



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA

ESTUDO TEÓRICO DOS ESPECTROS DE  
ABSORÇÃO E FLUORESCÊNCIA DO  
TRIPTOFANO E ANÁLOGOS

MARCOS SERROU DO AMARAL

Tese submetida ao Instituto de Física da  
Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora:

*Prof. Dr. Michel Loos* (Presidente), IQ/USP-SP.  
*Profa. Dra. Marília Junqueira Caldas*, IF/USP-SP.  
*Prof. Dr. Sylvio Roberto Accioly Canuto*, IF/USP-SP.  
*Prof. Dr. Paulo Monteiro Vieira Braga Barone*, UFJF-MG.  
*Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti*, UFRJ-RJ.

SBI-IFUSP

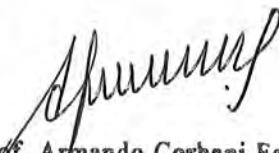


305M810T3623

Orientador: *Prof. Amando Siuiti Ito*

Co-orientador: *Prof. Michel Loos*

SÃO PAULO  
2001

  
*Prof. Armando Corbani Ferraz*  
Presidente da Comissão de Pós Graduação

INSTITUTO DE FÍSICA

Serviço de Biblioteca e Informação

Tombo: 3623

3623

ex-1

05/13/01

571.4  
A485e  
D  
ex.1

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação  
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Amaral, Marcos Serrou do

Estudo Teórico dos Espectros de Absorção e  
Fluorescência do Triptofano e Análogos.  
São Paulo, 2001.

Tese (Doutoramento) - Universidade de São Paulo  
Instituto de Física - Departamento de Física Geral

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito  
Co-orientador: Prof. Dr. Michel Loos  
Área de Concentração: Biofísica Molecular

Unitermos: 1. Ab Initio; 2. Semiempírico;  
3. Fluorescência; 4. Absorção Ótica;  
5. Método Híbrido QM/MM.

USP/IF/SBI-057/2001



*Às minhas queridas avós Guiomar Borges do Amaral e Anna Luiza da Cunha Serrou, ao meu avô Hermógenes Barbosa do Amaral e ao meu padrinho Lyrio Novaes.*

# Agradecimentos

Ao professor Amando Ito, pela oportunidade do doutorado, orientação, confiança, inspiração etc.

Ao professor Michel Loos, pelo acompanhamento, orientação, paciência, inspiração etc.

À minha querida Nájla, pelo amor, carinho, apoio e compreensão.

À professora Carla Goldman, pelas discussões a respeito das taxas de transferência de elétrons.

À professora Emi Márcia, pela suporte computacional e disponibilização do GAUSSIAN98 numa Alpha Digital de 64 bits para realização dos demorados cálculos de otimização de geometria no 1EE.

Ao professor Pedro Pascutti, pelos incentivos nos congressos, escolas etc, pela dica da interação cátion- $\pi$ , pela amizade.

À professora Marta Cassiano, pelas ajudas e incentivos, pelo THOR com caixa d'água que permitiu a realização dos cálculos neste trabalho do reagente na presença do solvente explícito.

Ao professor André Tsutomu, pelo apoio, pela informação a respeito do uso irrestrito do GAUSSIAN98 dentro dos *campi* da USP.

Às Profa. Maria Teresa e Cecil, pela confiança, pelos incentivos.

Aos meus pais, Diomedes e Márcia, e aos irmãos, Daniela e Paulo, pelo incentivo e pela eterna confiança que esse dia chegaria.

Ao meu avô Arsênio, pelo carinho sempre dado a este seu neto.

À tia Ambrolina, minha madrinha, que sempre foi e será minha terceira avó.

Aos amigos do Grupo de Biofísica e Física Médica da USP: Eduardo e Fábio, pelo doação dos importantes tempos de CPU (na biomol6 e na fismed2); à Silvana, pela amizade em momentos sempre oportunos; ao Marcelo, Cássia, Lorena, Sueli, Ana Maria, Ana Lúcia, Márcia, Rozane, Karin, Roberto Fernandez, Nestor pela amizade.

Às amigas Andréa Nemes e Isabelle Ortman, pelos momentos, discussões etc.

Aos amigos do IQ/USP: Breno e Sônia, pela compreensão e pelo carinho.

Ao Alex, pelo companheirismo, pela amizade, pelo Linux.

Aos amigos Hélio, Kotaro e Reinaldo, que me demonstraram que amizades podem durar para sempre.

Ao Winston e ao Marcelinho, pela amizade, pelo apoio e pelas oportunidades.

Ao Fernando e à Melissa, pela ajuda na organização das referências bibliográficas deste trabalho.

À tia Vivi, por sempre ter tido orgulho desse seu primeiro sobrinho.

Ao tio Roberto e à tia Yonne, pelas ajudas, pelo carinho e pela confiança.

Aos amigos do Centro de Computação Eletrônica (CCE), pelos momentos de estágio.

Aos demais amigos do Instituto de Física da USP: estudantes, funcionários e professores, por *tudo*.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

# Índice

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 Introdução	1
2 Espectroscopia Ótica	6
2.1 Absorção Ótica . . . . .	6
2.2 Fluorescência . . . . .	9
3 Método Híbrido <i>QM/MM</i>	13
3.1 Introdução . . . . .	14
3.2 Programa THOR Híbrido . . . . .	16
4 Etapa Experimental	25
4.1 Equipamentos e Materiais . . . . .	25
4.1.1 Equipamentos . . . . .	25
4.1.2 Materiais . . . . .	29
4.2 Resultados Experimentais para o 5-OH-triptofano . . . . .	30
4.2.1 Espectros de Absorção e de Fluorescência de Estado Estacionário . . . . .	30
4.2.2 Fluorescência Resolvida no Tempo . . . . .	30

4.3	Resultados Experimentais para o 7-aza-triptofano . . . . .	33
4.3.1	Espectros de Absorção e de Fluorescência de Estado Estacionário . . . . .	33
4.3.2	Fluorescência Resolvida no Tempo . . . . .	33
4.4	Comparação com Resultados Encontrados na Literatura . . . . .	35
<b>5</b>	<b>Cálculos no vácuo</b>	<b>40</b>
5.1	Metodologia . . . . .	41
5.1.1	Otimização de Geometria do Estado Fundamental e do Primeiro Estado Excitado . . . . .	41
5.1.2	Estados de Transição na Superfície de Energia Potencial do Estado Fundamental e do Primeiro Estado Excitado . . . . .	45
5.1.3	Espectros Teóricos de Absorção Ótica . . . . .	48
5.1.4	Espectros Teóricos de Fluorescência de Estado Estacionário . . . . .	49
5.1.5	Átomos Doadores e Aceitadores de Elétrons . . . . .	51
5.2	Resultados para o 5-OH-triptofano . . . . .	51
5.2.1	Estado Fundamental . . . . .	52
5.2.2	Primeiro Estado Excitado . . . . .	65
5.3	Resultados para o 7-aza-triptofano . . . . .	78
5.3.1	Estado Fundamental . . . . .	79
5.3.2	Primeiro Estado Excitado . . . . .	85
5.4	Resultados para o triptofano . . . . .	92
5.4.1	Estado Fundamental . . . . .	92
5.4.2	Primeiro Estado Excitado . . . . .	99
5.5	Discussão . . . . .	105

<b>6</b>	<b>Transferência de Elétrons</b>	<b>110</b>
6.1	Transferência de Elétrons: Base Teórica . . . . .	111
6.2	Programa para Cálculo de Taxas de Transferência de Elétrons	116
6.3	Resultados para as Taxas de Transferência de Elétrons no 5-OH-triptofano, 7-aza-triptofano e triptofano . . . . .	117
6.3.1	Energia de Reorganização Molecular $\lambda$ : Primeira Aproximação . . . . .	118
6.3.2	Energia de Reorganização Molecular $\lambda$ : Estimativas . .	120
<b>7</b>	<b>Simulações com o Solvente Explícito</b>	<b>125</b>
7.1	Metodologia . . . . .	125
7.1.1	Funções de Distribuição Radial entre Pares . . . . .	128
7.1.2	Espectros Teóricos de Absorção Ótica . . . . .	130
7.1.3	Ângulos Diedrais . . . . .	130
7.1.4	Populações Relativas . . . . .	131
7.2	Resultados para o 5-OH-triptofano . . . . .	131
7.2.1	Propriedades Energéticas . . . . .	132
7.2.2	Função de Distribuição Radial de Pares . . . . .	133
7.2.3	Populações Relativas e Espectros de Absorção Ótica . .	136
<b>8</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>145</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>151</b>



## Resumo

Realizaram-se cálculos *ab initio* e semi-empíricos em 5-hidrotriptofano (5-OH-trp), 7-aza-triptofano (7-aza-trp) e triptofano (trp), determinando as superfícies de energia potencial (SEP) do estado fundamental (EF) e do primeiro estado excitado (1EE), em função dos ângulos  $\chi_1$  e  $\chi_2$ , medidos nos diedros N-C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -C $_{\gamma}$  e C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -C $_{\gamma}$ -C $_{\delta 2}$ , respectivamente. Esses compostos foram estudados nos estados de protonação zwitteriônico, neutro e aniônico. A SEP do EF na forma zwitteriônica foi obtida pelo método semi-empírico AM1 e utilizada como referência para os cálculos *ab initio*. Os cálculos do 1EE foram feitos utilizando o método de Interação de Configurações com excitações simples (ICS) e orbitais internos congelados. As energias de transição entre o EF e o 1EE após as otimizações foram obtidas pelo método semi-empírico INDO/S-CIS, permitindo a obtenção dos espectros teóricos de absorção ótica, pelas energias de transição das geometrias otimizadas no EF, e de fluorescência de estado estacionário, pelas energias de transição das geometrias otimizadas no 1EE. Medidas experimentais dos espectros de absorção ótica e de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo foram realizadas com o 5-OH-trp e o 7-aza-trp em solução tampão fosfato, pH 7, 4. Os decaimentos fluorescentes ajustados a mais de uma exponencial foram estudados em termos das populações relativas de Boltzmann nos EF e 1EE. As taxas do decaimento não-radiativo de transferência de elétrons no 1EE foram obtidas pela implementação computacional da Teoria de Marcus e do Método da Expansão de Perturbação Renormalizada (EPR). Além disso, oti-

mizações de estruturas de estados de transição (ET) na SEP dos EF e 1EE foram realizadas pelo Método Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton e pelo algoritmo de Berny modificado. Para aproximar as condições experimentais, foram realizadas simulações por dinâmica molecular (DM) usando o método híbrido *QM/MM* no EF do 5-OH-trp na forma zwitteriônica, na presença do solvente aquoso representado explicitamente. Os resultados obtidos dos cálculos *ab initio* foram usados como referência para o início dessas simulações. As conformações visitadas no EF, os espectros teóricos de absorção óptica e as camadas de solvatação do solvente aquoso em torno do reagente são discutidas.

# Abstract

Semi-empirical and ab-initio calculations were performed on 5-hydroxytryptophan (5-OH-trp), 7-aza-tryptophan (7-aza-trp) and tryptophan (trp). The potential energy surface (PES) of the ground state (GS) and the lowest excited state (1ES) was determined as a function of  $\chi_1$  and  $\chi_2$  angles corresponding to the dihedrals  $\text{N-C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-C}_\gamma$  and  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-C}_\gamma\text{-C}_{\delta 2}$ , respectively. The compounds were studied in the zwitterionic, neutral and anionic states. The PES of the GS was obtained using the AM1 semi-empirical method and was used as a reference for the ab-initio calculations. The configuration interaction method with single excitations (CIS) was used for the calculations of the 1ES with frozen internal orbitals. After geometry optimization of GS, the transition energies to 1ES were obtained by INDO/S-CIS, giving the theoretical optical absorption spectrum. Similarly, following the geometry optimization of 1ES, the transition energies to GS were determined, giving the fluorescence emission spectrum. Experimental results were obtained for optical absorption and fluorescence spectra of 5-OH-trp and 7-aza-trp in phosphate buffer solution, pH 7.4. The fluorescence decay of the compounds was also examined. Decay profiles fitted to multiexponential function were analyzed in terms of Boltzmann relative populations in the GS and 1ES. The non-radiative electron transfer rates in the excited state were obtained by computational implementation of the Marcus' Theory with renormalized perturbation expansion method (RPE). In this study, optimizations of the transition states in the PES of the ground and lower

excited states were performed by the Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton method and the Bery algorithm modified. For further comparison with experimental conditions, molecular dynamic simulations for the zwitterionic 5-OH-trp were performed using the hybrid QM/MM method with explicit representation of the aqueous solvent. To start the simulations the results from ab-initio calculations were used. The conformations for the GS, the theoretical absorption spectrum and the solvation layers were compared to the experimental results.

# Capítulo 1

## Introdução

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas usadas para se estudar a relação entre estrutura e função de proteínas e peptídeos e o aminoácido triptofano (trp), Figura 1.1a, tem sido frequentemente usado como sonda fluorescente intrínseca[1]. Porém, em proteínas com vários resíduos de trp, a análise da emissão de fluorescência se torna complexa. Por essa razão, pequenas modificações estruturais têm sido realizadas no aminoácido natural trp a fim de alterar suas propriedades espectroscópicas de absorção ótica e fluorescência[2, 3].

Sendo assim, a molécula análoga pode ser incorporada biosinteticamente em proteínas na posição do aminoácido original. Para que essas alterações estruturais sejam válidas, a molécula análoga não pode modificar a estrutura, a estabilidade e a atividade da proteína. Wong et al. [4] incorporaram biosinteticamente o 5-hidroxitriptofano (5-OH-trp) e o 7-aza-triptofano (7-aza-trp) em nuclease estafilocócica a fim de estudar os efeitos causados na estrutura e estabilidade. Laws et al. [5] mostraram que a substituição da tirosina A14 na insulina pelo análogo do trp, 5-OH-trp, não altera as informações fornecidas a respeito do meio.

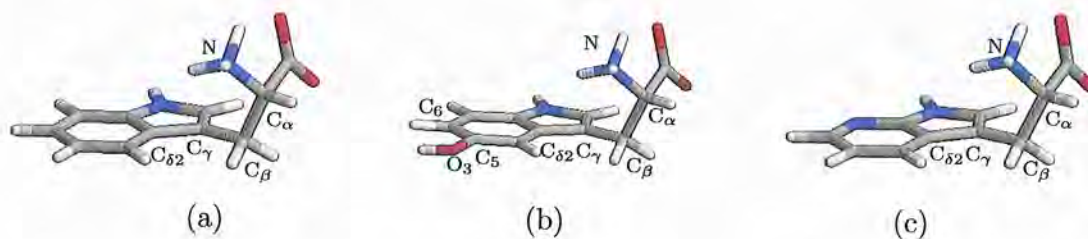


Figura 1.1: Representação gráfica do (a) trp, (b) 5-OH-trp e (c) 7-aza-trp na forma zwitteriônica ( $\text{NH}_3^+ \text{-C}_\alpha \text{-COO}^-$ ).

Além disso, o aumento espectral produzido pela substituição é importante em estudos de interação entre hormônios e receptores.

Dois análogos têm sido amplamente usados como sondas fluorescentes, os compostos 5-OH-trp e 7-aza-trp [4], Figuras 1.1b e 1.1c, respectivamente. Ambos apresentam modificações estruturais no indol, parte no trp responsável pela absorção e fluorescência. A molécula 5-OH-trp difere estruturalmente do aminoácido trp na posição 5 no anel aromático, onde é introduzida uma hidroxila. Já o composto 7-aza-trp tem o carbono  $\text{C}_7$  substituído por um nitrogênio.

Essas pequenas alterações no anel aromático modificam consideravelmente os espectros de absorção e de fluorescência desse aminoácido [5, 6, 7, 8]. Em relação ao trp, que apresenta o máximo de absorção em 280 nm, o composto 5-OH-trp tem absorção deslocada para o vermelho com o aparecimento de uma banda em torno de 296 nm, o que permite a excitação específica em proteínas com vários resíduos trp. Já sua emissão fluorescente



de estado estacionário é deslocada para o azul em relação ao aminoácido original e tem a largura da banda mais estreita. O máximo de emissão fluorescente, diferentemente do trp, não é sensível ao meio. O rendimento quântico em pH neutro é relativamente maior, o que favorece as medidas experimentais em concentrações baixas desse análogo. Para a fluorescência resolvida no tempo, resultados encontrados na literatura indicam que o 5-OH-trp em meio aquoso com pH neutro possui decaimento monoexponencial. Todavia experimentos realizados neste trabalho indicam que o melhor ajuste para o decaimento de fluorescência do 5-OH-trp em meio aquoso é o tri-exponencial, tendo uma componente principal com fator pré-exponencial igual a 0,947, além de duas componentes com tempos inferiores.

Para o 7-aza-trp, as modificações estruturais produzem também um deslocamento para o vermelho no máximo da absorção ótica em relação ao trp, mas inferior ao 5-OH-trp [5, 8]. As duas bandas observadas no espectro de absorção para o 5-OH-trp ficam unidas, impossibilitando a distinção entre elas. Na emissão fluorescente, o rendimento quântico diminui consideravelmente e o máximo de emissão é deslocado para o vermelho de cerca de 45 nm em relação ao trp. A fluorescência resolvida no tempo tem resultados ajustados com duas ou três exponenciais, dependendo do comprimento de onda de emissão.

A fim de interpretar essas diferentes propriedades espectroscópicas entre o trp e seus análogos: 5-OH-trp e 7-aza-trp, realizou-se neste trabalho cálculos *ab initio* dessas moléculas, usando a base 4-31G[9], determinando as superfícies de energia potencial (SEP) do estado fundamental

(EF) e do primeiro estado excitado (1EE), em função de  $\chi_1$  e  $\chi_2$ , medidos nos diedros N-C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -C $_{\gamma}$  e C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -C $_{\gamma}$ -C $_{\delta 2}$ , respectivamente (Figuras 1.1 e 1.2). Para o 5-OH-trp, rotações no diedro H-O $_3$ -C $_5$ -C $_6$ , denominado por  $\delta_{5OH}$ , também foram analisadas. A SEP do estado fundamental foi obtida pelo método semi-empírico AM1[10, 11, 12] e utilizada como referência para os cálculos ab initio. Os cálculos do estado excitado foram feitos utilizando o método de Interação de Configurações com excitações simples (ICS) e orbitais internos congelados[9]. As energias de transição vertical entre o EF e o 1EE após as otimizações de geometria foram obtidas pelo método semi-empírico INDO/S-CIS[13, 14]. Isso permitiu a obtenção dos espectros teóricos de absorção óptica, pelas energias de transição das geometrias do EF, e de fluorescência de estado estacionário, pelas energias de transição das geometrias do 1EE.

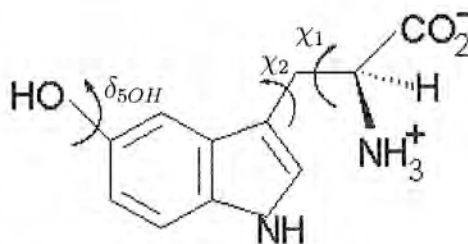


Figura 1.2: Ângulos Diedrais  $\chi_1$ ,  $\chi_2$  e  $\delta_{5OH}$  apresentados na estrutura química do 5-OH-trp na forma zwitteriônica.

No estudo da fluorescência resolvida no tempo, uma interpretação frequentemente usada é associar cada termo do ajuste exponencial a diferentes conformações rotaméricas[15, 16, 17, 18]. Para isso, foram determinadas as populações relativas dos rotâmeros estáveis encontrados

na SEP do 1EE. Além disso, a fim de verificar a possibilidade de interconversão entre esses rotâmeros, otimizações de estruturas de estados de transição (ET) na SEP do 1EE foram realizadas pelos métodos Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton[19, 20] e algoritmo de Berny modificado[21].

Diversos processos não-radiativos competem com a fluorescência no decaimento do 1EE para o EF [22, 23]. A transferência de elétrons no 1EE alternativo ao decaimento fluorescente é um mecanismo freqüentemente observado em proteínas[24] e descrito adequadamente pelo Método de Marcus[25, 26, 27]. Sendo assim, a fim de obter as taxas para essas transferências de cargas, desenvolveu-se um programa computacional para realização dos cálculos propostos pelo Método de Marcus, que trata da parte nuclear, e pela Expansão de Perturbação Renormalizada (EPR)[27, 28], que trata da parte eletrônica na transferência de elétrons.

Além dos cálculos no vácuo, simulações por dinâmica molecular (DM) usando o método híbrido *QM/MM*[29, 30] foram realizadas no EF na forma zwitteriônica para o 5-OH-trp. Os resultados obtidos dos cálculos ab initio foram usados como referência para o início dessas simulações. Neste caso, as conformações visitadas no EF, os espectros teóricos de absorção ótica e as camadas de solvatação do solvente aquoso em torno do reagente foram determinados.

## Capítulo 2

# Espectroscopia Ótica

### 2.1 Absorção Ótica

As regiões do ultra-violeta próximo (UV) e do visível (VIS) constituem uma pequena parte de todo o espectro da radiação eletromagnética. Nessas regiões, o comprimento de onda associado à radiação pode variar de 180 nm até 400 nm (UV) e de 400 nm até 750 nm (VIS). A absorção de luz nessas regiões depende da estrutura eletrônica da molécula e só pode ocorrer se a energia da radiação corresponde à diferença de energia entre dois estados eletrônicos. Além disso é preciso que a radiação eletromagnética, o fóton, interaja com a distribuição da carga molecular da transição caracterizada por

$$\hat{U}_{i \rightarrow j} = \langle \psi_k | \hat{U} | \psi_i \rangle \quad (2.1)$$

onde essa quantidade é denominada como o momento de transição entre os estados moleculares  $i$  e  $k$ , descritos pelas funções de onda  $\psi_i$  e  $\psi_k$ , respectivamente.

O operador  $\hat{U}$  pode corresponder tanto ao momento de dipolo elétrico ( $\hat{P}$ ) quanto ao momento de dipolo magnético ( $\hat{M}$ ) ou ao momento de quadrupolo elétrico ( $\hat{Q}$ ). Porém, todas essas transições associadas a cada um

desses momentos são distintas entre si. Nas regiões VIS ou UV, as possíveis transições ocorrem na razão de  $10^7:10^2:1$  com respeito aos momentos  $\hat{P}$ ,  $\hat{M}$  e  $\hat{Q}$ , respectivamente. Desta forma, é muito comum tratar apenas do dipolo elétrico de transição.

A intensidade de absorção devido a uma transição eletrônica pode ser medida pelo máximo valor do coeficiente de extinção molar,  $\epsilon_{max}$ . Uma quantidade com mais significado físico e fornecida em resultados de cálculos computacionais é dada pela área total sob a banda de absorção,

$$f_{osc} = 4,319 \times 10^{-9} \int \epsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (2.2)$$

e denominada força do oscilador, onde  $\tilde{\nu}$  é o número de onda e o valor máximo de  $f_{osc}$  para uma transição completamente permitida é igual à unidade.

Os espectros de absorção ótica na região UV de anéis aromáticos têm a forma apresentada na Figura 2.1a. As bandas de absorção devido às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  são divididas em três categorias de acordo com suas intensidades de absorção,  $\epsilon$ , e os estados excitados associados [22, 23, 31]:

- Estado  ${}^1L_b$ : baixa intensidade ( $\epsilon \sim 10^2 - 10^3$ ) e ainda pode ficar escondida devido à outra banda com maior intensidade.
- Estado  ${}^1L_a$ : intensidade moderada ( $\epsilon \sim 10^4$ ).
- Estado  ${}^1B_b$ : alta intensidade ( $\epsilon > 10^5$ ).

A Figura 2.1b mostra as posições dos máximos de absorção para essas três categorias de bandas,  ${}^1L_b$ ,  ${}^1L_a$  e  ${}^1B_b$ , em função do número de anéis benzeno. O deslocamento entre as bandas  ${}^1L_b$  e  ${}^1B_b$  ocorre paralelamente;

enquanto, a banda  ${}^1L_a$  tem um deslocamento mais acentuado à medida que aumenta o número de anéis benzeno, chegando a apresentar o máximo de absorção próximo ao da banda  ${}^1L_b$  no caso do naftaleno e do tetraceno [22].

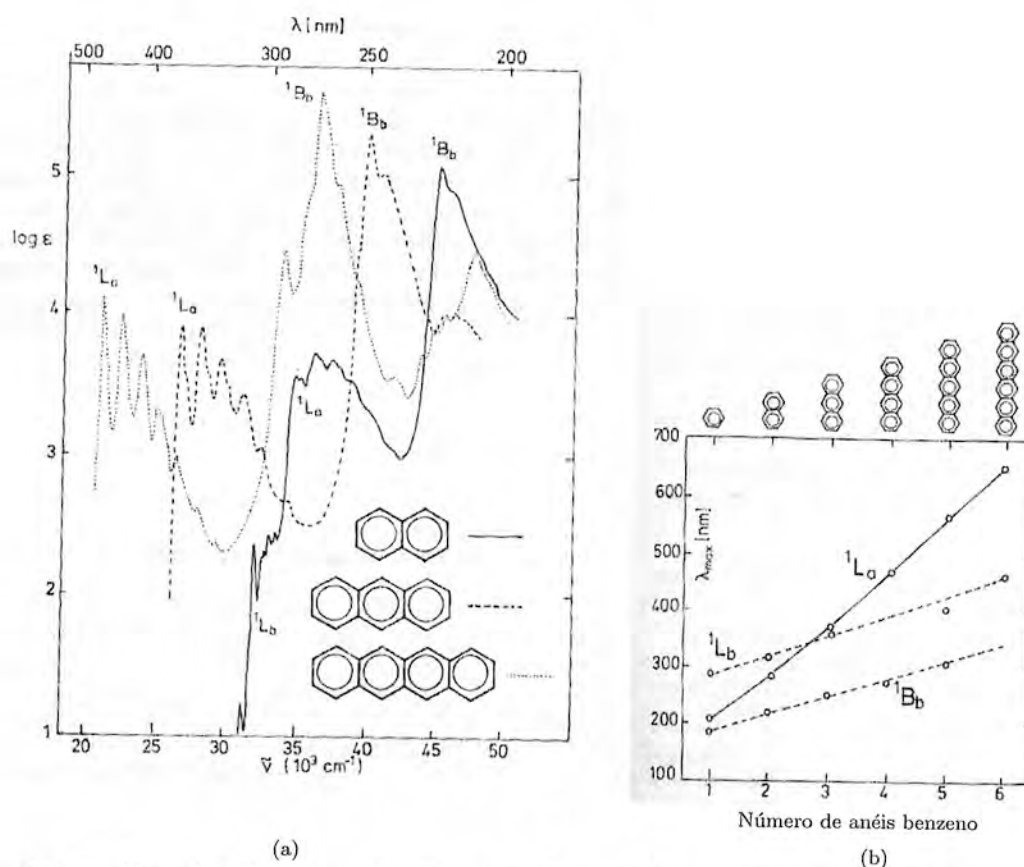


Figura 2.1: (a) Espectro de absorção do naftaleno (contínua), antraceno (traço) e tetraceno (ponto). (b) Comprimento de onda das bandas de absorção dos estados excitados  ${}^1L_b$ ,  ${}^1L_a$  e  ${}^1B_b$  (Fonte: referência [22]).

Esses resultados nos espectros de absorção, incluindo as devidas influências, podem ser estendidos para vários compostos orgânicos que são derivados desses anéis. O aminoácido trp possui o indol na cadeira lateral, por isso a banda de absorção ocorre em 280 nm [5, 6, 7, 8].



Neste caso, ela não é devido a apenas uma transição, mas a uma mistura de transições para os estados  $^1L_b$  e  $^1L_a$  [31, 32], com o estado  $^1L_b$  tendo seu máximo de absorção deslocado para o azul em relação à absorção do naftaleno, devido ao substituinte e ao tamanho do anel.

Nos estudos pela fluorescência do trp ou de seus análogos, em proteínas ou isoladas, as excitações são realizadas para os estados excitados  $^1L_a$  e  $^1L_b$ .

## 2.2 Fluorescência

Em geral, vários processos são responsáveis pela dissipação de energia no estado excitado levando a molécula de volta ao estado fundamental. Essa desexcitação pode ocorrer por processos fotofísicos ou fotoquímicos. Nesta seção serão discutidos apenas os processos fotofísicos, pois nas situações experimentais propostas para estudo neste trabalho, a identidade química das moléculas é preservada após a desexcitação.

Os processos de desexcitação do estado excitado podem ser divididos em radiativos, com emissão de luz, ou não-radiativos, sem emissão de luz. A ocorrência ou não desses processos depende da estrutura molecular como também do meio em que a molécula se encontra.

Esses processos fotofísicos podem ser estudados pelo Diagrama de Jablonski mostrado na Figura 2.2. Nesse diagrama são apresentados esquematicamente o estado fundamental ( $S_0$ ), os dois primeiros estados excitados singletos ( $S_1$  e  $S_2$ ) e os dois primeiros estados excitados tripleto ( $T_1$  e  $T_2$ ).

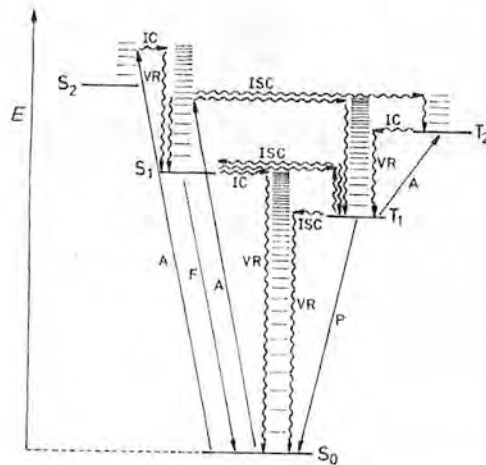


Figura 2.2: Diagrama de Jablonski. Processos de absorção de luz (A) e emissão são indicados por linhas sólidas (F=fluorescência, P=fosforescência) e processos não-radiativos por linhas onduladas (IC=conversão interna, ISC=conversão entre sistemas, VR=Relaxamento vibracional).

Da Figura 2.2, pode-se observar que uma molécula atinge um certo nível vibracional do estado excitado  $S_1$  ou pela absorção de um fóton com energia apropriada ou pela desexcitação não-radiativa a partir de níveis vibracionais de um estado excitado com maior energia, como por exemplo,  $S_2$ .

O aminoácido trp tem a intensidade de fluorescência e o rendimento quântico associados dependentes do meio devido a esses processos não-radiativos de desexcitação. O rendimento quântico de fluorescência  $\Phi_F$  e tempo de vida  $\tau$  são definidos por[24]

$$\Phi_F \equiv k_F / (k_F + k_{nr}) \quad (2.3)$$

$$\tau \equiv 1 / (k_F + k_{nr}) \quad (2.4)$$

onde  $k_F$  e  $k_{nr}$  são as taxas de decaimento fluorescente e decaimentos não-radiativos, respectivamente. Para o trp, a taxa  $k_{nr}$  pode ser expressa por

$$k_{nr} = k_{cs} + k_{rv} + k_{tp} + k_{ci} + k_{te} \quad (2.5)$$

incluindo a conversão entre sistemas  $k_{cs}$ , o relaxamento vibracional  $k_{rv}$ , a transferência de prótons no estado excitado  $k_{tp}$ , a conversão interna  $k_{ci}$  e a transferência de elétrons no estado excitado  $k_{te}$ .

Usando as relações 2.3 e 2.4 pode-se obter uma relação entre a taxa de decaimento não-radiativo com o rendimento quântico de fluorescência e o tempo de vida, desta forma tem-se que

$$k_{nr} = \frac{1 - \Phi_F}{\tau}. \quad (2.6)$$

Como a reação de transferência de elétrons tem sido apresentada como a mais efetiva dentre os processos de decaimento não-radiativos em resíduos de trp em peptídeos e proteínas, resolveu-se estudá-la quantitativamente neste trabalho a fim de entender os diferentes rendimentos quânticos observados experimentalmente entre o 5-OH-trp, o 7-aza-trp e o trp.

No capítulo seguinte, será apresentado o Método Híbrido *QM/MM* implementado no programa THOR[33, 34, 15], utilizado no estudo conformacional e espectroscópico do 5-OH-trp na presença do solvente aquoso explícito.. O Capítulo 4 trata de aspectos experimentais envolvidos no trabalho. No Capítulo 5 são apresentados os resultados dos cálculos efetuados no vácuo das geometrias do EF e do 1EE nas formas zwitteriônica, neutra e aniônica para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp. Mais adiante, no capítulo 6, a teoria utilizada para obtenção das taxas de transferência de elétrons será brevemente apresentada. As simulações com representação explícita do solvente aquoso são tratadas no Capítulo 7 e, finalmente, no Capítulo 8 são discutidas as conclusões do trabalho.

## Capítulo 3

### Método Híbrido $QM/MM$

Nos últimos anos, a velocidade na realização de processamento pelos computadores tem aumentado consideravelmente. Sendo assim, técnicas computacionais para investigação de sistemas naturais têm sido desenvolvidas e aprimoradas.

Em física, química e biofísica, vários estudos com o uso de métodos computacionais têm permitido compreender fenômenos observados experimentalmente tal como prever resultados para estudos futuros ou para triagens de novos reagentes, peptídeos ou proteínas. Métodos computacionais que utilizam a Mecânica Quântica produzem descrições completas a níveis moleculares do que acontece durante processos caracterizados por mudanças conformacionais complexas ou por reações químicas. Por exemplo, é possível obter informações conformacionais a respeito das geometrias de equilíbrio entre duas estruturas que se interconvertem, da estrutura de transição entre elas, da barreira de energia associada, dentre outras informações.

Neste capítulo será apresentado o Método Híbrido *QM/MM* que foi utilizado neste trabalho, pela implementação feita no programa THOR[33], para se levar em conta o efeito do solvente aquoso nas conformações e no espectro de absorção ótica do 5-OH-trp. Para isso, as moléculas de água são tratadas classicamente, enquanto que o soluto, pela mecânica quântica.

### 3.1 Introdução

Sistemas biológicos deveriam ser descritos pelos resultados de cálculos quânticos. Porém, devido ao enorme número de átomos nesses sistemas, as complexidades dos cálculos e as atuais limitações computacionais, essas contas não podem ser realizadas.

A fim de se obter resultados para estudos de sistemas biológicos, esforços foram realizados para desenvolver metodologias mais simples, possibilitando as simulações computacionais. Vários programas foram implementados para isso, por exemplo, CHARMM[35], AMBER[36], dentre outros. Os cálculos realizados por esses programas são chamados cálculos empíricos.

Desenvolvido em universidades públicas brasileiras, como a USP, a UFRJ e a UFBA, o programa THOR nasceu em meados dos anos 90 com implementações desenvolvidas em várias teses[15, 34]. Dentre os vários recursos já disponíveis está a possibilidade de realização de otimizações de geometria e de dinâmicas moleculares em sistemas contendo proteínas ou peptídeos na presença ou não do solvente aquoso explícito[15, 34]. Além disso, esse programa tem seu código-fonte, escrito na linguagem de programação Fortran,



totalmente aberto e livre para ser copiado em quantos computadores forem desejados, em várias plataformas, sem a necessidade de licença para o uso.

A fim de disponibilizar no programa THOR a possibilidade de realizar estudos de propriedades espectroscópicas, como o espectro de absorção ou de processos em que ocorram reações químicas, como o caso de reatividades em enzimas, Loos et al.[33] implementou-se o Método Híbrido *QM/MM*, integrando o THOR ao programa GEOMOP [37, 38]. A versão do programa THOR que realiza cálculos utilizando o Método Híbrido *QM/MM* é chamada, neste trabalho, por THOR Híbrido[33]. Nesse caso, parte do sistema em estudo pode ser tratada quanticamente, usando a hamiltoniana AM1, enquanto que a parte restante é tratada pelo campo de força empírico do programa THOR. No estudo de reações em enzimas, por exemplo, a reação enzimática pode ser estudada satisfatoriamente por mecânica quântica, definindo o sistema como o conjunto sítio ativo mais substrato. O resto da enzima é simulado por mecânica ou dinâmica molecular.

### 3.2 Programa THOR Híbrido

No cálculo empírico, o sistema biológico é descrito por seu campo de força molecular. Genericamente, atribui-se a denominação de campo de força à descrição de um sistema de muitas partículas pela soma de termos simples, que descrevem a interação entre dois, três ou quatro átomos. Diversos campos de força têm sido propostos. Como fatores comuns, entre eles aparecem termos harmônicos para descrever ligações covalentes entre pares de átomos e ângulos entre ligações químicas vizinhas; um termo torcional para descrever rotações em torno de ligações; e termos para descrever interações entre átomos não-ligados, que levam em conta a não interpenetração atômica, a dispersão, as atrações e repulsões eletrostáticas.

No programa THOR Híbrido, o campo de força é dado pela seguinte função energia potencial

$$V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) = \sum_{n=1}^{N_b} V_{b_n} + \sum_{n=1}^{N_\theta} V_{\theta_n} + \sum_{n=1}^{N_\xi} V_{\xi_n} + \sum_{n=1}^{N_\phi} V_{\phi_n} + \sum_{i < j}^N (V_{vdW} + V_C) + E_q, \quad (3.1)$$

onde  $N$  representa o número de átomos no sistema biológico em estudo;  $N_b$ , o número de ligações químicas;  $N_\theta$ , o número de ângulos entre pares de ligações químicas consecutivas;  $N_\xi$ , o número de ângulos diedrais impróprios; e,  $N_\phi$ , o número de ângulos diedrais próprios. A posição do  $i$ -ésimo átomo é dada pelo vetor-posição  $\vec{r}_i$ . As somatórias com índices mudos  $i$  e  $j$  são entre todos os pares de átomos se excluindo os primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados.

A seguir será descrito o que representa cada termo do campo de força 3.1 e seus respectivos parâmetros.

### Termos Harmônicos

O comprimento de ligações químicas oscila no tempo, por isso, a energia potencial das ligações entre átomos vizinhos é tratada pela Lei de Hooke,

$$V_b \equiv \frac{1}{2}k_b(b - b_0)^2, \quad (3.2)$$

onde  $k_b$  é a constante de Hooke associada à ligação química específica;  $b$ , o comprimento da ligação; e  $b_0$ , o parâmetro que define o comprimento de equilíbrio da ligação.

Da mesma forma que nas ligações químicas, as oscilações dos ângulos entre as mesmas também podem ser descritas por um potencial harmônico,

$$V_\theta \equiv \frac{1}{2}k_\theta(\theta - \theta_0)^2, \quad (3.3)$$

onde  $k_\theta$  é a constante de Hooke para a restituição ao ângulo de equilíbrio  $\theta_0$  entre as duas ligações químicas. O valor de  $\theta_0$  dependerá de fatores como hibridação dos orbitais atômicos e simetria da região a que pertence na molécula. O ângulo  $\theta$  é entre as ligações químicas específicas.

Em alguns programas que realizam cálculos empíricos, o campo de força possui um terceiro potencial harmônico, definido para manter a estrutura tridimensional em um conjunto de quatro átomos, descrevendo ainda oscilações da mesma. Nesse potencial, um átomo central, átomo  $i$ , é ligado a três outros átomos (átomos  $j$ ,  $k$  e  $l$ ). Sua expressão algébrica é dada por

$$V_{\xi} \equiv \frac{1}{2} k_{\xi} (\xi - \xi_0)^2, \quad (3.4)$$

onde  $\xi$  é o ângulo entre o plano formado pelos átomos  $ijl$  e o plano formado pelos átomos  $jkl$ . A constante de Hooke  $k_{\xi}$  é para restituição ao ângulo de equilíbrio  $\xi_0$  entre esses planos. Esse termo potencial é usado em campos de força onde os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono não são representados explicitamente. Ou seja, um átomo de carbono ligado a átomos de hidrogênio são considerados como sendo um único “átomo”, isto é, um pseudo-átomo. Este potencial é freqüentemente denominado “Potencial Diedral Impróprio”. Outra aplicação para esse potencial harmônico é na manutenção de determinadas conformações para quatro átomos ligados em seqüência, por exemplo, em anéis aromáticos, como o indol no trp, onde se deseja manter a estrutura planar.

**Termo Torcional**

A rotação entre ligações químicas é levada em conta em campos de força com a introdução de um termo torcional, o qual é denominado “Potencial Diedral Próprio”. Ele descreve a simetria rotacional pelas barreiras e mínimos de energia para a torção de cada ligação química com liberdade de rotação. No programa THOR, sua expressão algébrica é dada por

$$V_\phi \equiv k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)], \quad (3.5)$$

onde  $k_\phi$  é a constante que define a altura da barreira de rotação,  $n$  é o número de mínimos para a torção de uma ligação química específica,  $\phi$  é o ângulo diedral para a ligação central em uma seqüência de quatro átomos e  $\delta$  é a defasagem no ângulo diedral que pode colocar na posição  $\phi$  igual a zero um ponto de máximo ou de mínimo.

Os parâmetros dos potenciais 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5, são obtidos por cálculos quânticos sobre pequenas moléculas, aliados a informações estruturais obtidas experimentalmente e à “intuição química”.

**Termos de van der Waals e de Coulomb**

As interações entre átomos não-ligados quimicamente podem ser tratadas por potenciais efetivos, compostos por termos de curto e longo alcance que incluem a repulsão e atração de van der Waals e o termo eletrostático de Coulomb. Quando não há reações químicas, duas moléculas separadas interagem entre si obedecendo a potenciais desse tipo. Em uma molécula individual, com exceção dos primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados, cujas interações são tratadas pelos potenciais harmônicos já descritos anteriormente, a interação de cada átomo com os outros átomos da molécula é também descrita por termos de van der Waals e de Coulomb.

O termo de van der Waals é dado pela expressão

$$V_{vdW} = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (3.6)$$

onde  $\varepsilon$  é a profundidade do poço entre a barreira atrativa e a repulsiva e  $\sigma$  é o diâmetro de Lennard-Jones. Esses parâmetros são ajustados experimentalmente e por cálculos teóricos. A distância entre os átomos é dada por  $r$ .

O termo de Coulomb é dado por

$$V_C = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r}, \quad (3.7)$$

onde  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas residuais sobre os átomos  $i$  e  $j$ , respectivamente;  $r$  é a distância entre os átomos. A permissividade do vácuo é representada por  $\epsilon_0$ , enquanto a constante dielétrica que corrige  $\epsilon_0$  para considerar a polarizabilidade do meio é dada por  $\epsilon$ .

### Termo Híbrido

Todos os termos descritos até aqui, fazem parte do cálculo empírico do programa THOR. A fim de se tratar parte de uma molécula quanticamente, como no caso de uma enzima com substrato, introduziu-se o termo híbrido,  $E_q$ , ao potencial empírico do programa THOR (Equação 3.1). Essa é a diferença essencial entre o THOR sem o Método Híbrido QM/MM e a versão denominada THOR Híbrido.

No cálculo híbrido do programa THOR Híbrido, existem três conjuntos distintos de átomos. Um deles é composto pelos átomos clássicos. Estes átomos têm suas posições descritas por vetores-posições e a interação entre eles, pelos termos empíricos do campo de força do programa THOR. Outro conjunto é formado pelos átomos quânticos, os quais obedecem a aproximação de Born-Oppenheimer. Os cálculos sobre estes átomos são realizados por rotinas do programa GEOMOP. O último conjunto é composto pelos átomos chamados átomos de fronteira. Suas posições são descritas por orbitais “congelados” com grau de liberdade na orientação espacial. Será visto a seguir que os átomos de fronteira interagem entre si e com os átomos clássicos e os átomos quânticos.

A expressão para o termo híbrido é dada por

$$E_q \equiv \epsilon_{qq} + \epsilon_{fq} + \epsilon_{ff} + \epsilon_{fc} + \epsilon_{qc}, \quad (3.8)$$

onde

$$\begin{aligned} \epsilon_{qq} \equiv & \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} \left\{ H_{\mu\nu} + \frac{1}{2} \sum_j \sum_{\lambda} \sum_{\eta} 2c_{\lambda j} c_{\eta j} \left[ (\mu\nu|\lambda\eta) - \frac{1}{2}(\mu\eta|\lambda\nu) \right] \right\} \\ & + \frac{1}{2} \sum_{K \in S} \sum_{\substack{L \neq K \\ L \in S}} Z_K Z_L f_{KL}, \end{aligned} \quad (3.9)$$

$$\epsilon_{fq} \equiv \sum_l P_l \left\{ \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} \left[ (\mu\nu|ll) - \frac{1}{2}(\mu l|\nu l) \right] + \sum_{K \in S} Z_K (ll|s_K s_K) \right\}, \quad (3.10)$$

$$\epsilon_{ff} \equiv \sum_l P_l \sum_{l'} \frac{1}{2} P_{l'l'} (ll|l'l'), \quad (3.11)$$

$$\epsilon_{fc} \equiv \sum_l P_l \sum_{A \in E} Q_A (ll|s_A s_A), \quad (3.12)$$

$$\epsilon_{qc} \equiv \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} \sum_{A \in E} Q_A (\mu\nu|s_A s_A) + \sum_{K \in S} \sum_{A \in E} Z_K Q_A f_{KA}. \quad (3.13)$$

Nas equações 3.9 a 3.13 têm se que a letra  $S$  representa o conjunto dos átomos quânticos e a letra  $E$ , o conjunto dos átomos clássicos. As somatórias com índices mudos sendo letras do alfabeto grego,  $\mu, \nu, \eta, \lambda$ , são sobre o conjunto dos átomos quânticos, enquanto que as somatórias com índices mudos  $l$  e  $l'$  são sobre o conjunto dos átomos de fronteira.  $P_{\mu\nu}$  e  $H_{\mu\nu}$  denotam



os elementos das matrizes densidade e hamiltoniana, respectivamente, correspondente aos orbitais atômicos  $|\mu\rangle$  e  $|\nu\rangle$  do subsistema  $S$ , enquanto  $P_{ll}$  representa os elementos diagonais da matriz densidade correspondente aos orbitais “congelados”. A repulsão atômica caroço-caroço semiempírica é simbolizada pela função  $f_{KA}$  e, de acordo com o formalismo NDDO, a interação coulombiana entre duas cargas atômicas  $A$  e  $K$  é assumida ser proporcional a integral coulombiana entre as funções  $s_A$  e  $s_K$ . A carga residual e o número de elétrons de valência dos átomos do subsistema  $A$ , formado por átomos clássicos, são dados por  $Q_A$  e  $Z_A$ , respectivamente, com  $P_A = Z_A - Q_A$  e  $Z_K$ , o número de elétrons de valência do átomo  $K$  pertencente ao subsistema  $S$  dos átomos quânticos.

A energia do campo-autoconsistente para os átomos quânticos é dada pela equação 3.9. Já as interações entre os átomos quânticos e clássicos com os átomos de fronteira são representadas pelas expressões 3.10 e 3.12, respectivamente. O termo  $\epsilon_{ff}$ , equação 3.11, é devido a interação dos átomos de fronteira entre si. E, finalmente, a energia de interação entre os átomos quânticos e clássicos é dada pela expressão 3.13. O primeiro termo da equação 3.13 representa a interação entre os elétrons quânticos e o subsistema clássico; enquanto o segundo termo, as interações eletrostáticas entre os núcleos do subsistema quântico com o subsistema clássico.

### Minimização de Energia e Dinâmica Molecular

O programa THOR utiliza tanto o método *steepest-descent*[34, 39] quanto o *Gradiente Conjugado*[15, 34] para minimizar a energia potencial, equação 3.1. Para a dinâmica molecular, os cálculos são realizados com o algoritmo *Summed Verlet* ou *leapfrog* [15].

## Capítulo 4

# Etapa Experimental

Neste capítulo, serão descritos os equipamentos e a metodologia utilizados para determinação dos espectros de absorção e de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo. Em seguida, os resultados experimentais serão apresentados para o 5-OH-trp e o 7-aza-trp e comparados a fim de verificar os efeitos nas propriedades óticas devido às mudanças estruturais nessas moléculas.

### 4.1 Equipamentos e Materiais

#### 4.1.1 Equipamentos

As medidas de absorção ótica foram realizadas em espectrômetro HP 8452 A com irradiação por lâmpada de deutério e detecção por rede de diodos. Para a determinação da fluorescência de estado estacionário, um espectrômetro Fluorolog 3 Jobin Yvon-Spex foi utilizado, com aberturas das fendas de excitação e emissão variando entre 1 nm e 2 nm de largura de banda, dependendo do soluto e da concentração na amostra. A excitação foi feita com lâmpada de xenônio e os comprimentos de onda de excitação e emissão foram selecionados por monocromadores.

A técnica utilizada para a obtenção do decaimento da intensidade de fluorescência baseia-se no método de contagem de fóton único. Neste método, a amostra é excitada por um pulso de luz e os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra, obtendo-se o perfil de decaimento. Na Figura 4.1, um esquema genérico de um espectrofluorímetro com resolução temporal pode ser visto. O esquema está dividido em duas partes: sistema de excitação e sistema de detecção e aquisição de dados.

O sistema de excitação contém como fonte de excitação um sistema que tem como ponto de partida um laser de Argônio (2060-10 AS, Spectra Physics) cujas transições 4p e 4s produzem diversas linhas entre 4545 e 5287 Å. A luz de saída deste laser, com potência integrada na faixa entre 6,0 e 10,0 W, bombeia um laser de Titânio-safira (Tsunami 3950, Spectra Physics) que gera pulsos de laser na faixa compreendida entre 840 e 1.000 nm (Figura 4.2) e com frequência de repetição dos pulsos de 4 Mhz. Estes pulsos passam por um selecionador de pulsos (3980-25, Spectra Physics) que permite a operação em frequências, na faixa de 80 a 400 kHz, mas adequadas ao método de contagem de fótons. Finalmente, o laser passa por um gerador de terceiros harmônicos (GWN-23PL, Spectra Physics), de modo que o feixe emergente tem comprimentos de onda sintonizados na região entre 280 e 330 nm.

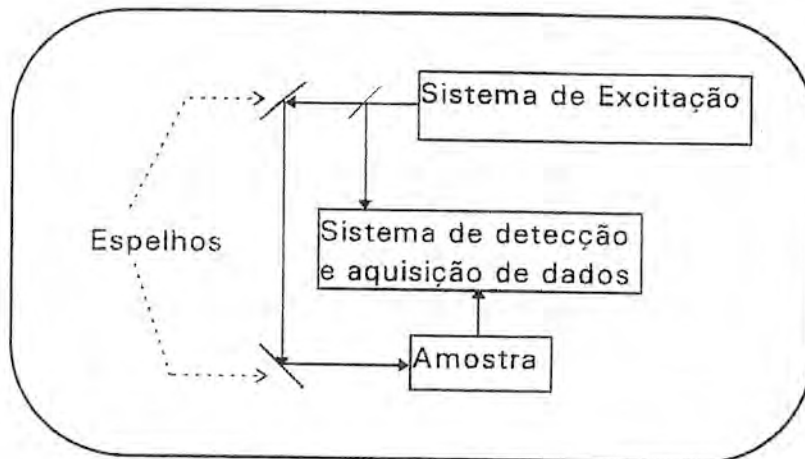


Figura 4.1: Diagrama do fluorímetro com resolução temporal.

Para o sistema de detecção e aquisição de dados, uma fotomultiplicadora de partida (R3809U, Hamamatsu) detecta o pulso de excitação e envia o sinal para um conversor tempo-amplitude (TAC) que inicia a subida de uma rampa de tensão. Um pulso de luz emitido pela amostra fluorescente é detectado por uma fotomultiplicadora de parada (R3809U, Hamamatsu) que envia um sinal para o TAC interrompendo a rampa de tensão. O valor da tensão é proporcional ao tempo transcorrido entre a excitação e a emissão e um analisador multi-canal (MCA) computa a ocorrência desse evento e o seu tempo correspondente. O processo repete-se a cada pulso de excitação e ao final de um número estatisticamente significativo de eventos ( $10^5$  contagens) obtém-se um histograma descrevendo o decaimento temporal da fluorescência. A largura de linha da função resposta do instrumento é tipicamente de 45 ps, determinado com uma resolução temporal de 6 ps por canal. Todas as medidas foram realizadas com resolução temporal de 12 ps por canal.

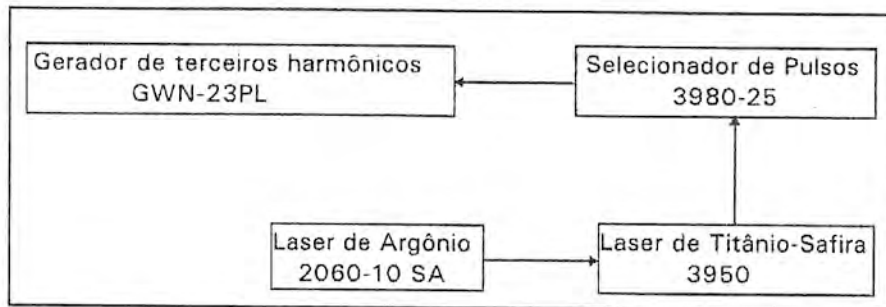


Figura 4.2: Sistema de excitação experimental.

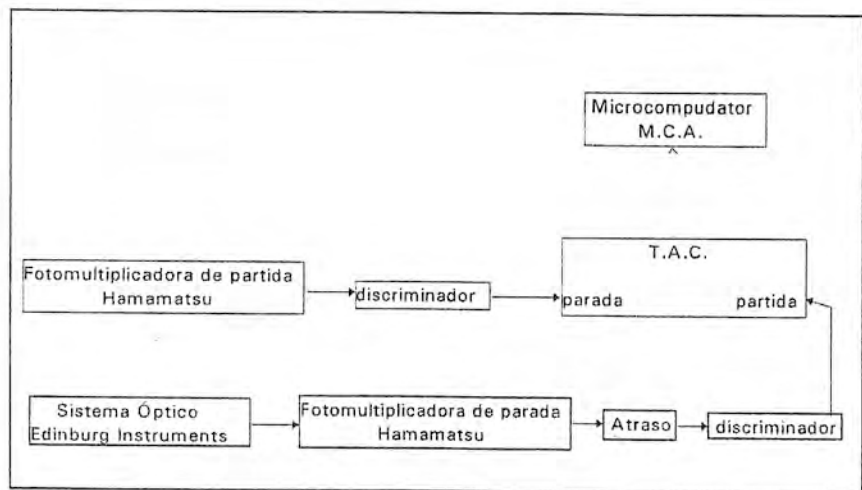


Figura 4.3: Sistema de detecção e aquisição de dados experimentais.

### 4.1.2 Materiais

Foram preparadas soluções estoque de L-5-OH-trp e L-7-aza-trp em solução tampão fosfato (0,1M), pH 7,4. Depois, para medidas de absorção ótica e fluorescência, essas soluções eram diluídas para concentrações entre  $20\mu M$  e  $50\mu M$ .

Um software fornecido pela *Edinburg Instruments* foi utilizado para análise das curvas de decaimento. O ajuste exponencial da curva foi escolhido pela inspeção dos resíduos e pelo parâmetro estatístico  $\chi^2$ . Quando dois ajustes exponenciais diferiam apenas pelo número de fatores pré-exponenciais, e não pelo parâmetro  $\chi^2$ , somente o ajuste com menor número de exponenciais era considerado.

Nas seções seguintes, os resultados dos espectros de absorção, fluorescência de estado estacionário e fluorescência resolvida no tempo para o 5-OH-trp e 7-aza-trp serão apresentados e analisados.

## 4.2 Resultados Experimentais para o 5-OH-trp

### 4.2.1 Espectros de Absorção e de Fluorescência de Estado Estacionário

Os espectros de absorção ótica e de fluorescência de estado estacionário para o 5-OH-trp obtidos em solução tampão fosfato, pH 7,4, são apresentados na Figura 4.4a.

Pela análise das derivadas primeira e segunda das curvas dos espectros de absorção e de fluorescência para o 5-OH-trp, pode-se determinar precisamente a posição dos picos de absorção (276 nm e 296 nm) e o comprimento de onda de máxima emissão fluorescente,  $\lambda_{em}^{max}$ , em 336 nm. Pode-se observar duas bandas suavemente separadas no espectro de absorção. Além disso, praticamente não há sobreposição entre os espectros de absorção e emissão, sendo, deste modo, predominante a excitação ótica do 5-OH-trp pela fonte do aparelho e não por um fluoróforo excitado.

### 4.2.2 Fluorescência Resolvida no Tempo

A amostra de 5-OH-trp foi excitada em 305 nm e os dados da emissão fluorescente foram coletados no intervalo entre 320 e 360 nm. Os decaimentos foram ajustados com duas ou três exponenciais, diferente do que é observado na literatura[8, 40], onde ajustes monoexponenciais são realizados mas não apresentaram bons resultados para os nossos dados experimentais. Na Figura 4.4b, a intensidade do decaimento fluorescente em função do tempo, para o



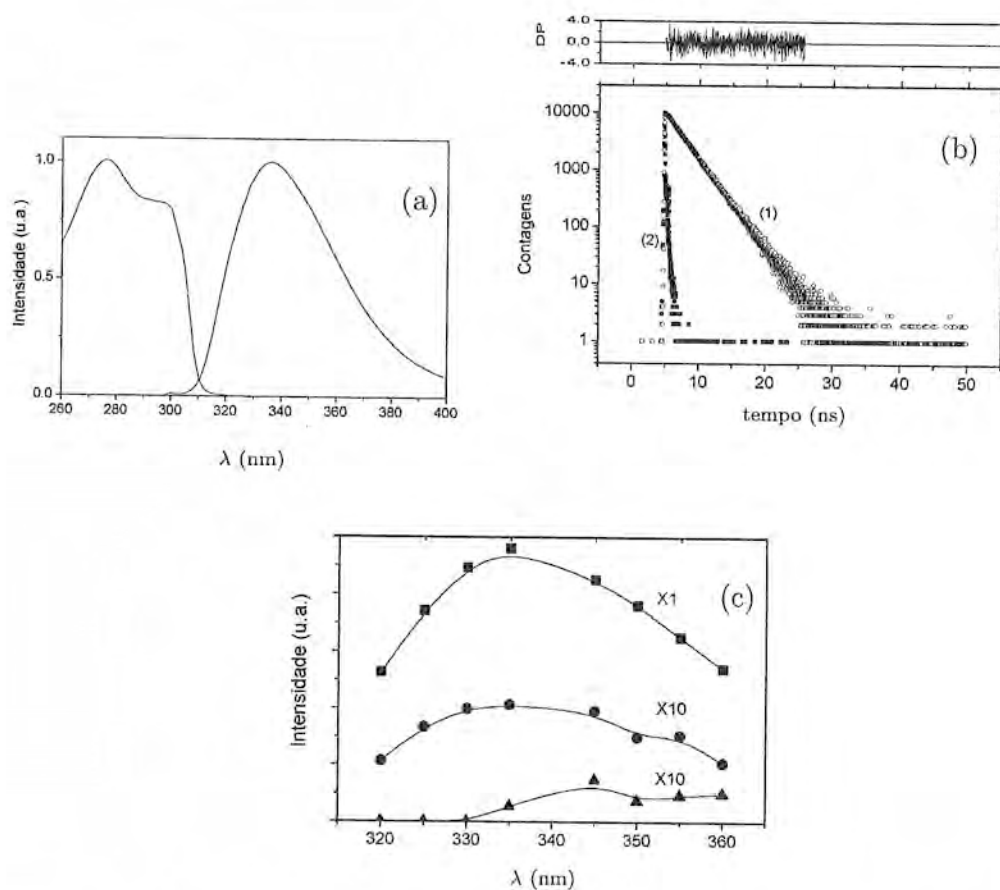


Figura 4.4: Resultados experimentais obtidos para o 5-OH-trp: (a) Espectros de absorção e de fluorescência em meio aquoso, pH 7,4 a 26°C. As curvas foram normalizadas para que os valores máximos dessem 1,0; (b) Curva de decaimento fluorescente do (1) 5-OH-trp e (2) resposta do instrumento. Neste caso, o comprimento de onda de excitação utilizado foi 305 nm, enquanto a emissão foi analisada em 355 nm; e, (c) Espectro de Decaimento Associado para o 5-OH-trp em tampão fosfato, pH 7,4: os quadrados representam o componente com tempo de vida mais longo ( $\sim 2,7$  ns), os círculos representam o componente com tempo de vida ( $\sim 0,7$  ns) e os triângulos representam o menor tempo de vida ( $\sim 0,06$  ns).

5-OH-trp, foi obtida para excitação em 305 nm e emissão em 335 nm. Neste caso, um tempo de vida mais longo ( $2750 \pm 20$  ps) domina o decaimento com fator pré-exponencial igual a 0,947. Duas outras exponenciais foram adicionadas no ajuste a fim de se obter melhor valor para o parâmetro  $\chi^2$  e aumento na qualidade gráfica do resíduo. Assim, os fatores pré-exponenciais foram 0,040 e 0,013 com tempos de vida iguais a  $750 \pm 150$  ps e  $60 \pm 20$  ps, respectivamente.

### **Espectro de Decaimento Associado (EDA)**

Os decaimentos obtidos para os diversos comprimentos de onda de emissão foram analisados conjuntamente empregando o método de análise global. Os três tempos de vida foram mantidos constantes e determinou-se a contribuição relativa de cada componente para a emissão fluorescente nos diversos comprimentos de onda entre 320 e 360 nm. Obteve-se assim o chamado Espectro de Decaimento Associado (EDA) ilustrado na Figura 4.4c. Os máximos de emissão fluorescente para os tempos de vida mais longos são bem próximos de 336 nm, enquanto que, o tempo de vida mais curto tem um deslocamento para o vermelho, 343 nm.

### 4.3 Resultados Experimentais para o 7-aza-trp

#### 4.3.1 Espectros de Absorção e de Fluorescência de Estado Estacionário

Os espectros de absorção ótica e de fluorescência de estado estacionário para o 7-aza-trp obtidos em solução tampão fosfato, pH 7,4, são apresentados na Figura 4.5a.

Pela análise das derivadas primeira e segunda das curvas dos espectros de absorção e de fluorescência para o 7-aza-trp, pode-se determinar a posição do pico de absorção (290 nm) e o comprimento de onda de máxima emissão fluorescente (400 nm). Como nos espectros do 5-OH-trp, praticamente não há sobreposição entre os espectros de absorção e emissão para o 7-aza-trp.

#### 4.3.2 Fluorescência Resolvida no Tempo

A amostra de 7-aza-trp foi excitada em 305 nm e os dados da emissão fluorescente foram coletados no intervalo entre 360 e 450 nm. Os decaimentos tiveram melhor ajuste com três exponenciais, sendo que apenas na análise da emissão em 450 nm, o ajuste biexponencial foi utilizado. Na Figura 4.5b, ilustra-se a intensidade do decaimento fluorescente em função do tempo, para o 7-aza-trp, obtida para excitação em 305 nm e emissão em 400 nm. Neste caso, um tempo de vida de  $678 \pm 5$  ps com fator pré-exponencial 0,762 predomina no decaimento. Quando duas outras exponenciais foram adicionadas no ajuste obteve-se melhor valor para o parâmetro  $\chi^2$  e aumento na qualidade

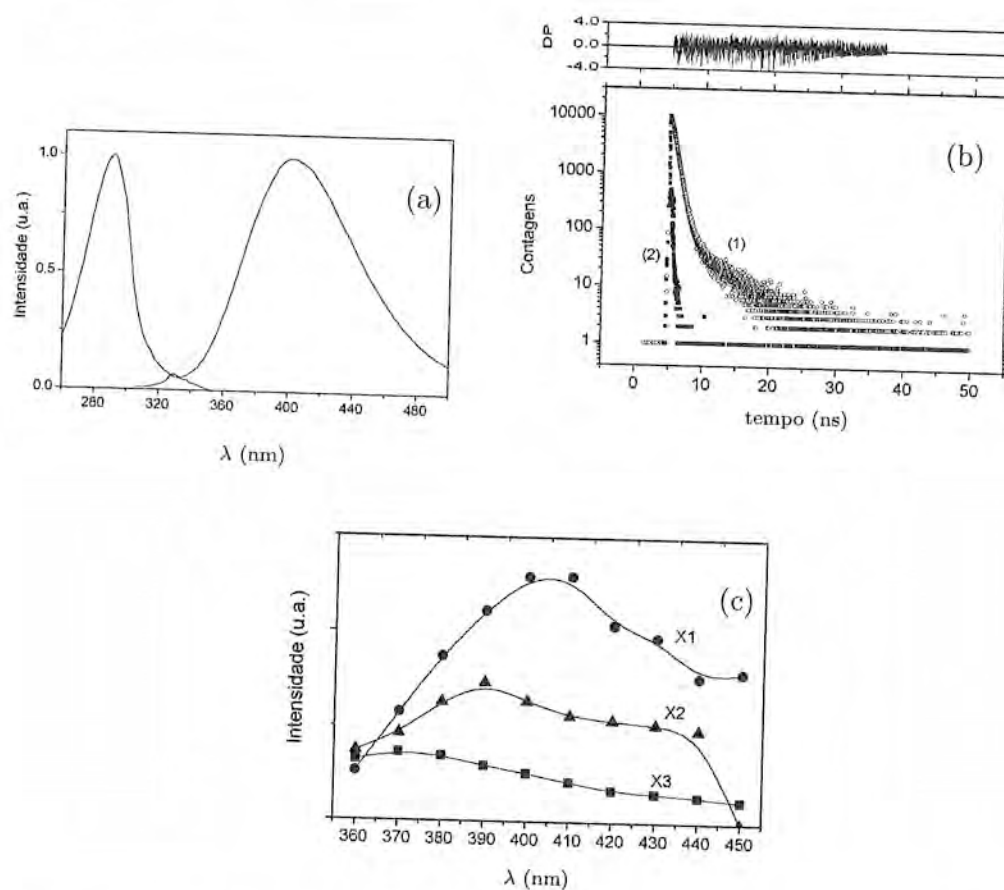


Figura 4.5: Resultados experimentais obtidos para o 7-aza-trp: (a) Espectros de absorção e de fluorescência em meio aquoso, pH 7,4 a 26°C. As curvas foram normalizadas para que os valores máximos dessem 1,0; (b) Curva de decaimento fluorescente do (1) 7-aza-trp e (2) resposta do instrumento. Neste caso, o comprimento de onda de excitação utilizado foi 305 nm, enquanto a emissão foi analisada em 400 nm; e, (c) Espectro de Decaimento Associado para o 7-aza-trp em tampão fosfato, pH 7,4: os quadrados representam o componente com tempo de vida mais longo ( $\sim 4,7$  ns); os círculos, o componente com tempo de vida intermediário ( $\sim 0,7$  ns); e os triângulos, o menor tempo de vida ( $\sim 0,3$  ns).

do gráfico de resíduos. Esses tempos de vida foram iguais a  $4750 \pm 80$  ps e  $280 \pm 10$  ps, com fatores pré-exponenciais 0,050 e 0,188, respectivamente.

### **Espectro de Decaimento Associado (EDA)**

Como no caso do 5-OH-trp foi obtido o EDA para o 7-aza-trp, analisando a contribuição de três exponenciais (Figura 4.5c). O máximo de emissão fluorescente variou para cada tempo de vida: o mais longo tem máximo em 370 nm; o mais curto em 390 nm; enquanto que o intermediário tem um deslocamento para o vermelho, 405 nm.

## **4.4 Comparação com Resultados Encontrados na Literatura**

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho para a absorção e a fluorescência do 5-OH-trp e do 7-aza-trp estão resumidos na Tabela 4.1. Nesta seção, eles serão comparados com resultados encontrados na literatura e com dados experimentais de absorção ótica e fluorescência do trp.

As bandas de absorção ótica do 5-OH-trp e do 7-aza-trp apresentam resultados e formas semelhantes aos encontrados na literatura, com máximos em 296 nm e 290 nm, respectivamente[6, 42, 44, 45]. Comparados com trp, que apresenta máximo de absorção ótica em 280 nm[5, 6, 7, 8], essas bandas estão deslocadas para o vermelho. Isso permite, através da incorporação desses análogos em proteínas ou em peptídeos, selecionar qual resíduo será responsável pela emissão fluorescente[5, 8, 42].

	$\lambda_{abs}^{max}$ (nm)	$\lambda_{em}^{max}$ (nm)	$\langle \tau \rangle$ (ps)	$\phi$	$k_{nr}$ (s <sup>-1</sup> )
5-OH-trp	296	336	2638	0,254[41]	$2,8 \times 10^8$
7-aza-trp	290	400	805	0,013[41, 42]	$1,2 \times 10^9$
trp	280	355	2632	0,18[42]	$3,1 \times 10^8$

Tabela 4.1: Dados experimentais para a absorção ótica e a fluorescência do 5-OH-trp e do 7-aza-trp, em solução tampão fosfato, pH 7,4. São apresentados o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{abs}^{max}$ ), o comprimento de onda de máxima emissão fluorescente ( $\lambda_{em}^{max}$ ), o tempo de vida médio de fluorescência ( $\langle \tau \rangle$ ), o rendimento quântico de fluorescência ( $\phi$ ) e a taxa de decaimentos não-radiativos ( $k_{nr}$ ). Para o trp, os dados apresentados foram obtidos da literatura (Chen et al.[6] e Souto[43]).

Na emissão fluorescente, o máximo para o 5-OH-trp encontrado neste trabalho ocorre em 336 nm, estando em acordo com valores observados na literatura [8, 40, 41, 42]. Uma característica freqüentemente observada nos espectros de fluorescência do 5-OH-indol e do 5-OH-trp é a independência do máximo de emissão em relação ao meio[46].

Kaystuv et al. [8] ajustaram os decaimentos fluorescentes do 5-OH-trp em meio aquoso, nos pHs de 6,4 e de 10,5, apenas com uma exponencial com tempos de vida de  $3680 \pm 53$  ps e 4278 ps, respectivamente. Resultado semelhante foi encontrado por Chen et al.[40] e Hogue et al.[41] para o 5-OH-trp em pH neutro, tendo ajuste monoexponencial para o decaimento fluorescente semelhante, com tempos de vida de  $3800 \pm 100$  ps e  $3600 \pm 1$  ps, respectivamente. Desta forma, o único tempo de vida encontrado nos ajustes monoexponenciais na literatura está mais próximo do tempo de vida longo observado neste trabalho,  $2750 \pm 20$  ps, que possui o maior fator pré-exponencial, 0,947.

Mais adiante, serão analisados resultados obtidos para a fluorescência do trp por Souto[43], nas mesmas condições e nos mesmos equipamentos realizados neste trabalho para o 5-OH-trp e o 7-aza-trp. Quando comparados com dados encontrados na literatura, Souto [43] verificou a necessidade de adicionar uma exponencial ao ajuste do decaimento fluorescente do trp, como ocorreu para a fluorescência do 5-OH-trp neste trabalho.

Em metanol ou em dimetilsufóxido, o 5-OH-trp também apresenta decaimento monoexponencial, com tempos de vida de 4023 ps e 3895 ps, respectivamente[8]. O mesmo ocorre para o decaimento fluorescente do 5-OH-indol em meio aquoso e pH 6,0, com o único tempo de vida valendo  $3278 \pm 35$  ps[8].

O tempo de vida médio no decaimento fluorescente do 5-OH-trp obtido neste trabalho foi 2638 ps. O rendimento quântico de fluorescência observado para o 5-OH-trp vale 0,254 [41], superior ao rendimento quântico do trp, 0,18 [42]. Usando a relação 2.6 do Capítulo 2, pode-se obter uma estimativa pontual para a taxa de decaimento não-radiativo do 5-OH-trp, desta forma,  $k_{nr}^{5hw} \sim 2,8 \times 10^8$ .

Para o 7-aza-trp, o máximo de emissão fluorescente é observado entre 397 nm e 410 nm[8, 40, 41, 42, 44, 45], estando em acordo com o resultado obtido neste trabalho, 400 nm.

Chen et al. [40] observaram um decaimento fluorescente do 7-aza-trp monoexponencial com tempo de vida de  $780 \pm 10$  ps, próximo ao tempo de vida intermediário de  $678 \pm 5$  ps, responsável por 76,1% da emissão fluorescente encontrada no ajuste tri-exponencial deste trabalho. Da mesma forma, Smirnov et al. [47] obtiveram decaimento monoexponencial para o 7-aza-trp com tempo de vida de 824 ps. A molécula 7-aza-indol apresenta tempo de vida semelhante ao 7-aza-trp, 915 ps, em meio aquoso e pH neutro[45].

Para o 7-aza-trp, o tempo de vida médio no decaimento fluorescente obtido neste trabalho foi 805 ps. O rendimento quântico de fluorescência observado é muito inferior ao do 5-OH-trp sendo próximo de 0,013 [41, 42]. Usando novamente a relação 2.6, obtem-se a estimativa pontual para a taxa de decaimento não-radiativo do 7-aza-trp sendo  $k_{nr}^{7aw} \sim 1,2 \times 10^9$ . Ou seja, uma ordem de grandeza superior à taxa de decaimento não-radiativo do 5-OH-trp devido à diferença entre os rendimentos quânticos.

O máximo de emissão fluorescente do trp, em pH neutro e meio aquoso, ocorre em 351 nm[43], enquanto em metanol a emissão é deslocada para o azul, 340 nm[40].



Souto [43] observou que o trp em tampão fosfato (50mM e pH 7,4) precisa de três exponenciais para ajustar o decaimento fluorescente. Um tempo de vida intermediário de 2790 ps está associado ao estado mais populoso com 88,5% da população total. Já os tempos de vida longos, 7320 ps, e curto, 510 ps, apresentaram populações relativas em torno de 6% e 5%, respectivamente. O máximo de emissão fluorescente para os tempos de vida longo e intermediário ocorre em 360 nm, enquanto para o tempo de vida mais curto tem um deslocamento para o vermelho, 345 nm.

Chen et al. [40] usaram dois tempos de vida para o decaimento fluorescente do trp isolado em pH neutro:  $670 \pm 50$  ps e  $3200 \pm 100$  ps, com a componente com tempo de vida menor tendo fator pré-exponencial valendo  $0,22 \pm 0,01$ . Da mesma forma, Petrich et al. [18] observaram para os tempos de vida para o trp em pH 7,  $620 \pm 50$  ps e  $3210 \pm 120$  ps. O fator pré-exponencial usado para o tempo de vida mais curto foi  $0,22 \pm 0,01$ .

Nas mesmas condições experimentais apresentadas no parágrafo anterior, o indol apresenta decaimento monoexponencial com tempo de vida valendo  $4550 \pm 20$  ps, com máximo de emissão em 341 nm.

Com o tempo de vida médio obtido por Rich et al [42] e Chen et al [40] para o trp, em torno de 2632 ps, pode-se estimar a taxa de decaimento não-radiativo sendo  $k_{nr}^w \sim 3,1 \times 10^8$ . Ou seja, ligeiramente superior à mesma taxa para o 5-OH-trp.

## Capítulo 5

### Cálculos no vácuo

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos por estudos *ab initio* e semi-empíricos realizados no vácuo para as moléculas 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp, usando a aproximação de Born-Oppenheimer. Em todos os cálculos realizados para essas moléculas foram utilizadas a forma isomérica *L* e estados de spin molecular singleto.

Uma interpretação para a existência de dois ou mais tempos de vida para o trp tem sido a existência de várias conformações rotaméricas[15, 48]. Isso tem sido confirmado por experimentos de RMN[49, 50], cristalografia de proteínas[51] e cálculos de mecânica molecular[15, 16, 34, 52]. Estas conformações rotaméricas não se interconverteriam no 1EE antes da emissão fluorescente e os diferentes tempos de vida seriam devido à diferentes taxas de transferência de cargas intramolecular[53]. Neste trabalho, essa interpretação será testada através das análises dos resultados teóricos obtidos das otimizações de geometria para o 5-OH-trp, o 7-aza-trp e o trp. Essas estruturas rotaméricas são obtidas por rotações dos ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  ( $\chi_1 \equiv \text{N-C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-C}_\gamma$  e  $\chi_2 \equiv \text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-C}_\gamma\text{-C}_{\delta 2}$ , Figuras 1.1 e 1.2), como será visto em seções seguintes.

## 5.1 Metodologia

### 5.1.1 Otimização de Geometria do EF e do 1EE

Inicialmente, a SEP do EF, em função dos ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$ , foi obtida pelo método semi-empírico AM1[10, 11, 12] para determinação das conformações de mínima energia. Usando esses resultados como referência, iniciou-se otimizações de geometria do EF utilizando o método Hartree-Fock Restrito, com a base de orbitais 4-31G. Recentes estudos teóricos têm mostrado que pelo menos essa base deve ser usada para obter resultados satisfatórios[54, 55]. Cálculos no nível de teoria HF/3-21G não produzem bons resultados, por exemplo, na descrição de estados conformacionais do grupamento amina em *o-methylformanilide*[54]. Outros estudos usam vários métodos teóricos, onde a base 4-31G é a menor utilizada[56, 57, 55, 58]. Devido à grande quantidade de cálculos propostos neste trabalho, em vários estados de protonação, em várias conformações rotaméricas e em dois estados eletrônicos, resolveu-se não usar uma base maior que a 4-31G.

Em seguida, otimizações de geometria foram realizadas no 1EE, a partir dos resultados obtidos pelo método *ab initio* no EF (no estado excitado essa conformação se encontra na chamada Região de Franck-Condon). Para isso, usou-se o método de Interação de Configurações com excitações simples (ICS) e orbitais internos congelados[9]. Sabe-se da literatura[31, 57] que bons resultados são encontrados para as conformações de pequenas moléculas em estados excitados quando se utiliza o método ICS em otimizações de geometria.

No estado excitado, somente otimizações de geometria do 1EE foram realizadas, pois de acordo com a Regra de Kasha[59], se a molécula emite um fóton, isso ocorre do estado excitado de menor energia. Processos não-radiativos de conversão interna entre os estados excitados mais altos para o 1EE ocorrem mais rapidamente que a fluorescência, devido à pequena diferença de energia entre esses estados, quando comparada com a energia de transição entre o 1EE e o EF. Deste modo, mais de que 99,9% da fluorescência provém do 1EE singleto[31].

Todas as otimizações de geometria do EF e do 1EE, em coordenadas internas, com a utilização de métodos *ab initio*, foram realizadas em quatro etapas de otimização na seguinte ordem: 1) otimização das distâncias; 2) otimização dos ângulos diedrais; 3) otimização dos ângulos diedrais e dos ângulos entre ligações; 4) otimização de todas as coordenadas internas.

Nas otimizações de geometria dos estados zwitteriônicos foi necessário fixar as distâncias entre os hidrogênios e o nitrogênio do grupamento amino, na última etapa de otimização, para manter a forma zwitteriônica (Figura 5.1a). Pois, caso contrário, a otimização de geometria convergiria para o estado neutro pela transferência de um próton do grupamento amino para o terminal carboxila. Esse fato motivou o estudo do estado neutro para testar a hipótese de transferência de prótons no estado excitado antes do decaimento fluorescente. No estado neutro, estudou-se a estrutura com a ligação de hidrogênio entre o par de elétrons isolados do nitrogênio do grupamento amino e o hidrogênio carboxílico (Figura 5.1b). Estes cálculos também foram realizados no EF.

Sabe-se da literatura que as energias de transição vertical obtidas pelo método ICS são superestimadas em relação aos valores experimentais[31, 60], enquanto o método INDO/S-CIS[13, 14] apresenta melhores resultados[31]. Deste modo, usou-se as energias de transição vertical entre o EF e o 1EE obtidas por cálculos de estado estacionário (*single-point*), nas geometrias estáveis, com o método semi-empírico INDO/S-CIS. Nesse caso, utilizou-se as configurações de excitações simples com energia inferior a duas vezes a energia da configuração de excitação simples de menor energia. Como não se está considerando as excitações duplas, não convém considerar as excitações simples com energia maior que a excitação dupla de menor energia.

Além das formas zwitteriônica ( $\text{NH}_3^+ \text{-C}_\alpha \text{-COO}^-$ ) e neutra ( $\text{NH}_2 \text{-C}_\alpha \text{-COOH}$ ), otimizações foram realizadas para as moléculas em estudo no estado de protonação aniônico ( $\text{NH}_2 \text{-C}_\alpha \text{-COO}^-$ ). Esta forma aniônica coexiste no EF com a forma zwitteriônica para valores de pH maiores que 7 e menores que 10, de acordo com a expressão de Henderson Hasselbach[61]:

$$\log \frac{[\text{aceitador de próton}]}{[\text{doador de próton}]} = \text{pH} - \text{p}K_a \quad (5.1)$$

Como os resultados dos experimentos realizados neste estudo são para pH 7,4, resolveu-se realizar cálculos também nesse estado de protonação. Os valores de  $\text{p}K_a$  para a protonação/desprotonação do grupo amino, no trp e no 7-aza-trp, são 9,39[61] e 9,35[40, 44], respectivamente. Com o uso da equação 5.1, obtém-se que em torno de 1% das moléculas do trp ou do 7-aza-trp em solução com pH 7,4 está no estado de protonação aniônico (Figura 5.1c).

A forma catiônica ( $\text{NH}_3^+ - \text{C}_\alpha - \text{COOH}$ ) não foi estudada neste trabalho pois, com  $pK_a$  igual a 2,38 para a protonação/desprotonação do grupo carboxílico do trp [61], a população nesse estado de protonação, usando a equação 5.1, é nula numa amostra com pH 7,4.

Para o 5-OH-trp, o estado dianiônico ( $\text{NH}_2 - \text{C}_\alpha - \text{COO}^- - 5\text{O}^-$ , Figura 5.1d) foi estudado para comparação com resultados encontrados na literatura para o 5-OH-indol [8], parte do 5-OH-trp responsável pela fluorescência, em que os espectros de absorção e fluorescência apresentam deslocamento para o vermelho em pH alto ( $> 11$ ). O valor do  $pK_a$  para protonação/desprotonação do grupo hidroxil do 5-OH-indol é igual a 11 em meio aquoso[8].

No 5-OH-trp, a ligação  $\text{O}_3 - \text{C}_5$  é livre para rotação, a qual está relacionada com o ângulo diedral  $\delta_{5OH}$  ( $\delta_{5OH} \equiv \text{H} - \text{O}_3 - \text{C}_5 - \text{C}_6$ ). Inicialmente, os cálculos de otimização de geometria foram realizados para  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , depois usou-se também  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  com os métodos *ab initio*.

Além disso, para as geometrias obtidas das otimizações, calculou-se as frequências vibracionais para determinação da natureza dessas geometrias otimizadas. Nenhuma frequência imaginária foi encontrada, caracterizando, deste modo, as geometrias como conformações de mínima energia.

Todos os cálculos com os métodos *ab initio* e semi-empíricos descritos neste seção foram realizados usando os pacotes de programas GAUSSIAN98[62] e GEOMOP[37, 38], respectivamente.



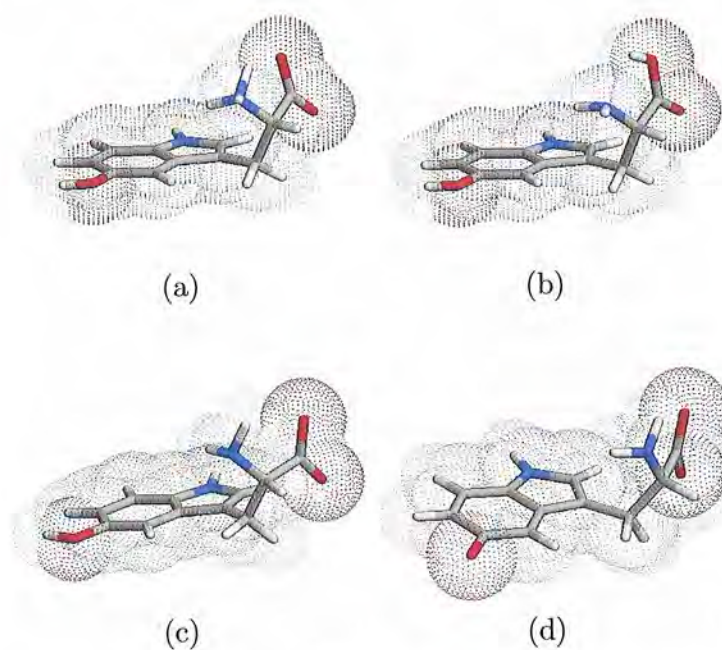


Figura 5.1: Estados de protonação para o 5-OH-trp ( $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ ): (a) zwitteriônico; (b) neutro; (c) aniônico; e, (d) dianiônico.

### 5.1.2 Estados de Transição na SEP do EF e do 1EE

A fim de se estudar a possibilidade de interconversão entre rotâmeros por rotações dos ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  no EF e no 1EE foram realizadas otimizações de estrutura de ET.

Na SEP do EF foram utilizados métodos semi-empíricos para localizar os ET e estimar a altura das barreiras de ativação. As coordenadas internas iniciais para esses cálculos foram obtidas pelas geometrias otimizadas, com ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  fixos, obtidas visualmente da SEP do EF entre dois rotâmeros estáveis vizinhos. Nessas otimizações de ET, utilizou-se o método Quasi-Newton com o algoritmo Schlegel.

Os cálculos de ET no 1EE foram realizados com métodos ab initio e, por serem mais complexos que no EF, divididos em duas etapas. Primeiramente, determinaram-se as coordenadas iniciais para a otimização de geometria de ET. Para isso, foram utilizadas as coordenadas das estruturas dos pontos de máxima energia obtidas a partir de curvas de interpolação quadrática de energias provenientes das conformações otimizadas pertencentes a retas, com  $\chi_1$  e  $\chi_2$  fixos, que ligam dois pontos de mínima energia na SEP do 1EE. Neste caso, nove retas foram usadas para interpolar de várias formas as interconversões possíveis entre os cinco rotâmeros estáveis.

Em seguida, a segunda etapa consistia na otimização de estrutura de ET a partir das coordenadas obtidas na etapa anterior. Várias estruturas foram obtidas por otimização de ET pelo método tradicional, algoritmo de Berny modificado[21]. Mas, em alguns casos, isso não foi possível, pois o método tradicional é muito sensível às coordenadas iniciais. Nesses casos, optou-se pela utilização do método *Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton*[20]. Para isso, foi necessário fornecer para o cálculo pelo menos duas conformações de mínima energia para iniciar a otimização de ET. Além disso, para esse método de cálculo existe a possibilidade de incluir uma terceira estrutura



que estaria entre esses dois rotâmeros. Neste estudo, optou-se pelo uso de três conformações, sendo a terceira estrutura proveniente da primeira etapa descrita no parágrafo anterior.

Com os valores obtidos para as alturas das barreiras de ativação no 1EE, pode-se determinar se a excitação em uma forma rotamérica é seguida ou não por um decaimento radiativo na mesma forma rotamérica, devido a altas barreiras de ativação, ou em outra conformação rotamérica, devido a baixas barreiras.

Nos cálculos de ET para o 5-OH-trp no 1EE, na forma zwitteriônica, foram obtidos nove estruturas (somente realizados com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ ). Para o 7-aza-trp e o trp, as geometrias dos ET na SEP do 1EE foram determinadas a partir dos ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  dos estados de ET determinados para o 5-OH-trp. Porém, antes das otimizações de ET, foi necessário realizar otimização de geometria, com  $\chi_1$  e  $\chi_2$  fixos.

Para todas as estruturas de ET encontradas, as frequências vibracionais foram calculadas e apresentaram uma única frequência vibracional imaginária, como era de se esperar para ET.

Todos os cálculos de otimização de estrutura dos ET no 1EE foram realizados com o pacote de programas GAUSSIAN98; e no EF, com o pacote GEOMOP.

### 5.1.3 Espectros Teóricos de Absorção Ótica

Os espectros teóricos de absorção ótica foram determinados a partir dos resultados obtidos para as populações relativas dos rotâmeros estáveis no EF e as energias de transição vertical e as respectivas forças do oscilador obtidas nas conformações estáveis do EF usando o método INDO-S/CIS.

Isto é, a intensidade de absorção teórica para uma dada energia de transição foi obtida pelo produto da população relativa do respectivo rotâmero pela força do oscilador da absorção no respectivo comprimento de onda.

Em seguida, como os espectros experimentais de absorção ótica podem ser representados numa primeira aproximação pela função Gaussiana, as linhas teóricas de absorção ótica foram convoluídas por

$$e^{-\frac{(\lambda-\lambda_{max})^2}{2a^2}} \quad (5.2)$$

onde  $a$  é a largura a meia altura da função Gaussiana.

Desta forma, para o 5-OH-trp e o 7-aza-trp, esse parâmetro foi obtido das curvas experimentais de absorção ótica apresentadas no Capítulo 4. Para o 5-OH-trp, só foi possível determinar o ponto de inflexão à esquerda da posição de máxima absorção resultando em  $a = 11$  nm. Já para o 7-aza-trp, o valor usado para  $a$  foi 14 nm.

Para o trp, o parâmetro  $a$  foi determinado visualmente a partir dos espectros representados graficamente encontrados na literatura[8, 41, 42, 47]. Sendo assim, seu valor ficou igual ao do 5-OH-trp, 11 nm.

Todos os cálculos das convoluções para os espectros teóricos de absorção ótica foram realizados utilizando o algoritmo da Transformada de Fourier Rápida[39].

#### 5.1.4 Espectros Teóricos de Fluorescência de Estado Estacionário

Da mesma forma usada para os espectros teóricos de absorção, foram determinados os espectros teóricos de fluorescência de estado estacionário. Para isso, usou-se as populações relativas dos rotâmeros estáveis no 1EE com as energias de transição vertical e as respectivas forças do oscilador obtidas nas conformações estáveis do 1EE usando o método INDO-S/CIS.

A intensidade de emissão fluorescente numa dada energia de transição foi obtida pelo produto da população relativa no 1EE do rotâmero que sofre o decaimento radiativo pela força do oscilador da respectiva transição, que é proporcional à taxa de emissão de fótons[31].

Para representar a largura no espectro teórico de fluorescência, as intensidades fluorescentes teóricas foram convoluídas com a função

$$(\lambda - \lambda_{max})^2 e^{-\frac{(\lambda - \lambda_{max})^2}{2a^2}}, \quad (5.3)$$

onde  $a$  também é um parâmetro determinado a partir da largura da banda dos espectros de fluorescência experimentais da molécula estudada.

Neste caso, foram determinados da mesma forma que foi utilizado nos espectros de absorção ótica.

Sendo assim, para o 5-OH-trp o valor utilizado foi  $a = 34$  nm, enquanto para o 7-aza-trp,  $a = 42$  nm. Para o trp, o parâmetro  $a$  também foi determinado visualmente a partir dos espectros de fluorescência encontrados na literatura[6, 8, 42]. Desta forma, o valor utilizado foi 38 nm.

A Equação 5.3 foi usada através de convolução para reproduzir, no espectro teórico de fluorescência, a forma assimétrica apresentada pelos espectros experimentais de fluorescência.

Da mesma forma que o espectro teórico de absorção, os cálculos das convoluções dos espectros de fluorescência foram realizados utilizando o algoritmo da Transformada de Fourier Rápida.

### 5.1.5 Átomos Doadores e Aceitadores de Elétrons

A partir dos resultados obtidos com o método INDO/S-CIS nas geometrias estáveis do 1EE, foram determinados os átomos doadores e aceitadores de elétrons para os cálculos das taxas de transferência de elétrons no estado excitado. Os átomos doadores de elétrons são definidos como os átomos que sofrem as maiores variações negativas na densidade de carga após a excitação, enquanto os átomos aceitadores, as maiores variações positivas na densidade de cargas[28].

## 5.2 Resultados para o 5-OH-trp

Nas seções seguintes serão apresentados os resultados obtidos no EF e no 1EE para as energias internas, os momentos de dipolo elétrico permanentes, as energias de transição vertical e as respectivas forças do oscilador dos rotâmeros estáveis do 5-OH-trp nas formas zwitteriônica, neutra, aniônica e dianiônica. Em seguida, serão discutidas as possibilidades de interconversão entre rotâmeros estáveis nos EF e no 1EE .

Finalmente, serão analisados os espectros teóricos de absorção ótica e fluorescência de estado estacionário, obtidos a partir das populações relativas desses rotâmeros no EF e no 1EE, respectivamente.

### 5.2.1 Estado Fundamental

#### Forma zwitteriônica

Inicialmente, buscaram-se as conformações estáveis no EF para a forma zwitteriônica do 5-OH-trp em função dos ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$ , com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ . Nesses cálculos, as geometrias foram obtidas utilizando o método semi-empírico AM1. A SEP do EF em função dos ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  para o 5-OH-trp é apresentada na Figura 5.2.

Como se pode observar, cinco rotâmeros estáveis - correspondentes às posições de mais baixa energia indicadas pelos círculos preenchidos na Figura 5.2 - foram encontrados na forma zwitteriônica. Os valores para  $\chi_1$  e  $\chi_2$  desses rotâmeros são apresentados na Tabela 5.1. Na literatura, através de cálculos de mecânica molecular clássica, encontram-se seis rotâmeros estáveis para o trp [15, 34]. A ausência em nossos resultados do rotâmero anti- $\chi_2$ t (Figura 5.3b) reportado nos outros trabalhos provavelmente se deve à repulsão entre o terminal carboxílico e os elétrons  $\pi$  do anel aromático, a qual será chamada neste estudo de interação “ânion- $\pi$ ”. Nos cálculos clássicos, essa interação não é suficientemente efetiva, pois as nuvens eletrônicas são representadas por esferas de van der Waals centradas nos núcleos.

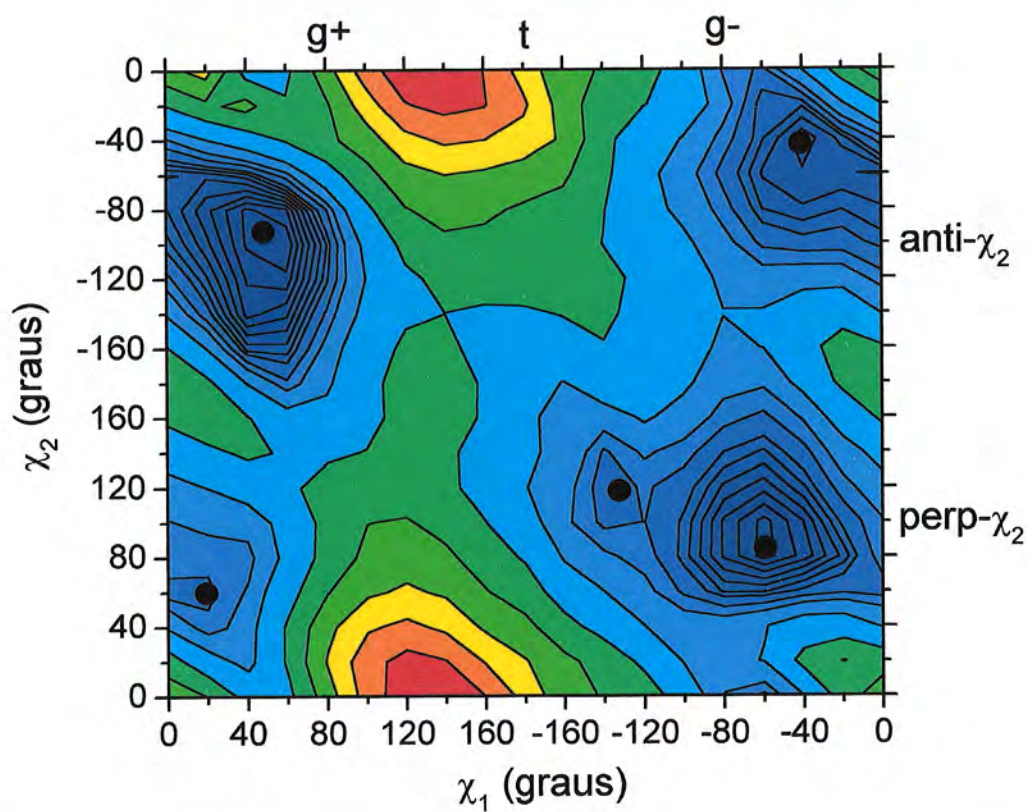


Figura 5.2: SEP do EF em função dos ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  para o 5-OH-trp, com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , com as posições dos rotâmeros estáveis marcadas com círculos preenchidos. As regiões coloridas com azul escuro representam valores menores para a energia; enquanto que as partes coloridas com vermelho, valores maiores.



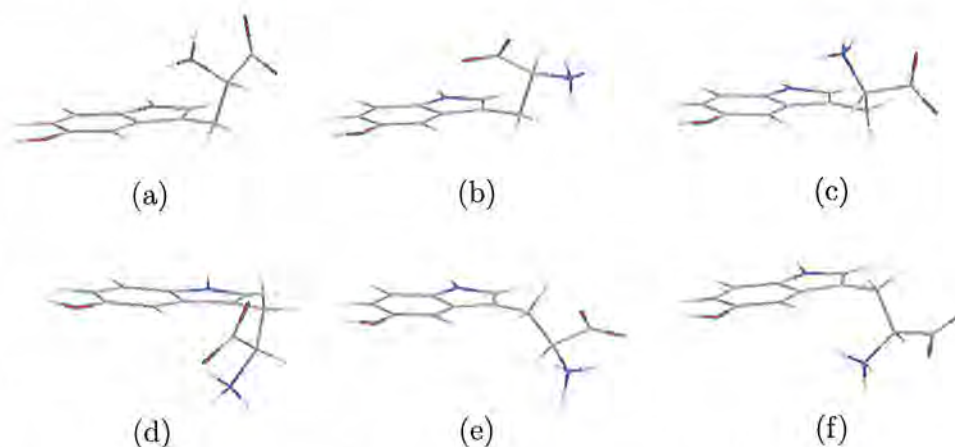


Figura 5.3: Representação gráfica das conformações do 5-OH-trp com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ : os rotâmeros estáveis (a) anti- $\chi_2g+$  (c) anti- $\chi_2g-$  (d) perp- $\chi_2g+$  (e) perp- $\chi_2g-$  (f) perp- $\chi_2t$ ; e, o rotâmero instável (b) anti- $\chi_2t$ .

Em seguida, usando as conformações estáveis obtidas com o método semi-empírico AM1 (Figura 5.2), após otimização das geometrias sem restrição para os ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$ , iniciou-se os cálculos de otimização de geometria do EF com o método ab initio HF/4-31G. Nesta etapa, foram incluídas as conformações do 5-OH-trp com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ , além das estruturas com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ .

A fim de verificar a instabilidade do rotâmero anti- $\chi_2t$  também nos cálculos ab initio, otimizações de geometria foram realizadas utilizando valores para os ângulos diedrais encontrados na literatura para o rotâmero anti- $\chi_2t$  ( $\chi_1 = 180^\circ$  e  $\chi_2 = -90^\circ$ )[34]. Porém, os cálculos convergiram para a geometria do rotâmero anti- $\chi_2g-$ .



Os resultados dos cálculos *ab initio* e das energias de transição vertical obtidas pelo método INDO/S-CIS para a forma zwitteriônica do 5-OH-trp podem ser vistos na Tabela 5.2. Os ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  obtidos pelo método *ab initio* (sobre-índice *hf*) são apresentados na Tabela 5.1, junto com os valores obtidos pela parametrização semi-empírica AM1 (sobre-índice *am1*) com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ . Pode-se observar que os valores para  $\chi_1$  e  $\chi_2$  independem do ângulo  $\delta_{5OH}$  no método *ab initio*, mas podem sofrer pequenas alterações (menores que  $20^\circ$ ) quando comparados aos obtidos pelo método semi-empírico, caso dos rotâmeros *perp- $\chi_2g+$* , *perp- $\chi_2t$*  e *anti- $\chi_2g-$* .

Rotâmeros	$\chi_1^{am1}$ ( $^\circ$ )	$\chi_2^{am1}$ ( $^\circ$ )	$\chi_1^{hf}$ ( $^\circ$ )	$\chi_2^{hf}$ ( $^\circ$ )
<i>perp-<math>\chi_2g+</math></i>	20	55	42 (42)	80 (77)
<i>perp-<math>\chi_2t</math></i>	-140	120	-153 (-153)	114 (118)
<i>perp-<math>\chi_2g-</math></i>	-61	89	-61 (-55)	92 (94)
<i>anti-<math>\chi_2g+</math></i>	54	-95	53 (52)	-98 (-101)
<i>anti-<math>\chi_2g-</math></i>	-34	-43	-53 (-57)	-66 (-68)

Tabela 5.1: Resultados obtidos para os ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  dos rotâmeros estáveis do EF na forma zwitteriônica do 5-OH-trp. Nos resultados *ab initio* (*hf*), entre parênteses estão os valores obtidos para  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  e sem os parênteses, para  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ . Os valores obtidos pela parametrização AM1 têm sobre-índice *am1*.

Na Figura 5.4a, ilustram-se as populações relativas dos rotâmeros estáveis no EF na forma zwitteriônica do 5-OH-trp obtidas à temperatura de 300K com as energias do EF obtidas pelo método *ab initio*.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2g+$	5,04 (0,63)	12,7 (12,2)	302 (301)	0,04 (0,04)	258 (257)	0,10 (0,11)
perp- $\chi_2t$	5,50 (6,07)	7,5 (7,3)	301 (300)	0,02 (0,02)	271 (270)	0,12 (0,12)
perp- $\chi_2g-$	3,78 (3,61)	13,9 (10,9)	302 (301)	0,02 (0,02)	268 (267)	0,11 (0,11)
anti- $\chi_2g+$	0,00 (0,65)	8,7 (7,5)	302 (301)	0,01 (0,01)	274 (273)	0,12 (0,13)
anti- $\chi_2g-$	3,70 (2,91)	14,0 (11,1)	302 (300)	0,03 (0,03)	263 (262)	0,10 (0,11)

Tabela 5.2: Resultados obtidos após otimização de geometria do EF do 5-OH-trp, na forma zwitteriônica, pelo método ab initio HF/4-31G. Os comprimentos de onda de absorção,  $\lambda$ , e as forças do oscilador,  $f_{osc}$ , foram obtidos pelo método semi-empírico INDO/S-CIS. Entre parênteses, estão os resultados obtidos para  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  e sem os parênteses,  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ . A energia relativa do EF entre os rotâmeros é representada por  $E_{EF}$  e o momento de dipolo elétrico permanente por  $\mu$ . O rotâmero mais estável, anti- $\chi_2 g+$  com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , apresentou energia interna igual a -474.329,274 kcal/mol.

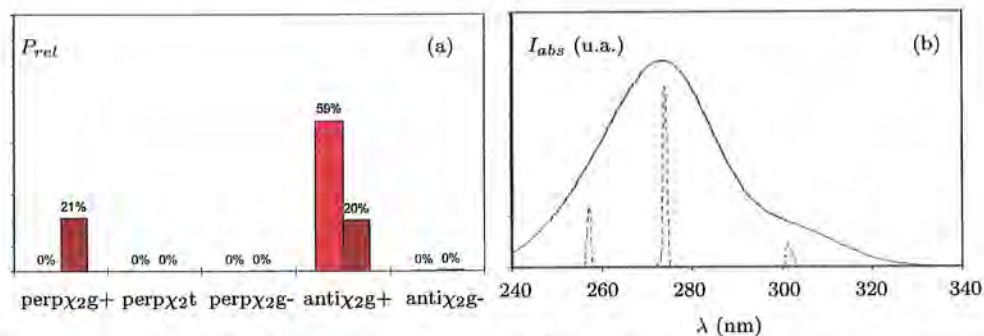


Figura 5.4: Resultados teóricos para o 5-OH-trp na forma zwitteriônica no EF : (a) População percentual relativa de Boltzmann, à temperatura de 300K. Em vermelho claro, os resultados para  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ ; e, em vermelho escuro,  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ . (b) Espectro teórico de absorção óptica. As linhas teóricas obtidas diretamente dos cálculos (sem convolução) são representadas em vermelho claro tracejadas, enquanto as linhas de convolução estão em vermelho escuro. Neste caso, o máximo de absorção óptica ocorre em 274 nm.

Na forma zwitteriônica, o rotâmero anti- $\chi_{2g}+$  (Figura 5.3a) é o mais estável (59% com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$  e 20% com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ ) devido à interação cátion- $\pi$  entre o terminal amina e os elétrons  $\pi$  do anel aromático. A estabilidade é menor no rotâmero anti- $\chi_{2g}+$  quando  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  devido à interação repulsiva entre o hidrogênio do grupo hidroxila e o terminal amina.

Todos os outros rotâmeros apresentaram população nula, com exceção do  $perp\chi_{2g}+$  (21% com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ ). Neste caso, devido à interação atrativa do terminal carboxílico com o hidrogênio do grupo hidroxila (Figura 5.5), além da interação cátion- $\pi$ .

A barreira de ativação para a rotação na ligação  $O_3-C_5$  é relativamente baixa, em torno de 2 kcal/mol, obtida por cálculo ab initio usando o algoritmo de Berny modificado. Desta forma, a rotação na ligação  $O_3-C_5$  é livre podendo ocorrer a interconversão de  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$  para  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  e vice-versa à temperatura ambiente.

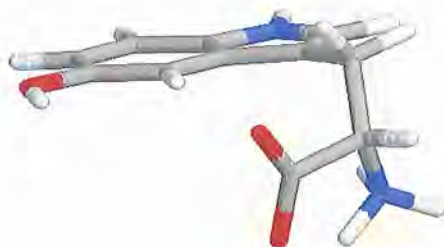


Figura 5.5: Representação gráfica do rotâmero perp- $\chi_2g^-$ , com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  do 5-OH-trp na forma zwitteriônica.

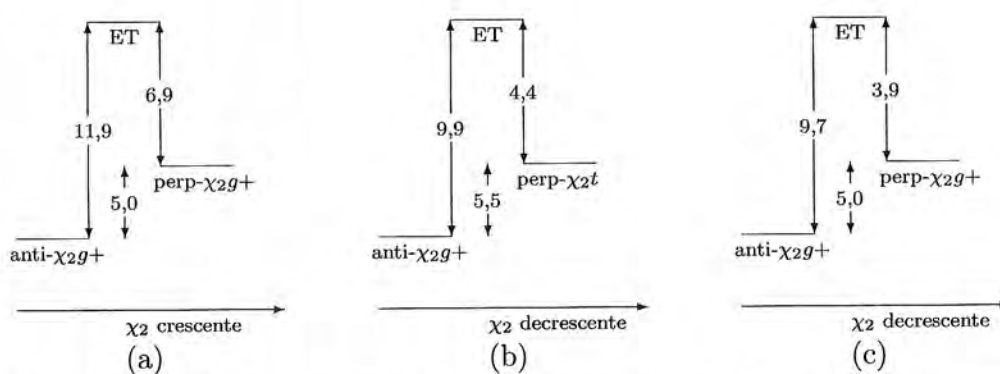


Figura 5.6: Diagramas para as três maiores barreiras de ativação (em kcal/mol) dos ET na SEP do EF para o 5-OH-trp ( $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ ), na forma zwitteriônica. As alturas das barreiras de ativação foram obtidas por cálculos semi-empíricos.

Usando resultados da Tabela 5.2, as linhas espectrais teóricas de absorção ótica do 5-OH-trp na forma zwitteriônica foram obtidas antes de qualquer medição experimental, Figura 5.4b.

Duas bandas de absorção muito próximas podem ser observadas no espectro teórico de absorção ótica: uma com maior absorção em torno de 274 nm (transição para  $^1L_a$ ), enquanto a outra próxima de 300 nm (transição para  $^1L_b$ ). Como nos resultados experimentais, a banda em torno de 300 nm não tem uma posição de máxima absorção no espectro.

Esses resultados estão bem próximos dos dados experimentais, apresentados no Capítulo 4, onde as bandas de absorção possuem máximos em 276 nm e 296 nm.

Além disso, foram obtidas as barreiras de ativação para interconversão entre os rotâmeros do 5-OH-trp no EF. Na Figura 5.6 são apresentados diagramas com as três maiores barreiras de ativação. A altura da barreira para interconversão da conformação anti- $\chi_2g+$  para um de seus vizinhos, perp- $\chi_2g+$  ou perp- $\chi_2t$ , é superior a 9,6 kcal/mol. Já para a passagem do anti- $\chi_2g-$  para o anti- $\chi_2g+$ , no sentido crescente de  $\chi_1$ , a barreira não atinge 2,3 kcal/mol. Sendo assim, a interconversão a partir do anti- $\chi_2g+$  para outra conformação estável pode não ser direta, mas deve ocorrer através da passagem por outros rotâmeros onde as barreiras são pequenas.

**Forma Neutra**

Cálculos de otimização de geometria foram realizados com a estrutura neutra a fim de verificar as diferenças entre as propriedades óticas obtidas na forma zwitteriônica .

Os resultados obtidos para o 5-OH-trp na forma neutra podem ser vistos na Tabela 5.3. O rotâmero mais populado anti- $\chi_2$  g+, com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , é em torno de 17 kcal/mol mais estável que o mesmo rotâmero na forma zwitteriônica . Por essa razão que as distâncias entre os hidrogênios do terminal amina e o nitrogênio tiveram que ser fixadas durante as otimizações de geometria na forma zwitteriônica .

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2$ g+	3,35 (0,50)	8,7 (8,4)	301 (300)	0,03 (0,03)	262 (261)	0,10 (0,11)
perp- $\chi_2$ t	3,30 (3,52)	3,6 (3,4)	301 (300)	0,02 (0,02)	268 (268)	0,11 (0,11)
perp- $\chi_2$ g-	2,73 (2,37)	9,1 (6,0)	301 (300)	0,02 (0,02)	266 (266)	0,11 (0,11)
anti- $\chi_2$ g+	0,00 (0,16)	4,8 (3,5)	302 (301)	0,02 (0,02)	268 (268)	0,11 (0,12)
anti- $\chi_2$ g-	2,33 (1,41)	9,7 (7,2)	301 (300)	0,03 (0,03)	263 (263)	0,10 (0,11)

Tabela 5.3: Mesmo da Tabela 5.2 para a forma neutra do 5-OH-trp . O rotâmero mais estável anti- $\chi_2$ g+, com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , apresentou energia interna igual a -474.346,503 kcal/mol.



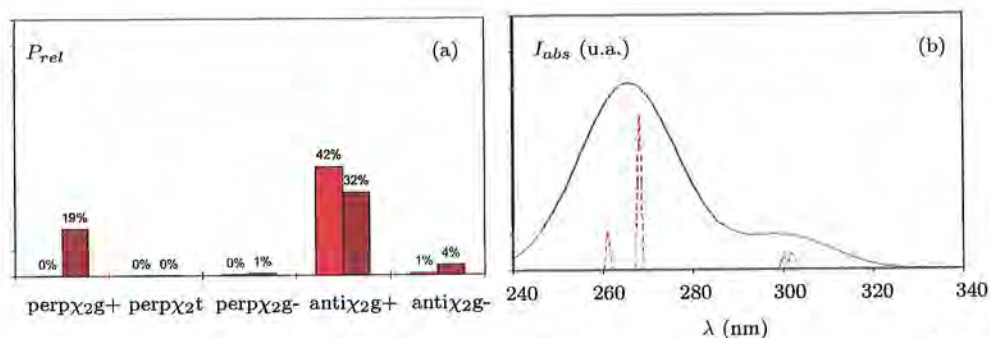


Figura 5.7: Mesmo da Figura 5.4 para o 5-OH-trp na forma neutra no EF. Neste caso, os máximos de absorção ótica ocorrem em 268 nm e em 301 nm.

Na Figura 5.7a, as populações relativas dos rotâmeros estáveis na forma neutra, à temperatura de 300K, são apresentadas. O rotâmero  $anti\chi_{2g+}$  teve sua população reduzida, em relação à forma zwitteriônica, devido à ausência da interação cátion- $\pi$  entre o terminal amina e os elétrons  $\pi$  do anel aromático.

Na Figura 5.7b, tem-se ilustrado o espectro teórico de absorção ótica obtido com os resultados da forma neutra. O máximo de absorção da banda da transição  ${}^1L_a$  é deslocado em 6 nm para o azul em relação ao espectro no estado zwitteriônico. Entretanto, para a transição  ${}^1L_b$  a posição do máximo praticamente não apresentou deslocamento.

**Forma Aniônica**

Os resultados obtidos para o 5-OH-trp na forma aniônica podem ser vistos na Tabela 5.4. O rotâmero perp- $\chi_2$ g+ somente é estável para  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ . Isso se deve ao caráter atrativo da interação do terminal carboxílico com o hidrogênio do O<sub>3</sub> que é necessária devido devido à ausência da interação cátion- $\pi$  causada pela desprotonação do terminal amina.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2$ g+	- (0,00)	- (11,6)	- (301)	- (0,03)	- (263)	- (0,09)
perp- $\chi_2$ t	4,03 (2,20)	15,4 (12,8)	306 (305)	0,01 (0,01)	287 (287)	0,11 (0,11)
perp- $\chi_2$ g-	7,89 (5,17)	20,7 (17,6)	305 (303)	0,02 (0,02)	281 (279)	0,07 (0,08)
anti- $\chi_2$ g+	2,90 (0,88)	15,0 (12,5)	306 (305)	0,01 (0,01)	288 (287)	0,11 (0,11)
anti- $\chi_2$ g-	7,60 (2,56)	20,3 (13,9)	304 (301)	0,02 (0,03)	276 (265)	0,07 (0,07)

Tabela 5.4: Mesmo da Tabela 5.2 para a forma aniônica do 5-OH-trp. O rotâmero mais estável, perp- $\chi_2$ g+ com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ , apresentou energia interna igual a -473.993,733 kcal/mol.



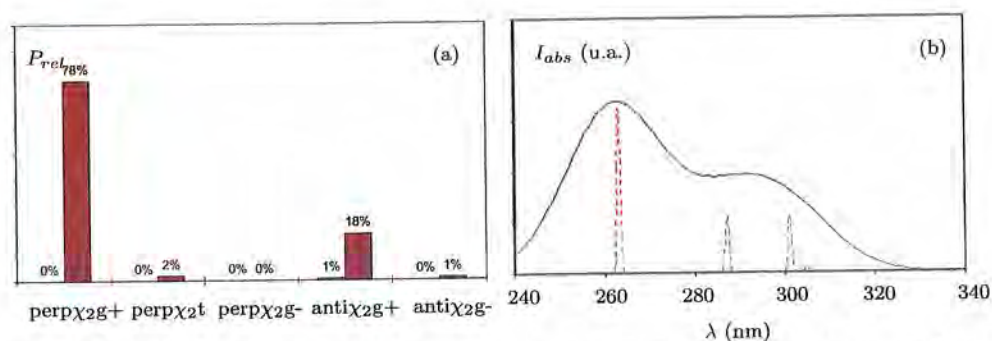


Figura 5.8: Mesmo da Figura 5.4 para o 5-OH-trp na forma aniônica no EF. Neste caso, os máximos de absorção óptica ocorrem em 263 nm e em 290 nm.

As populações relativas dos rotâmeros no EF, à temperatura de 300 K, podem ser vistas na Figura 5.8a. O rotâmero  $perp\chi_{2g+}$  com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  é o mais populado na forma aniônica do EF (78%) diferente do que ocorre nas formas zwitteriônica e neutra. Além disso, devido à ausência da interação cátion- $\pi$ , o rotâmero  $anti\chi_{2g+}$  tem somente 19% da população (18% com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  e 1% com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ ). Os outros rotâmeros apresentaram populações praticamente nulas.

Deslocado para o azul em 11 nm em relação aos resultados da forma zwitteriônica, o espectro teórico de absorção óptica na forma aniônica do 5-OH-trp é apresentado na Figura 5.8b. Pelos dados da Tabela 5.4, verifica-se que a segunda banda de absorção é devido a duas transições: transição  ${}^1L_a$  do rotâmero  $anti\chi_{2g+}$  e transição  ${}^1L_b$  do rotâmero  $perp\chi_{2g+}$ .

## Forma Dianiônica

Na Tabela 5.5 estão os resultados obtidos para o 5-OH-trp na forma dianiônica. Devido à desprotonação da hidroxila do indol, o ângulo  $\delta_{5OH}$  não é definido neste estado de protonação.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )
perp- $\chi_2g-2$	0,00	12,8	345	0,13	270	0,06
perp- $\chi_2t$	0,94	5,2	340	0,13	269	0,04
perp- $\chi_2g-$	1,97	12,7	344	0,15	271	0,06
anti- $\chi_2g+$	1,30	6,1	341	0,12	270	0,03
anti- $\chi_2g-$	3,46	14,7	343	0,16	271	0,07

Tabela 5.5: Mesmo da Tabela 5.2 para o 5-OH-trp na forma dianiônica no EF. O rotâmero mais estável, perp- $\chi_2g-2$ , apresentou energia interna igual a -473.565,238 kcal/mol.

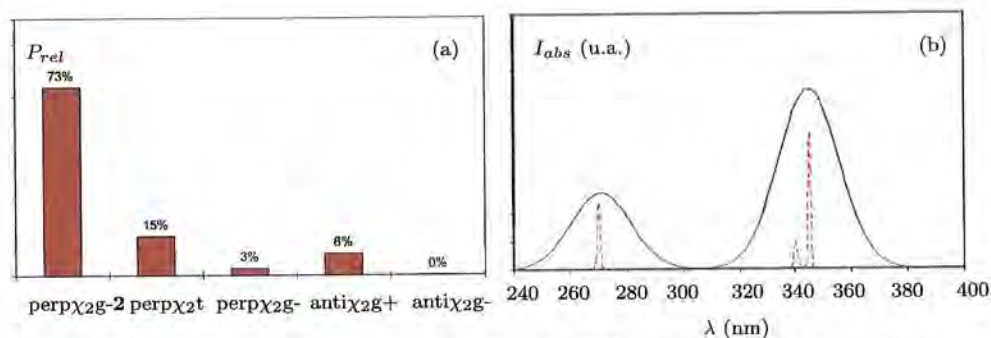


Figura 5.9: Mesmo da Figura 5.4 para o 5-OH-trp na forma dianiônica no EF. Neste caso, os máximos de absorção óptica ocorrem em 345 nm e em 270 nm.

As populações relativas do EF podem ser vistas na Figura 5.9a. A otimização de geometria com coordenadas iniciais próximas ao rotâmero perp $\chi_2g+$  convergiu para um rotâmero próximo ao perp $\chi_2g-$ , com ângulos diedrais  $\chi_1 = -61^\circ$  e  $\chi_2 = 177^\circ$  (denominado por perp $\chi_2g-2$ ). Representado

na Figura 5.10e, este rotâmero é o mais populado na forma dianiônica (73%), enquanto que os rotâmeros  $\text{perp}\chi_{2t}$ ,  $\text{perp}\chi_{2g^-}$  e  $\text{anti}\chi_{2g^+}$  apresentaram populações relativas de 15%, 3% e 8%, respectivamente. O rotâmero  $\text{anti}\chi_{2g^-}$  não é populado na forma dianiônica.

Além disso, contrariamente aos resultados obtidos nos outros estados de protonação, na forma dianiônica as bandas de absorção são bem separadas. A transição de menor energia é para o estado excitado  ${}^1L_a$  e tem absorção deslocada para o vermelho, enquanto a transição de maior energia é para o estado  ${}^1L_b$  e possui absorção deslocada para o azul. Esses resultados estão de acordo com o observado experimentalmente por Das et al[8] em estudo com o 5-OH-indol, onde para altos valores do pH ( $> 11$ ) a banda de absorção ótica desta molécula apresenta um significativo deslocamento para o vermelho.

## 5.2.2 Primeiro Estado Excitado

### Forma zwitteriônica

A partir das conformações estáveis obtidas para o 5-OH-trp no EF (Seção 5.2.1), iniciou-se as otimizações de geometria do primeiro estado excitado para o 5-OH-trp na forma zwitteriônica. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.6.

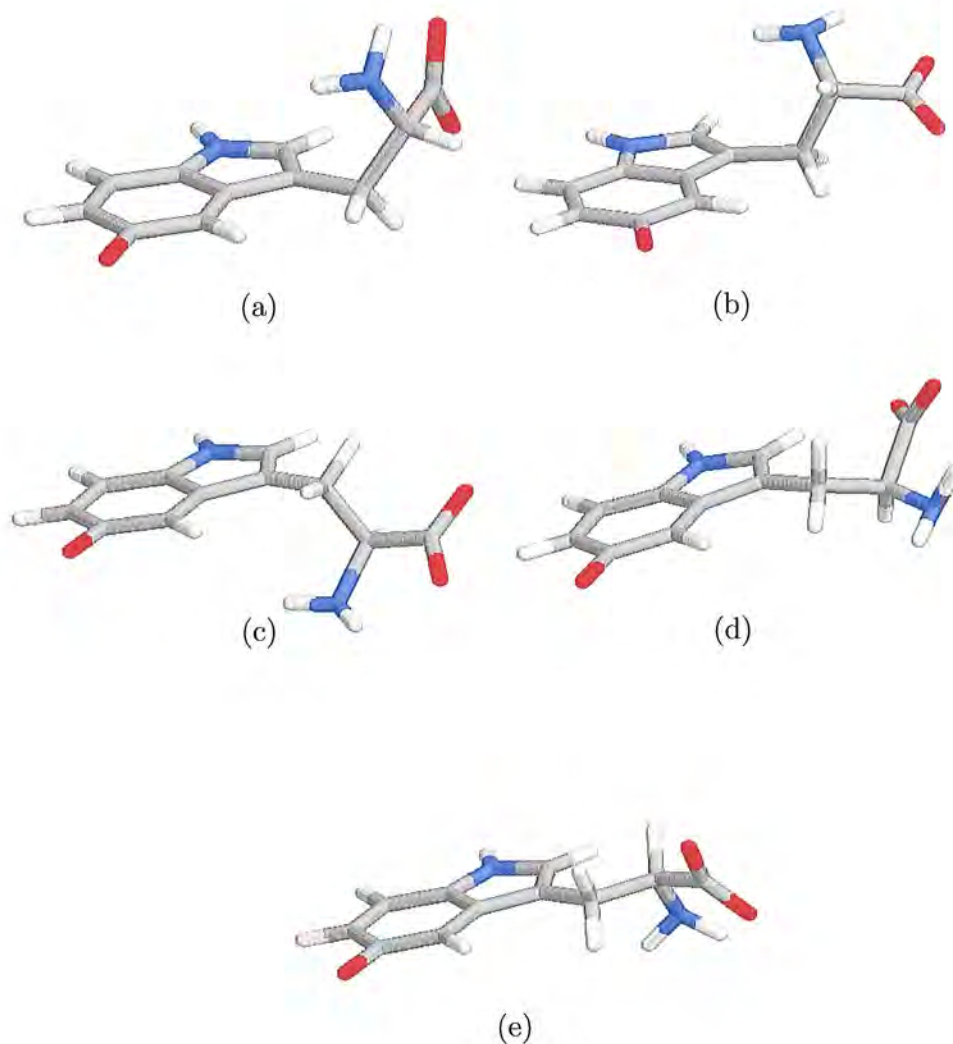


Figura 5.10: Representação gráfica dos rotâmeros estável na forma dianiônica do 5-OH-trp no EF : (a) anti- $\chi_{2g+}$  (b) anti- $\chi_{2g-}$  (c) perp- $\chi_{2g-}$  (d) perp- $\chi_{2t}$  (e) perp- $\chi_{2g-2}$ .

Cinco conformações estáveis foram encontradas na forma zwitteriônica. A Figura 5.11a ilustra as populações relativas desses rotâmeros no 1EE. O rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  (Figura 5.3a) é o mais estável devido à interação cátion- $\pi$  entre o terminal amina e os elétrons  $\pi$  do anel aromático. Já a otimização de geometria partindo do rotâmero anti- $\chi_{2t}$ , como no EF, não convergiu para este rotâmero devido à interação repulsiva ânion- $\pi$ .

As energias de transição vertical entre o 1EE e o EF foram determinadas a partir das geometrias estáveis do 1EE, através de cálculos com as geometrias fixas, pelo método INDO/S-CIS. Esses resultados permitirão a obtenção do espectro teórico de fluorescência de estado estacionário.

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_{2g+}$	4,0	10,4	326	0,22
	(0,8)	(9,9)	(326)	(0,23)
perp- $\chi_{2t}$	7,1	5,8	314	0,29
	(8,3)	(6,3)	(314)	(0,34)
perp- $\chi_{2g-}$	3,5	13,9	322	0,21
	(4,2)	(11,0)	(324)	(0,22)
anti- $\chi_{2g+}$	0,0	6,0	320	0,28
	(1,4)	(5,9)	(323)	(0,31)
anti- $\chi_{2g-}$	3,8	14,0	322	0,21
	(3,7)	(11,0)	(322)	(0,22)

Tabela 5.6: Resultados obtidos após otimização de geometria do 1EE do 5-OH-trp na forma zwitteriônica usando os métodos ab initio HF/4-31G e CIS/4-31G. Somente os comprimentos de onda da transição vertical,  $\lambda$ , foram obtidos pelo método semi-empírico INDO/S-CIS. Entre parênteses estão os valores obtidos para  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  e sem os parênteses, para  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ . A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_{2g+}$ , com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , vale -474.198,584 kcal/mol.



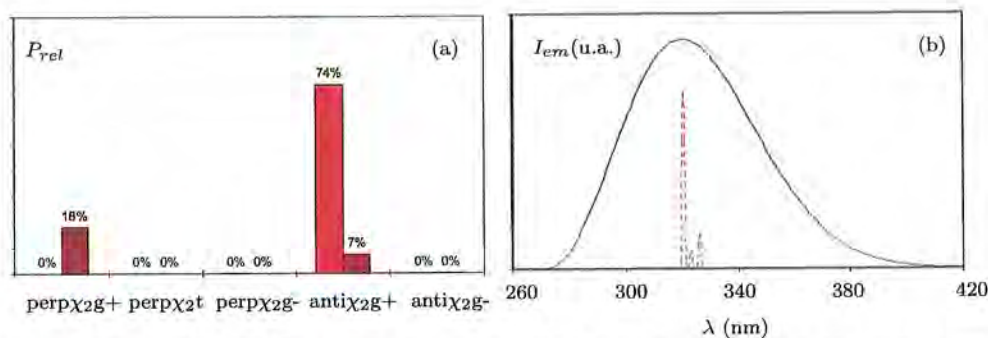


Figura 5.11: Resultados teóricos para o 5-OH-trp na forma zwitteriônica no 1EE : (a) População percentual relativa de Boltzmann, à temperatura de 300K. Em vermelho claro, os resultados para  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ ; e, em vermelho escuro,  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ . (b) Espectro teórico de fluorescência de estado estacionário ajustado com a linha da forma dada pela Equação 5.3. Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 321 nm.

Como no EF, a barreira de ativação para a rotação na ligação  $O_3-C_5$  é baixa, em torno de 2 kcal/mol, permitindo assim a sua livre rotação à temperatura ambiente.

Antes de qualquer medição experimental, foi determinado as linhas espectrais de fluorescência de estado estacionário para a forma zwitteriônica do 5-OH-trp, representadas na Figura 5.11b. O máximo de emissão fluorescente teórico para o 5-OH-trp na forma zwitteriônica ocorre em 321 nm e praticamente independe da forma rotamérica (Tabela 5.6) .

A Figura 5.12 ilustra a SEP do 1EE com as posições dos rotâmeros estáveis, obtidos pelo /CIS indicados pela letra "X" e os caminhos numerados, ligando essas conformações, usados na primeira etapa das otimizações de estruturas dos ET.

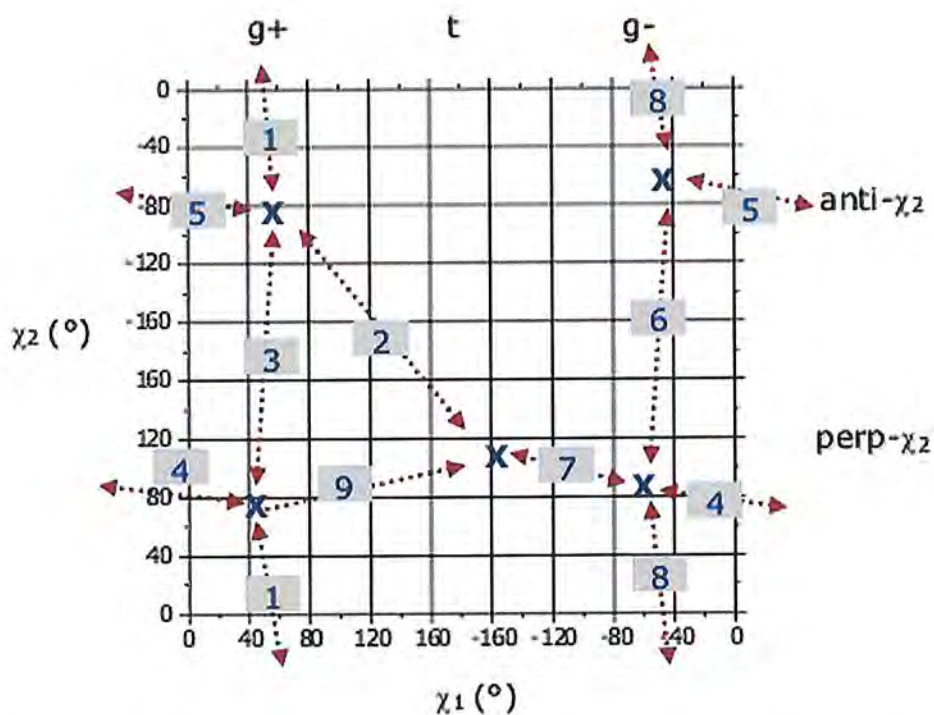


Figura 5.12: SEP do 1EE com as posições dos rotâmeros estáveis indicados pela letra "X". As linhas tracejadas representam os caminhos usados para otimização de geometria na primeira etapa dos cálculos dos ET no 1EE.

Os diagramas das três maiores barreiras de ativação são apresentados na Figura 5.13. As barreiras entre os conformações  $\text{anti}\chi_{2g+}$  e  $\text{perp}\chi_{2g+}$  são altas ( $> 9,6$  kcal/mol), Figura 5.13a e b, e impedem a interconversão direta entre esses rotâmeros. O mesmo ocorre entre os rotâmeros  $\text{anti}\chi_{2g-}$  e  $\text{perp}\chi_{2g-}$ , Figura 5.13c, com barreira superior à 6,8 kcal/mol.

Porém, existe a possibilidade que a interconversão ocorra pela passagem por outros rotâmeros já que as barreiras são inferiores a 5,0 kcal/mol. Sendo assim, é possível que a emissão fluorescente provenha de um rotâmero diferente daquele que tenha sido originalmente excitado. Isso dependerá do tempo de interconversão e do tempo de vida de fluorescência.

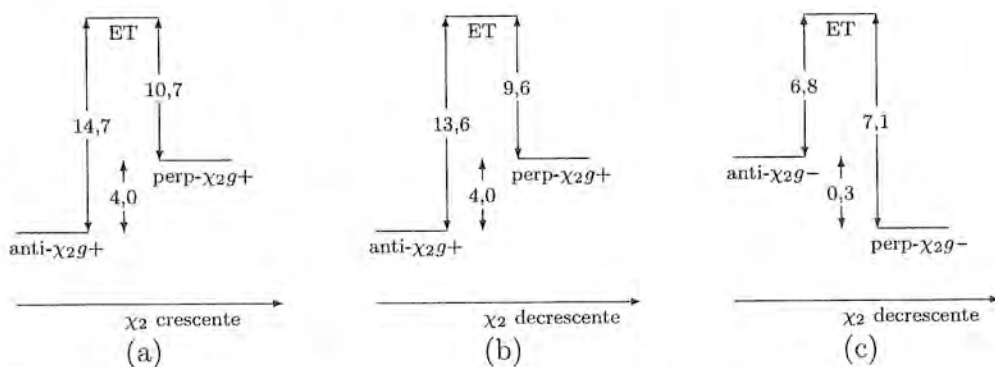


Figura 5.13: Diagramas para as três maiores barreiras de ativação (em kcal/mol) dos ET na SEP do 1EE para o 5-OH-trp ( $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ ), na forma zwitteriônica.



Para o cálculo das taxas de transferência de elétrons, é necessário conhecer quais são os átomos doadores e aceitadores de elétrons. Como essa reação de transferência de carga ocorre no 1EE então foram utilizadas as geometrias otimizadas no 1EE, com o método INDO/S-CIS, para determinação desses átomos. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 5.7. As notações utilizadas para os átomos doadores e aceitadores de elétrons podem ser consultadas na Figura 5.14.

Rotâmeros	Átomos Doadores	Átomos Aceitadores
perp- $\chi_{2g}+$	C <sub>2</sub> C <sub>6</sub> (C <sub>2</sub> C <sub>6</sub> )	C <sub>5</sub> N <sub>1</sub> (C <sub>5</sub> N <sub>1</sub> )
perp- $\chi_{2t}$	C <sub>7</sub> C <sub>5</sub> (C <sub>7</sub> C <sub>5</sub> )	C <sub>3</sub> N <sub>1</sub> (C <sub>3</sub> N <sub>1</sub> )
perp- $\chi_{2g}-$	C <sub>4</sub> C <sub>7</sub> (C <sub>4</sub> C <sub>7</sub> )	N <sub>1</sub> C <sub>3</sub> (N <sub>1</sub> C <sub>3</sub> )
anti- $\chi_{2g}+$	C <sub>7</sub> C <sub>5</sub> (C <sub>7</sub> C <sub>5</sub> )	C <sub>3</sub> N <sub>1</sub> (C <sub>3</sub> N <sub>1</sub> )
anti- $\chi_{2g}-$	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> C <sub>6</sub> )	N <sub>1</sub> O <sub>3</sub> (N <sub>1</sub> C <sub>5</sub> )

Tabela 5.7: Átomos doadores e aceitadores de elétrons no 1EE para os rotâmeros estáveis do 5-OH-trp obtidos pelo método INDO/S-CIS na forma zwitteriônica. Entre parênteses estão os átomos obtidos com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  e sem parênteses, para  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ .

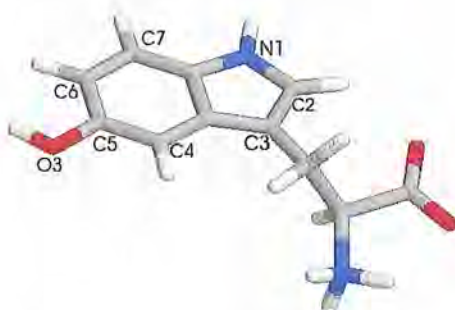


Figura 5.14: Representação gráfica dos átomos doadores e aceitadores de elétrons do 5-OH-trp no 1EE.

### Forma Neutra

Os resultados obtidos das otimizações de geometria do 5-OH-trp no estado neutro podem ser vistos nas Tabela 5.8. O rotâmero anti- $\chi_{2g+}$ , o mais estável na forma neutra, possui energia interna em torno de 16 kcal/mol inferior à energia do mesmo rotâmero no estado zwitteriônico, também o mais estável. Por isso, para evitar a transferência de um próton do terminal amina para o grupamento carboxílico nas otimizações de geometria realizadas na forma zwitteriônica, foi necessário fixar as distâncias entre os átomos de hidrogênio do terminal amina e o nitrogênio desse mesmo grupamento.

Na Figura 5.15a, as populações relativas dos vários rotâmeros estáveis no 1EE na forma neutra do 5-OH-trp foram obtidas à temperatura de 300K. O rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  é menos populado em relação à forma zwitteriônica devido à ausência da interação cátion- $\pi$ .

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_{2g}+$	2,27 (0,30)	7,3 (7,0)	321 (321)	0,20 (0,21)
perp- $\chi_{2t}$	3,58 (4,58)	1,7 (3,5)	314 (314)	0,28 (0,33)
perp- $\chi_{2g}-$	1,94 (2,42)	9,0 (5,9)	320 (320)	0,20 (0,21)
anti- $\chi_{2g}+$	0,00 (0,99)	2,5 (2,5)	315 (315)	0,28 (0,33)
anti- $\chi_{2g}-$	1,55 (1,35)	9,4 (6,7)	320 (321)	0,20 (0,21)

Tabela 5.8: Mesmo da Tabela 5.6 para a forma neutra do 5-OH-trp no 1EE. A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_{2g}+$ , com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , vale -474.214,437 kcal/mol.

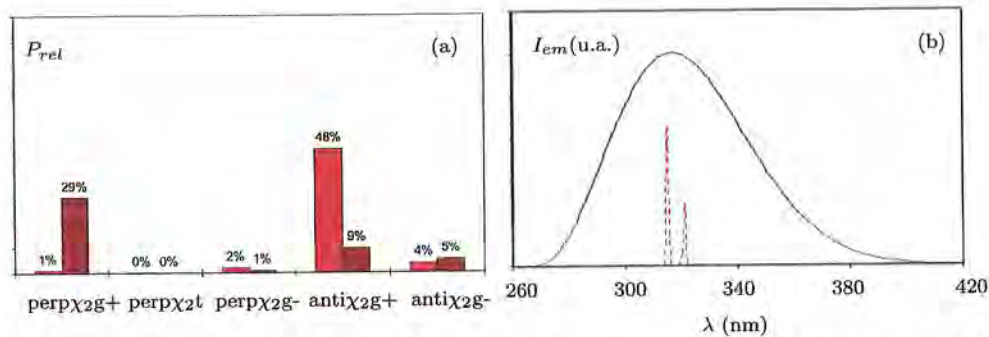


Figura 5.15: Mesmo da Figura 5.11 para o forma neutra do 5-OH-trp no 1EE. Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 317 nm.

A Figura 5.15b ilustra o espectro teórico de fluorescência de estado estacionário obtido para a forma neutra do 5-OH-trp. Um suave deslocamento para o azul (4 nm) é observado na emissão fluorescente em relação ao espectro obtido no estado zwitteriônico.

### Forma Aniônica

A Tabela 5.9 apresenta os resultados obtidos das otimizações de geometria no 1EE na forma aniônica do 5-OH-trp.

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
anti- $\chi_{2g}+2$	1,53	7,3	321	0,20
perp- $\chi_{2g}+$	(3,61)	(7,0)	(321)	(0,21)
perp- $\chi_{2t}$	1,76	1,7	314	0,28
	(0,97)	(3,5)	(314)	(0,33)
perp- $\chi_{2g}-$	6,38	9,0	320	0,20
	(5,26)	(5,9)	(320)	(0,21)
anti- $\chi_{2g}+$	0,89	2,5	315	0,28
	(0,00)	(2,5)	(315)	(0,33)
anti- $\chi_{2g}-$	8,11	9,4	320	0,20
	(5,98)	(6,7)	(321)	(0,21)

Tabela 5.9: Mesmo da Tabela 5.6 para a forma aniônica do 5-OH-trp no 1EE. A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_{2g}+$ , com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ , vale -473.865,101 kcal/mol.

As populações relativas dos vários rotâmeros estáveis no 1EE na forma aniônica do 5-OH-trp foram obtidas à temperatura de 300K e são apresentadas na Figura 5.16a. O rotâmero mais populado é o anti- $\chi_{2g}+$  com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  (64%), enquanto que no EF, o rotâmero mais estável é o perp- $\chi_{2g}+$  com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  (78%). Além disso, o rotâmero perp- $\chi_{2g}+$  é apenas populado no 1EE com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$  (5%).

O rotâmero  $\text{perp}\chi_{2g+}$ , com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , não é estável, pois as otimizações iniciadas nessa conformação convergiram para o rotâmero  $\text{anti}\chi_{2g+2}$ , Figura 5.17.

A Figura 5.16b ilustra o espectro teórico de fluorescência para o 5-OH-trp na forma aniônica. A posição do máximo de emissão ocorre em 315 nm próxima ao ponto de máximo obtido para a forma zwitteriônica.

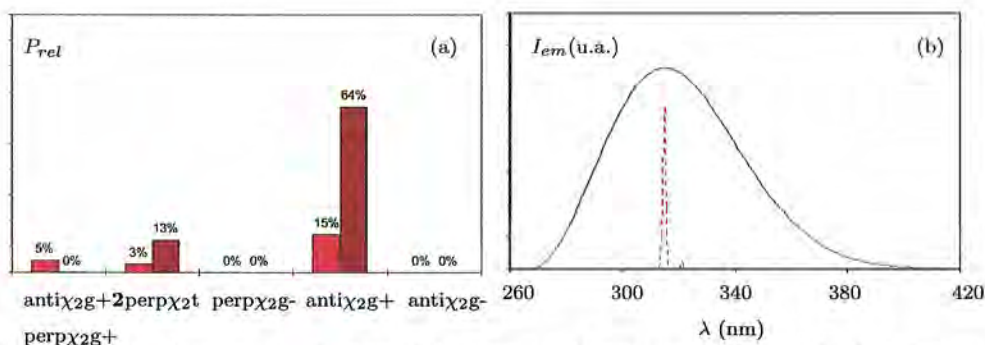


Figura 5.16: Mesmo da Figura 5.11 para o forma aniônica do 5-OH-trp no 1EE. (a) O rotâmero próximo da conformação  $\text{anti}\chi_{2g+}$ ,  $\text{anti}\chi_{2g+2}$   $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , tem 5% da população, enquanto o rotâmero  $\text{perp}\chi_{2g+}$ ,  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ , tem população nula. (b) Neste espectro de fluorescência, a emissão máxima ocorre em 315 nm.



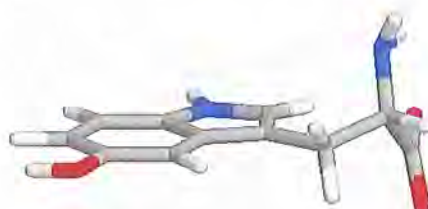


Figura 5.17: Representação gráfica do rotâmero estável anti- $\chi_2g+2$  do 5-OH-trp no 1EE com  $\chi_1 = 54^\circ$  e  $\chi_2 = -160^\circ$  na forma aniônica.

### Forma Dianiônica

A Tabela 5.10 apresenta os resultados provenientes das otimizações de geometria do 1EE para o 5-OH-trp na forma dianiônica.

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_2g+$	9,53	11,0	373	0,27
perp- $\chi_2t$	1,69	4,3	359	0,28
perp- $\chi_2g-$	0,00	10,8	366	0,28
anti- $\chi_2g+$	1,15	4,9	363	0,28
anti- $\chi_2g-$	0,81	12,1	370	0,28

Tabela 5.10: Mesmo da Tabela 5.6 para a forma dianiônica do 5-OH-trp no 1EE. A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_2g+$  vale -473.456,177 kcal/mol.

A Figura 5.18a ilustra as populações relativas obtidas para os vários rotâmeros estáveis no 1EE do 5-OH-trp na forma dianiônica. Neste estado de protonação, o rotâmero perp- $\chi_2g^-$  é o mais estável (68%), enquanto as conformações perp- $\chi_2t$ , anti- $\chi_2g^+$  e anti- $\chi_2g^-$  são populados em 4%, 10% e 18%, respectivamente.

Na Figura 5.18b pode-se observar o deslocamento para o vermelho do espectro de emissão teórico do 5-OH-trp dianiônico em relação as emissões em outros estados de protonação.

Em recentes estudos[46], a molécula 5-OH-indol apresenta o máximo de emissão fluorescente em 332 nm, independente do meio. Das *et al.*[8] observaram que em altos valores do pH ( $> 11$ ), a emissão fluorescente do 5-OH-indol é muito fraca e apresenta um significativo deslocamento para o vermelho, como ocorre no espectro de absorção ótica. Além disso, a dependência da fluorescência do 5-OH-indol em função do pH sugere que a componente com menor tempo de vida origina da interação do hidrogênio do grupo 5-hidroxil do anel com o solvente. A perda desse hidrogênio ou uma interação de hidrogênio nessa posição poderia fornecer um canal para decaimentos não-radiativos.

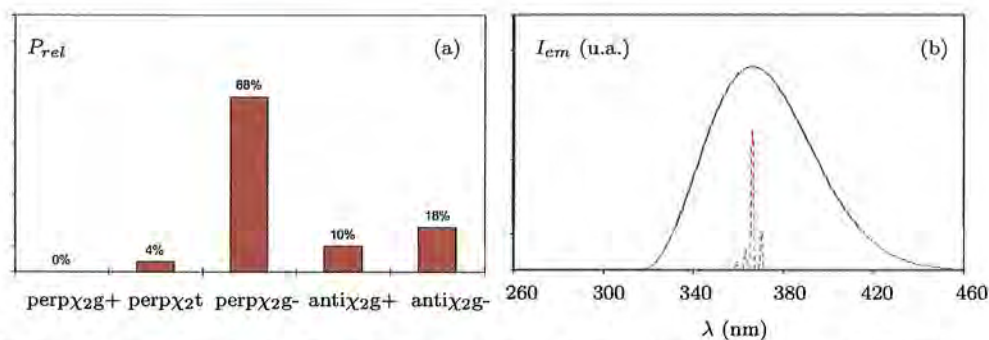


Figura 5.18: Mesmo da Figura 5.11 para o forma dianiônica do 5-OH-trp no 1EE. Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 366 nm.

### 5.3 Resultados para o 7-aza-trp

Como realizado para o 5-OH-trp, nesta seção serão apresentados os resultados obtidos no EF e no 1EE para as energias internas, os momentos de dipolo elétrico permanentes, as energias de transição vertical e as respectivas forças do oscilador dos rotâmeros estáveis do 7-aza-trp nas formas zwitteriônica, neutra e aniônica.

Ao mesmo tempo, serão discutidas as possibilidades de interconversão entre rotâmeros estáveis nos EF e no 1EE, na forma zwitteriônica, e analisados os espectros teóricos de absorção ótica e de fluorescência de estado estacionário, obtidos a partir das populações relativas desses rotâmeros no EF e no 1EE, respectivamente.



### 5.3.1 Estado Fundamental

#### Forma zwitteriônica

Para o 7-aza-trp, a SEP obtida por cálculos semi-empíricos no EF, em função dos ângulos diedrais, apresentou a mesma forma que a SEP do 5-OH-trp. Ou seja, cinco rotâmeros estáveis foram encontrados praticamente com os mesmos valores para  $\chi_1$  e  $\chi_2$ , apresentados na Tabela 5.11.

A partir dessas conformações de mínima energia, iniciou-se cálculos ab initio de otimização de geometria do EF. Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 5.11 e 5.12. Como observado nos resultados teóricos do 5-OH-trp, a ausência do rotâmero anti- $\chi_2t$  se deve à interação repulsiva ânion- $\pi$  entre o terminal carboxílico e os elétrons  $\pi$  do indol.

Rotâmeros	$\chi_1^{am1} (^\circ)$	$\chi_2^{am1} (^\circ)$	$\chi_1^{hJ} (^\circ)$	$\chi_2^{hJ} (^\circ)$
perp- $\chi_2g+$	26	55	45	77
perp- $\chi_2t$	-143	126	-154	119
perp- $\chi_2g-$	-56	92	-57	98
anti- $\chi_2g+$	53	-108	52	-104
anti- $\chi_2g-$	-54	-65	-58	-67

Tabela 5.11: Resultados obtidos, pelos métodos ab initio e semi-empírico AM1, para os ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  dos rotâmeros estáveis do EF na forma zwitteriônica do 7-aza-trp.

A Figura 5.19a ilustra as populações relativas dos rotâmeros estáveis no EF na forma zwitteriônica do 7-aza-trp obtidas à temperatura de 300K. Os rotâmeros perp- $\chi_2g+$  e anti- $\chi_2g+$  são as conformações mais populadas com 58% e 40%, respectivamente. A interação cátion- $\pi$  entre o terminal amina e o anel aromático contribui para a maior estabilidade desses rotâmeros.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2g+$	0,00	10,2	286	0,06	278	0,08
perp- $\chi_2t$	4,83	9,4	291	0,05	283	0,08
perp- $\chi_2g-$	3,39	9,7	290	0,05	283	0,08
anti- $\chi_2g+$	0,22	9,3	292	0,05	282	0,07
anti- $\chi_2g-$	2,19	9,7	289	0,05	283	0,08

Tabela 5.12: Resultados obtidos após otimização de geometria do EF do 7-aza-trp, na forma zwitteriônica, pelo método ab initio HF/4-31G. Os comprimentos de onda de absorção,  $\lambda$ , e as forças do oscilador,  $f_{osc}$ , foram obtidos pelo método semi-empírico INDO/S-CIS. A energia relativa do EF entre os rotâmeros é representada por  $E_{EF}$ ; enquanto, o momento de dipolo elétrico permanente por  $\mu$ . O rotâmero mais estável, perp- $\chi_2g+$ , apresentou energia igual a  $-437.440,748$  kcal/mol.

Usando resultados da Tabela 5.12, as linhas espectrais de absorção ótica do 7-aza-trp na forma zwitteriônica, Figura 5.19b, foram determinadas antes de qualquer medição experimental. Uma única banda de absorção pode ser observada nesse espectro (em torno de 282 nm) devido à proximidade energética dos estados  $^1L_a$  e  $^1L_b$  no 7-aza-trp, conforme pode ser verificado nos resultados experimentais. Além disso, a transição  $^1L_a$  apresentou força do oscilador ligeiramente inferiores aos valores apresentados anteriormente para o 5-OH-trp. Borin et al.[63], em estudo do 7-aza-indol, obtiveram valores semelhantes para as forças do oscilador associadas às transições  $^1L_a$  e  $^1L_b$ , 0,072 e 0,043, respectivamente.

Na Figura 5.20 são apresentados diagramas com as três maiores barreiras de ativação entre os rotâmeros estáveis no EF na forma zwitteriônica. As alturas das barreiras para interconversão do rotâmero perp- $\chi_2g+$  para o anti- $\chi_2g+$  são altas ( $> 8,0$  kcal/mol), Figura 5.20a e c. O mesmo ocorre da conformação anti- $\chi_2g+$  para a perp- $\chi_2t$ , com barreira  $\sim 9,2$  kcal/mol. Porém, como obtido para o 5-OH-trp, a barreira para interconversão do anti- $\chi_2g+$  para o anti- $\chi_2g-$ , no sentido decrescente de  $\chi_1$ , é baixa ( $\sim 2,3$  kcal/mol). Sendo assim, a interconversão a partir do anti- $\chi_2g+$  para outra conformação estável pode não ser direta, mas deve ocorrer através da passagem por outros rotâmeros onde as barreiras são pequenas.

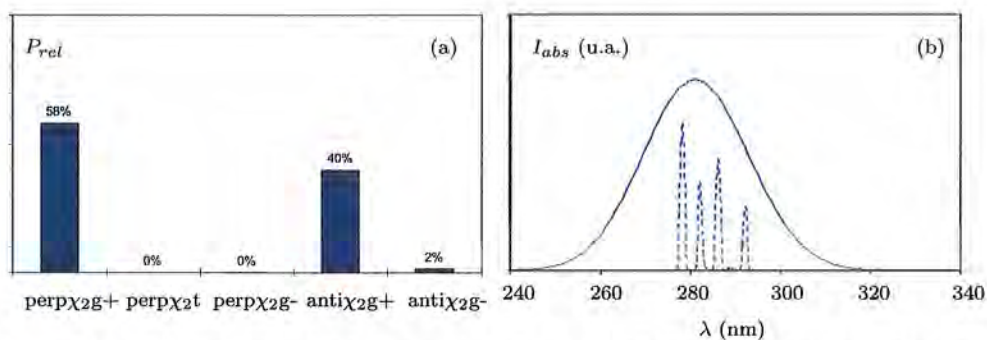


Figura 5.19: Resultados teóricos para o 7-aza-trp na forma zwitteriônica no EF: (a) População percentual relativa de Boltzmann, à temperatura de 300K. (b) Espectro teórico de absorção ótica. As linhas teóricas obtidas diretamente dos cálculos são tracejadas, enquanto as linhas de convolução estão em azul escuro. Neste caso, o máximo de absorção ótica ocorre em 282 nm.

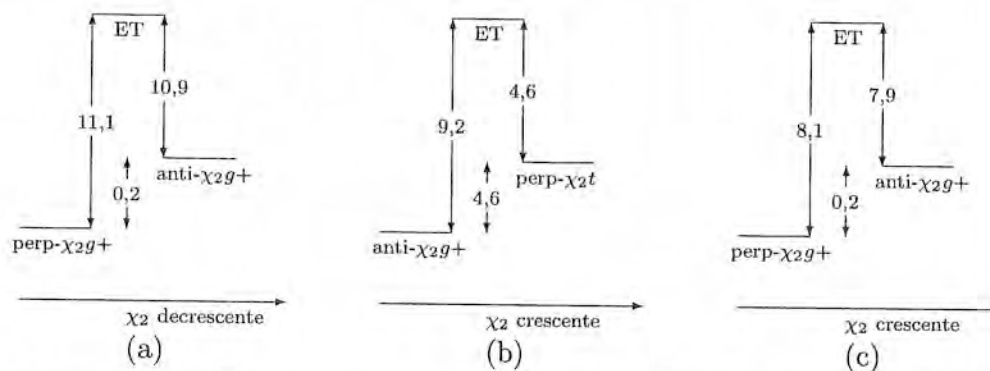


Figura 5.20: Diagramas para as três maiores barreiras de ativação (em kcal/mol) dos ET na SEP do EF para o 7-aza-trp, na forma zwitteriônica. As alturas das barreiras de ativação foram obtidas por cálculos semi-empíricos.

### Forma Neutra

Os resultados obtidos para a estrutura neutra do 7-aza-trp no EF podem ser vistos na Tabela 5.13. O rotâmero mais estável anti- $\chi_2 g+$  possui energia em torno de 18 kcal/mol inferior ao valor obtido para o rotâmero mais estável na forma zwitteriônica, perp- $\chi_2 g+$ . Por essa razão, da mesma forma que para o 5-OH-trp, as distâncias entre os hidrogênios do terminal amina e o nitrogênio tiveram que ser fixadas durante as otimizações de geometria na forma zwitteriônica.

Na Figura 5.21a são apresentadas as populações relativas dos rotâmeros estáveis na forma neutra à temperatura de 300K. A ausência da interação cátion- $\pi$  fez com que o rotâmero anti- $\chi_2g+$  se tornasse o mais populado com 56%, enquanto a conformação perp- $\chi_2g+$  teve sua população diminuída para 36%.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2$ g+	0,27	6,6	288	0,05	279	0,08
perp- $\chi_2$ t	3,00	5,5	290	0,05	282	0,07
perp- $\chi_2$ g-	2,34	5,1	290	0,05	281	0,07
anti- $\chi_2$ g+	0,00	5,4	291	0,05	281	0,07
anti- $\chi_2$ g-	1,23	5,5	289	0,05	280	0,07

Tabela 5.13: Mesmo da Tabela 5.12 para a forma neutra do 7-aza-trp. O rotâmero mais estável, anti- $\chi_2$ g+, apresentou energia igual a  $-437.458,785$  kcal/mol.

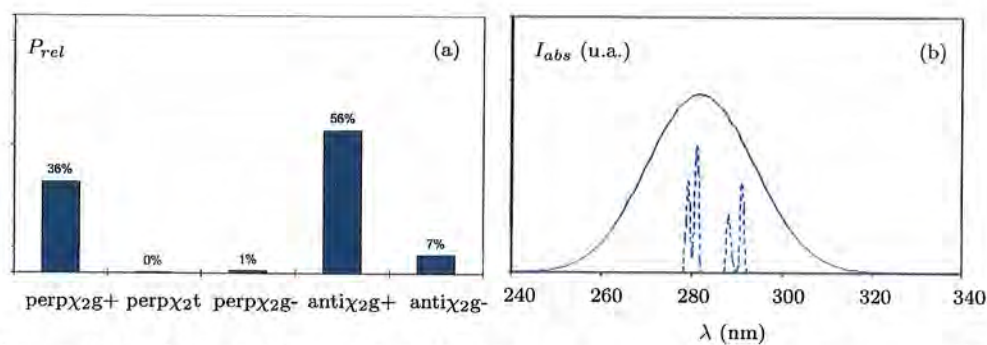


Figura 5.21: Mesmo da Figura 5.19 para o 7-aza-trp na forma neutra no EF. Neste caso, o máximo de absorção óptica ocorre em 282 nm.

O espectro teórico de absorção ótica obtido com os resultados da forma neutra pode ser visto na Figura 5.21b. A posição de máxima absorção ótica em 282 nm ocorre no mesmo comprimento de onda do espectro teórico de absorção no estado zwitteriônico .

### Forma Aniônica

Os resultados obtidos das otimizações de geometria no EF do 7-aza-trp na forma aniônica podem ser vistos na Tabela 5.14. Nesse estado de protonação todos os rotâmeros são populados, sendo o rotâmero anti- $\chi_2g+$  o mais populado (57%), como pode ser visto na Figura 5.22a.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2$ g+	1,03	14,6	292	0,03	281	0,09
perp- $\chi_2$ t	1,08	13,2	297	0,05	291	0,06
perp- $\chi_2$ g-	0,69	14,5	292	0,02	284	0,07
anti- $\chi_2$ g+	0,00	11,9	298	0,06	292	0,05
anti- $\chi_2$ g-	1,46	14,4	293	0,02	286	0,08

Tabela 5.14: Mesmo da Tabela 5.12 para a forma aniônica do 7-aza-trp. O rotâmero mais estável, anti- $\chi_2g+$ , apresentou energia igual a  $-437.106,523$  kcal/mol.

Deslocado para o vermelho em 13 nm em relação aos resultados da forma zwitteriônica, o espectro teórico de absorção ótica na forma aniônica do 7-aza-trp é apresentado na Figura 5.22b.



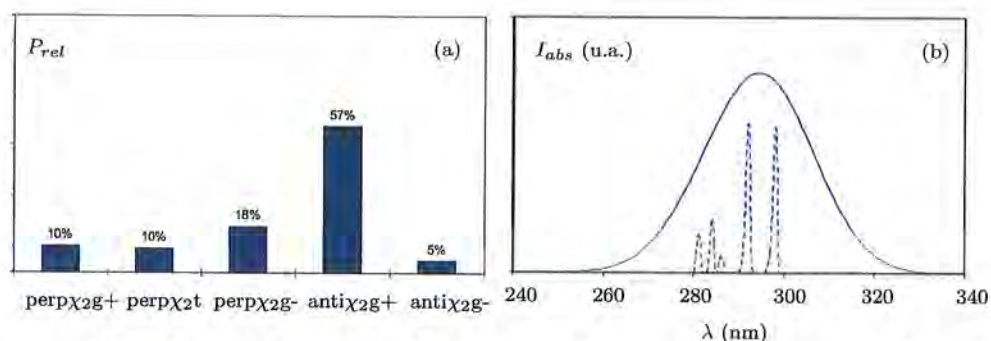


Figura 5.22: Mesmo da Figura 5.19 para o 7-aza-trp na forma aniônica no EF. Neste caso, o máximo de absorção ótica ocorre em 295 nm.

### 5.3.2 Primeiro Estado Excitado

#### Forma zwitteriônica

A partir das conformações estáveis obtidas para o 7-aza-trp no EF na forma zwitteriônica (Seção 5.3.1), iniciou-se as otimizações de geometria do 1EE na forma zwitteriônica. Os resultados são apresentados na Tabela 5.15. Do mesmo modo que no EF, cinco conformações estáveis foram encontradas, porém apenas o rotâmero  $anti-\chi_{2g}+$  é populado no 1EE (100%).

As energias de transição vertical entre o 1EE e o EF foram determinadas para obtenção dos espectros teóricos de fluorescência de estado estacionário para o 7-aza-trp.

Antes de qualquer medição experimental, foram determinadas as linhas espectrais de fluorescência para a forma zwitteriônica do 7-aza-trp, ilustradas na Figura 5.23b. Neste caso, o máximo de emissão fluorescente, pela curva de convolução, ocorre em 342 nm. Deslocado para o vermelho em relação ao 5-OH-trp, como observado experimentalmente (Capítulo 4).



Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_{2g}+$	6,87	12,8	378	0,05
perp- $\chi_{2t}$	6,80	7,6	320	0,32
perp- $\chi_{2g}-$	3,91	8,7	331	0,28
anti- $\chi_{2g}+$	0,00	6,7	341	0,26
anti- $\chi_{2g}-$	6,91	12,8	374	0,04

Tabela 5.15: Resultados obtidos após otimização de geometria do 1EE do 7-aza-trp na forma zwitteriônica usando os métodos ab initio HF/4-31G e CIS/4-31G. Somente os comprimentos de onda da transição vertical,  $\lambda$ , foram obtidos pelo método semi-empírico INDO/S-CIS. A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_{2g}+$  vale  $-437.313,241$  kcal/mol.

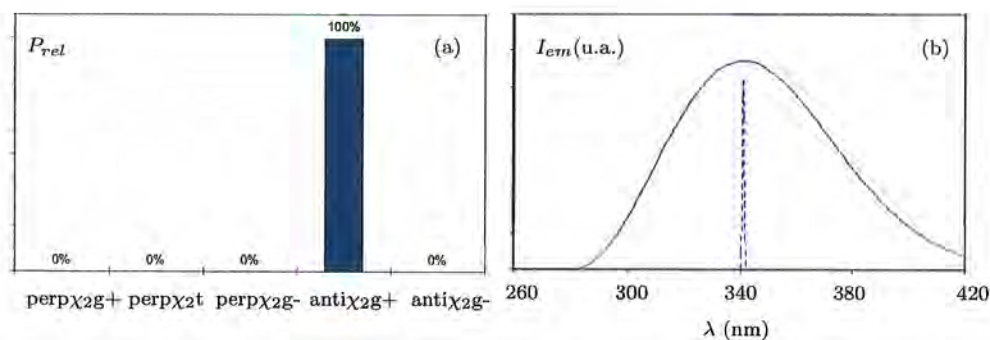


Figura 5.23: Resultados teóricos para o 7-aza-trp na forma zwitteriônica no 1EE: (a) População percentual relativa de Boltzmann, à temperatura de 300K. (b) Espectro teórico de fluorescência de estado estacionário ajustado com a linha da forma dada pela Equação 5.3. Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 342 nm.

Os diagramas com as três maiores barreiras de ativação entre os rotâmeros estáveis no EF podem ser vistos na Figura 5.24. As barreiras entre as conformações  $\text{anti}\chi_{2g+}$  e  $\text{perp}\chi_{2g+}$  são altas ( $> 9,5$  kcal/mol), Figura 5.24a e b, e impedem a interconversão direta entre esses rotâmeros. O mesmo ocorre entre os rotâmeros  $\text{anti}\chi_{2g-}$  e  $\text{perp}\chi_{2g-}$ , Figura 5.24c, com barreira superior à  $6,2$  kcal/mol.

Porém, como ocorre para o 5-OH-trp, existe a possibilidade que a interconversão se realize pela passagem por outros rotâmeros já que as outras barreiras são baixas ( $< 5,0$  kcal/mol). Sendo assim, é possível que a emissão fluorescente provenha de um rotâmero diferente daquele que te nha sido originalmente excitado.

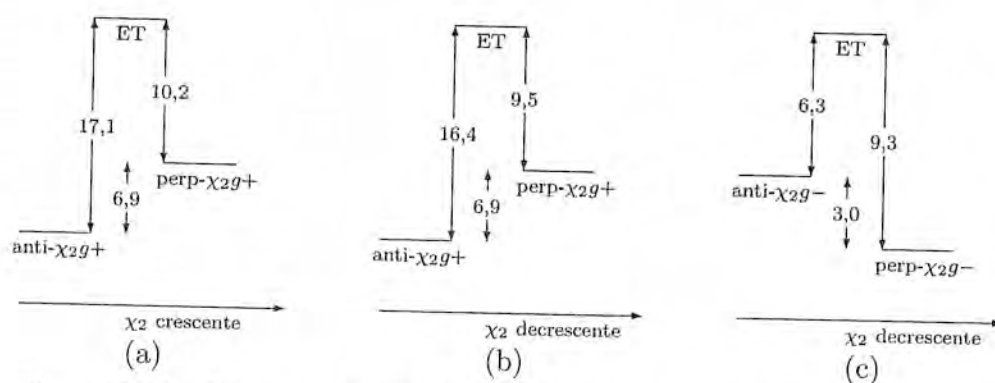


Figura 5.24: Diagramas para as três maiores barreiras de ativação (em kcal/mol) dos ET na SEP do 1EE para o 7-aza-trp na forma zwitteriônica.

Na Tabela 5.16 são apresentados os átomos doadores e aceitadores de elétrons para reações de transferência de cargas no 1EE do 7-aza-trp. As notações utilizadas para os átomos doadores e aceitadores de elétrons podem ser consultadas na Figura 5.25.

Rotâmeros	Átomos Doadores	Átomos Aceitadores
perp- $\chi_{2g}+$	C <sub>6</sub> C <sub>4</sub>	N <sub>2</sub> O <sub>COO-</sub>
perp- $\chi_{2t}$	C <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>
perp- $\chi_{2g}-$	C <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>
anti- $\chi_{2g}+$	C <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>
anti- $\chi_{2g}-$	C <sub>4</sub> C <sub>6</sub>	O <sub>COO-</sub> N <sub>2</sub>

Tabela 5.16: Átomos doadores e aceitadores de elétrons no 1EE para os rotâmeros estáveis do 7-aza-trp obtidos pelo método INDO/S-CIS na forma zwitteriônica.

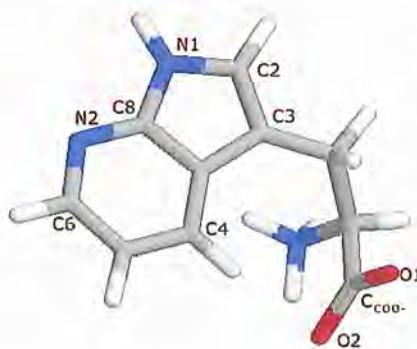


Figura 5.25: Representação gráfica dos átomos doadores e aceitadores de elétrons do 7-aza-trp no 1EE.

**Forma Neutra**

Os resultados obtidos das otimizações de geometria na forma neutro do 7-aza-trp podem ser vistos na Tabela 5.17. O rotâmero mais estável na forma neutra, como no estado zwitteriônico, tem em torno de 16 kcal/mol de energia a menos que o mesmo rotâmero no estado zwitteriônico .

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_{2g}+$	4,34	8,8	377	0,06
perp- $\chi_{2t}$	3,19	5,1	317	0,31
perp- $\chi_{2g}-$	2,86	3,8	316	0,31
anti- $\chi_{2g}+$	0,00	3,9	319	0,31
anti- $\chi_{2g}-$	6,90	8,6	368	0,05

Tabela 5.17: Mesmo da Tabela 5.15 para a forma neutra do 7-aza-trp no 1EE . A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_{2g}+$  vale  $-437.329,200$  kcal/mol.

Na Figura 5.26a, as populações relativas dos vários rotâmeros estáveis no 1EE na forma neutra do 7-aza-trp foram obtidas à temperatura de 300K. Como na forma zwitteriônica, o rotâmero anti- $\chi_{2g}+$  é praticamente o único populado.

O espectro teórico de fluorescência de estado estacionário obtido para a forma neutra do 7-aza-trp é ilustrado na Figura 5.26b. Um significativo deslocamento para o azul (22 nm) é observado na emissão fluorescente no estado neutro em relação ao estado zwitteriônico .

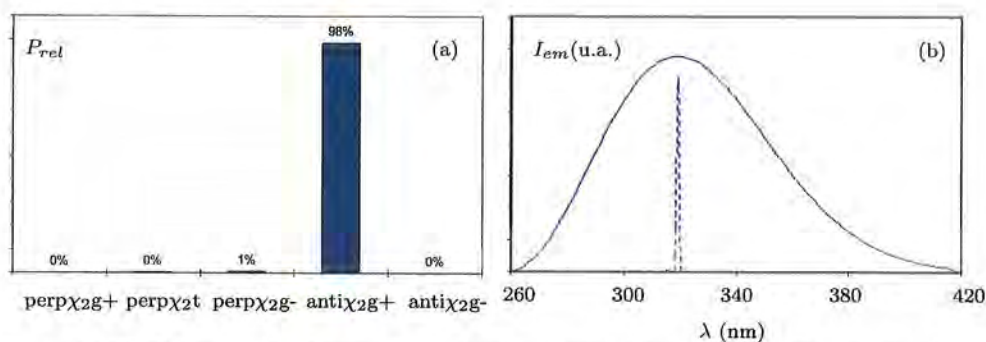


Figura 5.26: Mesmo da Figura 5.11 para o forma neutra do 7-aza-trp no 1EE . Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 320 nm.

### Forma Aniônica

A Tabela 5.18 apresenta os resultados obtidos das otimizações de geometria no 1EE na forma aniônica do 7-aza-trp. As respectivas populações relativas, à temperatura de 300K, podem ser vistas na Figura 5.27a. O rotâmero  $anti\text{-}\chi_{2g+}$  possui população relativa inferior (77%) neste caso do que nos outros estados de protonação, passando a competir com o rotâmero  $perp\text{-}\chi_{2t}$  (22%).

O espectro teórico de emissão fluorescente é ilustrado na Figura 5.27b, deslocado para o vermelho em 10 nm comparado com o espectro obtido na forma zwitteriônica.

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_2g+$	3,01	11,4	335	0,27
perp- $\chi_2t$	0,75	7,3	350	0,26
perp- $\chi_2g-$	4,88	11,7	342	0,27
anti- $\chi_2g+$	0,00	7,0	352	0,27
anti- $\chi_2g-$	4,11	11,6	339	0,26

Tabela 5.18: Mesmo da Tabela 5.15 para a forma aniônica do 7-aza-trp no 1EE. A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_2g+$  vale  $-436.983,355$  kcal/mol.

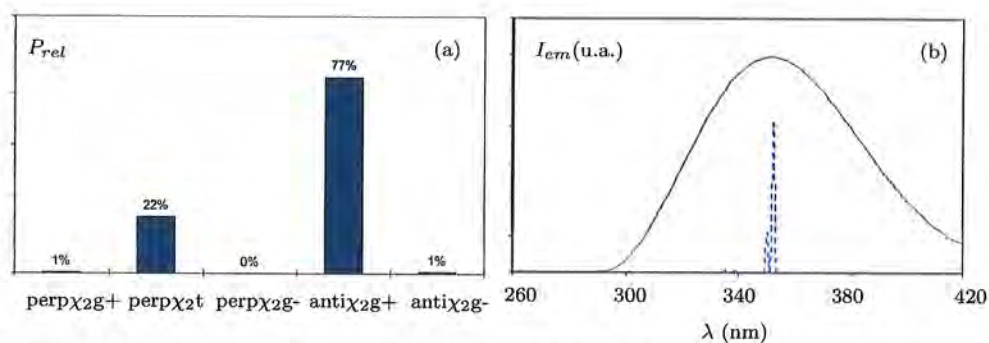


Figura 5.27: Mesmo da Figura 5.11 para o forma aniônica do 7-aza-trp no 1EE. Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 352 nm.



## 5.4 Resultados para o trp

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos no EF e no 1EE para as energias internas, os momentos de dipolo elétrico permanentes, as energias de transição vertical e as respectivas forças do oscilador dos rotâmeros estáveis do trp nas formas zwitteriônica, neutra e aniônica.

As alturas das barreiras entre essas conformações na forma zwitteriônica serão analisadas, além dos espectros teóricos de absorção ótica e de fluorescência de estado estacionário, obtidos a partir das populações relativas desses rotâmeros no EF e no 1EE, respectivamente.

### 5.4.1 Estado Fundamental

#### Forma zwitteriônica

A SEP do EF para o trp obtida por cálculos semi-empíricos apresentou a mesma forma, com cinco rotâmeros estáveis, como obtido para o 5-OH-trp e o 7-aza-trp. Os resultados de otimização de geometria no EF obtidos pelos cálculos *ab initio* são apresentados nas Tabelas 5.19 e 5.20. Os ângulos diedrais para as conformações estáveis no EF do trp obtidas nos cálculos semi-empíricos também são mostrados na Tabela 5.19. Como observado nos resultados teóricos do 5-OH-trp e do 7-aza-trp, a ausência do rotâmero anti- $\chi_2t$  para o trp também se deve à interação ânion- $\pi$  entre o terminal carboxílico e o indol.



Rotâmeros	$\chi_1^{am1}$ ( $^\circ$ )	$\chi_2^{am1}$ ( $^\circ$ )	$\chi_1^{hf}$ ( $^\circ$ )	$\chi_2^{hf}$ ( $^\circ$ )
perp- $\chi_2g+$	23	54	42	78
perp- $\chi_2t$	-142	125	-153	117
perp- $\chi_2g-$	-58	90	-58	94
anti- $\chi_2g+$	52	-100	52	-100
anti- $\chi_2g-$	-34	-45	-55	-67

Tabela 5.19: Resultados obtidos, pelos métodos ab initio e semi-empírico AM1, para os ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  dos rotâmeros estáveis do EF na forma zwitteriônica do trp.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2g+$	2,14	11,6	290	0,01	254	0,16
perp- $\chi_2t$	5,56	8,2	293	0,01	267	0,14
perp- $\chi_2g-$	3,21	12,4	292	0,01	264	0,14
anti- $\chi_2g+$	0,00	8,7	294	0,01	270	0,14
anti- $\chi_2g-$	2,68	12,4	291	0,01	259	0,14

Tabela 5.20: Resultados obtidos após otimização de geometria do EF do trp, na forma zwitteriônica, pelo método ab initio HF/4-31G. Os comprimentos de onda de absorção,  $\lambda$ , e as forças do oscilador,  $f_{osc}$ , foram obtidos pelo método semi-empírico INDO/S-CIS. A energia relativa do EF entre os rotâmeros é representada por  $E_{EF}$ ; enquanto, o momento de dipolo elétrico permanente por  $\mu$ . O rotâmero mais estável, anti- $\chi_2g+$ , apresentou energia igual a -427.426,021 kcal/mol.

A Figura 5.28a ilustra as populações relativas dos rotâmeros estáveis no EF na forma zwitteriônica do trp obtidas à temperatura de 300K. A conformação anti- $\chi_2g+$  é a mais populada com 96%, devido à interação cátion- $\pi$ , enquanto os rotâmeros perp- $\chi_2g+$  e anti- $\chi_2g-$  apresentam baixas populações relativas, 3% e 1%, respectivamente.

Usando resultados da Tabela 5.20, o espectro teórico de absorção ótica do trp na forma zwitteriônica, Figura 5.28b, foi determinado. Como observado no espectro teórico de absorção ótica do 7-aza-trp, apenas uma banda de absorção ocorre nesse espectro (em torno de 270 nm) devido à proximidade energética dos estados  $^1L_a$  e  $^1L_b$ , essa característica é observada experimentalmente (Seção 4.4).

As três maiores barreiras de ativação entre os rotâmeros estáveis no EF na forma zwitteriônica são apresentados através de diagramas na Figura 5.29. As alturas das barreiras para interconversão são altas ( $> 6,6$  kcal/mol). Porém, como obtido para o 5-OH-trp e o 7-aza-trp, as outras barreiras são inferiores a 5,0 kcal/mol. Por exemplo, na interconversão do anti- $\chi_2g-$  para o anti- $\chi_2g+$ , no sentido crescente de  $\chi_1$ , a barreira é baixa ( $\sim 1,9$  kcal/mol). Sendo assim, a interconversão a partir do anti- $\chi_2g-$  para outra conformação estável pode não ser direta, mas deve ocorrer através da passagem por outros rotâmeros onde as barreiras são menores.

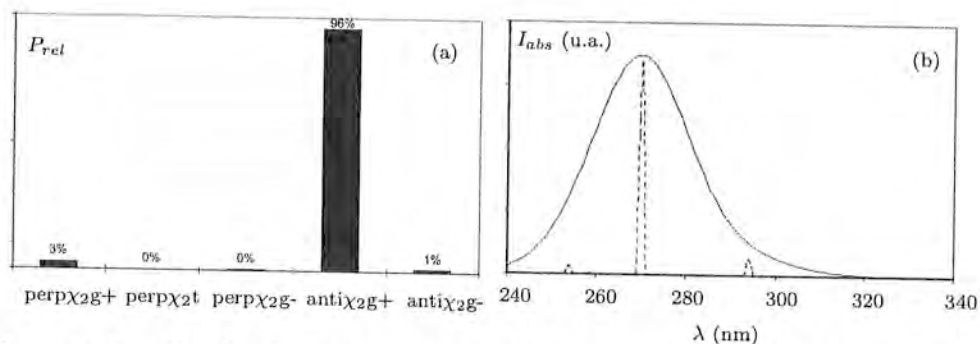


Figura 5.28: Resultados teóricos para o trp na forma zwitteriônica no EF : (a) População percentual relativa de Boltzmann, à temperatura de 300K. (b) Espectro teórico de absorção óptica. As linhas teóricas obtidas diretamente dos cálculos são tracejadas, enquanto as linhas de convolução estão em preto. Neste caso, o máximo de absorção óptica ocorre em 270 nm.

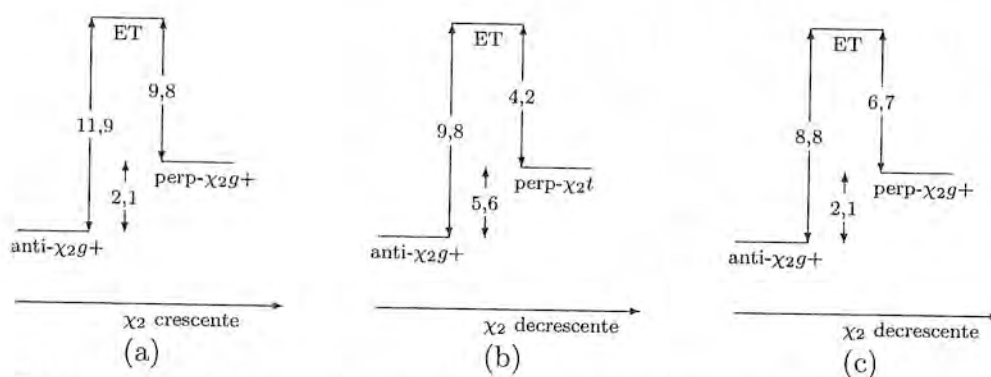


Figura 5.29: Diagramas para as três maiores barreiras de ativação (em kcal/mol) dos ET na SEP do EF para o trp , na forma zwitteriônica . As alturas das barreiras de ativação foram obtidas por cálculos semi-empíricos.

## Forma Neutra

Cálculos de otimização de geometria também foram realizados com a estrutura neutra do trp. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 5.21. O rotâmero mais estável anti- $\chi_2$  g+ possui energia em torno de 18 kcal/mol inferior ao valor obtido para o mesmo rotâmero na forma zwitteriônica. Como realizado para o 5-OH-trp e o 7-aza-trp, as distâncias entre os hidrogênios do terminal amina e o nitrogênio foram fixadas durante as otimizações de geometria na forma zwitteriônica.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2$ g+	1,71	7,6	291	0,01	258	0,15
perp- $\chi_2$ t	3,42	3,9	292	0,01	265	0,13
perp- $\chi_2$ g-	2,33	7,4	292	0,01	262	0,14
anti- $\chi_2$ g+	0,00	4,5	293	0,01	265	0,14
anti- $\chi_2$ g-	1,92	7,8	291	0,01	260	0,13

Tabela 5.21: Mesmo da Tabela 5.20 para a forma neutra do trp no EF. O rotâmero mais estável, anti- $\chi_2$ g+, apresentou energia igual a  $-427.443,783$  kcal/mol.

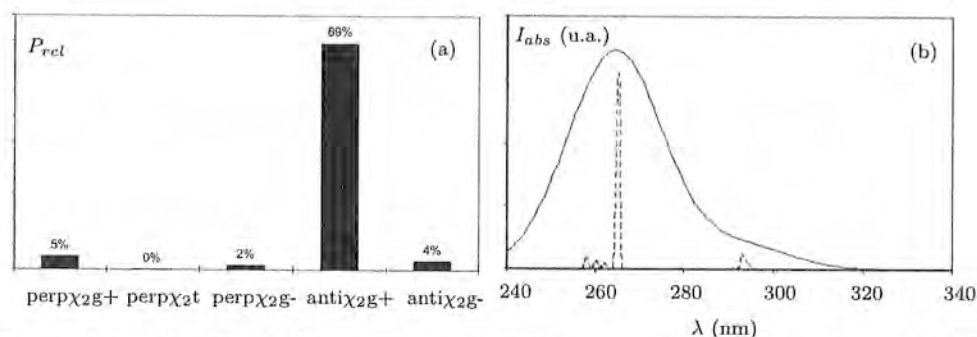


Figura 5.30: Mesmo da Figura 5.28 para o trp na forma neutra no EF. Neste caso, o máximo de absorção óptica ocorre em 265 nm.

Na mudança do estado zwitteriônico para o neutro, equivalente a subtração da interação cátion- $\pi$ , o efeito na população relativa é o mesmo que ocorre para o 7-aza-trp. Ou seja, no estado neutro o rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  tem sua população reduzida em relação ao valor na forma zwitteriônica, enquanto as conformações perp- $\chi_{2g+}$  e anti- $\chi_{2g-}$  têm suas populações aumentadas.

Na Figura 5.30a são apresentadas as populações relativas dos rotâmeros estáveis na forma neutra à temperatura de 300K. O rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  é o mais populado com 89%, bem superior as conformações perp- $\chi_{2g+}$ , perp- $\chi_{2g-}$  e anti- $\chi_{2g-}$  que obtiveram 5%, 2% e 4%, respectivamente.

O espectro teórico de absorção ótica obtido com os resultados da forma neutra é ilustrado na Figura 5.30b. A posição de máxima absorção ótica ocorre no mesmo comprimento de onda encontrado no espectro teórico de absorção do trp no estado zwitteriônico, 265 nm.

### Forma Aniônica

Os resultados obtidos das otimizações de geometria no EF do trp na forma aniônica podem ser vistos na Tabela 5.22. Nesse estado de protonação, o rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  também é o mais populado (74%), como pode ser visto na Figura 5.31a. Além disso, observa-se que a conformação perp- $\chi_{2t}$ , diferente que nos outros estados de protonação, passou a ser populada (16%).

Deslocado para o vermelho em 13 nm em relação aos resultados da forma zwitteriônica, o espectro teórico de absorção ótica na forma aniônica do trp é apresentado na Figura 5.31b.

Rotâmeros	$E_{EF}$ (kcal/mol)	$\mu$ (D)	$\lambda(^1L_b)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_b$ )	$\lambda(^1L_a)$ (nm)	$f_{osc}$ ( $^1L_a$ )
perp- $\chi_2$ g+	1,65	12,6	293	0,01	262	0,10
perp- $\chi_2$ t	0,92	14,1	298	0,01	281	0,10
perp- $\chi_2$ g-	1,66	16,9	296	0,01	274	0,09
anti- $\chi_2$ g+	0,00	12,9	284	0,01	283	0,11
anti- $\chi_2$ g-	3,48	17,9	295	0,01	271	0,09

Tabela 5.22: Mesmo da Tabela 5.20 para a forma aniônica do trp no EF. O rotâmero mais estável, anti- $\chi_2$ g+, apresentou energia igual a  $-427.088,387$  kcal/mol.

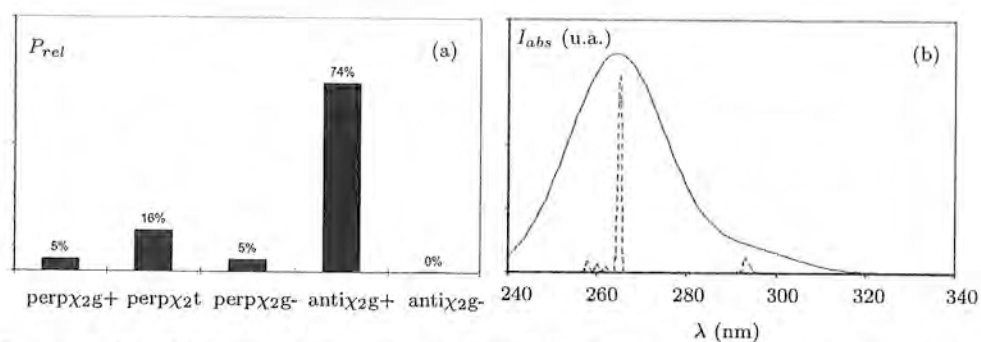


Figura 5.31: Mesmo da Figura 5.28 para o trp na forma aniônica no EF. Neste caso, o máximo de absorção óptica ocorre em 283 nm.

## 5.4.2 Primeiro Estado Excitado

### Forma zwitteriônica

Partindo das geometrias estáveis obtidas para o EF do trp na forma zwitteriônica (Seção 5.4.1), as otimizações de geometria do 1EE na forma zwitteriônica foram realizadas. Os resultados são apresentados na Tabela 5.23. Do mesmo modo que no EF, cinco conformações estáveis foram encontradas, porém apenas o rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  é populado na forma zwitteriônica (100%).

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_{2g+}$	5,76	11,2	307	0,34
perp- $\chi_{2t}$	7,55	6,7	308	0,30
perp- $\chi_{2g-}$	3,43	11,4	310	0,29
anti- $\chi_{2g+}$	0,00	6,1	317	0,26
anti- $\chi_{2g-}$	6,56	11,7	308	0,31

Tabela 5.23: Resultados obtidos após otimização de geometria do 1EE do trp na forma zwitteriônica usando os métodos ab initio HF/4-31G e CIS/4-31G. Somente os comprimentos de onda da transição vertical,  $\lambda$ , foram obtidos pelo método semi-empírico INDO/S-CIS. A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_{2g+}$  vale  $-427.295,106$  kcal/mol.

O espectro teórico de fluorescência de estado estacionário para a forma zwitteriônica do trp é ilustrado na Figura 5.32b. Neste caso, o máximo de emissão fluorescente, pela curva de convolução, ocorre em 317 nm.



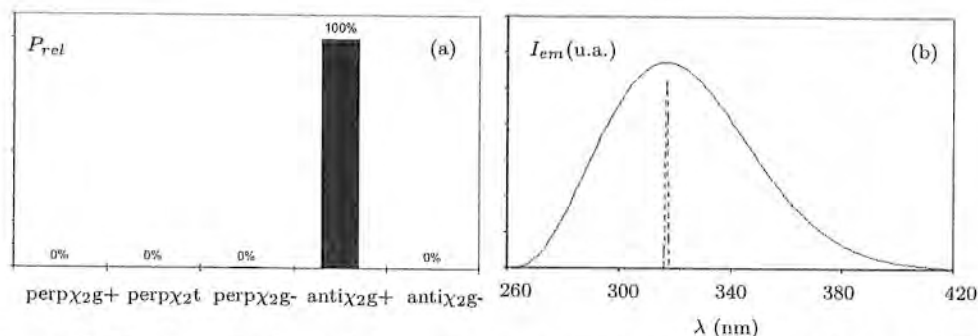


Figura 5.32: Resultados teóricos para o trp na forma zwitteriônica no 1EE : (a) População percentual relativa de Boltzmann, à temperatura de 300K. (b) Espectro teórico de fluorescência de estado estacionário ajustado com a linha da forma dada pela Equação 5.3. Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 317 nm.

Na Figura 5.33 são apresentados diagramas com as três maiores barreiras de ativação entre os rotâmeros estáveis no EF. As barreiras entre as conformações  $\text{anti}\chi_{2g+}$  e  $\text{perp}\chi_{2g+}$  são altas ( $> 9,4$  kcal/mol), Figura 5.33a e b, e impedem a interconversão direta entre esses rotâmeros. O mesmo ocorre entre os rotâmeros  $\text{anti}\chi_{2g-}$  e  $\text{perp}\chi_{2g-}$ , Figura 5.24c, com barreira superior à  $5,3$  kcal/mol.

Porém, como ocorre para o 5-OH-trp e o 7-aza-trp, existe a possibilidade que a interconversão se realize pela passagem por outros rotâmeros já que as outras barreiras são baixas ( $< 5,0$  kcal/mol). Sendo assim, é possível que a emissão fluorescente provenha de um rotâmero diferente daquele que tenha sido originalmente excitado.

Os átomos doadores e aceitadores de elétrons para reações de transferência de cargas no 1EE do trp são mostrados na Tabela 5.24 e na Figura 5.34.

INSTITUTO DE FÍSICA

Serviço de Biblioteca e Informação

Tombo: 3623

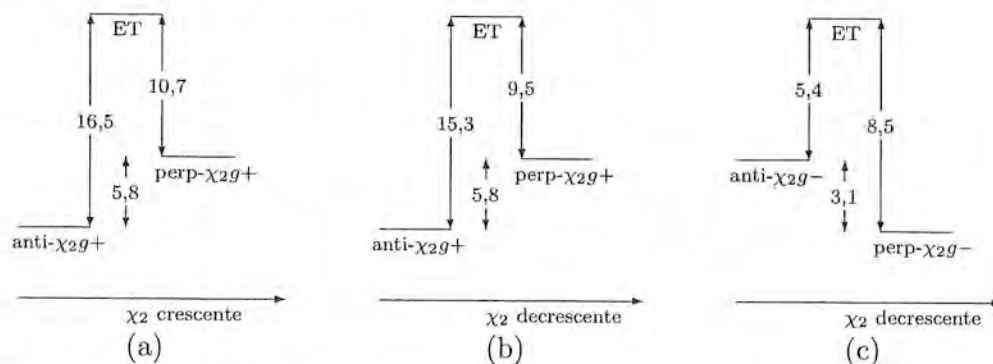


Figura 5.33: Diagramas para as três maiores barreiras de ativação (em kcal/mol) dos ET na SEP do 1EE para o trp na forma zwitteriônica .

Rotâmeros	Átomos Doadores	Átomos Aceitadores
perp- $\chi_{2g+}$	C <sub>4</sub> C <sub>8</sub>	N <sub>1</sub> C <sub>9</sub>
perp- $\chi_{2t}$	C <sub>5</sub> C <sub>8</sub>	C <sub>3</sub> N <sub>1</sub>
perp- $\chi_{2g-}$	C <sub>5</sub> C <sub>8</sub>	C <sub>3</sub> N <sub>1</sub>
anti- $\chi_{2g+}$	C <sub>7</sub> C <sub>5</sub>	C <sub>3</sub> O <sub>COO-</sub>
anti- $\chi_{2g-}$	C <sub>5</sub> C <sub>8</sub>	C <sub>3</sub> N <sub>1</sub>

Tabela 5.24: Átomos doadores e aceitadores de elétrons no 1EE para os rotâmeros estáveis do trp obtidos pelo método INDO/S-CIS de geometria na forma zwitteriônica .



Figura 5.34: Representação gráfica dos átomos doadores e aceitadores de elétrons do trp no 1EE .

### Forma Neutra

Os resultados obtidos das otimizações de geometria na forma neutra do trp podem ser vistos na Tabela 5.25. Neste caso, o rotâmero mais estável é o perp- $\chi_2g^-$  e apresenta energia 13 kcal/mol inferior a do rotâmero mais estável na forma zwitteriônica, anti- $\chi_2g^+$ .

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_2g^+$	1,17	12,4	310	0,32
perp- $\chi_2t$	1,17	9,8	321	0,27
perp- $\chi_2g^-$	0,00	14,9	315	0,30
anti- $\chi_2g^+$	1,17	9,3	323	0,28
anti- $\chi_2g^-$	0,97	16,5	313	0,29

Tabela 5.25: Mesmo da Tabela 5.23 para a forma neutra do trp . A energia do rotâmero mais estável perp- $\chi_2g^-$  vale  $-427.308,378$  kcal/mol.

Na Figura 5.35a, as populações relativas dos vários rotâmeros estáveis no 1EE na forma neutra do trp foram obtidas à temperatura de 300K. Praticamente todos os rotâmeros tiveram população relativa de 9%, enquanto a conformação  $\text{perp-}\chi_{2g}$  obteve 61%.

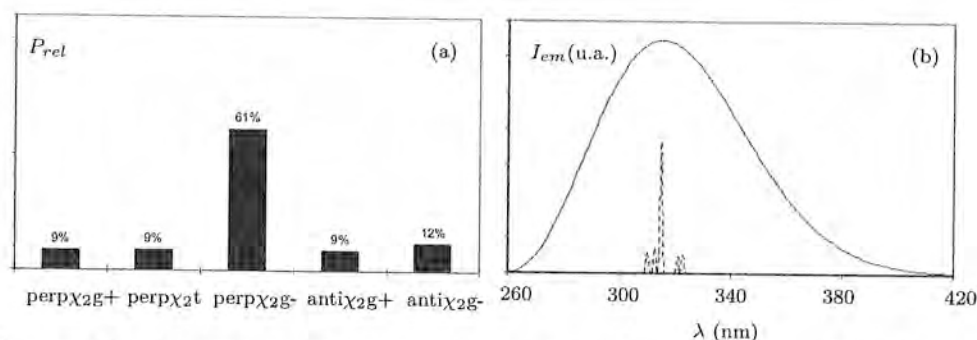


Figura 5.35: Mesmo da Figura 5.11 para o forma neutra do trp . Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 315 nm.

O espectro teórico de fluorescência de estado estacionário obtido para a forma neutra do trp é ilustrado na Figura 5.35b, praticamente com emissão fluorescente semelhante à obtida no estado zwitteriônico .

### Forma Aniônica

A Tabela 5.26 apresenta os resultados obtidos das otimizações de geometria no 1EE na forma aniônica do trp . As populações relativas associadas à temperatura de 300K podem ser vistas na Figura 5.36a. Os rotâmeros  $\text{anti-}\chi_{2g+}$  e  $\text{perp-}\chi_{2t}$  são os únicos populados com 84% e 16%, respectivamente.

O espectro teórico de emissão fluorescente é ilustrado na Figura 5.36b, deslocado para o vermelho em apenas 6 nm comparado com o espectro obtido na forma zwitteriônica .

Rotâmeros	$E_{1EE}$ (kcal/mol)	$\mu^*$ (D)	$\lambda$ (nm)	$f_{osc}$
perp- $\chi_{2g}+$	6,78	12,4	310	0,32
perp- $\chi_{2t}$	0,99	9,8	321	0,27
perp- $\chi_{2g}-$	4,60	14,9	315	0,30
anti- $\chi_{2g}+$	0,00	9,4	323	0,28
anti- $\chi_{2g}-$	6,78	16,5	313	0,29

Tabela 5.26: Mesmo da Tabela 5.23 para a forma aniônica do trp . A energia do rotâmero mais estável anti- $\chi_{2g}+$  vale  $-426.960,144$  kcal/mol.

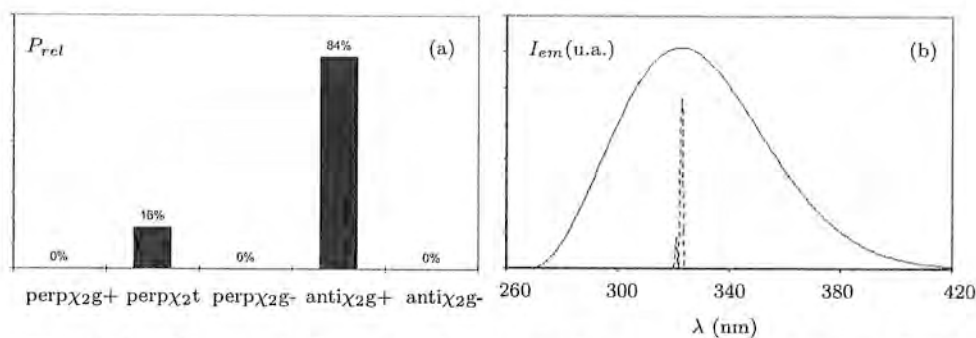


Figura 5.36: Mesmo da Figura 5.11 para o forma aniônica do trp . Neste caso, a emissão máxima de fluorescência ocorre em 323 nm.

## 5.5 Discussão

Nesta seção, os resultados obtidos nos cálculos no vácuo por métodos ab initio e semi-empíricos para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp serão comparados com dados experimentais e resultados teóricos encontrados na literatura.

No EF, a maioria dos resultados para as populações relativas apresentou as conformações *gauche*<sup>+</sup> como sendo a mais estável. Na forma zwitteriônica, a conformação anti- $\chi_2g^+$  é a mais estável para o 5-OH-trp e para o trp. Isso se deve à interação cátion- $\pi$  entre o terminal amina e os elétrons  $\pi$  do anel aromático. Para o 7-aza-trp no estado zwitteriônico, a modificação no anel aromático devido ao substituinte nitrogênio, fez com que o rotâmero perp- $\chi_2g^+$  se tornasse 0,22 kcal/mol mais estável que a conformação anti- $\chi_2g^+$ .

Subtraindo a interação cátion- $\pi$  pela desprotonação do terminal amina, o 7-aza-trp apresenta a conformação anti- $\chi_2g^+$  como a mais estável no estado neutro do EF, com energia apenas 0,27 kcal/mol inferior a da conformação perp- $\chi_2g^+$ . Para o 5-OH-trp e o trp, o efeito da desprotonação foi inverso, ou seja, o rotâmero anti- $\chi_2g^+$  perde população para o perp- $\chi_2g^+$  na forma neutra.

Na forma aniônica no EF, a conformação perp- $\chi_2g^+$  do 5-OH-trp é a mais estável com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$ , enquanto que no estado dianiônico, uma conformação com valores para os diedros  $\chi_1$  e  $\chi_2$  próximos aos do rotâmero perp- $\chi_2g^-$ , denominada neste trabalho por perp- $\chi_2g^-$  **2**, é 1,30 kcal/mol mais estável que o rotâmero anti- $\chi_2g^+$ . Para o 7-aza-trp e o trp, o rotâmero anti- $\chi_2g^+$  é o mais estável na forma aniônica.

Nos resultados para os cálculos no 1EE, o rotâmero anti- $\chi_2g^+$  é o mais estável em todos os estados de protonação para todas as moléculas, com a única exceção para o caso do 5-OH-trp na forma dianiônica, onde a conformação perp- $\chi_2g^-$  é a mais estável. Pode-se observar que a interação cátion- $\pi$  contribui para a maior estabilidade do rotâmero anti- $\chi_2g^+$  na forma zwitteriônica, pois no estado neutro, onde não há interação cátion- $\pi$ , as populações relativas do rotâmero anti- $\chi_2g^+$  diminuem em relação aos valores obtidos no estado zwitteriônico.

A conformação anti- $\chi_2t$  para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp não é estável devido à interação repulsiva ânion- $\pi$  entre o terminal carboxílico e os elétrons  $\pi$  do anel aromático.

Smolyar et al. [60] realizaram com o trp cálculos usando o método HF/3-21G. As conformações foram estudadas em função do ângulo diedral  $\chi_1$  nas formas zwitteriônica, neutra, aniônica e catiônica. No estado aniônico, o rotâmero mais estável apresentou  $\chi_1 \sim 210^\circ$  (conformação *trans*), seguido pelo rotâmero com  $\chi_1 \sim 45^\circ$  (conformação *gauche*<sup>+</sup>). Contrariamente ao observado neste trabalho onde a conformação anti- $\chi_2g^+$  é mais estável que o



rotâmero  $\text{perp-}\chi_2^t$ . Na forma neutra, o rotâmero mais populado apresentou  $\chi_1 \sim 60^\circ$  (conformação *gauche*<sup>+</sup>), da mesma forma que foi obtido neste trabalho. Já na forma zwitteriônica, Smolyar et al. [60] encontraram a conformação *gauche*<sup>-</sup> como sendo a mais estável. Neste trabalho, na conformação *anti*, o rotâmero *gauche*<sup>+</sup> é o mais estável na forma zwitteriônica do EF. Essa diferença deve ser devido às diferenças entre as metodologias utilizadas para obtenção desses resultados.

Experimentalmente, a conformação *gauche*<sup>-</sup> é mais favorável em solução, com a *gauche*<sup>+</sup> 0,5 kcal/mol menos estável e a *trans* com 1 kcal/mol a mais de energia. Contudo, os rotâmeros *gauche*<sup>+</sup> são favoráveis para os resíduos trp em proteínas e peptídeos[16]. Resultados de RMN para o trp em solução foram analisados em termos dos seis rotâmeros encontrados por simulações clássicas e a conformação *gauche*<sup>-</sup> apresentou-se como sendo dominante[50].

Devido à ausência de solvente solvatando os terminais desses aminoácidos com interações de hidrogênio, os diedros  $\chi_1$  e  $\chi_2$  possuem mais liberdade para interconversões entre as várias conformações estáveis no EF e no 1EE.

Além disso, as barreiras de ativação entre os rotâmeros estáveis não representam bloqueios efetivos para as interconversões conformacionais. Gordon et al. [48] obtiveram, utilizando simulações por DM, para as alturas das barreiras de ativação entre as formas *anti-}\chi\_2* e *perp-}\chi\_2* valores entre 3 kcal/mol e 5 kcal/mol, enquanto as barreiras entre as diferentes conformações de  $\chi_1$  são um pouco mais altas, entre 5 kcal/mol e 7 kcal/mol.

Smolyar et al. [60] obtiveram estimativas para as barreiras de ativação no EF do trp em vários estados de protonação. Para isso foi utilizado o método semi-empírico AM1, mas não foram realizadas otimizações de estruturas de ET. Os resultados dessa referência são qualitativamente semelhantes aos obtidos neste trabalho. Ou seja, a interconversão das conformações *gauche*<sup>+</sup> para as *trans* ou *gauche*<sup>-</sup> só ocorrem no sentido decrescente de  $\chi_1$ , onde as alturas das barreiras são menores do que 3 kcal/mol. No sentido oposto, as barreiras apresentam alturas superiores a 7 kcal/mol.

A banda de absorção ótica do 5-OH-trp, obtida experimentalmente, se apresenta deslocada para o vermelho em relação ao espectro de absorção do trp. Esse resultado foi reproduzido teoricamente. Isso se deve à transição para o estado  $^1L_b$  no 5-OH-trp que está deslocada para o vermelho com a força do oscilador quatro vezes superiores aos valores do trp.

Em relação ao trp, experimentalmente o 7-aza-trp possui o máximo de absorção deslocado para o vermelho em 10 nm. Teoricamente, o deslocamento também ocorre para o vermelho em 12 nm, porém a posição dos máximos está deslocada para o azul em relação aos dados experimentais. Este último efeito provavelmente se deve à ausência do solvente nos cálculos computacionais.

Na emissão fluorescente, o deslocamento para o vermelho do máximo no 7-aza-trp em relação ao que é observado para o trp foi reproduzido teoricamente, contudo a posição dos máximos está bastante deslocada para o azul. Novamente, esse deve ser um efeito devido ao fato dos cálculos estarem sendo realizados no vácuo.

Analisando a dispersão das energias de transição vertical obtidas a partir das geometrias otimizadas no 1EE do 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp na forma zwitteriônica, verifica-se que o 7-aza-trp apresenta maior dependência do rotâmetro no comprimento de onda teórico de emissão. Isso pode ser verificado experimentalmente pela largura na banda do espectro de fluorescência de estado estacionário.

Finalmente, os momentos de dipolo elétrico permanentes foram obtidos com a utilização das densidades de partícula única do EF e do 1EE. Porém, como é conhecido, para o 1EE essas densidades fornecem valores imprecisos para os momentos de dipolo elétrico permanente e outras propriedades derivadas do método CIS[64, 65]. Slater et al. [66] obtiveram para cálculos com o método CIS/3-21G para o indol, valores para os dipolos permanentes subestimados em relação aos dados experimentais. Por essa razão, os valores apresentados neste trabalho para os dipolos elétricos servem apenas para comparação com outros dados teóricos.

## Capítulo 6

# Transferência de Elétrons

A fim de estudar o efeito dos substituintes nos análogos do trp em relação a esse aminoácido num dos processos de decaimento não-radiativo que compete com a fluorescência, calculou-se as taxas de transferências de elétrons no IEE. A aproximação *tight-binding* foi utilizada para descrever o movimento de um elétron numa rede representando o sistema: doador, aceitador e os outros átomos que compõem a molécula. Para determinação da amplitude de transição eletrônica entre os sítios doador e aceitador foi utilizado o método de Expansão da Perturbação Renormalizada (EPR)[27, 28].

Para isso, devido à complexidade dos sistemas estudados ao nível dessa teoria, um programa computacional foi planejado e implementado. Isso permitiu realizar diversos cálculos variando os parâmetros da teoria (devido às diferentes moléculas em estudo), inclusive usando distintos sítios doadores e aceitadores de elétrons os quais são dependentes da conformação rotamérica e da molécula em estudo, como apresentados no capítulo anterior.

Sendo assim, neste capítulo será apresentada a base teórica utilizada para o cálculo das taxas junto com a descrição da metodologia empregada na implementação do programa para os respectivos cálculos. Em seguida, baseando-se nas informações acerca das moléculas em estudo obtidas no capítulo anterior, como por exemplo os sítios doadores e aceptadores de elétrons no 1EE, resultados dos cálculos serão apresentados e discutidos em relação aos dados experimentais.

## 6.1 Transferência de Elétrons: Base Teórica

Usando o Princípio de Franck-Condon (FC), a taxa de TE é dada por[23, 28]

$$k_{TE} = \frac{2\pi}{\hbar} |T_{DA}|^2 \mathfrak{F}_{FC}(T) \quad (6.1)$$

onde  $\mathfrak{F}_{FC}$ , o fator de Franck-Condon, diz respeito aos graus de liberdade vibracionais da molécula;  $T$ , a temperatura;  $T_{DA}$ , amplitude de transição eletrônica entre os sítios doador (D) e aceptador (A), numa configuração nuclear fixa.

Considerou-se a expressão clássica de Marcus para o fator de Franck-Condon, na aproximação harmônica, dada por[26, 25]

$$\mathfrak{F}_{FC}(T) = \frac{1}{(4\pi\lambda k_b T)^{1/2}} e^{-E_a/k_b T}, \quad (6.2)$$

onde  $k_b$  é a constante de Boltzmann e  $E_a$  a energia de ativação que pode ser escrita como

$$E_a = \frac{(\Delta G_0 + \lambda)^2}{4\lambda}. \quad (6.3)$$

Nesta expressão,  $\lambda$  é a energia de reorganização da molécula essencialmente devido a mudanças nas distâncias entre os átomos e na solvatação e  $\Delta G_0$  representa a variação de energia livre devido à transferência eletrônica.

Na Figura 6.1 são ilustradas curvas de energia livre com representação da energia de reorganização molecular, a variação de energia livre e o acoplamento eletrônico entre elas. O deslocamento horizontal na curva (na direção da coordenada de reação) reflete a mudança de geometria da molécula e do solvente, enquanto o deslocamento vertical é simplesmente a diferença de energia livre entre os dois estados: doador e aceitador. O sistema se move pela curva do estado doador e, quando atinge o ponto de intersecção, há certa probabilidade que uma transição eletrônica ocorra. A energia de interação eletrônica entre os dois estados nesse ponto é que determina as taxas de transferência de elétrons[23]. A teoria de Marcus[25, 26] é derivada assumindo que o acoplamento eletrônico é muito pequeno (limite não-adiabático).

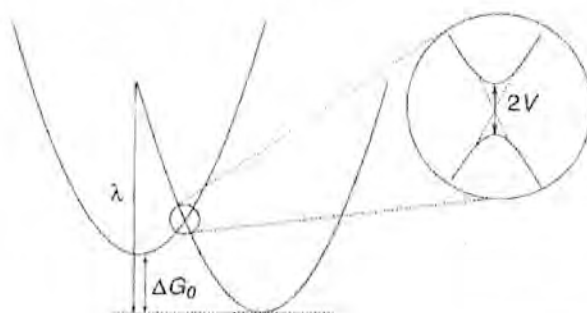


Figura 6.1: Ilustração das curvas de energia livre, entre os estados doador e aceitador de elétrons, em função da coordenada de reação de TE, sendo:  $V$ , acoplamento eletrônico ( $T_{DA}$ );  $\Delta G_0$ , diferença de energia livre; e,  $\lambda$ , energia de reorganização molecular (Fonte: referência [23]).

A parte nuclear da TE é representada pela energia de reorganização molecular. Essa energia é composta por duas partes:  $\lambda_s$  (devido ao solvente) e  $\lambda_i$  (contribuição intramolecular). Quando a transferência de carga numa molécula ocorre num meio apolar, a energia de reorganização interna pode ser estimada pela metade do deslocamento de Stokes[23].

A aproximação *tight-binding*, utilizada para descrever a parte eletrônica referente à TE, consiste em modelar a molécula como uma rede contendo vários poços de potenciais, os quais estariam representando os respectivos orbitais atômicos em cada ponto. Através dessa estrutura, um elétron seria transferido do sítio doador (D) para o sítio aceitador (A) através de “saltos” entre os sítios intermediários.

Para uma rede com  $N$  sítios, a hamiltoniana *tight-binding* possui elementos dados por

$$H_{ij} = \langle i|H|j \rangle \quad (6.4)$$

e pode ser decomposta em  $H = H_0 + H_1$ . A parte  $H_0$  é diagonal

$$(H_0)_{ij} = \langle i|H_0|j \rangle = \epsilon_i \delta_{ij} \quad (6.5)$$

enquanto a parte da interação  $H_1$  possui somente elementos nas posições não-diagonais,

$$(H_1)_{ij} = \langle i|H_1|j \rangle = V_{ij}, \text{ para } i \neq j, \quad (6.6)$$

onde os índices  $i, j$  podem assumir valores  $1, 2, \dots, N$ . Assume-se que o conjunto  $|i\rangle$ , com todos os índices, forma uma base completa.



Os elementos de matriz de  $H_0$  estão relacionados com a energia do orbital atômico não-ocupado de menor energia. Já o elemento  $V_{ij}$  é a energia de troca (ou acoplamento) associada à ligação entre os sítios  $i$  e  $j$ . Para ligações covalentes, costuma-se utilizar[28]

$$V_{ij} = V_{ji} \equiv \beta \simeq -2,5 \text{ eV} \quad (6.7)$$

para qualquer par  $(i, j)$  de átomos quimicamente ligados. Os valores de  $\epsilon_i$  foram normalizados fazendo valer zero para qualquer sítio.

A matriz de transição  $T$  é relacionada com  $H_1$  pela expressão

$$T = H_1 + H_1 G H_1, \quad (6.8)$$

onde  $G_{ij} = \langle i | G | j \rangle = \langle i | (E - H)^{-1} | j \rangle$  é elemento da matriz da função de Green, da correspondente equação de Schrödinger, entre os sítios  $i$  e  $j$ ; e  $E$  é a energia do elétron. Pela aproximação de Marcus,  $E$  está relacionada com os parâmetros que aparecem em  $\mathfrak{S}_{FC}$  por

$$E = V_0^e - \Delta G_0 - \lambda/2, \quad (6.9)$$

onde  $V_0^e$  é o potencial de ionização vertical da molécula quando o elétron está no sítio doador.

O cálculo do acoplamento eletrônico entre os sítios doador e aceitador,  $T_{DA}$ , foi realizado numericamente a partir da expressão proveniente da EPR [28, 27] dada por

$$\langle A|T|D\rangle \equiv T_{DA} = \sum_{ij} \langle A|H_1|i\rangle \langle i|G|j\rangle \langle j|H_1|D\rangle \quad (6.10)$$

onde  $\langle A|H_1|D\rangle = 0$  pois não há interação direta entre os sítios  $D$  e  $A$  e a soma nos índices  $i$  e  $j$  ocorre em todos os sítios ligados (covalentemente) aos sítios  $D$  e  $A$ . Sejam  $I$  e  $F$  os primeiros sítios ligados a  $D$  e  $A$ , respectivamente. Desta forma, usando as equações 6.7 e 6.10, tem-se que

$$T_{DA} = \beta^2 \sum_{I,F} \langle F|G|I\rangle. \quad (6.11)$$

A EPR consiste em expressar cada elemento de matriz da somatória da equação 6.11 com uma somatória sobre todos os caminhos renormalizados que iniciam em  $I$  e terminam em  $F$ , excluindo cálculos de  $G_{nm}$  nos sítios já visitados em cada caminho, ou seja,

$$\langle F|G|I\rangle = \sum G_{II} V_{Ii} G_{ii}[I] V_{ij} G_{jj}[I, i] \cdots V_{rF} G_{FF}[I, i, j, k, \dots], \quad (6.12)$$

onde os símbolos dentro dos colchetes indicam quais os sítios que devem ser excluídos nos cálculos de  $G_{nm}$ . Os elementos diagonais  $G_{nn}$  são dados por

$$G_{nn} = \frac{1}{E - \Delta_n}, \quad (6.13)$$

onde  $\Delta_n$  é a "auto-energia" que renormaliza o sítio  $n$ . Da mesma forma que a equação 6.12,  $\Delta_n$  é expressa por uma somatória num caminho que exclui os sítios já visitados. Neste caso, o caminho começa e termina em  $n$ .

Neste trabalho, apenas um caminho será considerado entre sítios  $D$  e  $A$ , o caminho com menor número de sítios. Desta forma, a somatória da equação 6.12 se resume a um único termo (caminho)

$$\langle F|G|I \rangle = G_{II}V_{Ii}G_{ii}[I]V_{ij}G_{jj}[I, i] \cdots V_{rF}G_{FF}[I, i, j, k, \dots]. \quad (6.14)$$

O uso recursivo das expressões 6.13 e 6.14, num sistema finito, permite obter exatamente os valores para  $\langle F|G|I \rangle$  e, conseqüentemente, para  $T_{DA}$ .

Na seção seguinte, será descrita a metodologia para implementação do programa computacional para os cálculos das taxas de TE.

## 6.2 Programa para cálculo de $k_{TE}$

Um programa computacional foi implementado para o cálculo de taxas de TE,  $k_{TE}$ , usando a teoria apresentada na seção anterior.

Inicialmente, a fim de verificar o correto funcionamento do programa, foram realizados testes do programa com o uso de pseudo-moléculas com poucos sítios ( $< 10$ ) e comparados com soluções analíticas que eram facilmente determinadas.

Em seguida, num estágio posterior de testes, usou-se o programa para reproduzir os mesmos dados obtidos por Goldman et al.[28]. Em todos os testes realizados, o programa reproduziu os resultados dessa referência.

Finalmente, o programa foi utilizado para cálculos das taxas de TE para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp, com informações acerca dos átomos doadores e aceitadores de elétrons obtidos dos cálculos *ab initio* e semi-empíricos no capítulo anterior. Os resultados serão apresentados na seção seguinte.

### 6.3 Resultados para as $k_{TE}$ no 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos para as taxas de transferência de elétrons no 1EE para 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp, na forma zwitteriônica.

Os átomos doadores (D) e aceitadores (A) de elétrons e os potenciais de ionização vertical,  $V_0^e$ , usados nos cálculos das taxas de TE foram obtidos através do uso do método INDO/S-CIS nas geometrias otimizadas no 1EE.

Para obtenção do potencial  $V_0^e$  foi necessário também otimizar a geometria da molécula ionizada positivamente pela subtração de um elétron. Assim, o potencial  $V_0^e$  pode ser obtido, por definição, pela diferença entre a energia da molécula neutra e a energia da molécula ionizada. Neste caso, as energias foram obtidas pelo método semi-empírico AM1. Os resultados podem ser consultados na Tabela 6.1.

Rotâmeros	$V_0^e$ (eV)		
	5-OH-trp	7-aza-trp	trp
perp- $\chi_{2g}+$	-7,635 (-7,666)	-8,449	-7,830
perp- $\chi_{2t}$	-7,542 (-7,584)	-7,724	-7,510
perp- $\chi_{2g}-$	-8,215 (-8,290)	-8,396	-8,151
anti- $\chi_{2g}+$	-7,795 (-7,849)	-8,003	-7,775
anti- $\chi_{2g}-$	-8,098 (-8,141)	-8,836	-8,203

Tabela 6.1: Resultados para os potenciais de ionização,  $V_0^e$ , para cada rotâmero do 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp na forma zwitteriônica. Para o 5-OH-trp, com parênteses estão os resultados obtidos para  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  e sem os parênteses para  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ .

### 6.3.1 Energia de Reorganização Molecular $\lambda$ : Primeira Aproximação

Inicialmente, as taxas de TE foram obtidas com as mesmas energias de reorganização,  $\lambda$ , e variação de energia livre,  $\Delta G_0$ , usadas para o trp por Goldman et al. [28], ou seja, 0,15 eV e -0,53 eV, respectivamente. Os resultados são apresentados nas Tabelas 6.2, 6.3 e 6.4 para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp, respectivamente. Dois cálculos distintos para as taxas de TE foram realizados: considerando apenas um sítio doador e outro aceitador ou dois pares de sítios doador e aceitador e conseqüentemente dois caminhos entre eles, um para cada par.

As médias das taxas de TE ponderadas pelas populações relativas entre os rotâmeros estáveis no 1EE (Capítulo 5) foram calculadas e forneceram os seguintes resultados:  $2,41 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$  e  $9,06 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$  para o 5-OH-trp;  $5,09 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$  e  $1,02 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$  para o 7-aza-trp; e,  $2,25 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$  e  $3,00 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$  para o trp. Os primeiros valores apresentados foram obtidos pela utilização apenas de um par doador-aceitador,

Rotâmeros	$k_{TE}^{(1)} (s^{-1})$	$k_{TE}^{(2)} (s^{-1})$
perp- $\chi_2g+$	$3,93 \times 10^{11}$ ( $3,63 \times 10^{11}$ )	$3,20 \times 10^{12}$ ( $3,03 \times 10^{12}$ )
perp- $\chi_2t$	$3,35 \times 10^{11}$ ( $3,11 \times 10^{11}$ )	$8,08 \times 10^{11}$ ( $7,42 \times 10^{11}$ )
perp- $\chi_2g-$	$1,39 \times 10^{11}$ ( $1,25 \times 10^{11}$ )	$5,15 \times 10^{11}$ ( $4,61 \times 10^{11}$ )
anti- $\chi_2g+$	$2,18 \times 10^{11}$ ( $2,02 \times 10^{11}$ )	$4,45 \times 10^{11}$ ( $4,45 \times 10^{11}$ )
anti- $\chi_2g-$	$8,27 \times 10^{12}$ ( $2,66 \times 10^{13}$ )	$1,17 \times 10^{12}$ ( $1,06 \times 10^{14}$ )

Tabela 6.2: Resultados para as taxas de transferência de elétrons no 1EE,  $k_{TE}$ , do 5-OH-trp na forma zwitteriônica. <sup>(1)</sup> Indica que somente um par de átomos doador e aceitador foram considerados com o menor caminho entre eles representando a trajetória do elétron transferido. <sup>(2)</sup> Levou-se em conta dois pares de átomos (doador e aceitador), com dois caminhos distintos para a trajetória do elétron, sendo os menores caminhos entre cada par de sítios doador e aceitador. As médias ponderadas das taxas de TE neste caso valem: <sup>(1)</sup>  $2,41 \times 10^{11} s^{-1}$  e <sup>(2)</sup>  $9,06 \times 10^{11} s^{-1}$ .

enquanto os segundos valores foram determinados pela utilização de dois pares doador-aceitador.

Desses resultados, pode-se observar que as médias ponderadas das taxas de TE são superiores quando se utilizam dois pares de átomos doador-aceitador ao invés de apenas um par doador-aceitador de elétrons. Além disso, como as taxas de TE obtidas nesta seção estão entre  $\sim 10^{11}$  e  $\sim 10^{13}$ , a fluorescência seria totalmente suprimida pela TE, o que não ocorre experimentalmente.

Rotâmeros	$k_{TE}^{(1)} (s^{-1})$	$k_{TE}^{(2)} (s^{-1})$
perp- $\chi_2g+$	$2,66 \times 10^{13}$	$2,73 \times 10^{13}$
perp- $\chi_2t$	$5,94 \times 10^{12}$	$1,24 \times 10^{13}$
perp- $\chi_2g-$	$4,20 \times 10^{12}$	$8,01 \times 10^{12}$
anti- $\chi_2g+$	$5,09 \times 10^{12}$	$1,02 \times 10^{13}$
anti- $\chi_2g-$	$1,69 \times 10^9$	$2,70 \times 10^{13}$

Tabela 6.3: Mesmo da Tabela 6.2 para o 7-aza-trp na forma zwitteriônica. As médias ponderadas das taxas de TE neste caso valem:  $^{(1)} 5,09 \times 10^{12} s^{-1}$  e  $^{(2)} 1,02 \times 10^{13} s^{-1}$ .

Rotâmeros	$k_{TE}^{(1)} (s^{-1})$	$k_{TE}^{(2)} (s^{-1})$
perp- $\chi_2g+$	$2,59 \times 10^{11}$	$3,21 \times 10^{13}$
perp- $\chi_2t$	$1,54 \times 10^{12}$	$4,10 \times 10^{13}$
perp- $\chi_2g-$	$7,79 \times 10^{11}$	$3,65 \times 10^{13}$
anti- $\chi_2g+$	$2,25 \times 10^{11}$	$3,00 \times 10^{11}$
anti- $\chi_2g-$	$7,42 \times 10^{11}$	$3,62 \times 10^{13}$

Tabela 6.4: Mesmo da Tabela 6.2 para o trp na forma zwitteriônica. As médias ponderadas das taxas de TE neste caso valem:  $^{(1)} 2,25 \times 10^{11} s^{-1}$  e  $^{(2)} 3,00 \times 10^{11} s^{-1}$ .

### 6.3.2 Energia de Reorganização Molecular $\lambda$ : Estimativas

Nesta seção, em função dos dados experimentais obtidos neste trabalho, a energia de reorganização será estimada e as taxas de TE serão determinadas em função da variação de energia livre.

Goldman et al[28] utilizaram a expressão para a energia de reorganização molecular

$$\lambda = 6,2(\lambda_1^{-1} - \lambda_2^{-1}) \times 10^3, \quad (6.15)$$

com resultados fornecidos em eV. Neste caso,  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$  são, respectivamente, os dois comprimentos de onda de emissão associados aos tempos de vida



curto e longo do trp, respectivamente, obtidos pela análise do espectro de decaimento associado (EDA).

Isso se deve ao fato que o processo de TE produz uma perda adicional de energia quando comparado a desexcitação sem a presença da TE. Desta forma, utilizou-se a seguinte hipótese: a espécie com tempo de vida longo,  $\tau^{longo}$ , decai por emissão fluorescente,  $k_F$ , e outros processos não-radiativos sem a TE,  $k_{nr}^*$ ,

$$(\tau^{longo})^{-1} = k_F + k_{nr}^*; \quad (6.16)$$

enquanto que a espécie com tempo de vida curto,  $\tau^{curto}$ , decai por emissão fluorescente, transferência de elétrons e outros processos não-radiativos,  $k_{nr}^*$ , presentes na espécie com tempo de vida longo,

$$(\tau^{curto})^{-1} = k_F + k_{nr}^* + k_{te}. \quad (6.17)$$

Partindo dessa hipótese, utilizando os EDA para o 5-OH-trp e para o 7-aza-trp, apresentados no Capítulo 4, obtêm-se as energias de reorganização molecular 0,055 eV e 0,589 eV, respectivamente. Para o 5-OH-trp, foram utilizados  $\lambda_1 = 335$  nm e  $\lambda_2 = 336$  nm, enquanto que para o 7-aza-trp,  $\lambda_1 = 390$  nm e  $\lambda_2 = 405$  nm. Como o 7-aza-trp possui três tempos de vida, foram considerados os comprimentos de onda associados aos tempos que produzem o menor valor para a energia de reorganização molecular.

Os resultados obtidos para as taxas de TE em função da variação da energia livre, com a energia de reorganização mantida fixa, são apresentados na Figura 6.2. Os valores obtidos para as taxas do 5-OH-trp com  $\delta_{5OH} \sim 180^\circ$  foram similares aos resultados do 5-OH-trp com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$  (Figura 6.2a).

Analisando os resultados obtidos para as taxas de TE para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp, verifica-se que elas dependem da conformação rotamérica. Isso se deve principalmente aos átomos doadores e aceitadores de elétrons no 1EE que variam entre um rotâmero e outro.

Além disso, dos resultados para as taxas de TE apresentados na Figura 6.2, pode-se estimar valores para a variação de energia livre considerando os dados obtidos, na Seção 4.4, para as taxas de decaimento não-radiativo. Desta forma, como  $k_{nr}^{5hw} \sim 2,8 \times 10^8 s^{-1}$ ,  $k_{nr}^{7aw} \sim 1,2 \times 10^9 s^{-1}$  e  $k_{nr}^w \sim 3,1 \times 10^8 s^{-1}$  as variações de energia livre teriam que assumir valores com  $\Delta G_0^{5hw} \leq -0,37$  eV,  $\Delta G_0^{7aw} \leq -1,65$  eV e  $\Delta G_0^w \leq -0,70$  eV para que aja competição entre a fluorescência e o decaimento por TE. Caso contrário, a reação de TE suprimirá a fluorescência.

A variação de energia livre é um parâmetro ajustável na Teoria de Marcus. Deste modo, se por hipótese a reação de TE no 1EE é predominante em relação a outros processos de decaimento não-radiativo, os valores de  $\Delta G_0$ , para que possam reproduzir os rendimentos quânticos observados experimentalmente para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp através das taxas de  $k_{nr}$ , devem ser  $\Delta G_0^{5hw} \sim -0,37$  eV,  $\Delta G_0^{7aw} \sim -1,65$  eV e  $\Delta G_0^w \sim -0,70$  eV. Além disso, esses resultados podem variar de acordo com a conformação rotamética da molécula.

Se outros processos de decaimento não-radiativo, intramolecular ou intermolecular, competem com a TE e a fluorescência, os valores para a variação de energia livre devem ser inferiores aos apresentados no parágrafo anterior.

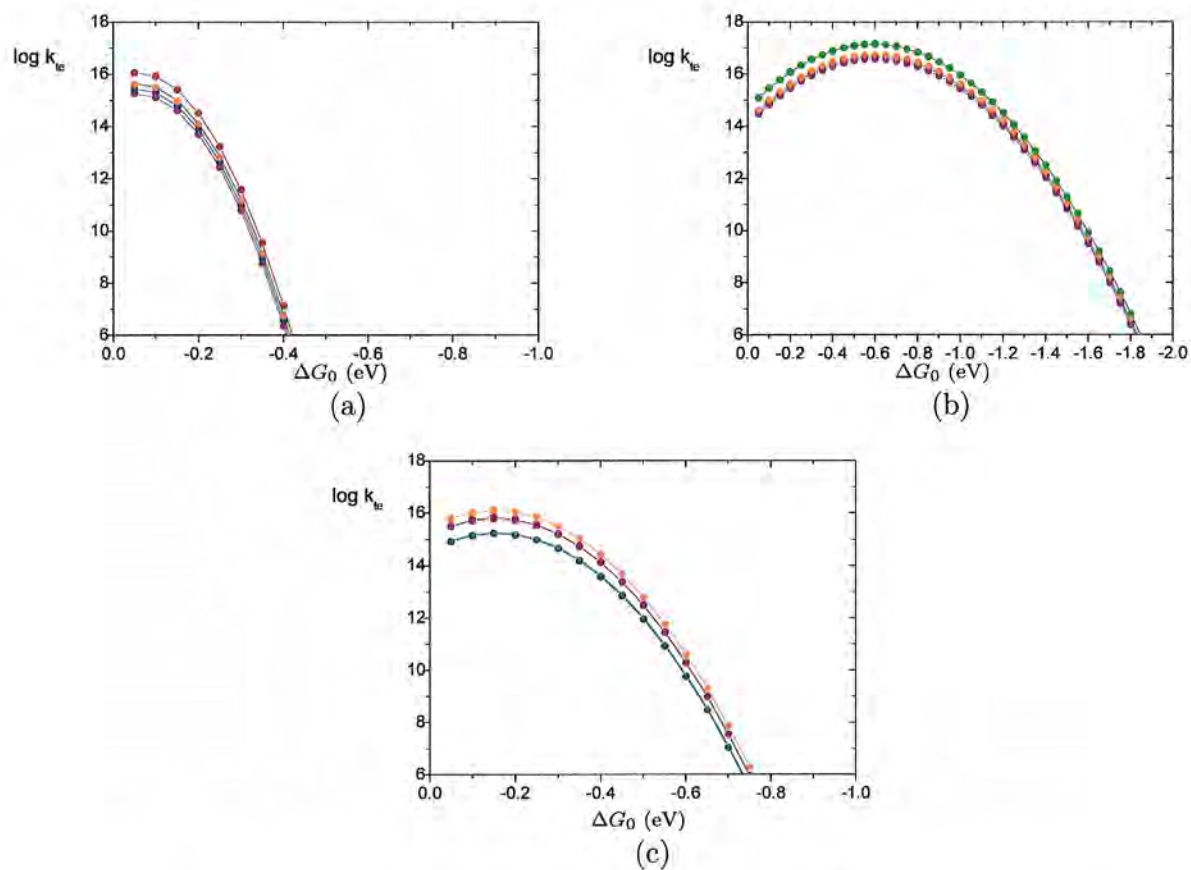


Figura 6.2: Resultados obtidos para as taxas de TE no (a) 5-OH-trp com  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ , (b) 7-aza-trp e (c) trp em função da variação de energia livre para os vários rotâmeros estáveis no 1EE. Neste caso, as energias de reorganização para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp foram mantidas fixas em 0,055 eV, 0,589 eV e 0,15 eV, respectivamente. As diferentes cores representam os vários resultados obtidos para os rotâmeros: anti- $\chi_{2g+}$  (azul escuro), anti- $\chi_{2g-}$  (vermelho escuro), perp- $\chi_{2g+}$  (verde), perp- $\chi_{2g-}$  (lilás) e perp- $\chi_{2t}$  (laranja).

Os resultados apresentados nesta seção poderão ser utilizados como referência em futuros estudos de taxas de TE no IEE ou de variação de energia livre, de modo a comprovar ou ajustar algum parâmetro da teoria ou método utilizadas nesta seção.

## Capítulo 7

# Simulações com o Solvente Explícito

Neste capítulo, a influência do solvente representado explicitamente é investigada sobre vários sistemas contendo 5-OH-trp, por DM usando o método *QM/MM*. Propriedades estruturais da água líquida, bem como sua influência sobre propriedades conformacionais e espectroscópicas dos sistemas simulados são analisadas.

### 7.1 Metodologia

Vários sistemas constituídos por moléculas de água do modelo SPC/E[52, 67] em uma caixa cúbica de lado 25 Å foram preparados junto com um 5-OH-trp, nas diversas conformações estáveis do EF obtidas pelo método *ab initio* (Capítulo 5), conforme ilustrado na Tabela 7.1. A Figura 7.1 ilustra a conformação rotamérica *perp- $\chi_2g^+$*  do soluto 5-OH-trp no sistema soluto-solvente. Todas as simulações foram iniciadas na forma zwitteriônica dos reagentes e com o ângulo diedral  $\delta_{5OH} \sim 0^\circ$ .

Simulação n <sup>o</sup>	Soluto	Conformação inicial rotâmero ( $\chi_1, \chi_2$ ) <sup>a</sup>	Moléculas de água n <sup>o</sup>
1	5-OH-trp	anti- $\chi_2g+$ (53,-98)	450
2	5-OH-trp	anti- $\chi_2g-$ (-53,-66)	448
3	5-OH-trp	perp- $\chi_2g+$ (42,80)	450
4	5-OH-trp	perp- $\chi_2g-$ (-61,92)	448
5	5-OH-trp	perp- $\chi_2t$ (-153,114)	450

Tabela 7.1: Simulações realizadas em sistemas soluto-solvente à temperatura de 300K. O modelo SPC/E foi usado para a água. <sup>a</sup> Os ângulos são dados em graus.

As simulações desses sistemas foram realizadas com o programa THOR híbrido (Seção 3.2), sendo as moléculas de água tratadas classicamente, enquanto os átomos do soluto, quanticamente. Cada sistema foi gerado pela inserção do soluto numa caixa cúbica com as posições das moléculas de águas obtidas aleatoriamente. As moléculas de água que tinham seu oxigênio a uma distância inferior a 4 Å de qualquer átomo do soluto eram eliminadas. O número total de moléculas e a dimensão da caixa estão relacionados entre si pela densidade do sistema.

Inicialmente, a geometria de cada sistema foi relaxada pela otimização de geometria com o uso alternado dos métodos *steepest descent*[15] e dos gradientes conjugados[34]. Isso se deve às diferentes vantagens desses métodos: quando a configuração do sistema está distante de um mínimo de energia, o método *steepest descent* se mostra poderoso; mas, quando a geometria do sistema já está próxima a um mínimo de energia, o método dos gradientes conjugados é mais eficiente.



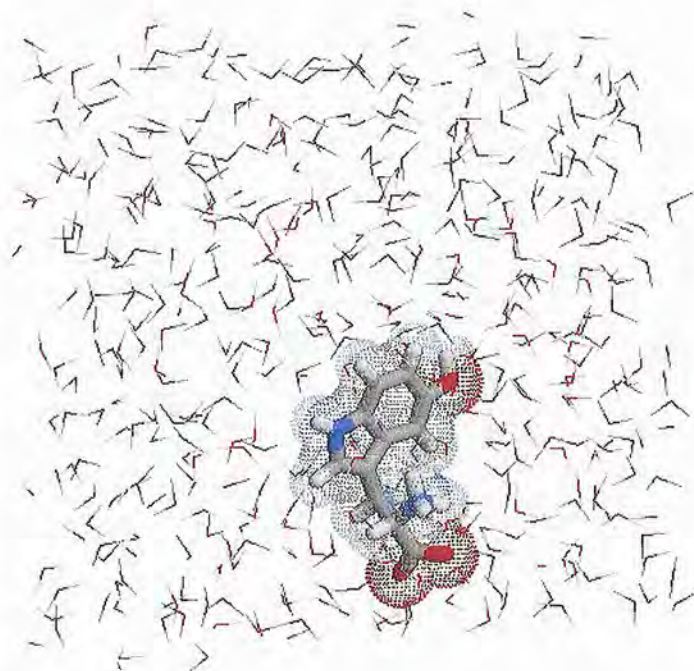


Figura 7.1: Representação gráfica do 5-OH-trp rodeado por moléculas de água numa caixa cúbica de 25 Å de lado, sem as condições de contorno periódicas.

Em seguida, foram definidos valores nulos para as velocidades atômicas iniciais e a DM inicia-se com a termalização do sistema a 300K em 1 ps realizado com 1.000 passos de dinâmica. Mantendo essa temperatura por reescalonamento das velocidades, a dinâmica prosseguiu por 10 ps com tempo entre os passos de 0,1 fs. Em seguida, o sistema foi acoplado a um banho térmico (reescalonamento de velocidades mais suave[34]) com tempo de relaxamento característico  $\tau = 0,1$ ps. O tempo de dinâmica para equilibração variou de um sistema para outro.



Após a equilibrção, o sistema continuou acoplado ao banho térmico com mesmo tempo de relaxamento e a dinâmica prosseguiu até que um tempo total de 1500 ps de dinâmica fosse completado, com tempo de integração de 1 fs.

As configurações do sistema durante a dinâmica foram armazenadas a cada 0,2 ps. A partir desses dados, os comprimentos de onda de máxima absorção e os ângulos diedrais  $\chi_1$ ,  $\chi_2$  e  $\delta_{5OH}$  foram determinados em função do tempo de dinâmica, enquanto que as primeiras camadas de solvatação da água em torno dos solutos foram analisadas.

As interações intramoleculares nas moléculas de água foram representadas por potenciais pseudo-rígidos, enquanto que as interações intermoleculares entre os átomos das moléculas de água, pelos potenciais de Coloumb e de Lennard-Jones.

Nas seções seguintes, serão descritas as metodologias usadas para obter propriedades estruturais e espectroscópicas das simulações por DM.

### 7.1.1 Funções de Distribuição Radial entre Pares

A função de distribuição radial de pares fornece a probabilidade de encontrar um par de átomos a uma certa distância, relativa à probabilidade esperada para um sistema de mesma densidade, com distribuição totalmente aleatória. Ela pode ser obtida experimentalmente por difração de raio-x, nêutrons e elétrons[68, 69, 70, 71, 72, 73].

Num solvente, a região sob o primeiro pico é chamada de primeira camada de solvatação; enquanto que o pico seguinte, segunda camada de solvatação e assim por diante. Os efeitos de curto alcance, como as ligações de hidrogênio, são analisados tomando a primeira camada de solvatação; enquanto os efeitos de longo alcance, são analisados a partir das camadas de solvatação posteriores.

A expressão para a função de distribuição radial de pares do átomo  $j$  em torno do átomo  $i$ ,  $g_{ij}(r)$ , pode ser dada por [34]:

$$g_{ij}(r) = \frac{\rho_{ij}(r)}{\rho_j^0}, \quad (7.1)$$

onde  $r$  é a distância entre os átomos;  $\rho_{ij}$  é a densidade média de átomos do tipo  $j$  a uma distância  $r$  e  $r + dr$  de átomos do tipo  $i$  e  $\rho_j^0$  é a densidade média de átomos do tipo  $j$  no sistema.

Integrando a função  $g(r)$  (Equação 7.1) num intervalo entre  $r_1$  e  $r_2$ , obtem-se o denominado número de coordenação, ou seja, o número médio de átomos do tipo  $j$  ao redor de átomos do tipo  $i$  a uma distância entre  $r_1$  e  $r_2$ :

$$N_{ij} = 4\pi\rho_j^0 \int_{r_2}^{r_1} g_{ij}(r)r^2 dr. \quad (7.2)$$

Usando as coordenadas cartesianas do sistema soluto-solvente armazenadas a cada 0,2 ps de DM, pode-se determinar as funções de distribuição radial de pares para vários grupos de átomos e, também, obter os números de coordenação associados a essas distribuições.

### 7.1.2 Espectros Teóricos de Absorção Ótica

A partir das configurações dos sistemas simulados obtidas na fase de equilíbrio das DM, armazenadas a cada 1 fs, realizou-se cálculos das energias de transição vertical e das forças do oscilador em função do tempo de simulação.

A intensidade de absorção para uma dada energia de transição vertical foi obtida pela soma das respectivas  $f_{osc}$  provenientes dos cálculos INDO/S-CIS, usando as diversas configurações do sistema armazenadas em disco a cada 200 fs de DM. Deste modo, os espectros teóricos de absorção ótica foram determinados para cada simulação. Além disso, a fim de filtrar as altas frequências obtidas dos espectros, cálculos de médias de 15 intensidades de absorção sucessivas no comprimento de onda associado foram realizados.

### 7.1.3 Ângulos Diedrais

A fim de estudar quais conformações rotaméricas são visitadas durante as simulações, os ângulos diedrais  $\chi_1$ ,  $\chi_2$  e  $\delta_{5OH}$  foram monitorados em função do tempo de simulação.

### 7.1.4 Populações Relativas

Para determinação das populações relativas dos rotâmeros durante as DM, realizou-se contagens das visitas das geometrias aos intervalos dos ângulos diedrais de cada rotâmero. Para isso, usou-se, como referência, as posições desses ângulos encontradas nos cálculos *ab initio* (Capítulo 5) num intervalo com desvio  $\pm 12^\circ$ .

Nas seções seguintes serão apresentados e discutidos os resultados obtidos pelas DM para o 5-OH-trp ao mesmo tempo em que serão comparados com os dados experimentais.

## 7.2 Resultados para o 5-OH-trp

Nesta seção, os resultados obtidos das DM para os sistemas contendo 5-OH-trp serão apresentados e comparados com os dados obtidos no vácuo, pelos métodos *ab initio* e semi-empíricos, vistos no Capítulo 5, ou provenientes de medidas experimentais desse trabalho ou encontrados na literatura.

Propriedades estruturais das moléculas de água em torno do soluto e entre elas serão discutidas com base nas funções  $g(r)$ .

### 7.2.1 Propriedades Energéticas

As energias potencial, cinética e total e a temperatura dos sistemas foram acompanhadas durante a simulação. Os resultados obtidos para o sistema iniciado na conformação anti- $\chi_2g+$  do 5-OH-trp podem ser vistos na Figura 7.2. Os resultados representam apenas a fase em que o sistema estava equilibrado. Os outros quatro sistemas contendo o 5-OH-trp apresentaram resultados semelhantes.

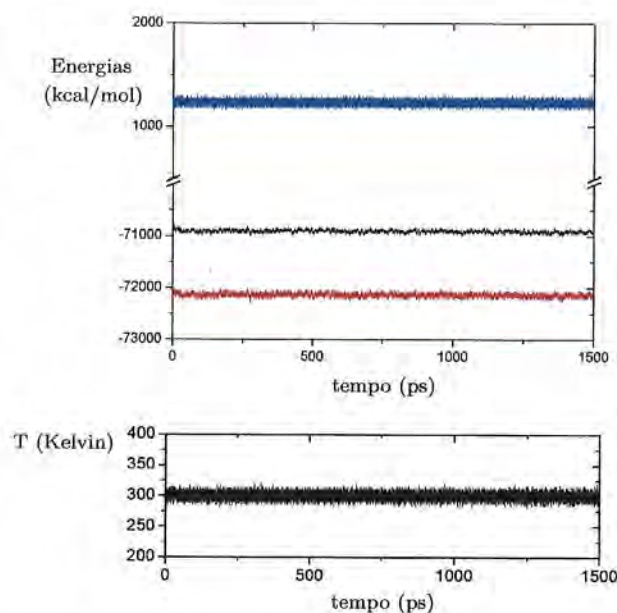


Figura 7.2: Acompanhamento temporal da temperatura e das energias potencial (em vermelho escuro), cinética (em azul escuro) e total (em preto) durante a simulação do 5-OH-trp que iniciou na conformação do rotâmero anti- $\chi_2g+$ .

## 7.2.2 Função de Distribuição Radial de Pares

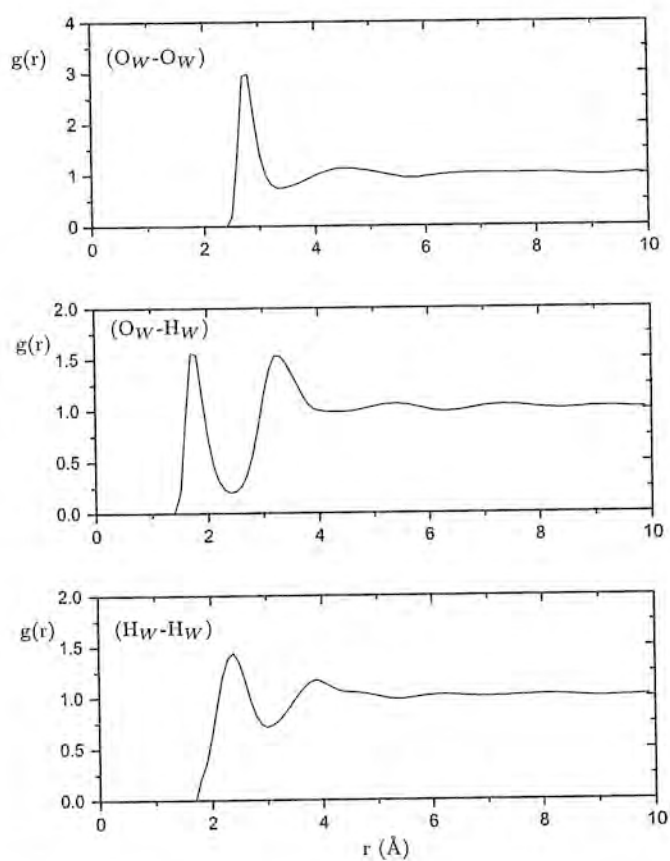


Figura 7.3: Funções de distribuição radial de pares para moléculas de água no sistema contendo 5-OH-trp .

Na Figura 7.3, têm-se as funções de distribuição radial para a água,  $g_{OW-OW}$ ,  $g_{OW-HW}$  e  $g_{HW-HW}$ , num sistema contendo o 5-OH-trp . Em todos os sistemas estudados, as funções analisadas apresentaram comportamento similar.

Todos os valores calculados para a função distribuição radial  $g_{OW-OW}$  têm o primeiro pico em 2,8 Å, de acordo com o que são estimados experimentalmente por difração de nêutrons e raios-X (2,85) [69, 70]. O número de coordenação para o intervalo entre 0 e 3,5 Å obtido é 4,36; enquanto, o valor experimental para um sistema composto de água e sem o soluto é 5,0[34]. Essa diferença se deve, provavelmente, à presença do soluto no sistema simulado e às propriedades do modelo SPC/E usado para a água.

Para a função  $g_{OW-HW}$ , dois picos se destacam: um, em torno de  $r_{OW-HW} = 1,7$  Å; o outro, em torno de 3,3 Å, sendo os dois picos praticamente do mesmo tamanho. Realizando integrações do primeiro pico até 2,4 Å, obtêm-se um número médio de pontes de hidrogênio por molécula de água igual a 1,83. Resultados obtidos por DM clássica em sistemas contendo somente água, obtêm-se 1,99 com os picos em  $r_{OW-HW} = 1,79$  e 3,29 Å, onde o segundo é um pouco maior que o primeiro pico[34].

Para a função  $g_{HW-HW}$ , também pode-se observar dois picos: um, em torno de  $r_{OW-HW} = 2,4$  Å e o outro, em torno de 3,9 Å, sendo o segundo menor que o primeiro em tamanho e com alturas e posições próximas aos resultados obtidos por simulações clássicas[74].



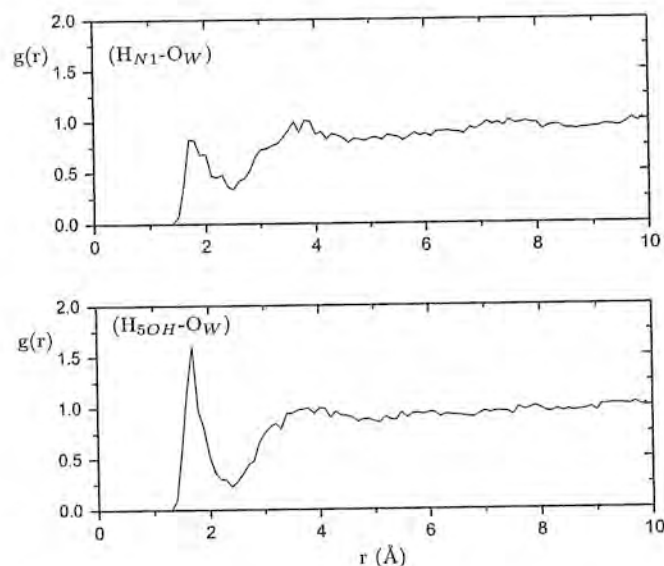


Figura 7.4: Função de distribuição radial de pares para moléculas de água em torno do soluto 5-OH-trp.

As funções de distribuições radial entre hidrogênio do anel aromático ligado ou ao nitrogênio ( $N_1$ ) ou ao oxigênio ( $O_3$ ) em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água são apresentadas na Figura 7.4. Pode-se observar que o primeiro pico nas duas funções está em torno de 1,7 Å. Realizando integrações do primeiro pico até 2,5 Å, obtêm-se um número médio de pontes de hidrogênio igual a 0,81 (entre oxigênio da água e o hidrogênio ligado ao nitrogênio no anel aromático) e 0,90 (entre oxigênio da água e o hidrogênio da hidroxila), respectivamente.

Na Figura 7.5 são apresentadas as funções  $g(r)$ , com o soluto 5-OH-trp, para moléculas de água ao redor dos átomos de carbono do anel aromático, em torno dos hidrogênios do terminal amina e ao redor dos oxigênios do terminal carboxila.

A função  $g_{C-O_W}(r)$  mostra uma distribuição larga com pico em 3,7 Å, semelhante aos resultados obtidos por dinâmica molecular clássica[34]. Para a função  $g_{H_T-O_W}(r)$ , dois picos podem ser observados em 2,2 Å e 3,3 Å, com o primeiro pico menor que o segundo. O resultado para o segundo pico está de acordo com simulações clássicas, enquanto o primeiro pico está bastante afastado do soluto e tem seu tamanho subestimado[34]. Finalmente, a função de distribuição radial  $g_{O_T-H_W}(r)$  apresenta apenas um pico em torno de 2,6 Å, também afastado do soluto, além de ter sua altura subestimada. Um segundo pico aparece fracamente em torno de 3,8 Å, enquanto em resultados clássicos ele está em 3,3 Å[34].

### 7.2.3 Populações Relativas e Espectros de Absorção Ótica

Nesta seção, serão apresentadas e analisadas as populações relativas dos rotâmeros no EF e os espectros de absorção ótica obtidos nos vários sistemas simulados por DM.

Na Figura 7.6a, pode-se observar o comportamento dos ângulos diedrais  $\chi_1$  (vermelho) e  $\chi_2$  (preto) durante a DM iniciada no rotâmero anti- $\chi_2g+$ . A partir desses resultados foram obtidas as populações relativas dos rotâmeros visitados durante a simulação, Figura 7.8a. Neste caso, o rotâmero perp- $\chi_2g-$  é visitado em 98% do tempo de DM, enquanto a conformação perp- $\chi_2g+$ , em 2% do tempo.

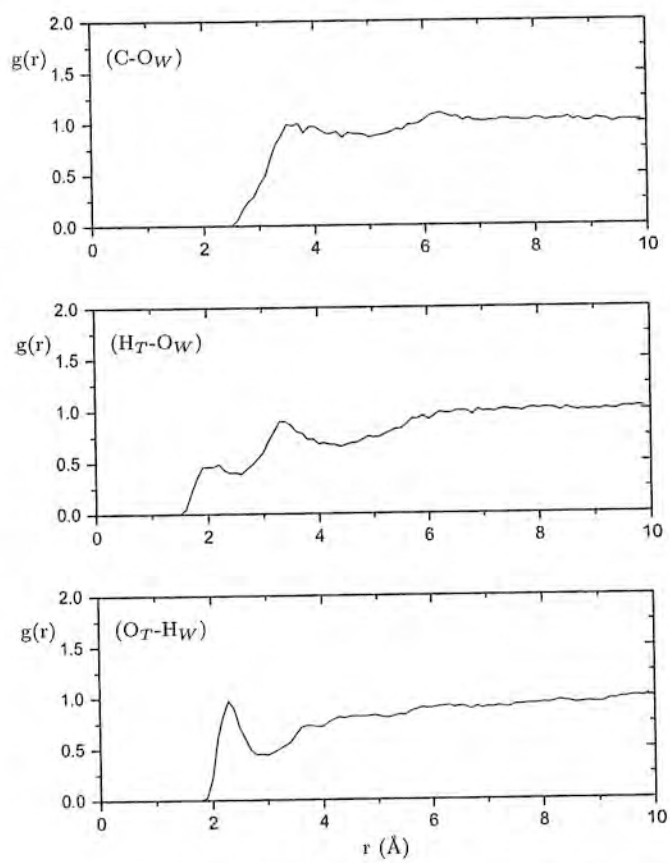


Figura 7.5: Mesmo da Figura 7.4.

Estão ilustrados na Figura 7.6b os valores assumidos pelo ângulo diedral  $\delta_{5OH}$  em função do tempo da simulação iniciada na conformação anti- $\chi_2g+$ . Analisando esses resultados, verifica-se que o ângulo  $\delta_{5OH}$  permaneceu 96% do tempo de DM próximo a  $0^\circ$ , enquanto que em 4% do tempo, esteve em torno de  $180^\circ$ . As outras quatro simulações apresentaram resultados semelhantes. Nos resultados teóricos obtidos pelo método ab initio, no EF e no 1EE, o 5-OH-trp na forma zwitteriônica também é significativamente mais populado quando o ângulo  $\delta_{5OH}$  está  $\sim 0^\circ$  (Figuras 5.4a e 5.11a).

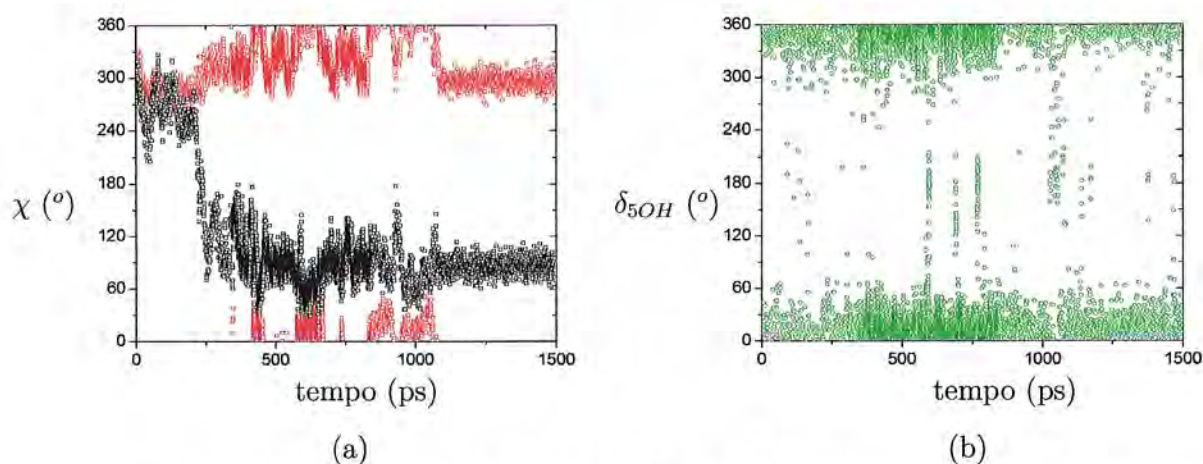


Figura 7.6: Resultados obtidos em 1500 ps de DM com o 5-OH-trp tendo conformação inicial o rotâmero anti- $\chi_2g+$ : (a) Ângulos diedrais  $\chi_1$  (em vermelho) e  $\chi_2$  (em preto) em função do tempo de simulação; (b) Ângulo diedral  $\delta_{5OH}$  em função do tempo de simulação.

As populações relativas das conformações rotaméricas do 5-OH-trp visitadas durante as simulações por DM são apresentadas na Figura 7.8. Pode-se observar que os resultados apresentam duas tendências: ou o rotâmero perp- $\chi_2g^-$  (Figura 7.7a) é praticamente o único populado, Figura 7.8a, c e d; ou somente o rotâmero anti- $\chi_2g^-$  (Figura 7.7b) é populado, Figura 7.8b e e. Ou seja, duas famílias de rotâmeros existem no EF com barreiras de potenciais impedindo a interconversão entre essas famílias.

A Figura 7.9 ilustra as posições assumidas pelos ângulos  $\chi_1$  e  $\chi_2$ , nas simulações dos vários sistemas, sobre a SEP do EF obtida pelo método semiempírico AM1 no Capítulo 5 (Figura 5.2). Pode-se observar claramente nesses gráficos que os ângulos  $\chi_1$  e  $\chi_2$  visitados durante as DM estão nas regiões limitadas pelas altas barreiras de potencial da SEP obtidas pela hamiltoniana AM1.

Na conformação anti- $\chi_2g^-$  (Figura 7.7b), duas moléculas de água se estabelecem por pontes de hidrogênio entre o terminal carboxílico e a hidroxila do anel aromático, restringindo desta forma a rotação na ligação  $C_\alpha-C_\beta$  ( $\chi_1$ ). Essa pode ser a razão pela qual a conformação anti- $\chi_2g^+$ , a mais estável nos cálculos no vácuo, não é visitada durante as simulações por DM.

Como mencionado na Seção 5.5 para o trp, a conformação *gauche*<sup>-</sup> é mais favorável em solução, com a *gauche*<sup>+</sup> sendo 0,5 kcal/mol menos estável[16]. Resultados de RMN para o trp em solução foram analisados em termos dos seis rotâmeros encontrados por mecânica molecular e a conformação *gauche*<sup>-</sup> apresentou-se como sendo dominante.[50]. Desta forma, os resultados obtidos das simulações do 5-OH-trp pelo método *QM/MM* estão de acordo com esses dados experimentais.

A existência populacional dessas três conformações rotaméricas no EF, *perp-χ<sub>2g</sub>*<sup>-</sup>, *perp-χ<sub>2g</sub>*<sup>+</sup> e *anti-χ<sub>2g</sub>*<sup>-</sup>, originaria o decaimento tri-exponencial observado experimentalmente. Os diferentes tempos de vida seriam devido à diferentes taxas de TE intramolecular.

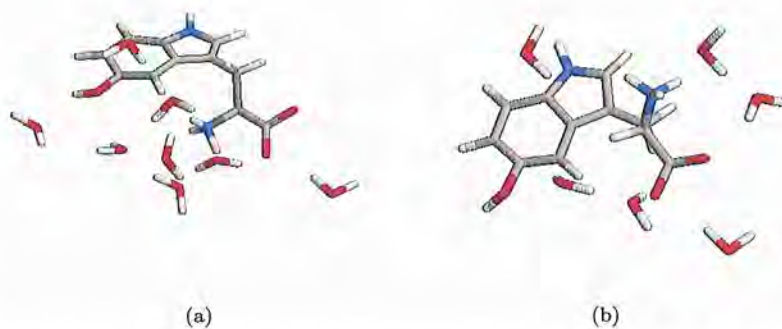


Figura 7.7: Representações gráficas dos rotâmeros (a) *perp-χ<sub>2g</sub>*<sup>-</sup> e (b) *anti-χ<sub>2g</sub>*<sup>-</sup> obtidas durante as simulações por DM na presença de moléculas de água.



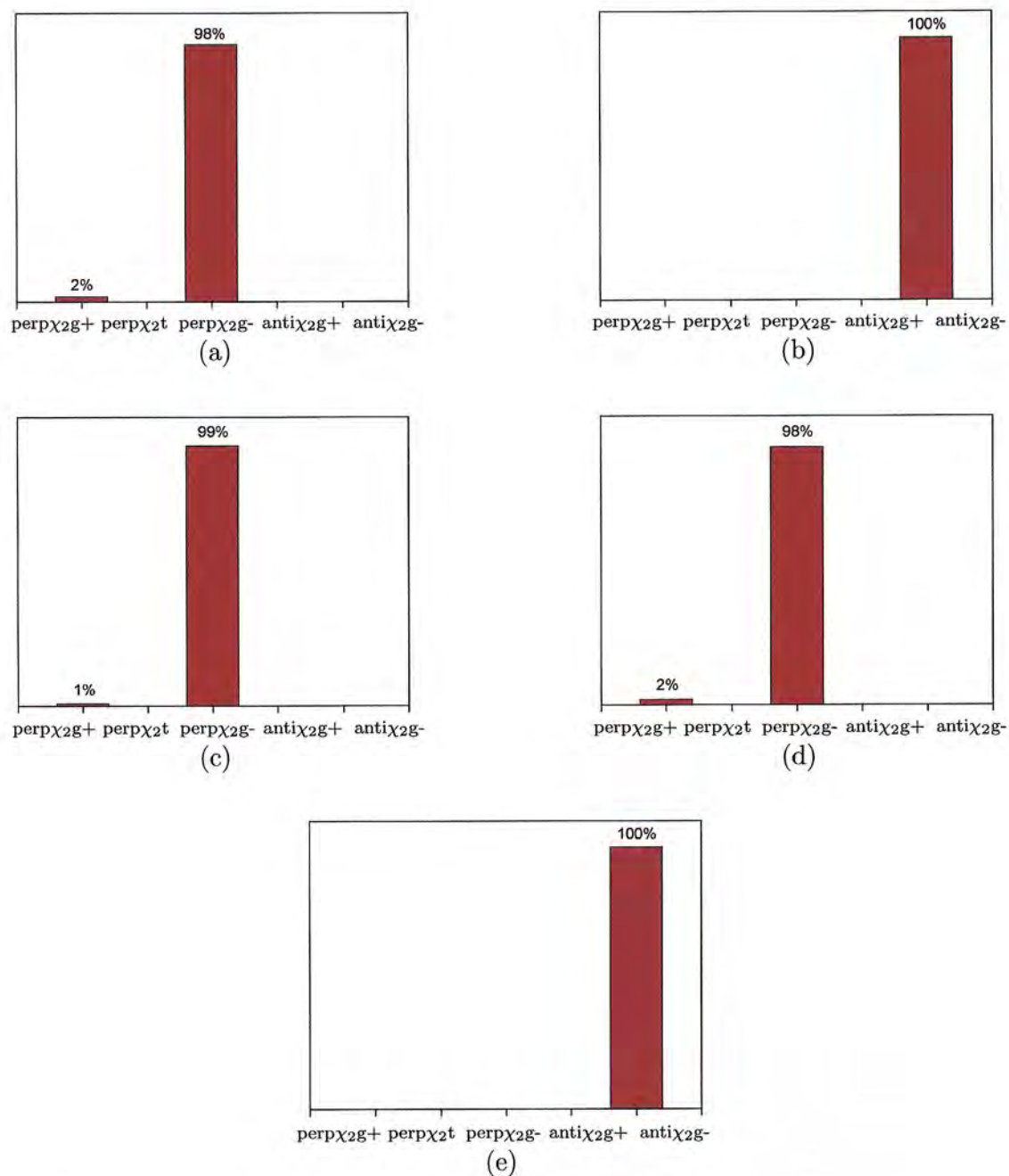


Figura 7.8: Populações percentuais relativas obtidas em 1500 ps de simulação por DM em sistemas equilibrados à 300K tendo conformações iniciais: (a) anti- $\chi$ <sub>2g+</sub>; (b) anti- $\chi$ <sub>2g-</sub>; (c) perp- $\chi$ <sub>2g+</sub>; (d) perp- $\chi$ <sub>2g-</sub>; (e) perp- $\chi$ <sub>2t</sub>.



Os espectros teóricos de absorção ótica foram obtidos a partir dos resultados obtidos de duas simulações que visitaram regiões distintas na SEP do EF. Neste caso, os sistemas usados foram os iniciados nos rotâmeros perp- $\chi_{2g}$ - e anti- $\chi_{2g}$ -. A Figura 7.10 ilustra os espectros teóricos obtidos.

Duas bandas de absorção podem ser observadas nos espectros teóricos obtidos das simulações: uma banda com máximo de absorção em torno de 280 nm, enquanto a outra, próxima de 318 nm. A primeira banda teórica está de acordo com resultado experimental, 276 nm, mas a segunda banda está deslocada para o vermelho em 22 nm e possui intensidade de absorção subestimada.

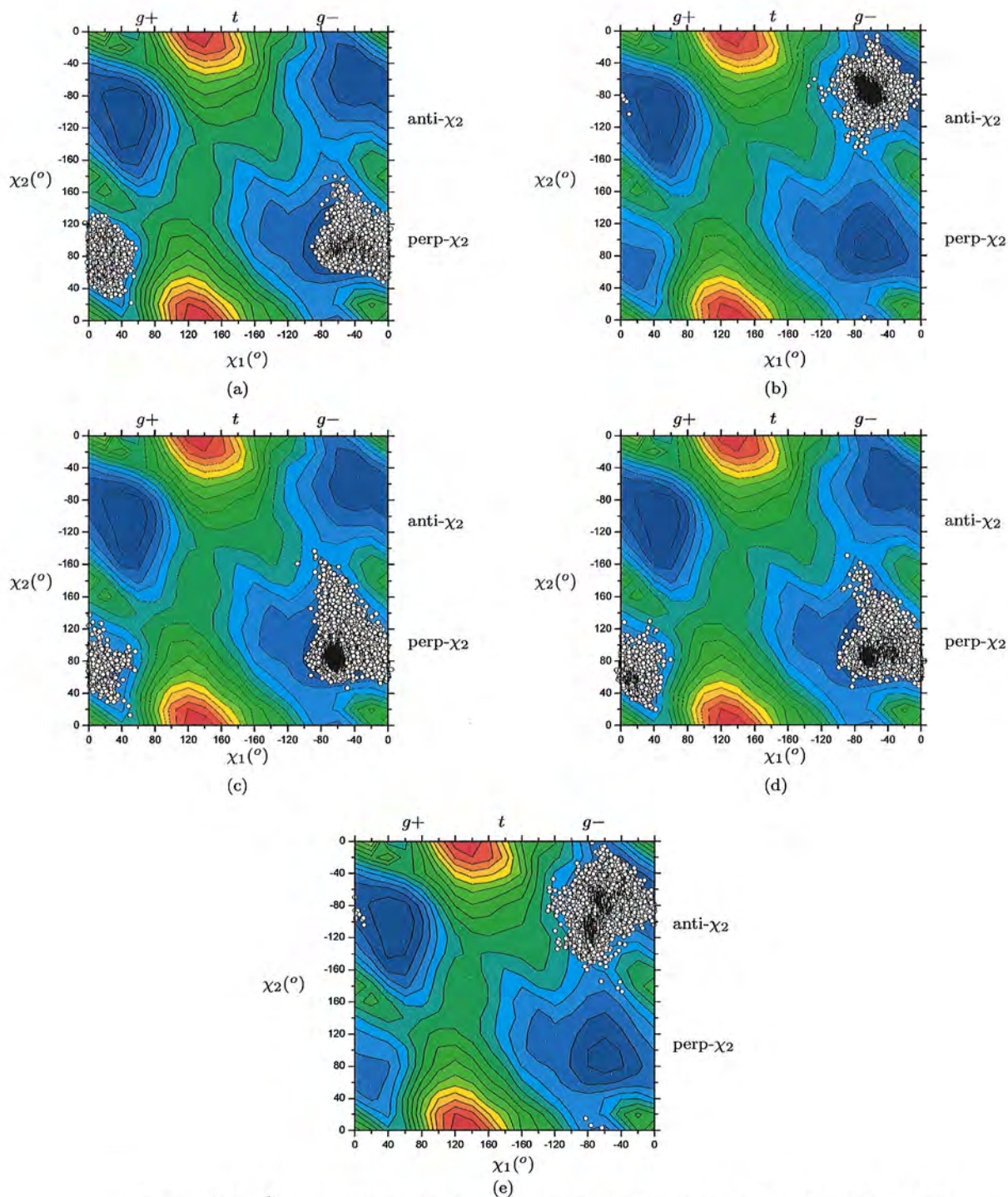


Figura 7.9: Ângulos diedrais  $\chi_1$  e  $\chi_2$  visitados durante a DM (círculos abertos) sobre a SEP obtida no EF pelo método AM1. As simulações foram iniciadas em (a)  $anti-\chi_2 g+$ , (b)  $anti-\chi_2 g-$ , (c)  $perp-\chi_2 g+$ , (d)  $perp-\chi_2 g-$  e (e)  $perp-\chi_2 t$ .

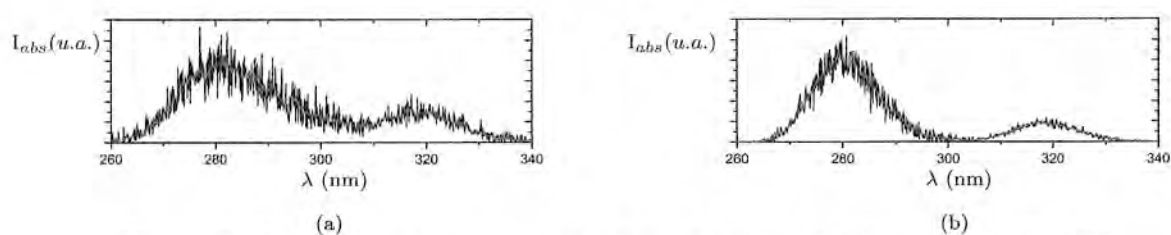


Figura 7.10: Espectros teóricos de absorção ótica obtido a partir da DM para o 5-OH-trp em água. O reagente foi posto no início da simulação nas conformações: (a)  $\text{perp-}\chi_2\text{g}^-$  e (b)  $\text{anti-}\chi_2\text{g}^-$ . As energias de transição foram obtidas pelo método semi-empírico INDO/S-CIS utilizando nos cálculos apenas as geometrias do soluto obtidas durante as DM. A linha em vermelho foi obtida pelo cálculo de médias sucessivas dos 15 valores seguintes ao comprimento de onda associado.

## Capítulo 8

### Conclusões e Perspectivas

Foram realizados cálculos *ab initio* e semi-empíricos em 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp, determinando as SEP do EF e do 1EE em função dos ângulos  $\chi_1$  e  $\chi_2$ . Esses compostos foram estudados nos estados de protonação zwitteriônico, neutro e aniônico. Os decaimentos fluorescentes ajustados a uma ou mais exponenciais foram estudados em termos das populações relativas de Boltzmann no EF e 1EE levando-se em conta as taxas de TE no 1EE, obtidas pela Teoria de Marcus com o uso do método EPR. Para se aproximar das condições experimentais, foram realizadas simulações por DM usando o método híbrido *QM/MM* no EF do 5-OH-trp na forma zwitteriônica, na presença do solvente aquoso representado explicitamente.

O método semi-empírico AM1 forneceu resultados para as conformações do 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp na forma zwitteriônica semelhantes aos valores obtidos pelo método *ab initio* HF/4-31G. Na forma zwitteriônica, as estabilidades dos rotâmeros sofreram a influência da interação atrativa cátion- $\pi$  entre o terminal amina e os elétrons  $\pi$  do anel aromático. A contribuição principal na interação cátion- $\pi$  é devido à atração entre o cátion e o momento de quadrupólo devido aos elétrons  $\pi$  do anel aromático, por isso não

é uma interação simples de ser descrita[75, 76]. Modificações em campos de força empíricos têm sido realizadas para se levar em conta essa interação em simulações por mecânica molecular[77].

Na literatura, seis rotâmeros são encontrados para o trp na forma zwitteriônica através de cálculos com campos de força empíricos[15, 18]. Neste trabalho, verificou-se que o rotâmero anti- $\chi_2t$  para o 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp não é estável devido à interação repulsiva ânion- $\pi$  entre o terminal carboxílico (COO-) e os elétrons  $\pi$  do anel aromático. Desta forma, apenas cinco conformações rotaméricas são estáveis para o 7-aza-trp e o trp no EF e no 1EE em cada forma de protonação com o terminal carboxílico desprotonado (COO-). O análogo 5-OH-trp apresentou dez rotâmeros estáveis, em cada estado eletrônico, devido às rotações na ligação O<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> (ângulo diedral  $\delta_{5OH}$ ). No estado zwitteriônico dessas moléculas, as distâncias entre os hidrogênios do terminal amina e o nitrogênio foram mantidas fixas, pois a forma neutra é mais estável do que o estado zwitteriônico.

O uso do método semi-empírico INDO/S-CIS, com as geometrias estáveis no EF obtidas pelo método *ab initio*, permitiu a obtenção dos espectros teóricos de absorção ótica. O deslocamento para o vermelho no comprimento de onda de máxima absorção do 5-OH-trp em relação ao trp, que é observado em experimentos, foi reproduzido nos cálculos. No mesmo sentido, ocorreu o deslocamento no espectro teórico do 7-aza-trp em relação ao trp, porém duas bandas com intensidades de absorção próximas foram obtidas, sendo que experimentalmente não é possível observar essa separação.

As otimizações de geometria na SEP do 1EE obtidas com o método CIS/4-31G permitiram a obtenção dos espectros de fluorescência de estado estacionário pelos cálculos das energias de transição vertical com o uso do método semi-empírico INDO/S-CIS. Os resultados apresentaram boa concordância com dados experimentais, como por exemplo, os deslocamentos para o vermelho nos máximos de emissão fluorescente do 7-aza-trp em relação ao trp e ao 5-OH-trp e da emissão do 5-OH-trp, na forma dianiônica, em relação aos outros estados de protonação.

Analisando as populações relativas do 7-aza-trp no 1EE, verifica-se que apenas o rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  é populado. A existência dessa conformação pode estar relacionada com o decaimento fluorescente monoexponencial observado na literatura. Para reprodução do rendimento quântico observado experimentalmente, a variação de energia livre no processo de transferência de elétrons do rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  deve ser inferior a  $-1,65$  eV.

O trp na forma zwitteriônica também possui o rotâmero anti- $\chi_{2g+}$  como o único populado no 1EE. Porém, como os decaimentos fluorescentes são ajustados com duas ou três exponenciais, não é possível relacionar as conformações rotaméricas obtidas em cálculos no vácuo com os tempos de vida de fluorescência obtidos em meio aquoso.

As geometrias otimizadas do 1EE permitiram também a determinação dos átomos doadores e dos aceitadores de elétrons, junto com os potenciais de ionização vertical, necessários para os cálculos das taxas de TE.



Pelo estudo dos estados de transição nas SEP do EF e do 1EE, verificou-se que a interconversão entre os rotâmeros estáveis na forma zwitteriônica sem a presença do solvente pode ocorrer. A interconversão entre conformações *gauche*<sup>+</sup> e os rotâmeros *trans* ou *gauche*<sup>-</sup> só ocorrem num sentido. No sentido *gauche*<sup>+</sup> para *gauche*<sup>-</sup> ou *trans*, com  $\chi_1$  decrescente, as alturas das barreiras são pequenas (< 2,5 kcal/mol). Já para  $\chi_1$  crescente, no mesmo sentido, as barreiras apresentam alturas superiores a 10 kcal/mol, semelhantes a resultados encontrados na literatura[60].

O programa computacional implementado para realização dos cálculos das taxas de TE apresentou resultados semelhantes a soluções analíticas obtidas em pseudo-moléculas e a valores encontrados na literatura. Desta forma, este programa poderá ser utilizado em estudos com outras moléculas, inclusive proteínas e peptídeos.

Para o cálculo das taxas de TE no 1EE do 5-OH-trp, 7-aza-trp e trp foi necessário estimar valores para a energia de reorganização molecular e analisar os resultados para as taxas de TE em função da variação de energia livre envolvida no processo de transferência de carga. Foram determinados valores máximos para as variações de energia livre considerando que o processo de transferência de elétrons não suprime a fluorescência. Esses resultados poderão ser comparados com dados experimentais a serem obtidos a fim de validar ou rejeitar as hipóteses sugeridas.



Usando o método híbrido *QM/MM* em sistemas compostos pelo 5-OH-trp na forma zwitteriônica, tratado quanticamente, e o solvente aquoso representado explicitamente, subsistema clássico, realizou-se simulações partindo das cinco geometrias otimizadas obtidas pelo método HF/4-31G no EF. Em 1500 ps de DM, as simulações permitiram observar a presença de duas famílias de rotâmeros: a anti- $\chi_2$  formada apenas pelo rotâmero *gauche*<sup>-</sup> e a perp- $\chi_2$  formada pelos rotâmeros *gauche*<sup>-</sup> e *gauche*<sup>+</sup>. A existência dessas três conformações rotaméricas do 5-OH-trp no EF originaria o decaimento fluorescente tri-exponencial observado experimentalmente. Os diferentes tempos de vida seriam devido a diferentes taxas de decaimento não-radiativos entre essas conformações.

Além disso, as simulações por DM permitiram a obtenção do espectro teórico de absorção ótica sem a necessidade de convolução dos dados para reprodução da forma experimental do espectro, apresentando assim resultados em boa concordância com dados experimentais.

As funções de distribuição radial de pares obtidas das simulações demonstram que as moléculas do solvente estão bem estruturadas em torno delas mesmas. Porém, o solvente está muito afastado do soluto. Isso pode ser devido a um problema de parametrização ou então à interação entre os núcleos da parte quântica com o subsistema clássico. Desta forma, sugere-se um estudo sistemático dessa interação para permitir simulações mais realistas em sistemas soluto-solvente que utilizam o método *QM/MM*.

Atualmente, implementações vêm sendo realizadas no programa GEOMOP para os cálculos de derivadas analíticas em otimizações de estados excitados usando métodos semi-empíricos[78]. Isso permitirá junto com o programa THOR a realização de simulações por DM usando o método QM/MM em estados excitados. Desta forma, estudos conformacionais de fluoróforos em estados excitados e, conseqüentemente, da fluorescência de moléculas no estado estacionário e resolvida no tempo de moléculas na presença explícita do solvente poderão ser realizados.

## Referências Bibliografias

- [1] J. M. Beechem and L. Brand. Time-resolved fluorescence of proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 54:43–71, 1985.
- [2] D. S. English, R. L. Rich, and J. W. Petrich. Nonexponential fluorescence decay of 7-azatryptophan induced in a peptide environment. *Photochem. Photobiol.*, 67(1):76–83, 1998.
- [3] J. B. A. Ross, A. G. Szabo, and C. W. V. Hogue. Enhancement of protein spectra with tryptophan analogs: Fluorescence spectroscopy of protein-protein and protein-nuclei acid interactions. *Meth. Enzym.*, 278:151–190, 1997.
- [4] C. Y. Wong and M. R. Eftink. Biosynthetic incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease: Effect of 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan on structure and stability. *Protein Sci.*, 6:689–697, 1997.
- [5] W. R. Laws, G. P. Schwartz, E. Rusinova, G. T. Burke, Y. Chu, P. G. Katsoyannis, and J. B. A. Roos. 5-hydroxytryptophan: An absorption and fluorescence probe which is a conservative replacement for [a14 tyrosine] in insulin. *J. Prot. Chem.*, 14:225–231, 1995.
- [6] Y. Chen, F. gai, and J. W. Petrich. Solvation of 7-azaindole in alcohols

- and water: Evidence for concerted, excited-state, double-proton transfer in alcohols. *J. Am. Chem. Soc.*, 115:10158–10166, 1993.
- [7] R. L. Rich, M. Ngrerie, J. Li, S. Elliott, R. W. Thornburg, and J. W. Petrich. The photophysical probe, 7-azatryptophan, in synthetic peptides. *Photochem. Photobiol.*, 58(1):28–30, 1993.
- [8] K. Das, K. D. Ashby, A. V. Smirnov, F. C. Reinach, J. W. Petrich, and C. S. Farah. Fluorescence properties of recombinant tropomyosin containing tryptophan, 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan. *Photochem. Photobiol.*, 70(5):719–730, 1999.
- [9] A. Szabo and N. S. Ostlund. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publications, Inc., Mineola, New York, first edition, 1996.
- [10] M. Dewar and W. Thiel. *J. Amer. Chem. Soc.*, 99:4499, 1977.
- [11] L. P. et al. Davis. *J. Comp. Chem.*, 2:433, 1981.
- [12] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, and E. F. Healy. Am1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Amer. Chem. Soc.*, 107:3902, 1985.
- [13] A. D. Bacon and M. C. Zerner. An intermediate neglect of differential overlap theory for transition metal complexes: Fe, co, and cu chlorides. *Theo. Chim. Acta*, 53:21, 1979.
- [14] L. K. Hanson, J. Fajer, M. A. Thompson, and M. C. Zerner. Environmental effects on the properties of bacteriachlorophylls in photosynthetic

- reaction centres: Theoretical models. *J. Amer. Chem. Soc.*, 109:4728, 1987.
- [15] P.G. Pascutti. *Dinâmica molecular de peptídeos na interface membrana-água*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 1996.
- [16] T. Simonson, C. F. Wong, and A. T. Brnger. Classical and quantum simulations of tryptophan in solution. *J. Phys. Chem.*, 101:1935–1945, 1997.
- [17] T. R. Rizzo, Y. D. Park, L. A. Peteanu, and Levy. D. H. The electronic spectrum of the amino acid tryptophan in the gas phase. *J. Chem. Phys.*, 84(5):2534–2541, 1986.
- [18] J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. McDonald, and G. R. Fleming. On the origin of nonexponential fluorescent decay in tryptophan and its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 105:3824–3832, 1983.
- [19] C. Peng, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel, and M. J. Frisch. Using redundant internal coordinates to optimize geometries and transition states. *J. Comp. Chem.*, 17:49, 1996.
- [20] C. Peng and H. B. Schlegel. Combining synchronous transit and quasi-newton methods to find transition states. *Israel J. Chem.*, 33:449–454, 1993.
- [21] H. B. Schlegel. Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *J. Comp. Chem.*, 3:214, 1982.
- [22] M. Klessinger and Michl J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. VCH Publishers, Inc., USA, first edition, 1995.

- [23] Waluk J. *Conformation Analysis of Molecules in Excited States*. WILEY-VCH, Inc., USA, first edition, 2000.
- [24] Y. Chen and M. D. Barkley. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, 37:9976–9982, 1998.
- [25] R.A. Marcus. *J. Chem. Phys.*, 24:966–978, 1956.
- [26] R.A. Marcus. *J. Chem. Phys.*, 43:679, 1965.
- [27] C. Goldman. Long-range electron transfer in proteins: A renormalized-perturbation-expansion approach. *Phys. Rev. A*, 43(8):4500–4509, 1991.
- [28] C. Goldman, P. G. Pascutti, P. Piquini, and A. S. Ito. On the contribution of electron transfer reactions to the quenching of tryptophan fluorescence. *J. Chem. Phys.*, 103(24):10614–10620, 1995.
- [29] G. Monard, M. Loos, V. Thry, K. Baka, and J-L. Rivail. Hybrid classical quantum force field for modelind very large molecules. *Int. J. Quant. Chem.*, 58:153–159, 1996.
- [30] N. Reuter, M. Loos, G. Monard, A. Cartier, B. Maigret, and J.L. Rivail. A quantum chemistry approach to reactions in biomolecules. In M.C. Nascimento, editor, *Proceedings of the Second South American Conference on Molecular Modeling*, 1998. (in press).
- [31] P. R. Callis. 11a and 11b transitions of tryptophan: Applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins. *Methods Enzymo.*, 278:113–150, 1997.

- [32] B. Valeur and G. Weber. resolution of the fluorescence excitation spectrum of indole the 1la and 1lb excitation bands. *Photochem. Photobiol.*, 25:441–444, 1977.
- [33] M. Loos, M. M. Cassiano, L. E. Dardenne, P.G. Pascutti, baseado em, P. G. Pascutti, K.C. Mundim, A.S. Ito, and P.M. Bisch. *J. Comp. Chem.*, 20(9):971–982, 1999.
- [34] M.M. Cassiano. *Dinâmica de Biomoléculas em Água: Simulações com Representação Explícita do Solvente*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 1998.
- [35] B.R. Brooks, R.E. Bruccoreli, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. Charmm: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.*, 4(2):187–217, 1983.
- [36] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I. R. Gould, K.M. Jr Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, and P.A. Kollman. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:5179–5197, 1995.
- [37] D. Rinaldi, P. E. Hoggan, A. Cartier, K. Baka, G. Monard, M. Loos, A. Mokrane, V. Dillet, and V. Thery. *GEOMOP (QCPE 584)*.
- [38] V. Thery. PhD thesis, Unniversity of Nancy I, France, 1993.
- [39] W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, and W.T. Vetterling. *Numerical Recipes in C - the art of scientific computing*. Cambridge University Press, USA, first edition, 1988.



- [40] Y. Chen, F. Gai, and J. W. Petrich. Single-exponential fluorescence decay of the nonnatural amino acid 7-azatryptophan and the nonexponential fluorescence decay of tryptophan in water. *J. Phys. Chem.*, 98:2203–2209, 1994.
- [41] C. W. V. Hogue and A. G. Szabo. Characterization of aminoacyl-adenylates in *b. subtilis* tryptophanyl-trna synthetase, by the fluorescence of tryptophan analogs 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan. *Bioph. Chem.*, 48:159–169, 1993.
- [42] R. L. Rich, F. Gai, J. W. Lane, J. W. Petrich, and A. W. Schawbacher. Using 7-azatryptophan to probe small molecule-protein interactions on the picosecond time scale: The complex of avidin and biotinylated 7-azatryptophan. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:733–739, 1995.
- [43] A.L.C.F. Souto. *Micelas Reversas e a Interação de Peptídeos Melanotrópicos*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 1999.
- [44] Kelepouris and G. J. Blanchard. Lifetime and reorientation measurements of 7-azaindole and 7-azatryptophan in aqueous adipic acid solutions: The significance of functionalities in solution phase association processes. *J. Phys. Chem. A*, 104:7261–7267, 2000.
- [45] M. R. Eftink and L. A. Selvidge. Photophysics of indole derivatives: Experimental resolution of Ia and Ib transitions and comparison with theory. *J. Phys. Chem.*, 94:3469–3479, 1990.
- [46] B. Sengupta, J. Guharay, and P. K. Sengupta. 5-hydroxyindole: usefulness as a novel optical probe. *J. Mol. Struct.*, 559:347–353, 2001.

- [47] A. V. Smirnov, D. S. English, R. L. Rich, J. Lane, L. Teyton, A. W. Schwabacher, S. Luo, R. W. Thornburg, and J. W. Petrich. Photophysics and biological applications of 7-azaindole and its analogs. *J. Phys. Chem. B*, 101(15):2758–2769, 1997.
- [48] H.L. Gordon, H.C. Jarrell, A.G. Szabo, K.J. Willis, and R.L. Somorjai. Molecular dynamics simulations of the conformational dynamics of tryptophan. *J. Phys. Chem.*, 96(4):1915–1921, 1992.
- [49] J. Kobayashi, T. Higashijima, S. Sekido, and T. Miyazawa. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 17:486–494, 1981.
- [50] B. Dezube, C. M. Dobson, and C. E. Teague. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*:730–735, 1981.
- [51] J. W. Ponder and F. M. Richards. Tertiary templates for proteins. use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J. Mol. Biol.*, 193:775–791, 1987.
- [52] X. Daura, R. Suter, and W. F. van Gunsteren. Validation of molecular simulation by comparison with experiment: Rotational reorientation of tryptophan in water. *J. Chem. Phys.*, 110:3048–3055, 1999.
- [53] X. Cao and G. Fischer. Infrared spectral, structural, and conformational studies of zwitterionic l-tryptophan. *J. Phys. Chem. A*, 103:9995–10003, 1999.
- [54] S. Ilieva, B. Hadjieva, and B. Galabov. Ab initio molecular orbital study of the conformation of the indole ring: o-methylformanilide. *J. Mol. Struct.*, 476:151–156, 1999.

- [55] S. Ilieva, B. Hadjieva, and B. Galabov. Ab initio molecular orbital and infrared spectroscopic study of the conformation of secondary amides: derivatives of formamide, acetamide and benzylamides. *J. Mol. Struct.*, 508:73–80, 1999.
- [56] W.L. Zhu, H.L. Jiang, J.D. Gu, J.Z. Chen, J.K. Shen, K.X. Chen, R. Ji.Y, and Y. Cao. Ab initio hf and density-functional theory studies on the structure and vibrational frequency of huperzine a. *J. Mol. Struct.*, 488:21–28, 1999.
- [57] M. K. Shukla and P. C. Mishra. A gas phase ab initio excited state geometry optimization study of thymine, cytosine and uracil. *J. Chem. Phys.*, 240:319–329, 1999.
- [58] A. Douhal, V. Guallar, M. Moreno, and J. M. Lluch. Theoretical study of molecular dynamics in model base pairs. *Chem. Phys. Lett.*, 256:370–376, 1996.
- [59] M. Kasha. *Discuss. Farad. Soc.*, 9:14, 1995.
- [60] A. Smolyar and C. F. Wong. Theoretical studies of the spectroscopic properties of tryptamine, tryptophan and tyrosine. *J. Mol. Struct.*, 488:51–67, 1999.
- [61] D. L. Nelson and M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, third edition, 2000.
- [62] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery, R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millan, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C.

- Strain, O Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Men-  
nucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Peters-  
son, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck,  
K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B. Stefa-  
nov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L.  
Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayak-  
kara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, G. Johnson, W. Chen,  
M.W. Wong, J.L. Andres, M. Head-Gordon, Replogle E.S., and J. A.  
Pople. *GAUSSIAN 98*. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, revision a.1  
edition, 1998.
- [63] A. C. Borin and L. Serrano-Andrs. A theoretical study of the absorp-  
tion spectra of indole and its analogs: indene, benzimidazole, and 7-  
azaindole. *Chem. Phys.*, 262:253–265, 2000.
- [64] J. B. Foresman, M. Head-Gordon, J. A. Pople, and M. J. Frisch. Toward  
a systematic molecular orbital theory for excited states. *J. Phys. Chem.*,  
96:135, 1992.
- [65] K. B. Wiberg, C. M. Hadad, T. J. LePage, C. M. Breneman, and M. J.  
Frisch. An analysis of the effect of electron correlation on charge density  
distributions. *J. Phys. Chem.*, 96:671, 1992.
- [66] L. S. Slater and P. R. Callis. Molecular orbital theory of the 11a and  
11b states of indole. 2. an ab initio study. *J. Phys. Chem*, 99:8572–8581,  
1995.
- [67] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, and T.P. Straatsma. *J. Phys. Chem.*,  
91:6269, 1987.

- [68] A.H. Narten, W.E Thiessen, and L. Blum. *J. Chem. Phys.*, 55:2263, 1971.
- [69] A.H. Narten. *J. Chem. Phys.*, 56:5681, 1972.
- [70] A.H. Narten, W.E Thiessen, and L. Blum. *Science*, 217:1033, 1982.
- [71] G. Pálinkás, E. Kálmán, and P. Kovács. *Mol. Phys.*, 34:525, 1977.
- [72] A. K. Soper and R. N. Silver. *Phys. Rev. Letter.*, 49:471, 1982.
- [73] W. E. Thiessen and A. H. Narten. *J. Chem. Phys.*, 77:2656, 1982.
- [74] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, and M.L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79:926, 1983.
- [75] D.A. Dougherty. Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, phe, tyr, and trp. *Science*, 271:163–168, 1996.
- [76] H. Minoux and Chipot C. Cation -  $\pi$  interactions in proteins: Can simple models provide an accurate description? *J. Am. Chem. Soc.*, 121:10366–10372, 1999.
- [77] O. Donini and D. F. Weaver. Development of modified force field for cation-amino acid interactions: Ab initio-derived empirical correction terms with comments on cation -  $\pi$  interactions. *J. Comp. Chem.*, 19:1515–1525, 1998.
- [78] A. L. Sperandio. Estudo teórico por modelagem molecular híbrido *qm/mm* de uma proteína fotosensor: Pyp. Doutorado em andamento no Instituto de Química, USP-SP.