			
		194 0.062852	C	194 0.291631	C			
		195 0.000000	H	195 0.000000	H			
		196 0.324926	C	196 0.465360	C			

		197 0.000000	H	197 0.000000	H		
		198 0.381485	C	198 0.605558	C		
		199 0.000000	H	199 0.000000	H		
		200 -0.124390	C	200 -1.207052	C		
		201 0.000000	H	201 0.000000	H		
		202 0.000000	H	202 0.000000	H		
		203 -0.553254	O	203 -0.997615	O		
		204 -0.187554	O	204 -0.289049	O		
		205 0.000000	H	205 0.000000	H		
		206 -0.319857	O	206 -0.421834	O		
		207 0.000000	H	207 0.000000	H		
		208 -0.389753	C	208 -0.497133	C		
		209 -0.505590	C	209 -1.469953	C		

		210 0.911794	C	210 2.566962	C		
		211 -0.646265	O	211 -0.021369	O		
		212 0.593667	C	212 1.401174	C		
		213 -1.009309	C	213 -2.410893	C		
		214 0.769846	C	214 1.966667	C		
		215 1.566100	O	215 2.489812	O		
		216 -0.024696	O	216 -0.034492	O		
		217 0.000000	H	217 0.000000	H		
		218 0.000000	H	218 0.000000	H		
		219 0.005560	O	219 0.009483	O		
		220 0.000000	H	220 0.000000	H		
		221 0.000000	H	221 0.000000	H		
		222 0.021244	O	222 0.029047	O		

		223	H	223	H		
		0.000000		0.000000			
		224	H	224	H		
		0.000000		0.000000			
		225	O	225	O		
		-0.003016		-0.003835			
		226	H	226	H		
		0.000000		0.000000			
		227	H	227	H		
		0.000000		0.000000			
		228	O	228	O		
		0.132196		-2.122598			
		229	O	229	O		
		-0.145902		-0.727238			
		230	O	230	O		
		1.030326		2.045966			
		231	O	231	O		
		-0.613991		-0.705501			
		232	O	232	O		
		-0.268804		-0.613244			
		233	O	233	O		
		0.188261		-1.218497			
		234	O	234	O		
		0.019087		-1.052256			
		235	O	235	O		
		-0.171783		-2.020415			

		236 -0.209716	○	236 -1.287451	○		
		237 -0.832562	○	237 -1.306715	○		
		238 -0.921100	○	238 -1.925356	○		
		239 -0.168047	○	239 -0.214518	○		