Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Danilo da Silva Olivier

Propriedades espectroscópicas do ácido orto-Aminobenzóico: estudo computacional e experimental de efeitos de pH

Ribeirão Preto

2012

Danilo da Silva Olivier

Propriedades espectroscópicas do ácido orto-Aminobenzóico: estudo computacional e experimental de efeitos de pH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia da FFCLRP da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia
Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

Versão Corrigida

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Olivier, Danilo da Silva.

Propriedades espectrais do ácido orto-Aminobenzóico: estudo computacional e experimental de efeitos de pH. Ribeirão Preto, 2012.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.
Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

Unitermos: 1. DFT;
2. Estrutura Eletrônica;
3. Espectros Eletrônicos;
4. Dinâmica Molecular.

Danilo da Silva Olivier

Propriedades espectroscópicas do ácido orto-Aminobenzóico: estudo computacional e experimental de efeitos de pH

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicia e Biologia.

Aprovado em:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais José Irio e Izonete, e ao meu irmão Renan por toda confiança, apoio e carinho em todos os momentos.

Agradecimentos

Ao professor Amando Ito, pela oportunidade, orientação, confiança, paciência etc.

Ao professor Sergio Galembeck pelas dicas e ajudas computacionais, aulas de química quântica e estrutura eletrônica e pelo tempo no cluster.

Ao professor Iouri pelas dicas sobre o trabalho, aulas experimentais, cafés, ensinamentos sobre história.

A minha família e à Suellen pelo incentivo, motivação e apoio em todos os momentos.

Ao amigo Sergio pela ajuda em Ribeirão Preto, conversas, dicas, ajudas com o linux, revisão do texto da dissertação e diversos momentos agradáveis nesses anos de caminhada.

A amiga Ana Carolina pela ajuda em Ribeirão Preto, conversas animadas, jantares, almoços e ajuda com a dissertação.

Ao amigo André, pelo companheirismo, almoços, motivação, ajudas e ensinamentos.

Aos amigos Rafael e Ana Paula, pelas conversas, dicas, cafés e momentos agradáveis.

Aos colegas da Fotobiofísica e da pós graduação que de alguma forma contribuiram para que este trabalho fosse realizado.

Ao Adriano, técnico de laboratório, pelas ajudas e discussões sobre experimentos.

Aos colegas de Ribeirão Leonardo, Talita, Newton, Natássia, Alvaro, Gustavo e César pela amizade, jantares, conversas etc.

Ao pessoal da limpeza por deixarem o ambiente de trabalho agradável.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesta caminhada.

A CAPES, pelo apoio financeiro

Resumo

A molécula de ácido orto-Aminobenzóico tem sido intensamente empregada como sonda fluorescente no estudo de peptídeos e membranas e o entendimento dos efeitos de solvente sobre suas propriedades espectroscópicas apresenta grande interesse científico. Neste trabalho realizamos um estudo experimental e cálculos DFT sobre alterações nos espectros de absorção e emissão da sonda em solução aquosa, em função do pH do meio. Examinamos também o seu derivado 2-amino-N-metil benzamida (o-Abz-NHCH3) e as mudanças espectrais na interação com micelas de SDS.

Resultados de experimentos de titulação mostraram-se coerentes com a existência de três estados de protonação para o-Abz à medida em que o pH torna-se ácido, resultantes da protonação dos grupos amino e carboxila, de modo semelhante ao que ocorre com aminoácidos.

Para cada estado de protonação, realizamos cálculos de otimização de geometria e verificação de mínima energia com a teoria DFT utilizando diferentes funcionais e conjuntos de bases para orbitais atômicos. Partindo das geometrias de menor energia, com a teoria TD-DFT (B3LYP/311++G(d,p)) fizemos cálculos das transições eletrônicas. A melhor concordância com os resultados experimentais foi obtida com a molécula na forma aniônica. Na comparação dos resultados da posição espectral da transição de mais baixa energia, no processo de absorção ótica, observamos uma diferença relativa de 0,6%. Para a fluorescência otimizamos e verificamos a geometria do estado excitado e obtivemos as energias de transição vertical com o método TD-DFT (B3LYP/Def2-TZVP) com o qual tivemos um resultado de $\lambda_{FG}^{flu} = 407nm$ considerado satisfatório quando comparado com o valor experimental λ_{exp}^{flu} = 394nm. Nas formas neutra e catiônica, as diferenças relativas entre os cálculos e os experimentos foram maiores, chegando a 11% na posição da banda de fluorescência da molécula neutra.

Usando simulações de Dinâmica Molecular conseguimos estimar quantas moléculas de água se distribuem em torno do o-Abz. Os resultados mostram que, embora exista um número parecido de moléculas de água solvatando a molécula nas formas aniônica e catiônica, há uma redução na quantidade de ligações de hidrogênio realizadas pela protonação catiônica em relação à aniônica.

O modelo utilizado para simular o o-Abz-NH(CH3) em micelas de SDS apresentou resultados satisfatórios com erro relativo entre 0,7% e 0,9%, no entanto são necessárias outras abordagens computacionais e experimentais para indicar em qual região a molécula se encontra na micela, dando assim mais confiabilidade e uma melhor interpretação aos resultados.

Palavras-chave: Ácido orto-Aminobenzóico, Espectros eletrônicos, DFT, Dinâmica Molecular

Abstract

The ortho-aminobenzoic acid is a molecule largely employed as a fluorescent probe in peptide and membrane studies. The solvent dependence of its spectroscopic properties deserves great interest and we describe here results of experimental measurements and computational calculations by ab-initio and Molecular Dynamics methods about spectroscopic and solvation properties of the molecule in aqueous medium at different pH values. We also examined the derivative 2-amino-N-methyl-benzamide (o-Abz-NHCH3), investigating the spectral modifications in its interaction with SDS micelles.

The results of titration experiments could be interpreted as originated from three protonation states for o-Abz: in neutral pH and above, both carboxy and amine groups are deprotonated, and the molecule is in the anionic form. Decreasing the pH, protonation of amino group or carboxy renders the molecule neutral (pK = 5.0) and at low pH both groups are protonated and the molecule is in the cationic form (pK = 2.3).

Geometry optimization and determination of energy minima were performed with the molecule in each protonation state using Density Functional Theory (DFT) with different functionals and basis set for atomic orbitals. Eletronic transitions were calculated from lowest energy geometry using TD-DFT (B3LYP/311++G(d,p)). The best agreement with experimental results were obtained for the anionic molecule: we observed a relative difference of 0.6% for the lowest energy optical transition. From the optimized geometry of the excited state the vertical transition was calculated with TD-DFT (B3LYP/Def2-TZVP), and the emission was predicted to occur at 407 nm, a reasonable result compared with the experimental value or 394 nm. For the molecule in neutral or cationic state, the relative differences between experimental and calculation results were greater, amounting to 11% for the fluorescence band in the neutral species.

From Molecular Dynamics simulation we estimated the number of water molecules distributed aroud the o-Abz molecule. The results show that, although there is similar number of water molecules solvating the o-Abz in anionic and cationic state, there is a decrease in the amount of hydrogen bond in the cationic molecule. The simulation of the derivative o-Abz-NHCH3 in SDS micelles by implicit solvent methods gave results comparable to the experimental ones, with relative deviations lower than 1%. It should be noted that further study should be carried out in order to have a better knowledge about the location of the probe in the micelle, and to afford a beter interpretation of the results.

Keywords: Ortho-Aminobenzoic Acid, electronic spectra, DFT, Molecular Dynamics

Lista de Abreviaturas

B3LYP Becke's three-parameter exchange + Lee-Yang-Parr correlation

BO Born-Oppenheimer

ChelpG Charges from Electrostatic Potential Grid based

CMC Concentração Micelar Crítica

CPMD Dinâmica Molecular de Car-Parrinello

DFT Teoria do Funcional da Densidade

DM Dinâmica Molecular

FG Fase Gasosa

GGA Aproximação de Gradientes Generalizados

GTO Orbitais Tipo Gaussianas

HF Hartree-Fock

HOMO Orbital Molecular Mais Alto Ocupado

LDA Aproximação de Densidade Local

LH Ligações de Hidrogênio

LUMO Orbital Molecular Mais Baixo Desocupado

MQ Mecânica Quântica

o-Abz Ácido orto-Aminobenzóico

OPLS-AA Parâmetros Otimizados para Simulação de Líquidos - Todos os Átomos Explícitos

PBC Condições Periódicas de Contorno

PBE Perdew-Burke-Erzenhof

PCM Modelo Contínuo Polarizável

QM/MM Mecânica Quântica/Mecânica Molecular

RMSD Desvio Quadrático Médio

RMSF Flutuação do Desvio Quadrático Médio

SCRF Campo de Reação Auto-Consistente

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

STO Orbitais do Tipo Slater

TD-DFT Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo

Lista de Figuras

Figura 1.1 - o-Abz em sua forma neutra nas conformações (a) C1 e (b) C2. 22

Figura 1.2 - o-Abz nas formas: (a) Catiônica - C1, (b) Catiônica - C2, (a) Aniônica e (d) Zwitteriônica. 23

Figura 2.1 - Representação do orbital molecular σ nas moléculas de H_2 e N_2. 26

Figura 2.2 - Representação do orbital molecular π na molécula de N_2. 26

Figura 2.3 - Representação do orbital molecular **n** na molécula de formaldeído. . . . 26

Figura 2.4 - Representação do orbital molecular antiligante σ^* na molécula de H_2. . 27

Figura 2.5 - Representação do orbital molecular antiligante π^* na molécula de N_2. . 27

Figura 2.6 - Esquema das transições eletrônicas singleto-singleto e singleto-tripleto . 28

Figura 2.7 - Esquema da transição de Franck-Condon. 28

Figura 3.1 - Ligação formada por dois átomos. 55

Figura 3.2 - Ângulo formado por três átomos ligados. 56

Figura 3.3 - Ângulo diedro formado por quatro átomos ligados. 56

Figura 3.4 - Energia potencial para átomos não ligados. Em azul o potencial de Lennard-Jones, em vermelho as contribuições positiva e negativa do potencial de Lennard-Jones e em verde o potencial Coulombiano provocado pela repulsão eletrostática. 57

Figura 3.5 - Replicação da caixa de simulação em duas dimensões em função da condição de contorno (PBC) aplicada. O círculo em vermelho representa o raio de corte $(\vec{r})$. 58

Figura 4.1 - Representação esquemática de um espectrofotômetro de absorção. Figura adaptada, retirado de: [www.chemkeys.com] 60

Figura 4.2 - Representação esquemática de um espectrofluorímetro. Figura adaptada, retirado de: [http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/mol-fluo.htm] 61
Figura 5.1 - Espectro de absorção ótica para o-Abz em solução tampão fosfato em função do pH. 66
Figura 5.2 - Espectro de fluorescência para o *o*-Abz em função da variação pH. . . . 67
Figura 5.3 - Curva de Titulação para o o-Abz em solução tampão fosfato. 68
Figura 5.4 - Estados de protonação devido a alteração do pH. 69
Figura 5.5 - Espectro de absorção ótica para o *o*-Abz-NH(CH3) em micelas de SDS. 69
Figura 5.6 - Representação dos orbitais HOMO, LUMO, HOMO -1 e LUMO +1. . . 73
Figura 5.7 - Orbitais Moleculares para a transição eletrônica HOMO $\rightarrow$ LUMO na molécula de o-Abz utilizando o modelo de meio contínuo e nível de teoria B3LYP/QZVP. 74
Figura 5.8 - Representação da curva de absorção ótica calculada utilizando a técnica da microhidratação. 75
Figura 5.9 - Distribuição de cargas parciais para o-Abz em fase gasosa na protonação aniônica. 77
Figura 5.10 - Energia média por átomo para o sistema o-Abz aniônico + íon + água. . 78
Figura 5.11 - RMSD do sistema. 78
Figura 5.12 - Distribuição radial água em torno da molécula de o-Abz na protonação aniônica, levando em consideração o centro de massa das moléculas. . . 79
Figura 5.13 - Distribuição radial entre pares para o átomo O9-HW1 e O9-OW. 80
Figura 5.14 - Flutuação na posição dos átomos do o-Abz durante a simulação computacional. 82
Figura 5.15 - Gráfico da varredura do ângulo diedro (* C1 C8 *) para a protonação neutra. 83
Figura 5.16 - Representação dos orbitais HOMO, LUMO, HOMO -1 e LUMO +1. . . 87

Figura 5.17 - Orbitais Moleculares para a transição eletrônica HOMO $\rightarrow$ LUMO na molécula de o-Abz utilizando o modelo de meio contínuo e nível de teoria B3LYP/QZVP. 89
Figura 5.18 - Conformações C1 e C2 para a molécula do o-Abz. 90
Figura 5.19 - Representação dos orbitais HOMO, LUMO, HOMO -1 e LUMO +1. . . 94
Figura 5.20 - Orbitais Moleculares ligados à transição eletrônica ($S_0 \rightarrow S_1$) na molécula de o-Abz utilizando solvente implícito (PCM) com nível de teoria B3LYP/QZVP. 95
Figura 5.21 - Distribuição de cargas parciais para o-Abz em fase gasosa na protonação neutra conformação C1 96
Figura 5.22 - Energia média por átomo para o sistema o-Abz catiônico + íon + água. . 97
Figura 5.23 - RMSD do sistema o-Abz catiônico + íon + água. 97
Figura 5.24 - Distribuição radial da água em torno da molécula de o-Abz na protonação catiônica considerando o centro de massa. 98
Figura 5.25 - Distribuição radial de pares entre N7-H15, N7-H16, N7-H18 e OW. . . 99
Figura 5.26 - RMSF do o-Abz. 101
Figura 5.27 - Gráfico da varredura do ângulo diedro (* C1 C8 *) para o o-Abz-NH(CH3). 102
Figura 5.28 - Conformações C1 e C2 para o-Abz-NH(CH3). 103

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 - Parâmetros da etapa de solvatação. 64

Tabela 5.1 - Parâmetros obtidos para o ajuste da curva de titulação do *o*-Abz. 68

Tabela 5.2 - Geometria do o-Abz na conformação aniônica em fase gasosa e PCM. Unidade de distância [Å] e ângulo [°]. Geometrias otimizadas e verificadas através dos cálculos de frequências vibracionais com DFT utilizando o funcional: B3LYP e as bases: TZVP e QZVP. 71

Tabela 5.3 - Absorção ótica para o o-Abz em FG e PCM na conformação aniônica. O funcional utilizado foi o B3LYP. 73

Tabela 5.4 - Absorção ótica para o sistema (o-Abz + seis moléculas de água). 76

Tabela 5.5 - ligações de hidrogênio formada entre o o-Abz e as moléculas de água. . 80

Tabela 5.6 - ligações de hidrogênio entre O9 e moléculas de água 81

Tabela 5.7 - ligações de hidrogênio entre dos pares $N7-H15$ e $N7-H16$ com moléculas de água. 81

Tabela 5.8 - Geometria do o-Abz na conformação neutra C1 em FG e PCM. Unidade de distância &[Å]& e ângulo [°]. Geometria otimizada e verificada com DFT utilizando o funcional B3LYP com o conjunto de bases QZVP para FG e Aug-cc-pVTZ para PCM. 84

Tabela 5.9 - Momento de dipolo para o o-Abz na conformação Neutra C1. Unidade de momento de dipolo Debye (D). 85

Tabela 5.10 - Absorção ótica para o o-Abz em FG e PCM na conformação neutra C1. O funcional utilizado foi o B3LYP. 86

Tabela 5.11 - Energia para o o-Abz na conformações: Catiônica C1 em fase gasosa, com relação a Catiônica C2. Unidade de energia [kcal/mol]. 91

Tabela 5.12 - Geometria do o-Abz na conformação catiônica em FG e PCM. Unidade de distância [Å] e ângulo [°]. Geometria otimizada e verificada com DFT utilizando o funcional: B3LYP e a base: QZVP. 92
Tabela 5.13 - Absorção ótica para o o-Abz em FG e PCM na conformação catiônica C1. O funcional utilizado foi o B3LYP. 94
Tabela 5.14 - Ligações de Hidrogênio formada entre o o-Abz catiônico e as moléculas de água. 99
Tabela 5.15 - Ligações de Hidrogênio formada entre os pares N7-H15, N7-H16, N7-H18 e OW. 100
Tabela 5.16 - Ligações de Hidrogênio formada entre o par O10-H17 e OW. 100
Tabela 5.17 - Geometria do o-Abz na conformação aniônica em fase gasosa e PCM. Unidade de distância [Å] e ângulo [°]. Geometrias otimizadas e verificadas com DFT utilizando o funcional: B3LYP e o conjunto de bases: TZVP. 104
Tabela 5.18 - Absorção ótica o-Abz-NH(CH3) utilizando diferentes valores de epsilon. Cálculo utilizando a teoria TD-DFT com o funcional B3LYP e conjunto de bases Def2-TZVP. 105

Sumário

1 Introdução **21**

2 Princípios de Espectroscopia **25**

2.1 Absorção Ótica no UV-Visível 25

2.2 Fluorescência 30

3 Bases Teóricas Computacionais **32**

3.1 Mecânica Molecular Quântica 32

3.1.1 Aproximação de Born-Oppenheimer 33

3.1.2 Teoria de Hartree-Fock-Roothaan 36

3.1.3 Conjuntos de Bases 41

3.1.4 Teoria do Funcional Densidade - (DFT) 45

3.1.5 Modelos de Solvente 49

3.2 Mecânica Molecular Clássica 50

3.2.1 Algorítmos de Verlet e *Leap-frog* 51

3.2.2 Termostato e Barostato 53

3.2.3 Campo de Força 54

3.2.4 Condições Periódicas de Contorno 57

4 Metodologia **59**

4.1 Etapa Experimental 59

4.1.1 Amostras 59

4.1.2 Absorção Ótica 60

4.1.3 Fluorescência Estática 60

4.2 Etapa Computacional 61

4.2.1 Cálculos de estrutura eletrônica 62

4.2.2 Fase Gasosa e Solvente Implícito 62

4.2.3 Microhidratação 63

4.2.4 Dinâmica Molecular 63

5 Resultados e Discussão **65**

5.1 Espectros Experimentais para *o*-Abz 65

5.1.1 Absorção Ótica 65

5.1.2 Fluorescência 66

5.1.3 Curva de Titulação 67

5.2 Espectro de absorção ótica para *o*-Abz-NH(CH3) 69

5.3 Cálculos Computacionais 70

5.4 Protonação Aniônica 70

5.4.1 Geometria 70

5.4.2 Absorção Ótica, Fluorescência e Orbitais Moleculares 71

5.4.3 Microhidratação - Absorção Ótica 75

5.4.4 Dinâmica Molecular 76

5.5 Protonação Neutra 82

5.5.1 Energia relativa e população de Boltzmann 82

5.5.2 Geometria 83

5.5.3 Momento de Dipolo 84

5.5.4 Absorção Ótica, Fluorescência e Orbitais Moleculares 85

5.6 Protonação Catiônica 89

5.6.1 Energia relativa e população de Boltzmann 90

5.6.2 Geometria 91

5.6.3 Absorção Ótica, Fluorescência e Orbitais Moleculares 92

5.6.4 Dinâmica Molecular 95

5.7 o-Abz-NH(CH3) 102

5.7.1 Energia relativa e população de Boltzmann 102

5.7.2 Geometria 103

5.7.3 Absorção Ótica 104

6 Conclusão **106**

Referências **110**

1 Introdução

Técnicas de espectroscopia, como absorção ótica e fluorescência, tem sido bastante empregadas no estudo de sistemas biológicos como membranas, proteínas, interação peptídeo-membrana e fármacos[1, 2]. Estas técnicas podem nos fornecer várias informações como: comprimento de onda, intensidade fluorescente, tempo de vida, rendimento quântico, anisotropia, dentre outras.

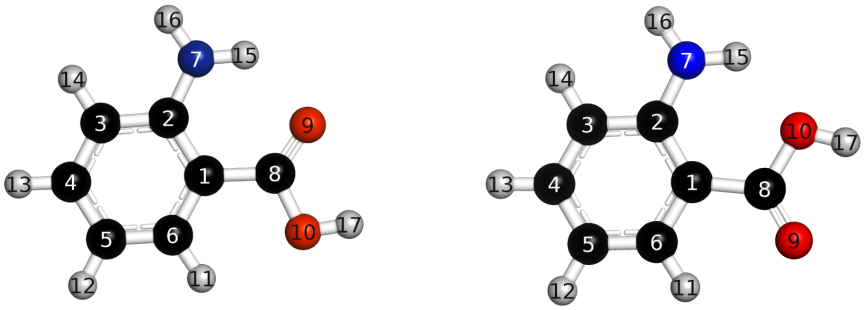
Para aplicação dessas técnicas devemos contar sempre com algum grupo ou molécula capaz de absorver ou emitir radiação no UV-visível. Quando desejamos obter informações a respeito de proteínas, micelas, vesículas e outras estruturas biológicas podemos contar com uma diversidade de moléculas que apresentam atividade fluorescente, essas moléculas podem ser chamadas de sonda. Por exemplo se desejamos entender como um peptídeo interage com uma membrana podemos analisar os espectros do aminoácido triptofano. O comportamento dessas sondas é alterado à medida que muda o ambiente em que ela se encontra por exemplo: a polaridade do meio, o pH, as ligações de hidrogênio.

Assim entender o funcionamento da sonda em diferentes ambientes é necessário, pois essas informações nos darão parâmetros para inferir sobre a interação de sistemas biológicos que sejam marcados com determinada sonda. A utilização de uma sonda adequada é de extrema importância para as atividades biológicas, por exemplo quando estuda-se peptídeos é comum a utilização da sonda intrínseca triptofano ou tirosina, pois por ser um aminoácido natural pode ja fazer parte das estruturas dos peptídeos e proteínas.

Uma molécula bastante utilizada para estudo de peptídeos e proteínas é o ácido orto-Aminobenzóico (o-Abz). Por ela ser semelhante a um aminoácido é possível inserí-lo em

proteínas, e assim, as propriedades da proteína poderão não se alterar.

O ácido orto-Aminobenzóico é um composto orgânico formado por um grupo amina e um grupo carboxílico em posições vizinhas de um anel benzênico.



(a) **(b)**

Figura 1.1 *– o-Abz em sua forma neutra nas conformações (a) C1 e (b) C2.*

Também conhecido como ácido antranílico é o precursor do aminoácido triptofano, sendo também conhecido como vitamina L1, auxilia no fluxo de leite em mulheres e seus ésteres são utilizados para mimetizar perfumes de laranja e jasmim. Pode-se ainda utilizar o o-Abz na indústria para criação de pigmentos, na indústria farmacêutica pode ser utilizado para criar diuréticos de alça,[3] que atuam nos rins agindo especificamente na porção ascendente da alça de Henle aumentando o volume e diminuindo a concentração da urina. Ainda na área biológica podemos utilizar o o-Abz como uma sonda fluorescente para compreensão de propriedades de peptídeos e proteínas [4] e, formando um par com um grupo aceitador ligado ao terminal carboxila de peptídeos, é intensamente usado em ensaios proteolíticos.

Devido às diversas aplicações para o o-Abz inclusive em áreas biológicas surge a necessidade de estudá-lo mais profundamente para entender como ele interage em meios biológicos. O o-Abz e seus análogos tem sido amplamente estudados com o objetivo de caracterizar o seu comportamento conforme muda-se o solvente [5, 6], mudanças que ocorrem quando ligado à peptídeos[7], ou ainda estudos sobre a supressão causada pelo Eddnp por transferência de energia [4].

Apesar da extensa literatura que existe sobre o o-Abz, existem poucos estudos computacionais desta sonda sendo necessário um maior detalhamento de questões mais teóricas. A

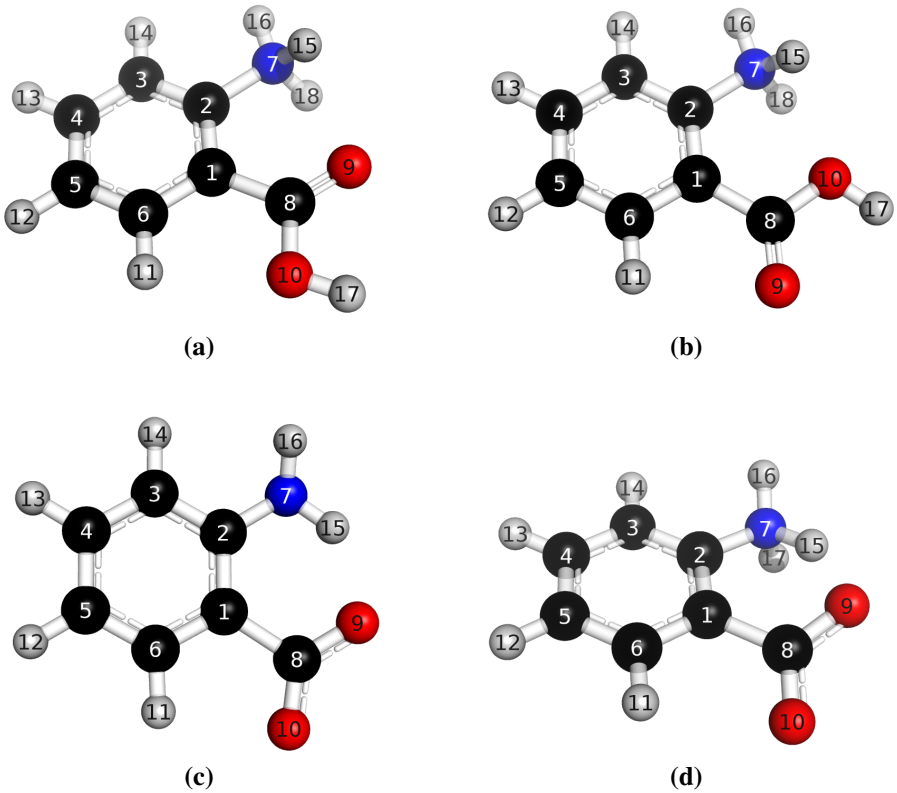


Figura 1.2 *– o-Abz nas formas: (a) Catiônica - C1, (b) Catiônica - C2, (a) Aniônica e (d) Zwitteriônica.*

partir dessa necessidade, desenvolvemos estudos computacionais buscando dar maiores detalhes sobre conformações, espectros de absorção e fluorescência e dinâmica das interações com solvente polar.

Assim como os aminoácidos, o o-Abz possui os grupos carboxila e amino e, em meio aquoso, apresenta diferentes estados de protonação, dependendo do pH do meio. Cada estado de protonação tem uma carga líquida sendo que em pH neutro a carga é -1 (carboxila desprotonada) tendo assim a forma aniônica; com pH abaixo de 5,0 o o-Abz tem a carga líquida zero possuindo duas formas: zwiteriônica (protonação no grupo amino) e neutra (protonação na carboxila), sendo que a forma neutra possui duas conformações C1 e C2 (Figura 1.1); quando o pH esta abaixo de 2,3 a molécula tem a tambem duas conformações C1 e C2. Na Figura 1.2 vemos as outras possíveis conformações além da Figura 1.1.

Este trabalho foi dividido em duas partes, onde na primeira parte foram realizados estudos experimentais do o-Abz em meio aquoso afim de se verificar quais as possiveis alterações nos

espectros de absorção e fluorescência à medida que se altera o pH. A etapa computacional consiste em cálculos de estrutura eletrônica, absorção ótica e fluorescência para entendimento de propriedades conformacionais e espectroscópicas, além de simulações por dinâmica molecular sobre três estados de protonação do o-Abz, sendo eles: aniônico, catiônico e neutro.

A segunda etapa do trabalho foi o estudo da interação de um derivado, o o-Abz-NH(CH3), com micelas de SDS afim de verificar mudanças no espectro de absorção. Para a complementação computacional foram realizados cálculos de estrutura eletrônica utilizando modelos quânticos para simular efeitos de solvente.

O trabalho está dividido em 6 capítulos, sendo o capítulo 2 referente as bases espectroscópicas, o capítulo 3 trata as teorias utilizadas para o tratamento quântico de moléculas e o modelo para simulação clássico de dinâmica molecular. No capítulo 4 apresentamos as metodologias usadas para a realização de experimentos e cálculos computacionais. O capítulo 5 apresenta resultados obtidos dos experimentos e simulações computacionais e no último capítulo fazemos a conclusão do trabalho comparando resultados experimentais e os resultados dos modelos computacionais utilizados.

2 *Princípios de Espectroscopia*

A região do UV-visível que corresponde aproximadamente 180-750 nm, é de grande interesse para a biofísica devido ao fato que muitas moléculas absorvem luz e emitem nessa faixa. Diversas informações podem ser retiradas a partir dos espectros de absorção e fluorescência, dentre as propriedades que influenciam no espectro de uma molécula estão efeitos gerais como o solvente em que a molécula esta situada e também efeitos específicos como ligações de hidrogênio. Apresentamos neste capítulo bases introdutórias a respeito de absorção ótica na região do UV-visível, fluorescência e efeitos gerais de solvente.

2.1 Absorção Ótica no UV-Visível

A absorção ótica do Ultra Violeta - Visível (UV-Visível), consiste basicamente na promoção de um elétron de um orbital de valência com menor energia ocupado para um orbital com maior energia vazio, onde a diferença de energia entre os orbitais chamada de gap, é a menor energia que o fóton deve ter para ocorrer a absorção. Sabemos que, em moléculas, conforme ocorrem as ligações entre orbitais atômicos, surgem grupos de orbitais classificados em ligantes e antiligantes, cuja energia cresce do orbital sigma ligante (σ) para o sigma antiligante (σ^*).

Sigma Ligante - σ: Orbital resultante de ligações simples, onde podem interagir orbitais atômicos s - s, s - p e p - p ligados no mesmo eixo linearmente, como na Figura 2.1.

(a) Orbitais s na molécula de H_2

(b) Orbitais p na molécula de N_2

Figura 2.1 *– Representação do orbital molecular* σ *nas moléculas de* H_2 *e* N_2*.*

Pi Ligante - π: Este orbital se origina da ligação dupla, quando os orbitais p - p se sobrepoem como na Figura 2.2.

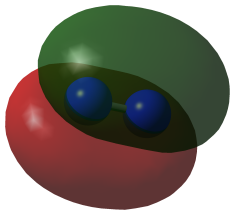


Figura 2.2 *– Representação do orbital molecular* π *na molécula de* N_2*.*

Orbitais não ligantes - n: Orbitais cuja ocupação por elétrons não altera a ordem de ligação entre os átomos envolvidos. Esses orbitais tem energias similar a dos orbitais atômicos. Estes orbitais podem ser ligantes em algumas regiões da molécula e não ligantes em outras.

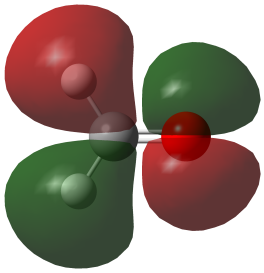


Figura 2.3 *– Representação do orbital molecular* ***n*** *na molécula de formaldeído.*

Sigma Antiligante - σ^*: Estes são orbitais de alta energia formados pela sobreposição de funções de onda com sinais opostos criando um plano nodal entre os orbitais, o que desestabiliza a molécula. Na Figura 2.4 vemos dois exemplos para moléculas de H_2 e N_2.

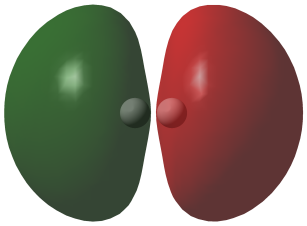


***Figura 2.4** – Representação do orbital molecular antiligante σ^* na molécula de H_2.*

Pi Antiligante - π^*: A combinação lateral de orbitais atômicos p que estejam com as funções de onda opostas gera um orbital molecular de alta energia chamados de pi antiligante (π^*). Na Figura 2.5 mostramos uma representação para a molécula de N_2.

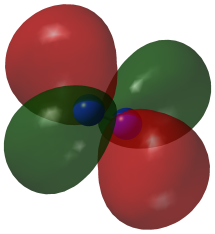


***Figura 2.5** – Representação do orbital molecular antiligante π^* na molécula de N_2.*

Existe ainda dois orbitais especiais que estão relacionados ao preenchimento das camadas no estado fundamental e ao primeiro orbital do estado excitado. São eles o HOMO, do inglês (Highest Occupied Molecular Orbital), e o orbital virtual chamado de LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) sendo esta a região onde ocorre as atividades espectroscópicas e reativas em muitas moléculas [8].

Quando a transição vertical não envolve a mudança da componente do spin, dizemos que é uma transição singleto-singleto cuja soma dos spins eletrônicos será S=0, quando a transição ocorre com mudança da orientação do spin do elétron, temos uma transição de estado tripleto para singleto ou vice-versa. Estas são transições proibidas, ja que pelas regras de seleção transições entre estados de multiplicidade diferente não são permitidas [9].

O movimento nuclear é governado por forças Coulombianas entre o núcleo e a nuvem eletrônica, isto é, o núcleo se move em uma resposta ao potencial criado pelos elétrons, esta

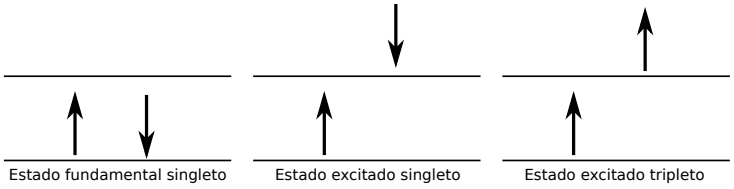


Figura 2.6 *– Esquema das transições eletrônicas singleto-singleto e singleto-tripleto*

é a aproximação de Born-Oppenheimer[10]. Baseado nesta aproximação podemos dar duas descrições para o princípio de Franck-Condon[8], a descrição clássica nos diz que durante a transição eletrônica o núcleo ficará estático fazendo com que a transição entre as superfícies de potencial seja uma transição vertical como na Figura 2.7.

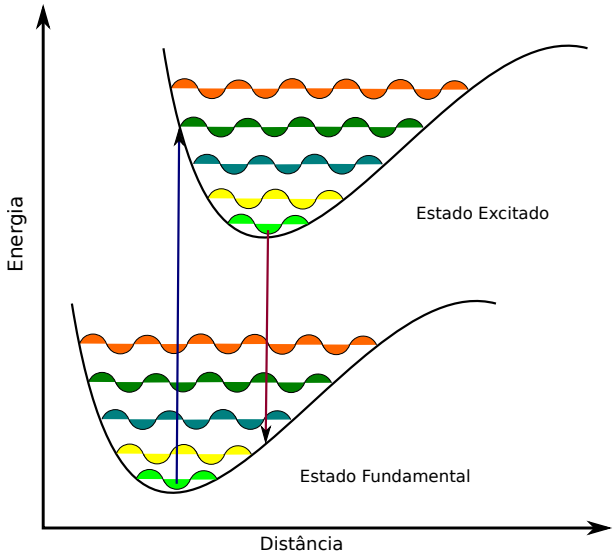


Figura 2.7 *– Esquema da transição de Franck-Condon.*

A descrição quântica nos diz que a transição vibrônica, ou seja, transição eletrônica e vibracional ao mesmo tempo acontece sem a quebra do princípio de Franck-Condon. Esta transição ocorre de um estado vibracional fundamental χ_A para um estado vibracional excitado χ_B, que são estados semelhantes. A justificativa dessa descrição é baseada no dipolo de transição entre os estados inicial e final, onde o operador momento de dipolo de transição $\hat{\mu}$ depende apenas da posição e cargas dos elétrons como segue abaixo:

$$\langle \Psi_1 \chi_A | \hat{\mu} | \Psi_2 \chi_B \rangle \tag{2.1}$$

Rearranjando a expressão (2.1) chegamos em:

$$\langle \Psi_1 | \hat{\mu} | \Psi_2 \rangle \langle \chi_A | \chi_B \rangle \tag{2.2}$$

O fator a direita da expressão (2.2) é o chamado fator de Franck-Condon e o primeiro termo que representa a transição eletrônica está relacionado com a força do oscilador. A força do oscilador, de grande interesse por ser obtida em cálculos de estrutura eletrônica é uma expressão adimensional que relaciona o momento de dipolo de transição (μ_{if}) com a integral da banda de absorção ($\mathscr{A}$), que é medida experimentalmente. O coeficiente de absorção ($\mathscr{A}$) é dado pela equação 2.3:

$$\mathscr{A} = \int \varepsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = \frac{h\tilde{\nu}}{c} N_A B = \frac{\pi \tilde{\nu} N_A |\hat{\mu}|^2}{3\varepsilon_0 \hbar c} \tag{2.3}$$

Na Equação 2.3 $\varepsilon(\tilde{\nu})$ representa o coeficiente de absorção molar que está relacionado a quanto a molécula é capaz de absorver luz em um dado número de onda ($\tilde{\nu} = \frac{2\pi}{\lambda}$), sendo deste modo ($\mathscr{A}$) expresso pela integral do coeficiente de absorção molar sobre todas as frequências. N_A é o número de avogadro, B é o coeficiente de Einstein, c a velocidade da luz e $\hbar$ a constante de Planck.

Levando em consideração o momento de dipolo de transição, a força do oscilador pode ser escrita na forma:

$$f = \frac{4\pi m_e \nu}{3e^2\hbar} |\langle \Psi_1 | \hat{\mu} | \Psi_2 \rangle|^2 \tag{2.4}$$

Onde $\hat{\mu}$ é o operador momento de dipolo para a transição estados ψ_1 e ψ_2, Sendo e a carga eletrônica e m_e é a massa do elétron. Combinando as equações (2.3) e (2.4) mostramos que a força do oscilador pode ser escrita como:

$$f = \frac{4 m_e c \varepsilon_0}{N_A e^2} \mathscr{A} \tag{2.5}$$

De modo prático a força do oscilador varia conforme as transições. Para transições $n \rightarrow \pi$,

os valores de ε da ordem de algumas centenas e $f \sim 10^{-3}$. Transições $\pi \rightarrow \pi^*$, ε e f tem valores muitos altos, sendo que quando $f \approx 1$ os valores de ε são da order de 10^5 [11].

2.2 Fluorescência

Existem várias formas de um elétron retornar ao estado de menor energia depois que está no estado excitado, onde é possivel ocorer ou não a emissão de luminescência[11]. Dentre os processos luminescentes o processo de interesse é o da fluorescência. O fenômeno da fluorescência é interessante pois assim como na maioria dos casos na absorção ótica ocorre uma transição eletrônica singleto-singleto, isto é, um processo permitido quando comparado a fosforescência.

Assim como na absorção ótica, na fluorescência ocorre uma transição vertical respeitando o princípio de Franck-Condon sendo o tempo de vida médio desde a absorção de um fóton até a emissão fluorescente da ordem de nanosegundos $\sim 10^{-9}s$[12]. Em geral após a promoção do elétron a um alto nível vibracional em um estado excitado S_n, tem-se a relaxação até o menor nível vibracional do primeiro estado excitado S_1 para então ocorrer a emissão de um fóton.

A emissão tem um comprimento de onda maior que o da absorção devido a perda de energia por relaxação vibracional. A diferença entre os picos de absorção e emissão é conhecida como deslocamento de Stokes. Os espectros de fluorescência podem ou não apresentar a estrutura vibracional através de vários picos sucessivos[12].

Outra característica é a chamada regra de Kasha que postula o rendimento quântico da fluorescência em geral independe do comprimento de onda de absorção. A explicação é que quanto maior a sobreposição das funções de onda vibracionais para moléculas excitadas mais rapidamente elas perdem energia através de conversão interna chegando ao menor nível vibracional do estado excitado S_1.

Características como posição espectral e diferença entre níveis vibracionais dos estados excitado (S_1) e fundamental (S_0) podem ser vistas a partir de experimentos de fluorescência

estática, porém quando desejamos descobrir tempo de vida e rendimento quântico obtemos estes dados a partir de experimentos envolvendo fluorescência resolvida no tempo.[12]

3 *Bases Teóricas Computacionais*

Neste capítulo iremos abordar algumas teorias e modelos utilizados para a realização de simulações computacionais em sistemas biomoleculares, sendo o objetivo central dar suporte ao trabalho desenvolvido expondo os assuntos tratados de forma simplificada. Métodos de química quântica como Hartree-Fock-Roothaan, DFT e modelos de solvente constituem a primeira parte do capítulo. A complementação é feita tratando das teorias de aproximação utilizadas em simulações por Dinâmica Molecular (DM), tais como: termostato e barostato, algorítmos de *Verlet* e *Leap-frog*, campo de força e condições de contorno.

3.1 Mecânica Molecular Quântica

Em 1900 houve uma grande revolução na física, o nascimento da física quântica que culminou na moderna Mecânica Quântica (MQ)[13]. A história da MQ começa com a quantização de energia proposta por Planck, passando pela teoria de Einstein para fóton, o entendimento da dualidade onda-partícula da luz, as ondas de matéria de de Broglie, os primeiros modelos atômicos até chegar na MQ propriamente dita com a equação de Schrödinger em 1925.

Erwin Schrödinger, usando as idéias de *de Broglie* desenvolveu uma equação diferencial cuja solução é chamada de função de onda, que contém toda a informação sobre o sistema quântico. Esta equação inicial descreve a evolução no tempo de um determinado estado quântico para um sistema físico[13]. No entanto podemos usar uma versão para estados estacionários da equação de Schrödinger cuja solução é uma função de onda dependente apenas das coordenadas espaciais.

$$\left[\frac{-\hbar}{2m_e}\nabla^2 + V(\vec{r})\right]\Psi(\vec{r}) = E\Psi(\vec{r}) \tag{3.1}$$

A resolução da equação 3.1 é relativamente simples quando usamos potenciais simples ou sistemas monoeletrônicos como o caso do átomo de hidrogênio. No entanto quando desejamos tratar problemas mais complexos como átomos multieletrônicos e moléculas, devemos recorrer a teorias específicas como Hartree-Fock (HF) e Teoria do Funcional Densidade (DFT). Foram elas que fizeram avançar muito o entendimento sobre a estrutura eletrônica. Para entendimento da teoria de Hartree-Fock-Roothann iniciamos pelo estudo da aproximação de Born-Oppenheimer.

3.1.1 Aproximação de Born-Oppenheimer

A aproximação de Born-Oppenheimer (BO) apresentada em 1927 [14, 15], é utilizada para desacoplar o movimento nuclear do movimento eletrônico. O desacoplamento elétron-núcleo vai possibilitar a aplicação de um tratamento quântico aos elétrons e um tratamento clássico ao núcleo[16]. Este desacoplamento é permitido pois a massa do núcleo é muito maior que a massa do elétron ($m_N \gg m_e$) o que torna o movimento do núcleo muito lento em relação ao do elétron, desta forma podemos considerar que o núcleo se move sobre uma superfície potencial criada pelos elétrons. Faremos uma demonstração da aproximação BO considerando um sistema com L núcleos e M elétrons, para isto devemos considerar o Hamiltoniano total do sistema (H) que é composto pelos termos energia cinética eletrônica (T^e) energia cinética nuclear (T^N) e potenciais de interação núcleo-núcleo ($V_{NN}(\vec{R})$), elétron-núcleo ($V_{eN}(\vec{r};\vec{R})$) e elétron-elétron ($V_{ee}(\vec{r};\vec{R})$).

Temos então o Hamiltoniano do sistema:

$$H = T^e + T^N + V_{NN} + V_{eN} + V_{ee} \tag{3.2}$$

De forma que reescrevendo explícitamente a equação (3.2) temos:

$$H = -\sum_{i=1}^{M} \frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla^2 - \sum_{j=1}^{L} \frac{-\hbar^2}{2m_N}\nabla^2 + V_{NN}(\vec{R}) + V_{eN}(\vec{r};\vec{R}) + V_{ee}(\vec{r};\vec{R}) \tag{3.3}$$

Aplicando a equação (3.1) chegamos em:

$$H\Psi(\vec{r},\vec{R}) = E\Psi(\vec{r},\vec{R}) \tag{3.4}$$

A idéia central da função de onda molecular é que ela pode ser substituída pela multiplicação das funções de onda nuclear vezes a função de onda eletrônica ($\Psi_{Molécula} = \psi_{elétron}\chi_{núcleo}$), deste modo supomos então uma solução da forma:

$$\Psi(\vec{r},\vec{R}) = \psi(\vec{r};\vec{R})\chi(\vec{R}) \tag{3.5}$$

Neste caso ψ será a função de onda eletrônica que depende parametricamente da posição nuclear e χ será a função de onda nuclear. Substituindo a equação (3.5) na equação (3.4) obtemos:

$$H\psi\chi = -\frac{\hbar^2}{2m_e}\sum_{i=1}^{M}\chi\nabla^2\psi - \sum_{j=1}^{L}\frac{\hbar^2}{2m_N}\left[\psi\nabla^2\chi + \nabla^2\psi\chi + 2\nabla\psi\nabla\chi\right] + \left[V_{NN} + V_{eN} + V_{ee}\right]\psi\chi \tag{3.6}$$

A massa nuclear é muito maior que a massa eletrônica, de forma que a contruibuição dos termos ($\nabla^2\psi\chi + 2\nabla\psi\nabla\chi$) são muito pequenas e podem ser desprezadas, utilizando assim a aproximação:

$$-\sum_{j=1}^{L}\frac{\hbar^2}{2m_N}\left[\psi\nabla^2\chi + \nabla^2\psi\chi + 2\nabla\psi\nabla\chi\right] \approx \sum_{j=1}^{L}\frac{\hbar^2}{2m_N}\psi\nabla^2\chi \tag{3.7}$$

Utilizando a aproximação da equação (3.7) fica:

$$-\sum_{i=1}^{M}\chi\nabla^2\psi-\sum_{j=1}^{L}\frac{\hbar^2}{2m_N}\psi\nabla^2\chi+\left[V_{NN}+V_{eN}+V_{ee}\right]\psi\chi=E\psi\chi \tag{3.8}$$

Substituindo a equação (3.5) em equação (3.4) com o uso do Hamiltoniano que é dado pela equação (3.2) obtemos

$$\left[T^e+T^N+V_{NN}+V_{eN}+V_{ee}\right]\psi\chi=E\psi\chi \tag{3.9}$$

Reorganizando a equação acima e dividindo pela equação (3.5) chegaremos a duas equações dependentes apenas de uma variável:

$$\frac{T^e\psi(\vec{r};\vec{R})+V_{eN}\psi(\vec{r};\vec{R})+V_{ee}\psi(\vec{r};\vec{R})}{\psi(\vec{r};\vec{R})}=E-\frac{T^N\chi(\vec{R})+V_{NN}\chi(\vec{R})}{\chi(\vec{R})} \tag{3.10}$$

Igualando o lado esquerdo da equação a uma função $\varepsilon(\vec{R})$

$$[T^e+V_{eN}+V_{ee}]\psi(\vec{r};\vec{R})=\varepsilon(\vec{R})\psi(\vec{r};\vec{R}) \tag{3.11}$$

A solução acima nos fornece um auto valor $\varepsilon(\vec{R})$ para cada auto função $\psi(\vec{r};\vec{R})$ correspondente ao hamiltoniano eletrônico $T^e+V_{eN}+V_{ee}$. Para cada auto valor encontrado na equação (3.11) teremos uma nova auto função para o núcleo dada pela equação:

$$[T^N+V_{NN}+\varepsilon(\vec{R})]\chi(\vec{R})=E\chi(\vec{R}) \tag{3.12}$$

Deste modo desacoplamos os movimentos eletrônico e nuclear o que facilita grandemente os cálculos computacionais, essa será a base utilizada para a teoria de Hartree-Fock que é explicada no próximo tópico.

3.1.2 Teoria de Hartree-Fock-Roothaan

Após a aproximação BO, o tratamento de sistemas multieletrônicos se dividiu em duas partes (nuclear e eletrônica), surgiu então a necessidade do desenvolvimento de métodos capazes de resolver o problema de sistemas de muitos elétrons. Um tratamento proposto foi considerar um sistema de N partículas como N sistemas de uma partícula, e o potencial elétron-elétron tratado como o campo médio do sistema de N-1 elétrons, ou seja, um elétron vai sentir o campo médio efetivo produzido pelos outros elétrons. Utilizando estes princípios, Douglas R. Hartree propôs uma aproximação para a equação de Schrödinger, (equação (3.1)), onde a energia do sistema de N-elétrons seria dada pela soma das auto-energias dos N sistemas de um elétron menos um termo de repulsão intereletrônico.

$$H_i\Psi(\vec{r}_i) = \sum_{i=1}^{N} h_i\Psi(\vec{r}_i) \tag{3.13}$$

Um passo importante de Hartree foi definir um termo para a repulsão eletrônica como o campo médio produzido pelos N-1 elétrons contidos no sistema.

$$V_{ee} = \sum_{j=i} \int \frac{\psi_j^* \psi_j}{r_{ij}} dr_j \tag{3.14}$$

Nesta proposição a energia potencial é contabilizada duas vezes, de modo que devemos subtraí-la da energia total.

$$E_{eletrônica} = \sum_{i=1}^{N} \varepsilon_i - \sum_{i=1}^{N} V_i(ee) \tag{3.15}$$

A componente potencial eletrônica é de caráter puramente coulombiano. Outra proposição é que a função de onda do sistema seria dada pelo produto das funções de onda do sistema, este produto é conhecido como produto de Hartree.

$$\Psi(\vec{r}_i) = \prod_{i=1}^{N} \psi(\vec{r}_i) = \psi_1(\vec{r}_1)\psi_2(\vec{r}_2)\cdots\psi_N(\vec{r}_N) \tag{3.16}$$

Onde $(\vec{r}_1)$ representa a posição do elétron. O produto de Hartree no entanto não garante por si só que a função de onda seja anti-simétrica, ou seja, a troca de dois elétrons de posição altera o sinal da função.

$$\Psi(\vec{r}_1,\vec{r}_2,\vec{r}_3\cdots\vec{r_{i-1}}\vec{r}_i) = -\Psi(\vec{r}_1,\vec{r}_3,\vec{r}_2\cdots\vec{r_{i-1}}\vec{r}_i) \tag{3.17}$$

A solução desde problema foi resolvida por Vladimir A. Fock que introduziu a utilização do determinante de Slater que considera funções spin-orbital $\chi_i(x_i)$. Desta forma incluímos a indistiguibilidade eletrônica e criamos obrigatoriamente funções de onda anti-simétricas.

Logo o determinante de Slater fica:

$$\Psi(x_1,x_2,...N) = \left(\frac{1}{N!}\right)^{1/2} \begin{vmatrix} \chi_a(x_1) & \chi_b(x_1) & \cdots & \chi_z(x_1) \\ \chi_a(x_2) & \chi_b(x_2) & \cdots & \chi_z(x_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_a(x_N) & \chi_b(x_N) & \cdots & \chi_z(x_N) \end{vmatrix} \tag{3.18}$$

Reescrevendo o determinante em uma forma mais compacta e elegante com a notação de Dirac.

$$\Psi(x_1,x_2,...N) = \left(\frac{1}{N!}\right)^{1/2} det|\chi_1\chi_2\cdots\chi_N| \tag{3.19}$$

$$\Psi(x_1,x_2,...N) = |\chi_1\chi_2\cdots\chi_n\rangle \tag{3.20}$$

Os spin-orbitais podem ser descritos como uma função dependente da posição vezes a função de spin: $\chi_i(x_i) = \psi(\vec{r}_i)\alpha(i)$ ou $\chi_i(x_i) = \psi(\vec{r}_i)\beta(i)$, onde α e β significam spin para cima e para baixo respectivamente.

Para encontrar o melhor conjunto de spin-orbitais e consequentemente a energia do estado fundamental, fazemos a minimização de energia usando a teoria variacional que envolve a razão

de Rayleigh.

$$\varepsilon = \frac{\langle \psi | H | \psi \rangle}{\langle \psi | \ \psi \rangle} \tag{3.21}$$

Neste caso os spin-orbitais são considerados ortonormais. O procedimento de minimização leva as equações de Hartree-Fock para os spin-orbitais. Fock introduziu operador de Fock para um spin-orbital.

$$f_i = h_i + \sum_u \{2J_u(i) - K_u(i)\} \tag{3.22}$$

onde h_i é o chamado hamiltoniano de caroço para um elétron, o operador Coulombiano $J_u(i)$ e operador de troca $K_u(i)$ são representados por:

$$J_u(1)\chi_a(1) = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0}\left[\int \chi_u(2)^* \frac{1}{r_{12}}\chi_u(2)dx_2\right]\chi_a(1) \tag{3.23}$$

Esta equação é semelhante a equação (3.14) proposta por Hartree, de modo que ela reflete o campo médio que o elétron *i* percebe dos outros N-1 elétrons. O outro termo chamado operador de troca é dado por:

$$K_u(1)\chi_a(1) = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0}\left[\int \chi_u(2)^* \frac{1}{r_{12}}\chi_a(2)dx_2\right]\chi_u(1) \tag{3.24}$$

O operador de troca está relacionado à correlação de spin eletrônico e só está presente para elétrons com mesmo spin. Logo a equação de Hartree-Fock pode ser escrita.

$$f\,|\chi_a\rangle = \varepsilon_a\,|\chi_a\rangle \tag{3.25}$$

Onde ε_a é a energia do spin-orbital e f é o operador de Fock.

Resolve-se a equação de Hartree-Fock interativamente a partir de uma função spin-orbital teste e usando o operador de Fock, a solução fornece novos spin-orbitais e então são recons-

truídas as equações de Hartree-Fock com esses valores, este procedimento auto consistente é realizado até atingir os critérios de convergência.

O operador de Fock é dependente dos n spin-orbitais ocupados, podendo ser considerado um operador hermiteano ele terá infinitos spin-orbitais e auto-valores. A resolução pratica da equação (3.25) considera um número finito m de spin-orbitais onde $m \geq n$. Ao final da minimização auto consistente os spin-orbitais são arrumados em nível crescente de energia, os n spin-orbitais de mais baixa energia são chamados orbitais ocupados. Os outros orbitais são chamados orbitais virtuais [8].

O procedimento até então apresentado foi bastante útil na resolução de problemas de átomos, pois estes tem simetria esférica, trabalhar com moléculas era extremamente complicado computacionalmente devido a perda de simetria, foi então que Clemens C. J. Roothaan melhorou a técnica empregando o uso de conjunto de funções de base para expandir os spin-orbitais. Deste modo o trabalho se transforma em um problema matricial que pode ser resolvido por manipulações de matrizes, de modo que podemos reescrever a equação de Hartree-Fock na forma:

$$f_1 \psi_a(1) = \varepsilon_a \psi_a(1) \tag{3.26}$$

Neste caso o operador de Fock, equação (3.22), é expresso em termos apenas espaciais. De modo que suas componentes coulombianas e termo de troca são reescritos.

$$J_u(1)\psi_a(1) = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0}\left[\int \psi_u(2)^* \frac{1}{r_{12}} \psi_u(2) dx_2\right] \psi_a(1) \tag{3.27}$$

$$K_u(1)\psi_a(1) = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0}\left[\int \psi_u(2)^* \frac{1}{r_{12}} \psi_a(2) dx_2\right] \psi_u(1) \tag{3.28}$$

A função ψ passa a ser considerada uma expansão de M funções de base, assim o problema se torna tratável por técnicas matriciais.

$$\psi_i = \sum_{j=1}^{M} c_{ji}\phi_j \tag{3.29}$$

onde ϕ_j são as funções de bases conhecidas e c_{ji} são os coeficientes procurados. A busca por um melhor conjunto de funções de bases é um trabalho árduo, haja visto que podem existir inúmeras configurações possíveis para um melhor conjunto.

Para encontrar os coeficientes c_{ji} devemos substituir a equação (3.29) na equação (3.26).

$$f_1 \sum_{j=1}^{M} c_{ja}\phi_j(1) = \varepsilon_a \sum_{j=1}^{M} c_{ja}\phi_j(1) \tag{3.30}$$

Multiplicando ambos os lados da equação por ϕ_i^* e integrando.

$$\sum_{j=1}^{M} c_{ja} \int \phi_j(1)^* f_1 \phi_j(1) d\vec{r}_1 = \varepsilon_a \sum_{j=1}^{M} c_{ja} \int \phi_j(1)^* \phi_j(1) d\vec{r}_1 \tag{3.31}$$

Podemos escrever a equação acima de forma mais compacta introduzindo a matriz de sobreposição **S**.

$$S_{ij} = \int \phi_j(1)^* \phi_j(1) d\vec{r}_1 \tag{3.32}$$

onde os elementos da matriz de sobreposição S_{ij} possuem magnitude $0 \leqslant S_{ij} \leqslant 1$. Outra matriz que podemos definir é a matriz de Fock **F**.

$$F_{ij} = \int \phi_j(1)^* f_1 \phi_j(1) d\vec{r}_1 \tag{3.33}$$

Reescrevendo a equação (3.31):

$$\sum_{j=1}^{M} F_{ij} C_{ij} = \varepsilon_a \sum_{j=1}^{M} S_{ij} C_{ij} \tag{3.34}$$

A equações de Roothaan, (3.32) e (3.33) podem ser utilizadas para escrever uma equação

matricial.

$$\mathbf{F}C = \mathbf{S}C\varepsilon \tag{3.35}$$

onde a matriz dos coeficientes C_{ij} é uma matriz M x M.

$$C = \begin{pmatrix} C_{11} & C_{12} & \dots & C_{1k} \\ C_{21} & C_{22} & \dots & C_{2k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ C_{k1} & C_{k2} & \dots & C_{kk} \end{pmatrix} \tag{3.36}$$

De modo semelhante escrevemos uma matriz M x M diagonal para a auto-energia ε_a.

$$\varepsilon = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \varepsilon_k \end{pmatrix} \tag{3.37}$$

A solução das equação (3.35) pode ser feita através de um determinante secular:

$$det|\mathbf{F} - \varepsilon_a \mathbf{S}| = 0 \tag{3.38}$$

O processo acima é realizado de forma a atingir os critérios de convergência, buscando valores para os coeficientes C_{ij} pela solução das equações seculares, e as auto-energias dos orbitais ε_a pelo determinante secular.

3.1.3 Conjuntos de Bases

A busca por um conjunto de bases satisfatórias para cálculos *Ab Initio* está relacionada diretamente ao modelo que melhor representa um orbital molecular. Em princípio poderíamos utilizar um conjunto completo de funções de bases para representar um orbital molecular, mas

este procedimento é computacionalmente impossível, então recorremos a conjuntos com determinadas características e a medida que necessitamos obter novas propriedades adicionamos funções de bases a esses conjuntos para melhor representar o sistema estudado.

A energia total de um conjunto completo de bases é chamada de energia do limite de Hartree-Fock, que é diferente da energia da molécula em estado fundamental, pois não leva em consideração a correlação eletrônica sendo portanto a energia de Hartree-Fock maior que a energia da molécula.

As primeiras funções utilizadas para construção de um orbital atômico conforme a equação (3.29), foram chamadas de Orbitais Tipo Slater (STO) [17]. As STOs possuem a forma exponencial descrescente centrada no núcleo.

$$\Psi_{\zeta,n,l,m_l}(r,\theta,\phi) = NY_{l,m_l}(\theta,\phi)r^{n-1}e^{-\zeta r} \tag{3.39}$$

onde N é a constante de normalização e Y_{l,m_l} são os harmônicos esféricos. Outro tipo de funções proposta foram as funções Orbitais Tipo Gaussianas (GTO), que possuem forma semelhante as funções STO. Inicialmente podemos escrever as funções GTO em dois sistemas de coordenadas: esféricas e cartesianas.

$$\Psi_{\zeta,n,l,m_l}(r,\theta,\phi) = NY_{l,m_l}(\theta,\phi)r^{2n-2-l}e^{-\zeta r^2} \tag{3.40}$$

$$\Psi_{\zeta,n,l,m_l}(r,\theta,\phi) = NX^{l_x}Y^{l_y}Z^{l_\}}e^{-\zeta r^2} \tag{3.41}$$

Neste caso a forma do orbital muda conforme os valores que l_x, l_y e l_z assumem. Quando $l_x = l_y = l_z = 0$ forma-se um orbital tipo **s**, quando $l_x + l_y + l_z = 1$ temos um orbital do tipo **p** e assim por diante [18]. As diferenças referentes ao sistema de coordenadas nas funções gaussianas é que quando utilizado o sistema de coordenadas cartesianas precisamos de maior número de funções para representar um mesmo orbital em relação às funções em coordenadas esféricas, diminuindo o custo computacional.

Existem diferenças nas formas das funções STO e GTO, sendo as funções gaussianas são contínuas em zero sendo assim elas não representam bem propriedades próximas do núcleo. Uma desvantagem das funções gaussianas é que como decaem mais rapidamente que funções de Slater elas representam de forma menos precisa a cauda das funções de onda. Além do que é necessário uma maior quantidade de funções GTO para descrever um sistema.

Uma propriedade importante das funções GTO é que o produto de duas gaussianas com centros diferentes, é equivalente a uma gaussiana centrada em um ponto entre os centros, o que facilita os cálculos computacionais [8].

Algumas classificações são dadas aos diversos conjunto de bases, o conjunto de base minímo é igual ao número de orbitais atômicos, considerando-se todos os orbitais da última camada, mesmo os semi-preenchidos ou vazios, as triplo zeta (TZ) triplicam o número mínimo de bases e assim por diante. Com a necessidade de representar melhor a camada de valência, pois é nela onde ocorre as ligações químicas, surgiram as funções de bases de valências duplo zeta (VDZ), que são funções *DZ* aplicadas apenas na camada de valência.

Pode-se adicionar também polarização para dar uma maior flexibilidade aos orbitais moleculares, isto é feito através da adição de funções de base com pelo menos um número quântico secundário maior, por exemplo a uma função de base **s** adiciona-se uma função de base **p**, ou então a partir de uma função de base **p**, adiciona-se uma função de base **d** para inserir a polarização e assim sucessivamente [19].

Formação de Conjuntos de Bases

A construção de um conjunto de bases é realizada através de uma combinação linear de funções usadas para descrever um orbital molecular. Existem vários conjuntos de bases utilizados que apresentam características comentadas acima. O conjunto mínimo de bases mais conhecido é **STO-nG**, onde o $n = 2 - 6$. Neste conjunto de bases há um ajuste de uma STO através de n-GTOs. Atualmente este conjunto é pouco utilizado pois apresenta resultados não satisfatórios quando comparados com dados experimentais. Como no exemplo:

STO-3G Indica que são utilizadas 3 gaussianas para representar uma função de Slater.

O conjunto das bases de Pople, um conjunto *Slipt-valence*, **a-bcdG**, são conhecidos por terem na camada de valência funções DZ ou TZ. Nesta representação "**a**"indica a quantidade de gaussianas utilizadas para descrever o caroço, **bcd** indicam a quantidade de gaussianas para descrever a parte interna, média e externa da camada de valência. Alguns exemplos são:

3-21G Esta função de base utiliza 3 funções gaussianas para o caroço, 2 funções gaussianas para a parte interna da camada de valência e 1 função para a parte externa da camada de valência.

6-311G Esta função de base utiliza 6 funções gaussianas para o caroço, 3 funções gaussianas para a parte interna, 1 função para a parte média e 1 gaussiana para a parte externa da camada de valência.

Existe a possibilidade de adicionar funções de difusão às bases através da inclusão de um sinal (+) para átomos pesados e (++) para hidrogênios. A adição de funções de polarização nas bases de Pople é possível. Para isto algumas regras devem ser seguidas conforme os exemplos:

6-31G* ou 6-31G(d) Adiciona-se uma função **d** nos átomos pesados.

6-31+G* Adiciona-se além da polarização (d) ou *, funções difusas que aumentam os orbitais. Geralmente utilizadas para ânions.

6-31G ou 6-31G(d,p)** Adiciona-se uma função **d** nos átomos pesados e uma função **p** nos hidrogênios.

6-31++G(d,p) Adiciona-se funções de polarização (d,p) e funções de difusão (++) ao sistema inteiro (átomos pesados e hidrogênios).

6-311G(3df,3pd) Adiciona-se 3 funções **d** mais uma função **f** nos átomos pesados e 3 funções **p** mais uma função **d** aos hidrogênios. Esta é a máxima polarização que podemos colocar em uma base de Pople.

Os conjuntos descritos são os mais conhecidos. Atualmente outros modelos estão sendo bastante explorados tais como o conjunto de Ahlrichs (SV, TZVP, QZVP) [20, 21, 22], o conjunto de correlação consistente desenvolvido por Dunning (cc-pVxZ), onde $x = D, T, Q, 5, 6$ [23] e o conjunto de bases polarizado consistentemente (PC-n), onde $n = 0, 1, 2, 3, 4$ [24, 25]. No caso das bases cc-pVxZ pode-se adicionar funções difusas colocando o prefixo *Aug*.

3.1.4 Teoria do Funcional Densidade - (DFT)

Outro caminho para resolver a equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos é a partir da Teoria do Funcional Densidade (DFT - do inglês Density Functional Theory). O DFT tem se tornado uma forte alternativa para resolução dos problemas envolvendo muitos elétrons pois em comparação com outros métodos *ab initio* apresenta uma melhor performance quanto ao tempo e espaço em memória utilizada[26]. A idéia do DFT é o uso da função densidade eletrônica $\rho(r)$.

Em 1964 Hohenberg e Kohn publicaram um trabalho sobre gás de elétrons não-homogêneos que foi a base conceitual da teoria DFT[27], onde foram enunciados dois teoremas:

Teorema 1 O potencial externo $V_{ext}(r)$ percebido pelos elétrons é um funcional único da densidade eletrônica do estado fundamental $S_0(r)$.

Teorema 2 A energia do estado fundamental $E_0[n]$ é mínima para a densidade eletrônica $\rho(r)$ exata.

assim, lembrando que o Hamiltoniano de um sistema pode ser escrito como a soma das energias potencial, cinética e potencial externo:

$$H = T + U + V \tag{3.42}$$

podemos escrever a energia do sistema na forma:

$$E_V[\rho(\vec{r})] = \int v(\vec{r})\rho(\vec{r})dr + F[\rho] \tag{3.43}$$

onde F é um funcional universal dependente de ρ. A equação 3.43 em conjunto com o Teorema 2, nos diz que qualquer outra função densidade que não seja exata, elevará a energia E_V.

Os teoremas de Hohenberg-Kohn apenas diz que existe um funcional densidade mas não diz a sua forma. Então em 1965 Kohn-Sham propõem um método para encontrar este funcional.

Equações de Kohn-Sham

Pela proposta de Kohn-Sham podemos escrever a equação 3.43 na forma:

$$E[\rho] = -\frac{\hbar^2}{2m_e}\sum_{i=1}^{n}\int \psi_i^*(\vec{r}_1)\nabla_1^2\psi(\vec{r}_1)d\vec{r}_1 - j_0\sum_{I=1}^{N}\frac{Z_I}{r_{I1}}\rho(\vec{r})d\vec{r} + \frac{1}{2}\int\int\frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{\vec{r_{12}}}d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{XC}[\rho] \tag{3.44}$$

onde o primeiro termo é a energia cinética de um sistema de *n* partículas que não interagem; o segundo termo é a energia de atração elétron-núcleo sobre todos os núcleos; o terceiro termo representa a interação de Coulomb e o último termo representa a energia de troca-correlação. O termo $E_{XC}[\rho]$ é o único que não conhecemos a forma, logo neste funcional encontram-se as aproximações da DFT.

É necessário a minimização da energia para encontrar a função densidade, fazemos isto aplicando o princípio variacional na equação 3.44 e escrevemos as equações de Kohn-Sham para um orbital $\psi_i(\vec{r}_1)$.

$$\left\{-\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_1^2 - j_0\sum_{I=1}^{N}\frac{Z_I}{r_{I1}} + j_0\int\frac{\rho(\vec{r}_2)}{\vec{r_{12}}}d\vec{r}_2 + V_{XC}(\vec{r}_1)\right\}\psi_i(\vec{r}_i) = \varepsilon_i\psi_i(\vec{r}_i) \tag{3.45}$$

Nesta equação, o potencial de troca-correlação $V_{XC}(\vec{r}_1)$ pode ser obtido como a derivada da energia de troca-correlação:

$$V_{XC}[\rho] = \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho} \tag{3.46}$$

As aproximações de Kohn-Sham focam em cima deste potencial, se nós sabemos qual é a energia E_{XC} podemos encontrar o potencial V_{XC}. A solução da equação 3.45 é feita de modo auto-consistente, de modo que as aproximações para os orbitais de Kohn-Sham são feitas a partir de conjuntos de bases para orbitais atômicos (seção 3.1.2). A vantagem computacional do DFT está no fato de que o tempo computacional para realização das simulações escalona formalmente com a terceira potência do número de funções dos conjuntos de bases (M^3), enquanto Hartree-Fock com (M^4).

Existem várias aproximações para a energia de troca-correlação E_{XC}, sendo a primeira aproximação chamada de aproximação local da densidade (LDA, do inglês Local Density Approximation):

$$E_{XC}^{LDA} = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{XC}^{LDA}[\rho(\vec{r})] d\vec{r} \tag{3.47}$$

Neste caso, $\varepsilon_{XC}^{LDA}[\rho(\vec{r})]$ representa a energia por elétron. O funcional LDA considera um gás homogêneo de elétrons com densidade ρ, onde a densidade no ponto $\vec{r}$ só depende da densidade no mesmo ponto.

Outro tipo de funcional existente é a aproximação de gradientes generalizados (GGA, do inglês Generalized Gradient Approximation):

$$E_{XC}^{GGA} = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{XC}^{GGA}[\rho(\vec{r}), |\nabla \rho(\vec{r})|] d\vec{r} \tag{3.48}$$

onde $\varepsilon_{XC}^{GGA}[\rho(\vec{r}), |\nabla \rho(\vec{r})|]$ representa a energia em cada ponto, levando em consideração não apenas a densidade local, mas também o gradiente da densidade em $\vec{r}$. Este grupo de funcionais foram criados para considerar a não homogeneidade de um gás de elétrons, sendo portanto uma melhoria do funcional LDA.

Alguns funcionais são criados a partir da combinação de GGA's e LDA's como PBE, BLYP dentre outros. Existem ainda os chamados funcionais híbridos que trabalham com termos de troca da metodologia Hartree-Fock em conjunto com funcionais DFT. Um funcional híbrido bastante conhecido é o B3LYP, que foi utilizado neste trabalho.

Usamos também os chamados funcionais de longo alcance, que são modelados para trabalhos onde envolva excitações eletrônicas para orbitais de alta energia, sendo que neste trabalho utilizamos o funcional CAM-B3LYP.

DFT dependente do tempo (TD-DFT)

Quando se deseja obter informações de sistemas dependentes do tempo como os espectros de absorção, utiliza-se a teoria do funcional densidade dependente do tempo (TD-DFT). Esta teoria expande a equação 3.45 para um sistema onde $\psi(\vec{r},t)$ passa a depender não apenas da posição mas do tempo. Assim como o potencial de troca-correlação passa a ser dependente do tempo também $V_{xc}(\vec{r},t)$. Deste modo reescrevemos a equação 3.45 da forma:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_1^2 - j_0\sum_{I=1}^{N}\frac{Z_I}{r_{I1}} + j_0\int\frac{\rho(\vec{r_2},t)}{r_{12}}d\vec{r_2} + V_{XC}(\vec{r_1},t) + V_{ext}(t) \right\}\psi_i(\vec{r_1},t) = i\hbar\frac{\partial}{\partial t}\psi_i(\vec{r_1},t) \tag{3.49}$$

$$\rho(\vec{r},t) = \sum_{i=1}^{n}|\psi_i(\vec{r},t)|^2 \tag{3.50}$$

onde o potencial externo $V_{ext}(t)$ pode ser por exemplo um campo eletromagnético oscilante[8].

A idéia por trás do TD-DFT foi a generalização feita por Runge e Gross [28], indicando que existe uma correspondência unívoca ente a densidade $\rho(\vec{r},t)$ e o potencial dependente do tempo $V_{ext}(t)$, de modo que se conhecemos a densidade dependente do tempo, conhecemos também o potencial externo, logo podemos determinar todos os observáveis calculados a partir do Hamiltoniano [29].

3.1.5 Modelos de Solvente

Descrever a estrutura eletrônica de moléculas em fase gasosa é relativamente fácil, porém quando necessitamos de propriedades onde a interação com o solvente é relevante como por exemplo absorção ótica, temos certa dificuldade para realização desses cálculos. Para resolver esses problemas surgem alguns modelos de solvente.

Podemos tratar o solvente como um meio contínuo e o soluto estando dentro de uma cavidade apropriada, este é modelo de solvente implícito[30] e é resolvido pelas leis da mecânica quântica. Ainda com métodos de mecânica quântica é possível tratar o solvente de forma mista onde irá ter uma camada de solvatação em torno do solvente e a vizinhança é tratada como um meio dielétrico contínuo[31]. Quando desejamos tratar o solvente de forma explícita, devemos considerar soluto e solvente como clássicos e resolver por leis de mecânica clássica, este modelo é conhecido como modelo de solvente explícito. Existe ainda a possibilidade de usar o soluto quântico e o solvente clássico, conhecida como QM/MM.

Modelos de Solvente Implícito

A idéia básica da representação de um solvente de forma implícita é a utilização de parâmetros como a constante dielétrica (ε) e utilizá-la como ”plano de fundo”para o sistema estudado ou seja, a molécula a ser estudada está imersa em um meio contínuo com determinada constante ε, dentre outros parâmetros. A ”energia de solvatação”de uma molécula em um meio dielétrico é diferente da energia em fase gasosa e os diferentes métodos de ajuste tentam aproximar este valor calculado do valor experimental.

Os modelos mais simplificados para inclusão de efeitos de solvente são baseados em cavidades como o modelo de Onsager onde é considerado o dipolo da molécula em uma cavidade esférica. Um modelo semelhante é o da cavidade elíptica desenvolvido por Kirkwood-Westheimer onde além da forma da cavidade, passam a considerar ordens maiores de multipolos. Apesar da importância e melhorias que esses modelos proporcionaram ser indiscutível, esbarramos no fato que nem todas moléculas tem forma esférica ou elipsoidal desta forma surge

a necessidade de modelos mais reais como os *Self-Consistent Reaction Field* (SCRF).

Uma mudança importante é que nos modelos SCRF não utilizamos cavidades englobando toda a molécula mas englobando os átomos. Cavidades que utilizam a isodensidade são formadas a partir da função densidade eletrônica, onde se forma uma superfície bastante parecida com a superfície molecular. Modelos mais sofisticados como o *Pisa Polarizable Continuum Model* (PCM), constroem a cavidade através da sobreposição de pequenas cavidades de van der Waals centradas no núcleo atômico possibilitando uma melhor aproximação com a realidade. Outro modelo de interesse é o *COnductor-like Screening MOdel* (COSMO), que representa o potencial eletrostático da cavidade por um conjunto de pontos relacionados a carga parcial dos átomos.

As possibilidades de utilização de meios contínuos para representar solventes é bastante ampla, porém alguns fatores que devem ser levados em consideração é que esses modelos não tratam interações mais específicas como ligações de hidrogênio. O ajuste teoria-experimento ainda é complicado, pois trabalha com valores muito pequenos como por exemplo energias de hidratação. Contudo para uma descrição quântica mais detalhada devemos recorrer a utilização de outros métodos como a dinâmica molecular quântica como o CPMD [32],EFP [33] ou recorrer à microhidratação onde já se utiliza desde poucas moléculas numa região de interesse até algumas camadas de solvatação. No entanto estas implementações demandam um elevado custo computacional.

3.2 Mecânica Molecular Clássica

O tratamento de um sistema biológico pela mecânica quântica torna-se dificil à medida em que aumentam o número de átomos, sendo uma alternativa o uso da DM para realização dessas simulações. Uma vantagem relacionada à DM está no fato de poder tratar explícitamente um grande número de átomos, predizer propriedades como ligações de hidrogênio e número de coordenação, além de tratar o sistema considerando temperatura e pressão. No entanto temos algumas desvantagens como o não tratamento dos elétrons, não se pode estudar reações

químicas ou então realizar um estudo sobre transição eletrônica com essas técnicas.

Na DM resolve-se as equações de movimento de Newton para um conjunto de átomos que estão submetidos à um potencial. A resolução deste sistema pode ser feita em termos do Hamiltoniano H como uma soma de energia cinética e potencial:

$$H = \sum_i K_{P_i} + \sum_{i,j} U_{q_i,p_i} \tag{3.51}$$

onde p_i são os momentos generalizados e q_i são as coordenadas generalizadas para o sistema com N partículas.
Sendo a energia potencial U_{q_i,p_i} representada pelo campo de força (seção 3.2.2), e a energia cinética K_{p_i} podendo ser escrita como:

$$K = \sum_i^N \frac{p_i}{2m_i} \tag{3.52}$$

onde m_i é a massa da partícula i.

Partindo da equação 3.51 podemos construir as equações de movimento:

$$\dot{q}_i = \frac{\delta H}{\delta p_i} \tag{3.53}$$

$$\dot{p}_i = \frac{\delta H}{\delta q_i} \tag{3.54}$$

Resolvendo as equações de movimento e integrando no tempo, criamos um conjunto de energias e trajetórias para o sistema com as quais propriedades poderão ser obtidas. Dentre os vários algorítmos para as simulações estão o Verlet e *Leap-frog*.

3.2.1 Algorítmos de Verlet e *Leap-frog*

Para resolver as equações de movimento utilizamos algorítmos numéricos capazes de fazer os cálculos de forma eficiente e simplificada. Dois métodos bastante conhecidos são os

algorítmos de Verlet [34] e *Leap-frog* [35].

Podemos expandir em série de Taylor a posição em função do tempo ($\vec{r}(t)$), considerando um passo δt para frente e para trás, e usando $\dot{r} = \vec{v}$ e $\ddot{r} = \vec{a}$.

$$\vec{r}(t+\delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2!}\vec{a}(t)\delta t^2 + \frac{1}{3!}\vec{b}\delta t^3 + \mathscr{O}(\delta t^4) \tag{3.55}$$

$$\vec{r}(t-\delta t) = \vec{r}(t) - \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2!}\vec{a}(t)\delta t^2 - \frac{1}{3!}\vec{b}\delta t^3 + \mathscr{O}(\delta t^4) \tag{3.56}$$

Somando as equações acima obtemos:

$$\vec{r}(t+\delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t-\delta t) + \vec{a}(t)\delta t^2 + \mathscr{O}(\delta t^4) \tag{3.57}$$

Usando a 2ª lei de Newton, encontramos a aceleração:

$$\vec{a}(t) = -\frac{1}{m}\vec{\nabla}V(\vec{r}(t)) \tag{3.58}$$

O algorítmo não fornece a velocidade naturalmente, de modo que esta é uma variável importante na simulação. Podemos então obter a velocidade truncando a série e subtraindo as equações 3.56 e 3.55.

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t+\delta t) - \vec{r}(t-\delta t)}{2\delta t} \tag{3.59}$$

Temos assim as equações necessárias para a resolução do algorítmo. Outro método para resolução das equações de movimento é o algorítmo de *Leap-frog* que utiliza um passo ($\frac{\delta t}{2}$). Desta forma temos as equações para o algorítmo.

$$\vec{v}(t+\frac{1}{2}\delta t) = \vec{v}(t-\frac{1}{2}\delta t) + \vec{a}(t)\delta t \tag{3.60}$$

$$\vec{r}(t+\delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t+\frac{1}{2}\delta t)\delta t \tag{3.61}$$

Este algorítmo é mais rápido que o de Verlet. De modo que modificando as equações chegamos em um tempo de integração (δt) para a posição e velocidade.

$$\vec{r}(t+\delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \vec{a}(t)\frac{\delta t^2}{2} \tag{3.62}$$

$$\vec{v}(t+\delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t)+\vec{a}(t+\delta t)}{2}\delta t \tag{3.63}$$

Com essas equações podemos encontrar a posição e velocidade no mesmo instante de tempo $(t+\delta t)$.

3.2.2 Termostato e Barostato

Quando realizamos a DM precisamos manter o sistema equilibrado, isto é feito utilizando um artifício de acoplar ao sistema um reservatório de pressão (barostato), e um de calor (termostato). O termostato vai controlar a temperatura do sistema através da energia cinética durante todos os processos da DM, evitando com isso flutuações na etapa de equilibração ou flutuações no resultado de truncamento de forças e possíveis erros na integração.

Por padrão o Gromacs utiliza o termostato de Berendsen[36], que será o banho térmico durante a simulação com uma determinada temperatura T_0 acoplada a cinética de primeira ordem. Os desvios de temperatura do sistema são corrigidos pela equação 3.64:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \tag{3.64}$$

onde o desvio de temperatura decai exponencialmente com o tempo τ.

Do mesmo modo o Gromacs utiliza o barostato de Berendsen como reservatório de pressão para o sistema. O algorítmo reescala as coordenadas do sistema e os vetores da caixa de simulação para cada passo com a matriz μ, tem seu efeito numa relaxação de cinética de primeira ordem da pressão para uma determinada pressão de referência P_0.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P - P_0}{\tau} \tag{3.65}$$

onde P é a pressão do sistema, P_0 é a pressão de referência e τ o tempo de acomplamento.

Os elementos de matriz são escritos como:

$$\mu_{ij} = \left\{ 1 - \frac{\Delta t}{\tau} \left[P_{0ij} - P_{ij}(t) \right] \right\}^{\frac{1}{3}} \tag{3.66}$$

onde Δt é o tempo do passo de integração.

3.2.3 Campo de Força

O desacoplamento dos movimentos eletrônicos e nucleares realizada pela aproximação de Born-Oppenheimer dá origem a dois tratamentos distintos: o tratamento quântico para os elétrons, considerando que o núcleo se move na superfície potencial eletrônica e o tratamento clássico que considera o movimento nuclear como independente dos elétrons, gerando assim uma curva de energia potencial.

A descrição dessa superfície de energia para os núcleos é feita a partir de um conjunto de funções potenciais derivadas empíricamente utilizando como modelo clássico o oscilador harmônico, dando assim origem ao campo de força[37, 16]. O campo de força descreve ligações, ângulos, rotações e interações entre átomos não ligados descritas pelos potenciais de Lennard-Jones e coulombiano. Existem campos de forças específicos para cada tipo de sistema que se deseja estudar como por exemplo para biomoléculas: AMBER[38], CHARMM[39, 40], GROMOS[41], OPLS[42] e Dinâmica Molecular de Coarse-Grained: Martini[43], para polímeros: COMPASS[44, 45, 46], dentre outros sistemas. O pacote computacional Gromacs pode utilizar diferentes campos de força, no entanto, comumente utiliza o GROMOS e o OPLS-AA, sendo que o campo de força OPLS-AA é específico para simulações de líquidos e opera considerando todos os átomos do sistema.

Com esses conceitos podemos encontrar a energia potencial do sistema que será definida

em função dos parâmetros do campo de força utilizado (OPLS-AA), sendo a energia potencial total dada pela soma das componentes:

$$E_{Total} = \sum^{Lig} E_r + \sum^{Ângulo} E_\theta + \sum^{Â.Diedro} E_\chi + \sum^{NãoLig} E_{ij} \tag{3.67}$$

Na equação (3.67) temos as componentes referentes a ligação entre átomos, ângulos planares, ângulos diedros, interações Coulombianas e de Lennard-Jones.

O potencial que descreve a ligação entre dois átomos é escrito como um oscilador harmônico válido para todas as ligações.

$$E_r = \sum_{lig} k_r (r - r_{eq})^2 \tag{3.68}$$

onde k_r e r_{eq} muda para cada par de átomos.

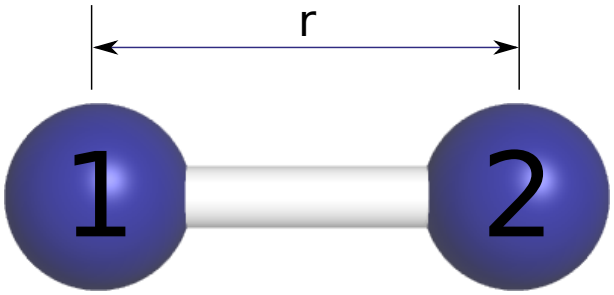


Figura 3.1 *– Ligação formada por dois átomos.*

A Figura 3.1 em conjunto com a eq. (3.68) representam a ligação entre átomos quaisquer i,j como exemplo C-C, C-H e O-H.

De modo semelhante ao potencial de ligação, a energia referente ao ângulo planar utiliza uma função harmônica válida para todos os ângulos.

$$E_\theta = \sum_{Ângulo} k_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \tag{3.69}$$

onde k_θ e $_{eq}$ são parametrizados para cada conjunto de três átomos.

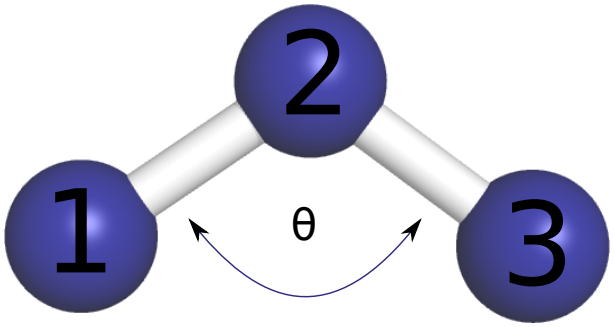


Figura 3.2 *– Ângulo formado por três átomos ligados.*

Na Figura 3.2 temos a representação do movimento no sistema de três átomos.

As torções moleculares características entre quatro átomos sendo dois conjuntos (1,2,3) e (2,3,4) são descritas da forma

$$E_\chi = \sum_i \frac{V_1^i}{2}[1+cos(\phi_i+f_i1)]+\frac{V_2^i}{2}[1-cos(2\phi_i+f_i2)]+\frac{V_3^i}{2}[1+cos(3\phi_i+f_i3)] \qquad (3.70)$$

onde ϕ_i é o ângulo diedro, V_1, V_2 e V_3 são os coeficientes de Fourier e f_1, f_2 e f_3 a fase associada a cada conjunto de quatro átomos. Este somatório é válido sobre todos os ângulos torcionais.

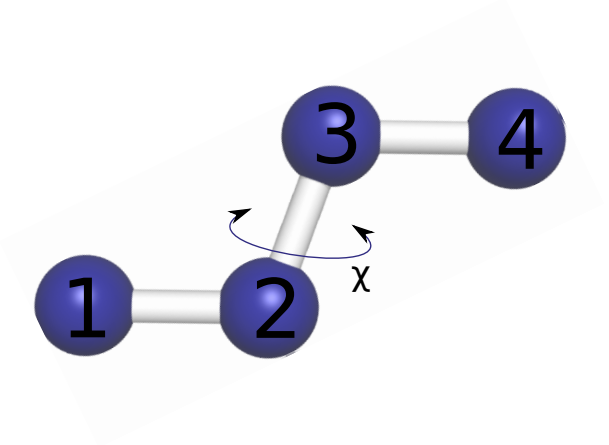


Figura 3.3 *– Ângulo diedro formado por quatro átomos ligados.*

Estes são os potenciais utilizados para descrever ligação, ângulo e torção pelo campo de forças OPLS-AA.

Para descrever as interações entre átomos não ligados, o campo de forças utiliza duas com-

ponentes: Lennard-Jones e interação coulombiana. Assim podemos escrever a equação para átomos não ligados.

$$E_{ij} = \sum_{i}^{a}\sum_{i}^{b} f_{ij}\left[\frac{q_i q_j e^2}{r_{ij}} + 4\varepsilon_{ij}\left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^{6}}{r_{ij}^{6}}\right)\right] \tag{3.71}$$

A Figura 3.4 representa as interações de não ligação, onde para o potencial de Lennard-Jones ε_{ij} é a profundidade do potencial e σ_{ij} o diâmetro de Lennard-Jones.

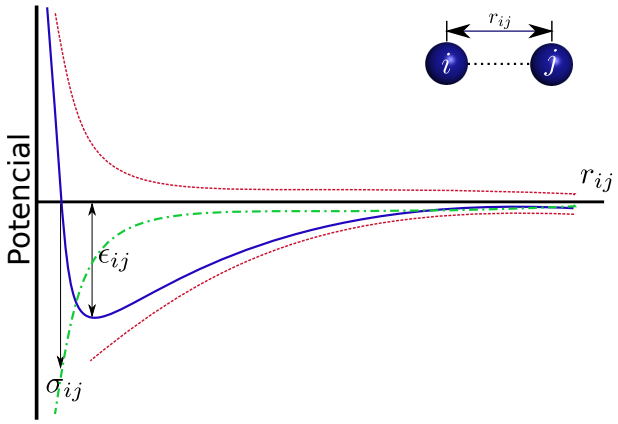


Figura 3.4 *– Energia potencial para átomos não ligados. Em azul o potencial de Lennard-Jones, em vermelho as contribuições positiva e negativa do potencial de Lennard-Jones e em verde o potencial Coulombiano provocado pela repulsão eletrostática.*

3.2.4 Condições Periódicas de Contorno

Para eliminar problemas de superfície, reduzir a quantidade de átomos e consequentemente ter um ganho computacional, as simulações por DM fazem o uso de condições periódicas de contorno (PBC). A forma básica de como são aplicadas as condições de contorno é a replicação da célula de simulação [47, 48].

Na Figura 3.5 a célula central é replicada infinitamente em todas as direções de modo que uma molécula sai por uma face da célula de simulação com velocidade $\vec{v}$ e entra por outra face com as mesmas condições. Isto é importante pois desta forma mantemos o sistema (célula de simulação) conservado, ou seja, a energia do sistema permanece constante.

A aplicação da PBC gera uma quantidade infinita de interações entre átomos não ligados, sendo necessário definir um raio de alcance onde as moléculas vão interagir com a vizinhança.

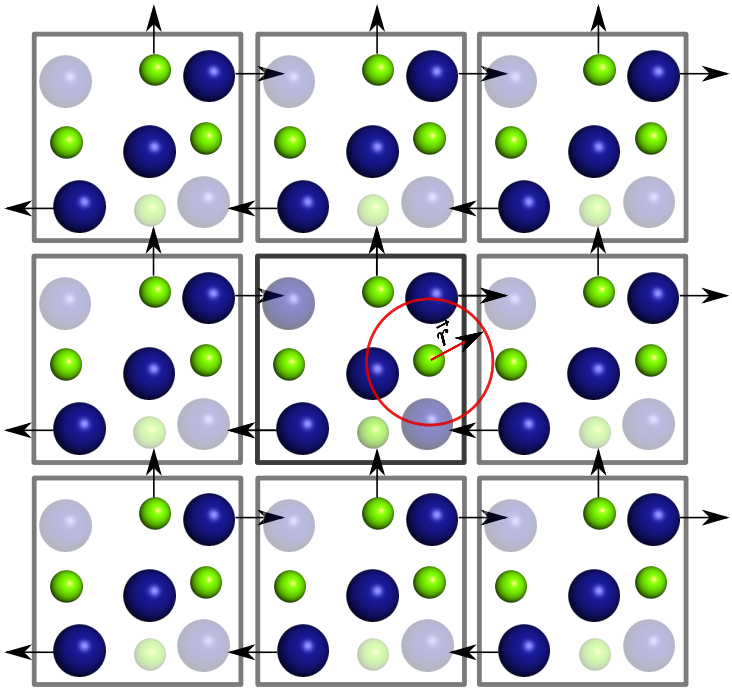


Figura 3.5 *– Replicação da caixa de simulação em duas dimensões em função da condição de contorno (PBC) aplicada. O círculo em vermelho representa o raio de corte* $(\vec{r})$.

Este artifício é chamado de raio de corte ou *"Cutoff"*, geralmente essa esfera onde serão consideradas as interações tem um raio que é metade do diâmetro da caixa de simulação.

4 Metodologia

4.1 Etapa Experimental

Foram utilizadas duas sondas fluorescentes: o-Abz para estudo sobre os efeitos de pH na absorção ótica e fluorescência, além da obtenção da curva de titulação para esta sonda. Sobre a sonda o-Abz-NH(CH3) foram realizados estudos de efeitos de solvente e interação com miméticos de membrana.

4.1.1 Amostras

Para os experimentos de absorção e fluorescência preparamos uma solução estoque de 2 mM em tampão fosfato (PBS) 15 mM com pH $\approx$ 7,35. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

Para o *o*-Abz foram realizados medições de absorção e fluorescência variando a escala de pH com adição de pequenas quantidades de HCl ou NaOH, com intuito de montar uma possível curva de titulação.

No segundo conjunto de experimentos foram escolhidos arbitrariamente dois pH's fixos e realizadas medições variando-se a concentração de o-Abz. A escolha do pH foi baseada nos pontos de pKa obtidos da curva de titulação do experimento inicial.

Para o derivado *o*-Abz-NH(CH3) foram realizados experimentos de absorção ótica, em tampão PBS e micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS) abaixo e acima da concentração molar crítica (CMC).

4.1.2 Absorção Ótica

O espectrofotômetro *Ultroscopec 2100 pro* cuja faixa de operação é de 190-900nm foi utilizado para realização das medições dos espectros de absorção. Neste experimento uma lâmpada de xenônio emite continuamente luz em vários comprimentos de onda, que incide sobre a amostra e a intensidade de luz transmitida passa por uma rede de difração. Após passar pela rede de difração ela será detectada por um sistema receptor de diodos. Em experimentos de absorção ótica, são realizadas inicialmente medições do espectro do solvente, depois, durante o processo de medição da amostra é subraído o espectro do solvente ficando apenas o espectro do cromóforo. Na Figura 4.1 temos um esquema de como funciona o espectrômetro.

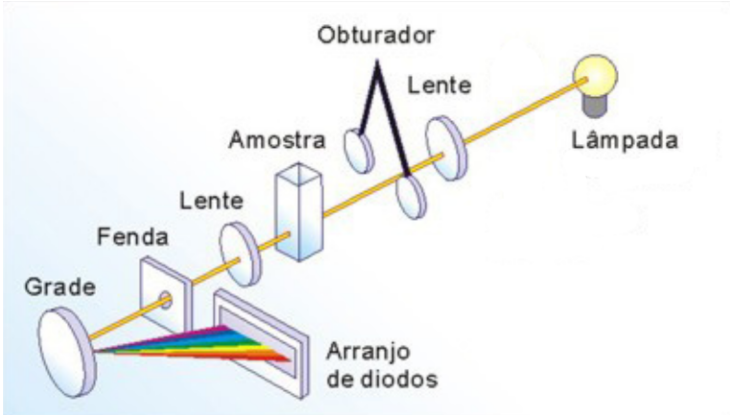


Figura 4.1 *– Representação esquemática de um espectrofotômetro de absorção. Figura adaptada, retirado de: [www.chemkeys.com]*

4.1.3 Fluorescência Estática

O espectrofluorímetro Hitachi F-7000 que opera na faixa de 200-750nm e possui uma lâmpada de xenônio foi utilizado para medições de espectros de fluorescência. Um espectrofluorímetro é capaz de obter tanto espectros de emissão como de excitação. O procedimento experimental está esquematizado na Figura 4.2.

A luz emitida pela fonte passa por um monocromador (excitação) para selecionar um comprimento de onda, em geral o comprimento de máxima absorção, que irá excitar a molécula. Em uma configuração de 90° está um outro monocromador (emissão) que receberá a luz vinda da amostra. Essa luz passa por uma fenda para ajuste de intensidade e entra na fotomultiplicadora,

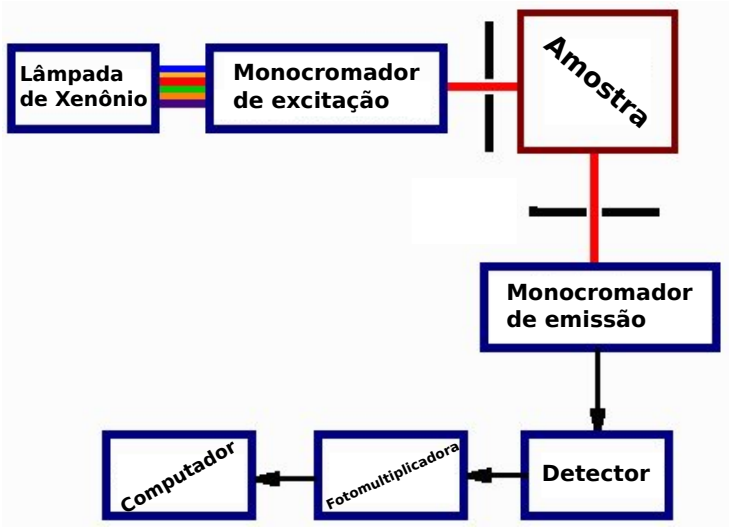


Figura 4.2 *– Representação esquemática de um espectrofluorímetro. Figura adaptada, retirado de: [http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/mol-fluo.htm]*

onde irá tratar o sinal e enviá-los ao detector. A configuração em 90° é para evitar que a luz transmitida seja adquirida como fluorescência.

4.2 Etapa Computacional

Nas etapas computacionais realizadas utilizamos diversas técnicas e teorias para estudar os sistemas propostos, dentre elas estão os cálculos *ab initio* para obtenção de geometrias, energias, cargas parciais e espectros, sendo que empregamos também simulações por dinâmica molecular para estudo da interação soluto-solvente.

Todos os cálculos *Ab Initio* foram realizados com os pacotes GAUSSIAN09 (G09)[49] e TurboMole[50], as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com o software GROMACS-4.5.4 [51, 52]. Para visualização e tratamento das imagens foram utilizados os softwares: Molden 5.0[53], VMD 1.9[54], PyMol[55] e GaussView 5.0[56] cedido pelo professor Sérgio E. Galembeck. Os gráficos foram editados e tratados pelos programas: Origin[57] e Grace 5.1.22[58].

Para a realização das simulações computacionais utilizamos 2 clusters, sendo um disponibilizado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos - INCTFCx e outro pelo Laboratório de Química Quântica Computacional - Departamento de Química -

FFCLRP supervisionado pelo professor Dr. Sérgio E. Galembeck.

4.2.1 Cálculos de estrutura eletrônica

As análises de geometria, energia, cargas e espectros foram realizadas a partir da teoria do funcional densidade utilizando diversos funcionais e conjuntos de funções de bases. Nestes estudos foram realizados cálculos em fase gasosa (FG), também conhecidos como fase gasosa e utilizando algumas aproximações para modelos de solvente dentre elas: modelo contínuo polarizável (PCM), e microhidratação. Foram realizadas também simulações por dinâmica molecular para obtenção de propriedades relacionadas a interação entre soluto-solvente como ligações de hidrogênio e solvatação de regiões específicas.

4.2.2 Fase Gasosa e Solvente Implícito

Como base para os resultados teórico-computacionais inicialmente realizamos cálculos de otimização de geometria e frequências vibracionais para verificação do ponto de mínima energia em fase gasosa onde encontramos duas conformações estáveis para o o-Abz na forma neutra. A minimização de energia e cálculo de frequências vibracionais foram realizadas com a teria do funcional densidade (DFT) a partir de funcionais híbridos[59]: B3LYP [59], M06-2X [60] e as bases de orbitais atômicos utilizadas: 6-311++G(d,p), Aug-cc-pVDZ e TZVP.

A partir da geometria otimizada na forma neutra montamos as outras três formas protonadas da molécula: catiônica, zwitteriônica e aniônica, logo em seguida procedemos novamente com otimização de geometria e verificação de ponto de mínimo para cada nova conformação. A partir de todas as seis moléculas encontradas e já otimizadas, realizamos cálculos de energia e cargas parciais com diversas bases e funcionais para verificação de população relativa e distribuição de cargas parciais.

Para o cálculo das energias de transição vertical foi utilizada a teoria DFT dependente do tempo (TD-DFT), em conjunto com funcionais e bases utilizados durante a etapa de minimização.

A otimização e cálculos de frequências vibracionais no S_1 foram realizados com TD-DFT

utilizando as geometrias previamente otimizadas com o DFT, seguindo a mesma sequência de conjuntos de funções de bases e funcionais adotados na etapa de otimização no S_0.

A inclusão de efeitos de solvente é relativamente simples, envolvendo apenas a adição de algumas palavras-chave no arquivo de entrada do cálculo, sendo necessário repetir todas as etapas de otimização, verificação energia de mínimo e cálculos de transição eletrônica.

4.2.3 Microhidratação

O método de microhidratação consiste em colocar algumas moléculas de solvente na região de interesse, para assim proceder com os cálculos de estrutura eletrônica. A sequência de cálculos é realizada através da otimização de geometria, verificação das frequências vibracionais e utilizando a teoria TD-DFT obtenção das energias de transição vertical. A única forma apresentada é o *o*-Abz no estado de protonação aniônico onde foram utilizadas seis moléculas de água para solvatar os terminais amina e ácido carboxílico.

4.2.4 Dinâmica Molecular

Como forma de complementar os cálculos de estrutura eletrônica foram realizadas simulações por Dinâmica Molecular (DM) com objetivo de entender melhor as interações soluto-solvente. Para este propósito utilizamos modelos de mecânica clássica para as simulações através do pacote computacional GROMACS [52].

As simulações foram realizadas a partir de geometrias otimizadas nos estados de protonação: aniônico e catiônico.

Utilizando modelo para cargas ChelpG[61] calculamos as cargas das moléculas através do pacote computacional Gaussian09 utilizando o nível de teoria B3LYP/TZVP. Com o programa *mktop* [62] geramos os arquivos de topologia e coordenadas baseados no campo de força OPLS/AA. Os passos seguintes foram realizados com o Gromacs, para isso a molécula foi centrada uma caixa cúbica e utilizando o modelo de água TIP4P [63] diluímos a molécula deixando a distância mínima entre o soluto e a borda da caixa em 1,0 nm e neutralizamos a carga

do sistema através da adição de íons positivos (Na+) ou negativos (Cl-).

Tabela 4.1 *– Parâmetros da etapa de solvatação.*

Protonação	Número de íons	Número de átomos do soluto	Número de moléculas de solvente
Aniônica	1 (Na+)	16	576
Catiônica	1 (Cl-)	18	628

Com o sistema montado fizemos a minimização da energia, onde o objetivo é baixar a força em qualquer átomo para próximo de zero. Como critério padrão utilizamos a força mínima $F < 100 kJmol^{-1}nm^{1}$.

A etapa de parametrização e equilibração do sistema é responsável por deixar o sistema em equilíbrio termodinâmico e pronto para a DM. Nesta etapa utilizamos o termostato e barostato de berendsen com temperatura de 298 K e pressão de 1bar. Foram realizados 2 ns de simulação com passo de 1 fs e raio de corte de 1,0 nm para as interações eletrostáticas.

Após o sistema equilibrado, cada simulação foi realizada com passo de 1 fs durante 10 ns utilizando o *ensemble* NPT com as mesmas condições de temperatura e pressão da etapa de equilibração. Nesta etapa não houve restrição quanto ao movimento das moléculas estando todos os graus de liberdade livres.

5 *Resultados e Discussão*

5.1 Espectros Experimentais para *o*-Abz

Neste capítulo apresentamos resultados experimentais para estudo dos efeitos de pH na absorção ótica e fluorescência molécula *o*-Abz. Para o análogo *o*-Abz-NH(CH3) apresentamos um estudo relacionado às diferenças na absorção quando ocorre a interação com micelas de SDS.

5.1.1 Absorção Ótica

Para entender as características da molécula o-Abz, realizamos um estudo sobre os efeitos da variação do pH afim de verificar alterações nos espectros e identificar possíveis formas de protonação que são encontradas em moléculas semelhantes como os aminoácidos.

O espectro de absorção ótica (Figura 5.1) apresenta três bandas que estão relacionadas com estados de protonação da molécula, sendo que à medida em que se diminui o pH além das mudanças no comprimento de onda da absorção existe a diminuição da absorbância. As bandas estão localizadas abaixo de pk1 com 272 $\pm$ 0,5nm, entre pk1 e pk2 com 326 $\pm$ 0,5nm e acima de pk2 com 310 $\pm$ 0,5nm.

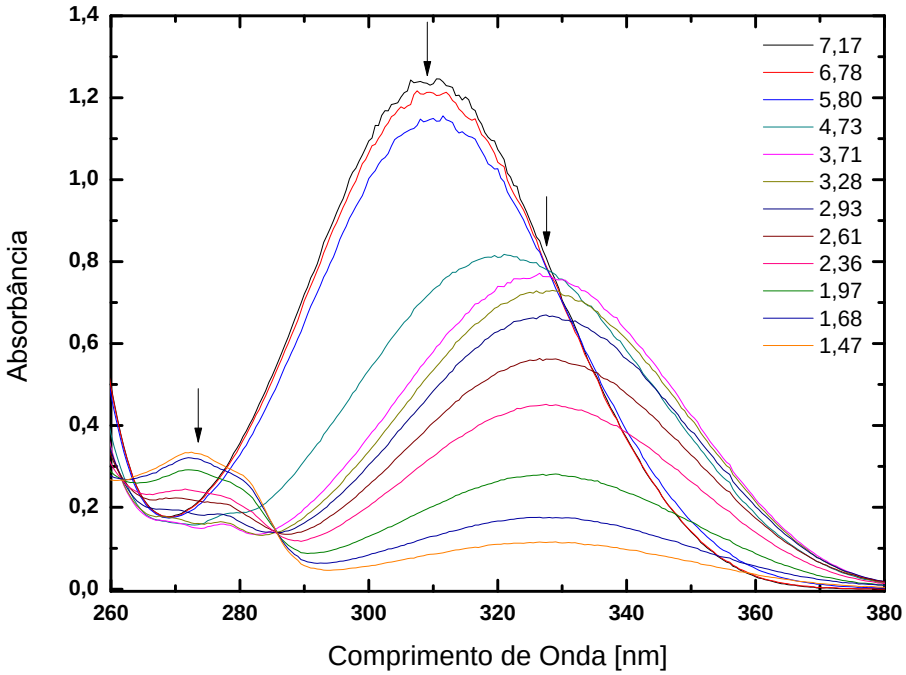


Figura 5.1 *– Espectro de absorção ótica para o-Abz em solução tampão fosfato em função do pH.*

5.1.2 Fluorescência

De modo semelhante a absorção, realizamos medições para obtenção dos espectros de fluorescência no estado estacionário. Para cada um dos espectros foram realizadas excitações no comprimento de onda máximo de absorção.

Observamos da Figura 5.2 que ao contrário do que ocorre na absorção ótica, na fluorescência existem apenas duas bandas, de modo que em pH muito ácido a fluorescência deixa de existir mantendo assim uma característica em comum que é a baixa intensidade em meio mais ácido. A banda acima do pk2 tem pico de fluorescência em 394 $\pm$ 1,0nm, enquanto que a outra banda, abaixo de pk2 tem pico em 418 $\pm$ 1,0nm.

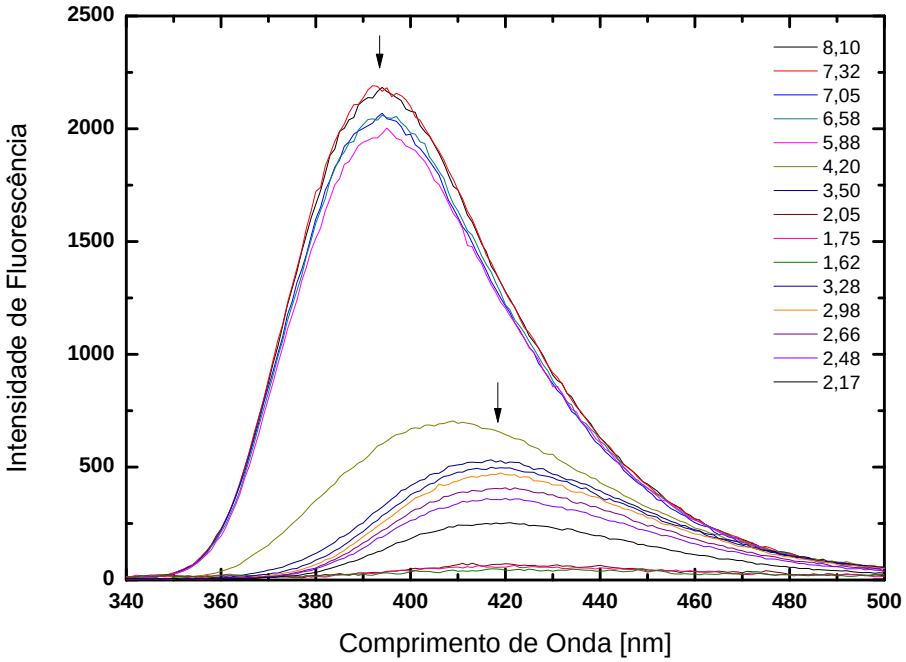


***Figura 5.2** – Espectro de fluorescência para o o-Abz em função da variação pH.*

5.1.3 Curva de Titulação

A partir de espectros de absorção ótica construímos a curva de titulação para o o-Abz em tampão fosfato (PBS) obtendo assim dois valores de pKa o que mosta seu comportamento semelhante aos aminoácidos.

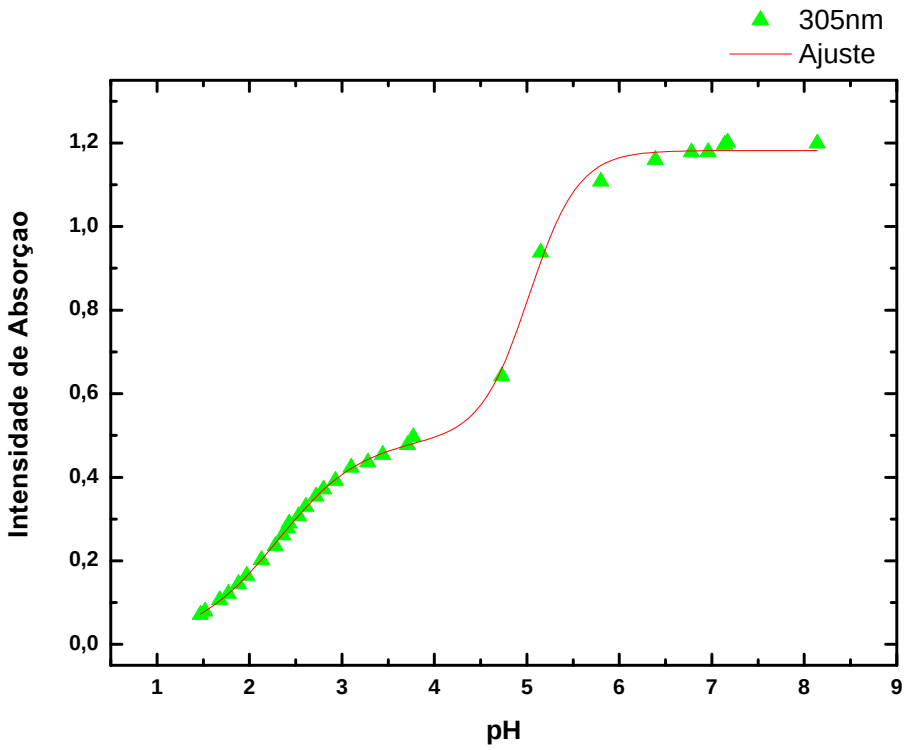


Figura 5.3 *– Curva de Titulação para o o-Abz em solução tampão fosfato.*

A Tabela 5.1 mostra os valores dos parâmetros para a curva de titulação.

Tabela 5.1 *– Parâmetros obtidos para o ajuste da curva de titulação do o-Abz.*

Parâmetros	**Valor**	**Erro**
y_0	1,182	0,00542
A	-1,17657	0,03386
frac	0,41484	0,02861
x_1	2,30603	0,05981
x_2	5,02693	0,02236
k1	0,45712	0,0651
k2	0,26605	0,02181
A1	-0,48809	
A2	-0,68848	
Equação de Ajuste	$y = y_0 + A*[\frac{frac}{1+exp^{(x-x_1)/k1}} + \frac{1-frac}{1+exp^{(x-x_2)/k2}}]$	
χ^2	$1,76549 * 10^{-4}$	
R^2	0,99891	

A partir da Tabela 5.1 através de um ajuste duplo de Boltzmann encontramos dois valores de pka indicando três regiões de protonação. O valor do $pK_1 \approx 2,3$ onde coexistem as formas catiônicas e zwitteriônicas do *o*-Abz, enquanto que o $pK_2 \approx 5,0$ as protonações existentes serão zwitteriônica e aniônica sendo que em pH neutro e básico existe apenas a molécula no estado

aniônico. Assim, na Figura 5.4 apresentamos as protonações possíveis para o *o*-Abz.

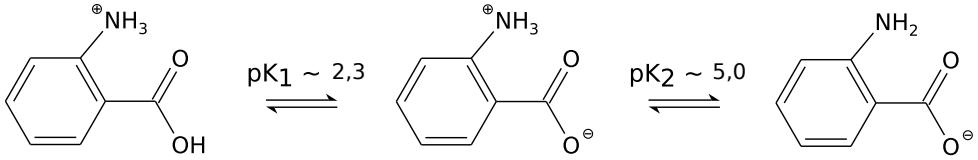


Figura 5.4 *– Estados de protonação devido a alteração do pH.*

5.2 Espectro de absorção ótica para *o*-Abz-NH(CH3)

Apresentamos nesta seção os espectros de absorção ótica para o *o*-Abz-NH(CH3) em micelas de SDS acima e abaixo da CMC mantendo o pH neutro.

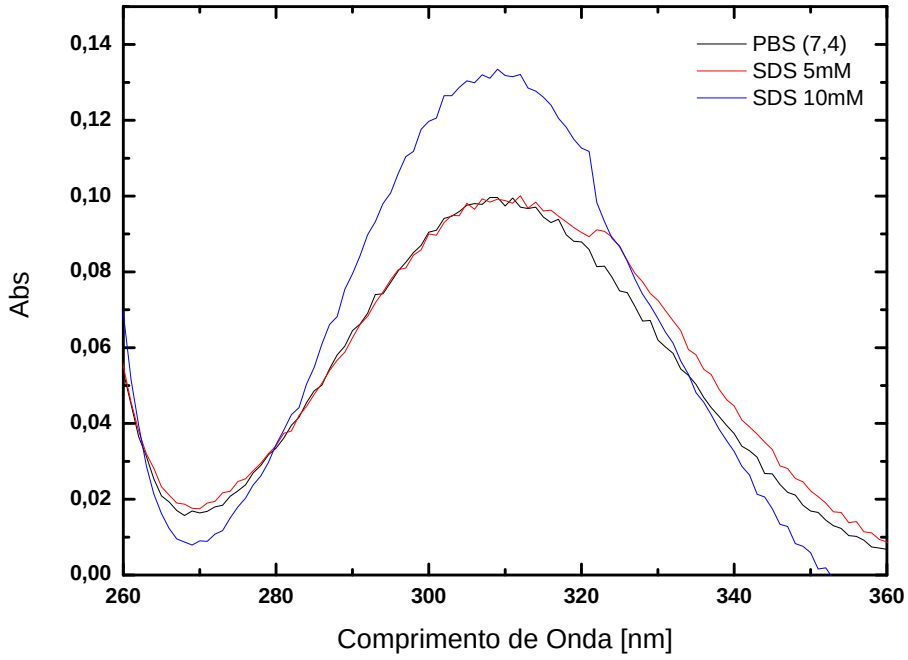


Figura 5.5 *– Espectro de absorção ótica para o o-Abz-NH(CH3) em micelas de SDS.*

Na Figura 5.5 é observado que não existe diferença no valor máximo do comprimento de onda conforme muda-se a concentração de micelas de SDS, nem quando está apenas em meio polar no caso do tampão PBS, sendo a única mudança perceptível na intensidade de absorção. O valor experimental da absorção é de $309 \pm 0{,}5$nm.

5.3 Cálculos Computacionais

Neste capítulo apresentamos os resultados referentes aos cálculos computacionais realizadas para obtenção de propriedades óticas e conformacionais do o-Abz. Para obter informações sobre atividades espectrais inicialmente realizamos a análise conformacional através do estudo de geometria e energia, sempre validando as estruturas de menor energia com cálculo de frequências vibracionais, e os espectros de absorção e fluorescência foram obtidos utilizando os mesmos conjuntos de bases e funcionais usados para minimização de energia. Foram utilizadas várias aproximações para obtenção dos espectros, dentre elas métodos quânticos no vácuo, modelos de solvente implícito e microsolvatação, foram ainda utilizadas simulações por dinâmica molecular para simular um solvente explícito para obter informações sobre a interação (o-Abz + vizinhança).

Foram estudadas diversas protonações para o ácido orto-aminobezóico: aniônica, catiônica e neutra, porém os resultados de dinâmica molecular referentes a protonação neutra não se apresentaram adequados, possivelmente devido a falhas na parametrização que podem ser solucionadas com mais pesquisa.

5.4 Protonação Aniônica

5.4.1 Geometria

A geometria do o-Abz foi otimizada com diferentes funcionais e conjuntos de bases. Buscando a melhor representação, apresentamos dados relativos a minimização de energia realizada com o nível de teoria B3LYP/TZVP em Fase Gasosa (FG) e utilizando o modelo de solvente implícito (PCM) para representar a água. A validação dos mínimos de energia para cada sistema foi realizada através de cálculos de frequências vibracionais das geometrias obtidas.

A molécula na forma aniônica é quase planar, com os hidrogênios do grupo NH2 e oxigênios saltando fora do plano. Isto ocorre devido a interação hidrogênio-oxigênio e apesar das pequenas diferenças na geometria quando utilizado efeito de solvente em comparação a FG, estas irão

apresentar uma diferença significativa em propriedades como absorção ótica.

***Tabela 5.2** – Geometria do o-Abz na conformação aniônica em fase gasosa e PCM. Unidade de distância [Å] e ângulo [°]. Geometrias otimizadas e verificadas através dos cálculos de frequências vibracionais com DFT utilizando o funcional: B3LYP e as bases: TZVP e QZVP.*

Geometria	**B3LYP/TZVP**		**B3LYP/QZVP**	
	FG	PCM	FG	PCM
$C_1 - C_8$	1,550	1,528	1,533	1,511
$C_8 = O_9$	1,268	1,269	1,301	1,301
$C_8 - O_{10}$	1,245	1,256	1,275	1,287
$C_2 - N_7$	1,385	1,381	1,376	1,375
$N_7 - H_{15}$	1,032	1,018	1,031	1,012
$N_7 - H_{16}$	1,008	1,008	1,005	1,006
$\theta(C_1 - C_8 - O_9)$	116,3	117,6	116,9	118,4
$\theta(C_1 - C_8 - O_{10})$	116,4	117,4	117,3	118,4
$\theta(C_2 - N_7 - H_{15})$	109,9	116,5	114,1	116,6
$\theta(C_2 - N_7 - H_{16})$	115,5	112,7	121,2	121,2
$\theta(C_2 - C_1 - C_8 - O_9)$	6,0	8,6	0,0	0,0
$\theta(C_2 - C_1 - C_8 - O_{10})$	-175,1	-172,1	-180,0	-180,0
$\theta(C_3 - C_2 - N_7 - C_{15})$	167,8	165,1	-180,0	180,0
$\theta(C_3 - C_2 - N_7 - C_{16})$	31,6	25,2	0,0	0,0

Como observamos na Tabela 5.2, os valores referentes as distâncias interatômicas diferem muito pouco entre si, tanto quando levamos em consideração a mudança entre FG e PCM ou a mudança entre o conjunto de bases utilizado. Os ângulos de ligação de modo semelhante as distâncias interatômicas são bastante próximos, uma pequena diferença ocorre nos ângulos diedros pois enquanto que as geometrias em FG e PCM permanecem no plano da molécula para a base QZVP, para o conjunto de bases TZVP ela sai levemente do plano. Essas conformações foram escolhidas pois apresentaram os melhores resultados para a propriedade de absorção ótica, como veremos na próxima seção.

5.4.2 Absorção Ótica, Fluorescência e Orbitais Moleculares

Nesta seção apresentamos resultados referentes a transições verticais de absorção ótica e fluorescência utilizando os mesmos conjuntos de bases para a minimização e validação das geometrias.

Absorção Ótica

O resultados obtidos para absorção ótica foram satisfatórios quando comparados a valores experimentais. Na tentativa de melhor descrever a absorção ótica, foram comparados vários conjuntos de bases para os cálculos de transição vertical. São apresentados dados de comprimento de absorção, força do oscilador e transição dominante para descrever as transições eletrônicas.

O critério adotado para escolha dos melhores resultados foi a menor diferença entre os comprimentos de onda calculados e experimental, sendo os melhores em FG com a teoria B3LYP/6-311++G(d,p) e em PCM utilizando B3LYP/QZVP que apresentaram valores de 311,9nm e 305,9nm respectivamente.

As transições verticais envolve uma complexa combinação dos orbitais moleculares, comumente essas transições ocorrem nas proximidades dos chamados orbitais de fronteira HOMO, cujo significado é mais alto orbital molecular ocupado e LUMO que pode ser traduzido por mais baixo orbital molecular desocupado. A análise dessas transições comparando-se FG e PCM mostra que as transições HOMO $\rightarrow$ LUMO são dominantes quando considerado solvente implícito.

Outro resultado interessante é a diferença das forças do oscilador que indicam uma probabilidade de transição eletrônica proibida para a FG, enquanto que quando utilizado PCM existe uma probabilidade real de transição.

Os erros relativos obtidos dos cálculos são considerados baixos, permanecendo entre 0,6% e 4,9% para a FG e 1,3% e 5,8% para efeito de solvente.

Fluorescência

Para a fluorescência calculamos no S_1 as geometrias, frequências vibracionais e emissão, porém, devido ao alto custo computacional para simular estados excitados apresentamos apenas o resultado obtido em nível de teoria B3LYP/Def2-TZVP.

Tabela 5.3 *– Absorção ótica para o o-Abz em FG e PCM na conformação aniônica. O funcional utilizado foi o B3LYP.*

Conjunto de Bases	**Fase Gasosa**				
	λ (nm)	F. Oscilador	Transição	E. Excitado	Erro (%)
6-311++G(d,p)	311,94	0,0040	HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO	2º	0,6
TZVP	313,97	0,0006	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	1,3
QZVP	325,21/301,97	0/0	HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO	2º	4,9/2,6
Aug-cc-pVDZ	313,1	0,0010	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+1	6º	1,0
Aug-cc-pVTZ	314,08	0,0013	HOMO $\rightarrow$ LUMO+2	6º	1,3
Def2-TZVP	313,21	0,0006	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	1,0
Conjunto de Bases	**Solvente Implícito - PCM**				
	λ(nm)	F. Oscilador	Transição	E. Excitado	Erro (%)
6-311++G(d,p)	295,38	0,0963	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	4,7
TZVP	292,05	0,0891	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	5,8
QZVP	305,92	0,1259	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	1,3
Aug-cc-pVDZ	300,00	0,0957	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	3,2
Aug-cc-pVTZ	296,00	0,0957	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	4,5
Def2-TZVP	292,67	0,0870	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	5,6
Experimental	310	-	-	-	-

Para a absorção ótica a energia de transição vertical entre os estados ($S_0 \rightarrow S_1$) foi de 3,96 eV com comprimento de onda de 313,21 nm e duas contribuições para a função de onda: 35 $\rightarrow$ 37 com coeficiente 0,254 e 36 $\rightarrow$ 37 com coeficiente 0,650.

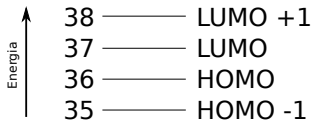


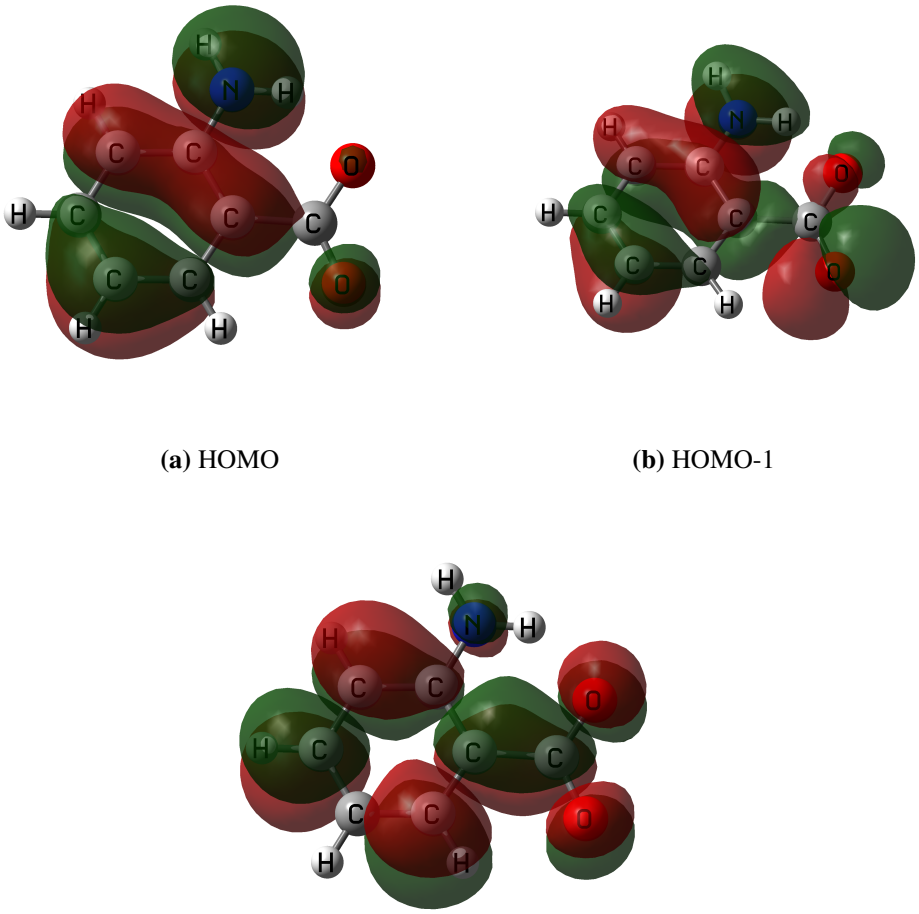
Figura 5.6 *– Representação dos orbitais HOMO, LUMO, HOMO -1 e LUMO +1.*

Para a fluorescência a energia de transição vertical ($S_1 \rightarrow S_0$) diminuiu para 3,05 eV onde o comprimento de onda aumentou para 407,21 nm. Houve apenas uma única transição entre orbitais 35 $\rightarrow$ 37 de 0,697 caracterizando assim uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$.

Levamos em conta a alta dificuldade de realizar cálculos em estado excitado, o resultado de fluorescência teórico (407 nm) pode ser considerado bom quando comparado ao valor experimental (394 nm), apresentando um erro percentual de 3,4%.

Orbitais Moleculares

Para uma idéia qualitativa do estudo das transições apresentamos os orbitais moleculares 35 (HOMO-1), 36 (HOMO) e 37 (LUMO) para o conjunto de bases Def2-TZVP em fase gasosa.



(a) HOMO

(b) HOMO-1

(c) LUMO

Figura 5.7 *– Orbitais Moleculares para a transição eletrônica HOMO → LUMO na molécula de o-Abz utilizando o modelo de meio contínuo e nível de teoria B3LYP/QZVP.*

Durante a absorção haverá uma combinação de orbitais HOMO-1 → LUMO e HOMO → LUMO, enquanto que na fluorescência apenas uma transição HOMO-1 → LUMO.

5.4.3 Microhidratação - Absorção Ótica

Utilizamos ainda uma técnica adicional para obter resultados de absorção ótica chamada de microhidratação, onde são adicionadas moléculas de água em regiões específicas com objetivo de simular a interação real com a água. Apresentamos resultados para absorção ótica utilizando seis moléculas de água para a microhidratação na região da amina e ácido carboxílico. Por se tratar de uma técnica difícil apresentamos apenas o resultado que apresentou o menor erro relativo, sendo o cálculo de transição vertical realizado com o método TD-DFT com o funcional CAM-B3LYP e o conjunto de bases TZVP.

A Figura 5.8 apresenta o espectro obtido para absorção ótica utilizando a técnica de microhidratação para o sistema (o-Abz + seis moléculas de água).

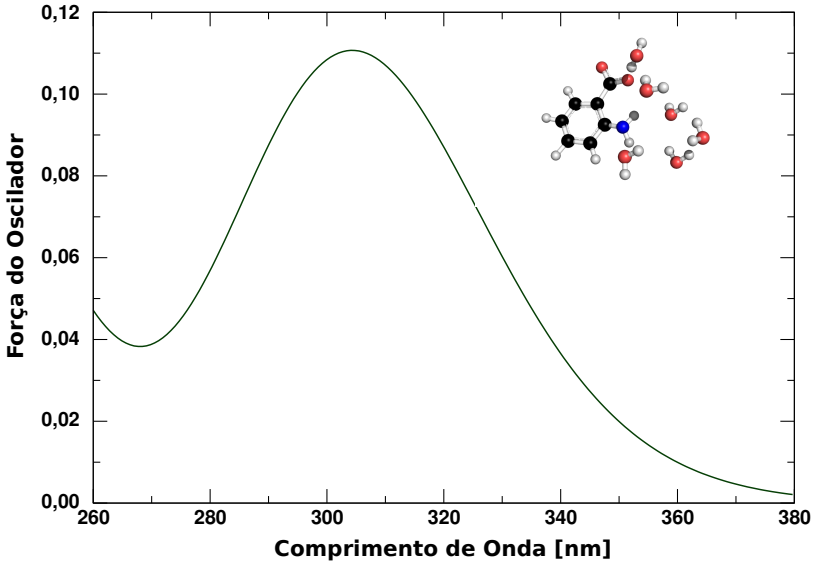


Figura 5.8 *– Representação da curva de absorção ótica calculada utilizando a técnica da microhidratação.*

Observando a (Tabela 5.4), notamos que para o primeiro e segundo estados excitados, a transição vertical é dada por uma complexa combinação entre orbitais moleculares. O máximo ocorre em 309,48 nm, apresentando então o menor erro relativo de 0,17%, sendo este considerado o melhor resultado para a absorção ótica.

Tabela 5.4 *– Absorção ótica para o sistema (o-Abz + seis moléculas de água).*

Estado Excitado	**1º**	**2º**
λ (nm)	309,48	302,40
Energia (eV)	4,01	4,10
F. Oscilador	0,0414	0,0966
Erro (%	0,17	-
Transição	**Coeficiente**	
63→69	-	0,506
65→67	0,506	-0,424
65→77	-0,150	-
66→67	0,435	0,520

Sendo agora os orbitais moleculares HOMO (66) e LUMO (67), a transição para o primeiro estado excitado mostra um caráter HOMO -1 $\rightarrow$ LUMO enquanto que para o segundo estado excitado apresenta um caráter HOMO $\rightarrow$ LUMO.

Os resultados apresentados para a microhidratação servem apenas como exemplo do uso da técnica, a execução destes cálculos é bastante difícil nem sempre sendo possível a reprodução de dados experimentais.

5.4.4 Dinâmica Molecular

A realização de uma Dinâmica Molecular envolve várias etapas de preparação como criação da caixa de solvente, parametrização do sistema através da escolha de um campo de força, escolha de temperatura, pressão e até mesmo cargas parciais, que podem ser explicadas como uma aproximação clássica para a distribuição de cargas para uma molécula. O o-Abz não tem as cargas parametrizadas no campo de força, logo existe a necessidade de calcular as cargas parciais que apresentamos no próximo tópico.

Cargas Parciais

Inicialmente as cargas parciais foram calculadas com o nível de teoria B3LYP/TZVP. Na Figura 5.9 apresentamos uma imagem qualitativa da distribuição de cargas, indicando as regiões mais positivas em verde e mais negativas em vermelho.

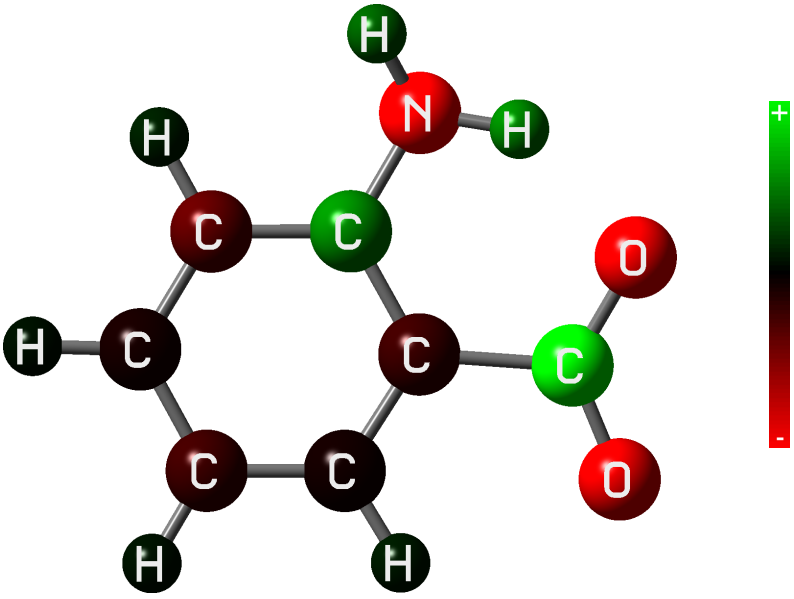


Figura 5.9 *– Distribuição de cargas parciais para o-Abz em fase gasosa na protonação aniônica.*

É importante ressaltar que na dinâmica molecular a carga do sistema deve ser zero, no entanto a molécula em estudo tem carga líquida negativa (-1), logo adicionamos um íon positivo Na^+ para compensar a carga negativa.

Validação da Dinâmica Molecular

Para validação dos resultados da DM, apresentamos os gráficos de RMSD e energia total do sistema. A Figura 5.10 mostra a energia média por átomo próxima de $-34,75 kJ/mol$, sendo importante nesta etapa não o valor da energia e sim o seu comportamento do sistema durante a simulação.

A energia média por átomo pode ser complementada pela Figura 5.11 que apresenta o RMSD do sistema durante a DM. Este apresenta uma variação no início da DM e mostra-se bastante estável ao longo de toda a simulação indicando que o sistema está equilibrado.

As Figuras 5.10 e 5.11 em conjunto mostram que o sistema esta bem parametrizado e equilibrado, indicando a confiabilidade dos resultados sobre interações do soluto com solvente que serão apresentados a seguir.

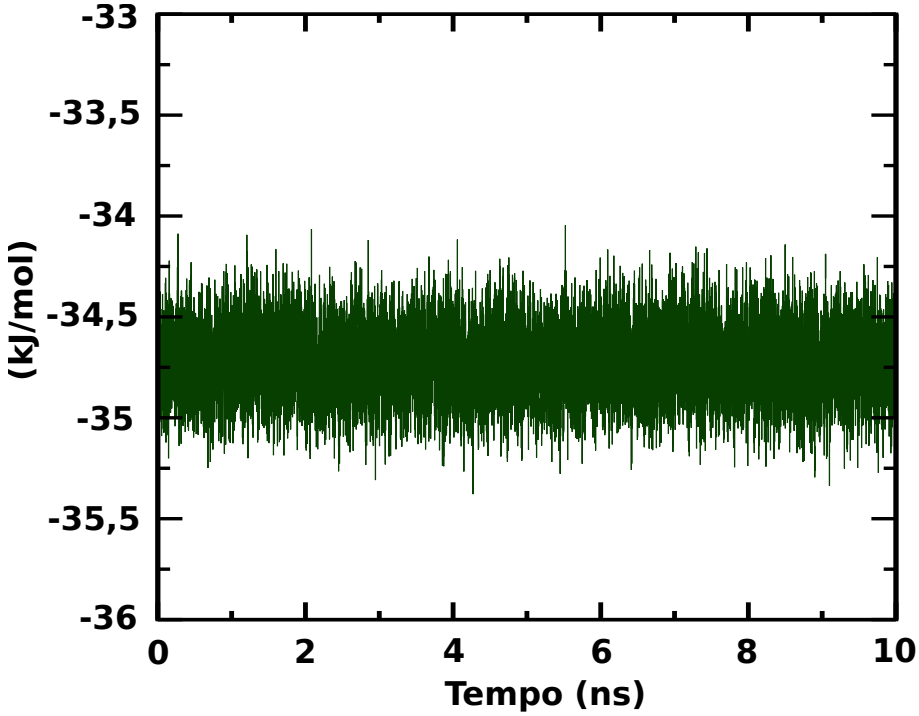


Figura 5.10 *– Energia média por átomo para o sistema o-Abz aniônico + íon + água.*

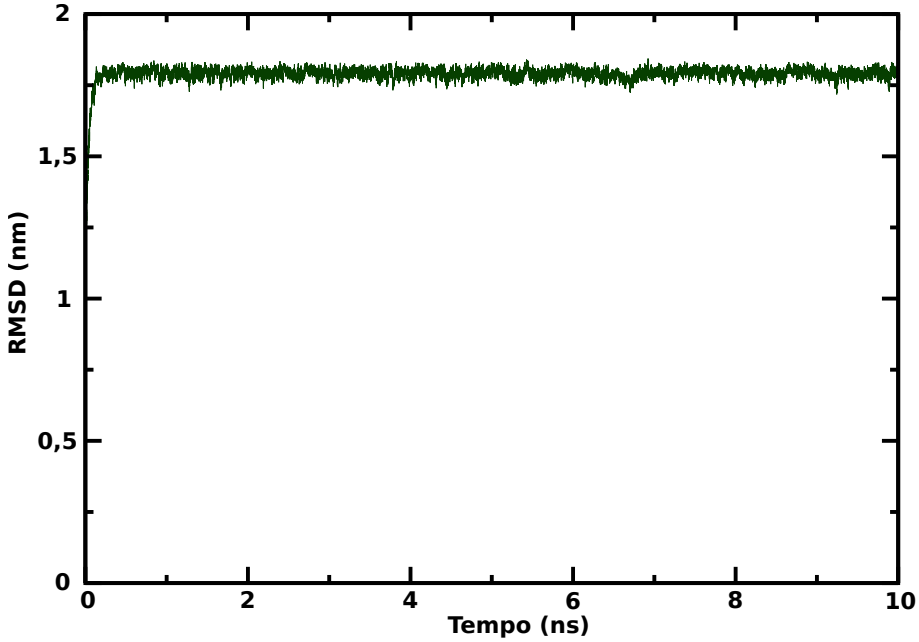


Figura 5.11 *– RMSD do sistema.*

Distribuição Radial, Ligações de Hidrogênio e RMSF

Apresentamos resultados de distribuição radial dos sistemas (o-Abz + Solvente) e regiões específicas da molécula mostrando também as ligações de hidrogênio durante a DM.

A curva representada na Figura 5.12 apresenta um ombro em 0,45nm e dois picos bem

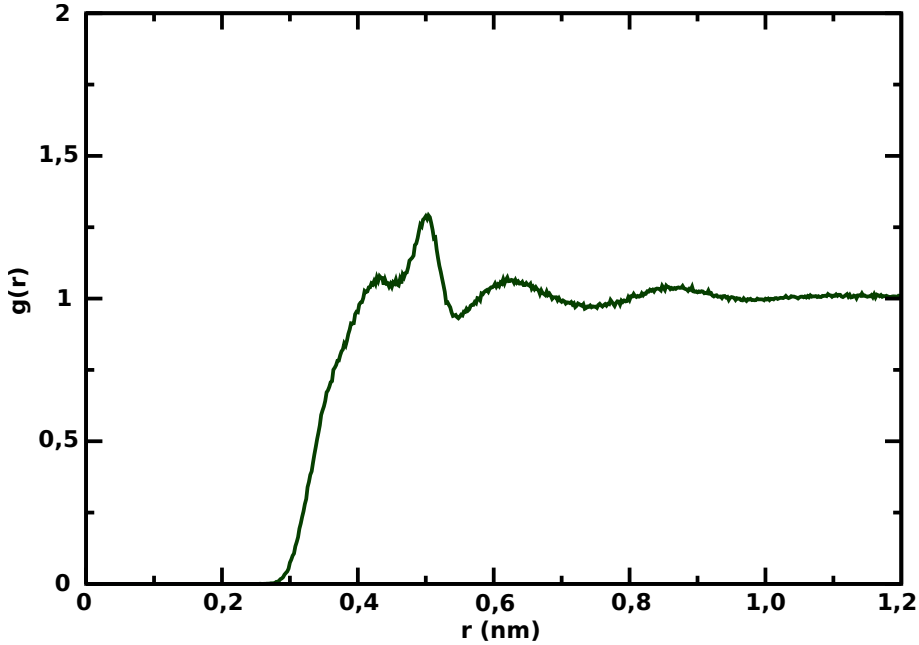


Figura 5.12 *– Distribuição radial água em torno da molécula de o-Abz na protonação aniônica, levando em consideração o centro de massa das moléculas.*

definidos entre 0,45-0,55nm e 0,55-0,76nm. Para encontrar as camadas de solvatação, devemos analisar o gráfico do número cumulativo que indica quantas moléculas estão dentro de uma distribuição com raio definido. Deste modo para a primeira camada de solvatação temos 18,15 moléculas de água, para a segunda temos aproximadamente 56 moléculas de água e olhando um terceiro pico entre 0,76-0,97nm encontramos 122,5 moléculas de solvente.

Para entendermos melhor o que acontece no microambiente próximo à molécula devemos além do estudo da distribuição radial, estudar as ligações de hidrogênio (LH). Para isso definimos alguns critérios geométricos como o raio de corte para a distância entre doador-aceitador de $0,35nm$ e o ângulo máximo entre aceitador-doador-hidrogênio de 30°, conforme [64].

Observamos que durante a simulação ocorrem muitas possibilidades de LH, quando consideramos o sistema o-Abz - água, a distribuição das LH apresenta o valor médio de 8,13 LH.

Em uma análise estatística (Tabela 5.5), observamos que ocorrem 8 LH em 30% do tempo e 9 LH em 25,89%. Considerando a integral da curva até o ombro, ou seja entre 0,26-0,46nm obtemos um número cumulativo de 7,69 moléculas, desta forma podemos supor que dentro do ombro, temos cerca 8 moléculas disponíveis para a ligação de hidrogênio tendo uma média de

8 ligações ao longo da simulação.

Tabela 5.5 *– ligações de hidrogênio formada entre o o-Abz e as moléculas de água.*

LH	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
%	0,07	0,58	2,62	8,12	18,33	29,90	25,89	11,43	2,74	0,32

O estudo da solvatação e LH para uma molécula deve ser complementado com estudo específico de regiões de interesse, as quais podemos identificar o átomo O9, e do grupo amina os átomos N7-H15.

Inicialmente apresentamos o estudo referente ao oxigênio, onde foi realizada a distribuição radial de pares entre os átomos O9-OW, O9-HW1. A distância média entre O9-OW fica próximo de 0,26nm, sendo maior que a distância média entre O9-HW1 de 0,172nm, conforme esperado. Observamos ainda que temos picos bem definidos e estreitos o que corresponde a uma boa estruturação os átomos HW1 e OW ao redor de O9.

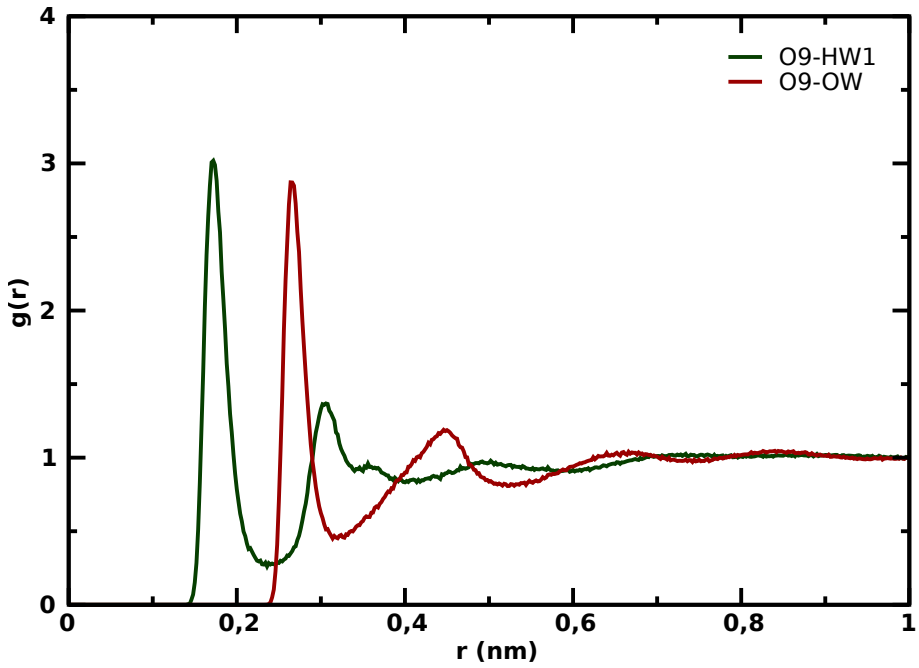


Figura 5.13 *– Distribuição radial entre pares para o átomo O9-HW1 e O9-OW.*

Para analisar as LH realizadas por este átomo com a água podemos obter o resultado a partir do gráfico de número cumulativo após o primeiro pico em 0,314nm que é de 2,99 átomos OW circundando O9. Para confirmar esse valor podemos realizar uma análise estatística (Tabela 5.6) das LH entre O9-água.

Tabela 5.6 *– ligações de hidrogênio entre O9 e moléculas de água*

LH	1	2	3	4	5	6
%	2,31	19,41	60,56	17,02	0,69	0,01

O número médio de LH foi de 2,94 ao longo da simulação e de acordo com os dados estatísticos a probabilidade de acontecimento de 3 LH é de 60,56%. Deste modo a partir da contagem de LH e distribuição radial de pares, podemos dizer que no O9 ocorrem em média 3 LH ao logo da simulação. O tempo de vida média dessas LH foram de 1,05ps de acordo com resultados obtidos da simulação.

O estudo do átomo O10 apresenta resultados muito semelhantes ao O9, devido à possibilidade de rotação da ligação entre os átomos C1-C8 que ocorrem durante a DM.

Também foram analisadas as ligações de hidrogênio de outras regiões de interesse ($N7-H15$) e ($N7-H16$).

Analisando a Tabela 5.7, observamos que o par $N7-H15$ forma 1 LH em 49,32% do tempo de simulação, valor este que é próximo do número médio de ligações realizadas ao longo da simulação de 1,25 LH, com um tempo de vida da LH de 0,45ps.

Tabela 5.7 *– ligações de hidrogênio entre dos pares* $N7-H15$ *e* $N7-H16$ *com moléculas de água.*

LH	0	1	2	3	4
% (N7-H15)	13,68	49,32	35,59	1,40	0,01
% (N7-H16)	5,08	30,56	62,20	2,15	0,01

O par $N7-H16$ apresenta resultados bastante diferentes, quando comparados ao $N7-H15$, sendo que durante a simulação ocorrem em média duas LH em 62,2% do tempo, sendo o número médio de ligações foi de 1,62 LH com um tempo de vida de 0,8ps.

Complementando os estudos sobre a forma aniônica do o-Abz, podemos analisar o quanto a molécula se movimenta em relação a estrutura inicial através do gráfico de RMSD.

Analisando ainda a estrutura do o-Abz, podemos notar pela Figura 5.14 que durante a DM, que as regiões dos oxigênios e hidrogênios do grupo NH2 foram as que mais se movimentaram,

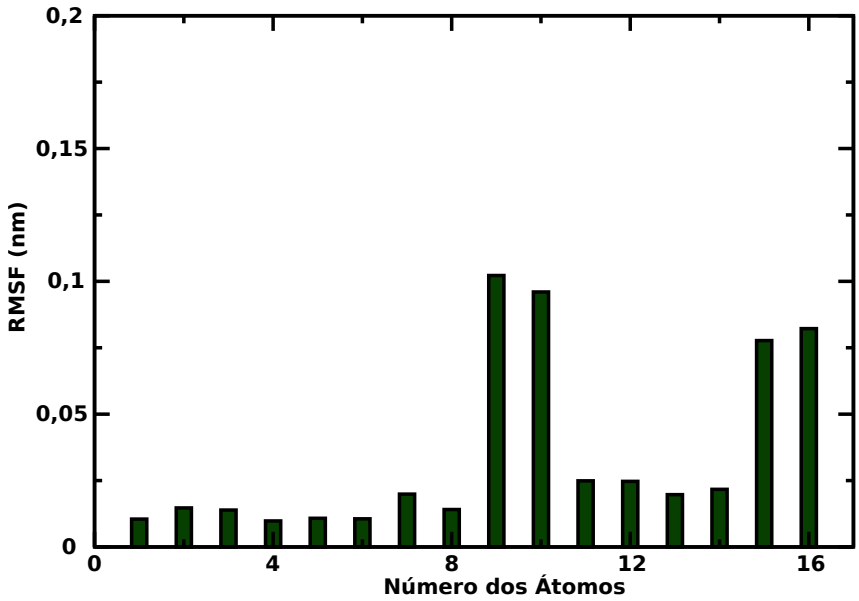


Figura 5.14 *– Flutuação na posição dos átomos do o-Abz durante a simulação computacional.*

conforme esperado, pois são as regiões com maior grau de liberdade e forte interação com moléculas do solvente.

5.5 Protonação Neutra

Para a carga líquida zero, temos dois estados de protonação para o o-Abz. A forma zwitteriônica e a forma neutra, sendo a forma neutra composta por duas conformações. Na protonação zwitteriônica a molécula mostrou-se altamente instável, deste modo existe a necessidade de outras abordagens para tratar a molécula. Apresentamos nesta seção resultados referentes à protonação neutra para a molécula de (o)-Abz.

5.5.1 Energia relativa e população de Boltzmann

A partir de estudos preliminares de energia observou-se que a forma neutra C1 é a mais estável, sendo que a população relativa de Boltzmann apresenta mais de 95% das moléculas na conformação C1. Assim apresentamos resultados apenas para a conformação de menor energia.

A Figura 5.15 apresenta o gráfico da variação de energia quando rotaciona-se o ângulo diedro da ligação (* C1 C8 *), originando assim as duas conformações C1 e C2. Como observamos

na figura, existe um máximo próximo de 100^{o}, que é onde temos a forma de transição entre as geometrias estudadas.

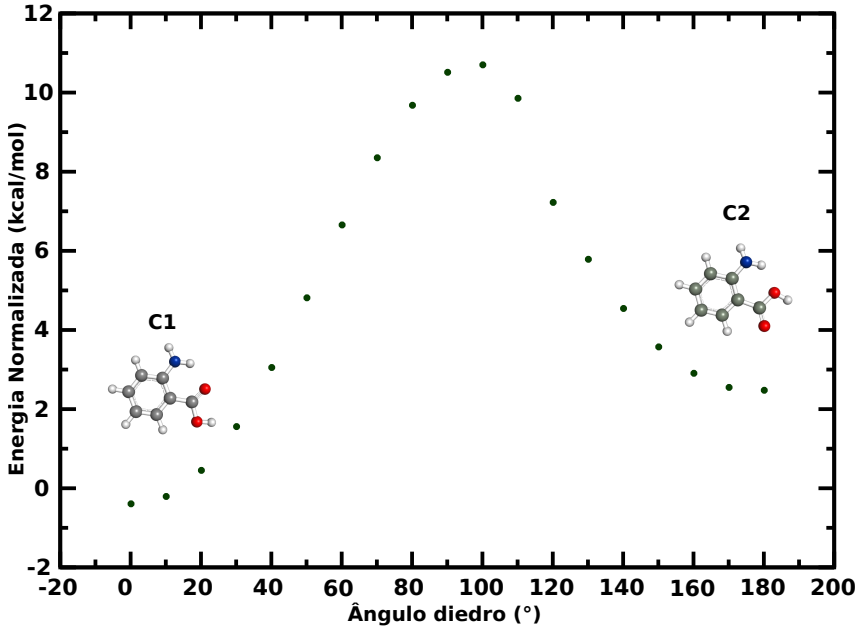


Figura 5.15 *– Gráfico da varredura do ângulo diedro (* C1 C8 *) para a protonação neutra.*

5.5.2 Geometria

O tratamento dado para a forma neutra foi semelhante ao utilizado na protonação aniônica. Realizamos diversas otimizações de geometria em fase gasosa e utilizando um modelo de solvente implícito. O parâmetro para escolha da melhor geometria foi a maior proximidade com o resultado experimental na absorção ótica. Na Tabela 5.8 podemos ver resultados para FG utilizando o nível de teoria B3LYP/QZVP e utilizando o efeito de solvente implícito PCM com a teoria B3LYP/Aug-cc-pVTZ.

Realizamos uma comparação entre as geometrias em FG e PCM, utilizando como referência as bases QZVP e Aug-cc-pVTZ. De um modo geral podemos notar que os valores referentes a distâncias e ângulos planares pouco diferem. Apesar desta pequena diferença, o resultado para a energia de absorção é bastante significativo.

Quando utilizado o conjunto de bases QZVP a molécula tanto em fase gasosa quanto imersa em solvente implícito apresenta-se totalmente planar, como podemos ver pelos ângulos diedros.

Tabela 5.8 *– Geometria do o-Abz na conformação neutra C1 em FG e PCM. Unidade de distância &[Å]& e ângulo [°]. Geometria otimizada e verificada com DFT utilizando o funcional B3LYP com o conjunto de bases QZVP para FG e Aug-cc-pVTZ para PCM.*

Geometria	**B3LYP/QZVP**		**B3LYP/Aug-cc-pVTZ**	
	FG	PCM	FG	PCM
$C_1 - C_8$	1,455	1,453	1,464	1,463
$C_8 = O_9$	1,250	1,254	1,221	1,224
$C_8 - O_{10}$	1,384	1,381	1,358	1,353
$C_2 - N_7$	1,370	1,366	1,357	1,258
$N_7 - H_{15}$	1,010	1,009	1,008	1,007
$N_7 - H_{16}$	1,005	1,006	1,002	1,004
$O_{10} - H_{17}$	0,979	0,980	0,967	0,969
$\theta(C_2 - N_7 - H_{15})$	119,3	119,8	119,1	118,8
$\theta(C_2 - N_7 - H_{16})$	120,5	120,5	120,1	119,4
$\theta(C_1 - C_8 - O_9)$	126,4	126,1	125,9	125,7
$\theta(C_1 - C_8 - O_{10})$	114,3	114,4	114,1	114,1
$\theta(C_8 - O_{10} - H_{17})$	109,1	110,1	106,1	107,2
$\theta(C_3 - C_2 - N_7 - C_{15})$	180,0	180,0	-179,9	-172,7
$\theta(C_3 - C_2 - N_7 - C_{16})$	0,0	0,0	-0,1	-10,6
$\theta(C_6 - C_1 - C_8 - O_9)$	180,0	180,0	180,0	178,7
$\theta(C_6 - C_1 - C_8 - O_{10})$	0,0	0,0	0,0	-1,1
$\theta(C_1 - C_8 - O_{10} - H_{17})$	180,0	180,0	180,0	179,8

Se a comparação for feita com a base Aug-cc-pVTZ, observa-se uma leve mudança nesses ângulos em FG mantendo a molécula quase planar. Quando calculado utilizando o efeito de solvente, a molécula quebra a simetria planar e desloca o nitrogênio (N7) para fora do plano.

Estas diferenças na geometria e energia podem ser melhor visualizadas com a distribuição de cargas e momento de dipolo. Na seção seguinte apresentamos esses resultados.

5.5.3 Momento de Dipolo

Pequenas mudanças conformacionais alteram muito as propriedades moleculares tais como momento de dipolo, absorção ótica e fluorescência. Essas mudanças ocorrem por interações com a vizinhança no caso de interação com outras moléculas ou até mesmo interações interatômicas. Como utilizamos uma variedade de conjuntos de bases, estas vão impor uma maior ou menor restrição aos orbitais moleculares. Uma forma de mostrar o quanto essas pequenas

alterações na geometria interferem nos resultados é através do momento de dipolo que é muito sensível ao ambiente em que a molécula se encontra.

Apresentamos na Tabela 5.9 resultados para o momento de dipolo para todas as otimizações em FG e PCM.

Tabela 5.9 *– Momento de dipolo para o o-Abz na conformação Neutra C1. Unidade de momento de dipolo Debye (D).*

Funcional/Base	**Momento de Dipolo (D)**	
	FG	PCM
B3LYP/TZVP	1,2602	1,7516
B3LYP/QZVP	**1,6091**	2,2566
B3LYP/Aug-cc-pVDZ	1,2954	1,8420
B3LYP/Aug-cc-pVTZ	1,2735	**1,8208**
B3LYP/Def2-TZVP	1,2163	1,6961

Na tabela, podemos observar todos os valores de momento de dipolo, para FG existe pouca variação dos valores sendo o conjunto de bases QZVP o dado que mais se distanciou da média. Em um modelo de solvente implícito, existe uma grande variação dos resultados, mas a conformação referente a base QZVP destaca-se das demais. Os valores marcados em negrito foram os que a absorção ótica forneceu valores mais próximos aos dados experimentais.

No próximo tópico apresentamos e discutimos sobre resultados de absorção e fluorescência, além de apresentar figuras referentes aos orbitais moleculares para uma maior complementação dos resultados.

5.5.4 Absorção Ótica, Fluorescência e Orbitais Moleculares

Apresentamos nesta seção os resultados referentes as transições verticais para a molécula do o-Abz na protonação neutra.

Absorção Ótica

Quando o sistema está com carga líquida zero possui duas protonações diferentes: zwitteriônica e neutra. Uma análise mais realista deveria levar em consideração a distribuição para

Tabela 5.10 *– Absorção ótica para o o-Abz em FG e PCM na conformação neutra C1. O funcional utilizado foi o B3LYP.*

Conjunto de Bases	**Fase Gasosa**				
	λ(nm)	F. Oscilador	Transição	E. Excitado	Erro (%)
TZVP	317,74	0,1019	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	2,5
QZVP	326,53	0,1097	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	0,2
Aug-cc-pVDZ	325,16	0,0952	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	0,3
Aug-cc-pVTZ	320,97	0,0958	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	1,5
Def2-TZVP	318,57	0,0962	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	4,7
Conjunto de Bases	**Solvente Implícito - PCM**				
	λ (nm)	F. Oscilador	Transição	E. Excitado	Erro (%)
TZVP	323,33	0,1266	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	0,8
QZVP	335,65	0,1390	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	3,0
Aug-cc-pVDZ	332,37	0,1230	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	2,0
Aug-cc-pVTZ	326,62	0,1216	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	0,2
Def2-TZVP	323,63	0,1204	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	0,7
Experimental	326	-	-	-	-

as três conformações estáveis, no entanto os resultados referentes ao o-Abz na protonação neutra são considerados satisfatórios pela sua elevada proximidade com dados experimentais. Os resultados de absorção ótica para a forma neutra chamam atenção pela sua baixa oscilação entre os diversos níveis de teoria. Seguindo os mesmos critérios que na forma aniônica, o valor mais próximo dos dados experimentais foram considerados o melhor modelo.

Analisando a Tabela 5.10 podemos notar que em FG os valores pouco diferem do valor experimental de 326 nm, deste modo podemos dizer que os modelos químico-quânticos utilizados conseguem descrever as excitações eletrônicas do o-Abz. O modelo que melhor representa a molécula foi o B3LYP/QZVP quando estudamos em fase gasosa. Quando utilizado o solvente implícito é observado que os valores de absorção aumentam porém, é importante ressaltar o aumento consistente de todos os valores. Utilizando o solvente implícito PCM, a melhor descrição para a molécula foi feita com o nível de teoria B3LYP/Aug-cc-pVTZ.

As transições verticais são formadas por um conjunto de transições entre vários orbitais onde, na forma neutra, os estados que tiveram maior coeficiente são caracterizadas como HOMO $\rightarrow$ LUMO, o que difere das transições encontradas na forma aniônica. Observa-se também que a força do oscilador é bem maior em todos os casos mostrando que é muito mais intensa na forma neutra quando comparada com a forma aniônica. Os erros relativos obtidos dos cálculos são considerados baixos, permanecendo entre 0,2% e 4,7% para a FG e 0,2% e 3,0% para efeito de solvente.

Fluorescência

Para o o-Abz neutro, obtivemos a fluorescência em FG apenas com o conjunto de bases QZVP a partir e resultados de geometria com o mesmo conjunto. Inicialmente calculamos a geometria do estado excitado, confirmamos a estabilidade e mínimo de energia através do cálculo de frequências vibracionais e posteriomente calculamos a transição entre os estados excitado e fundamental.

Como observado no tópico anterior, a absorção ótica com o conjunto de bases QZVP apresentou comprimento de onda de 326,5 nm com força do oscilador 0,1097. A energia para a transição $(S_0 \rightarrow S_1)$ foi de 3,80 eV sendo as transições entre os estados 35 $\rightarrow$ 38 com coeficiente 0,115 e 36 $\rightarrow$ 37 com coeficiente igual a 0,694. Observando as componentes das transições vemos que a transição dominante é HOMO $\rightarrow$ LUMO.

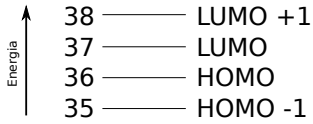


***Figura 5.16** – Representação dos orbitais HOMO, LUMO, HOMO -1 e LUMO +1.*

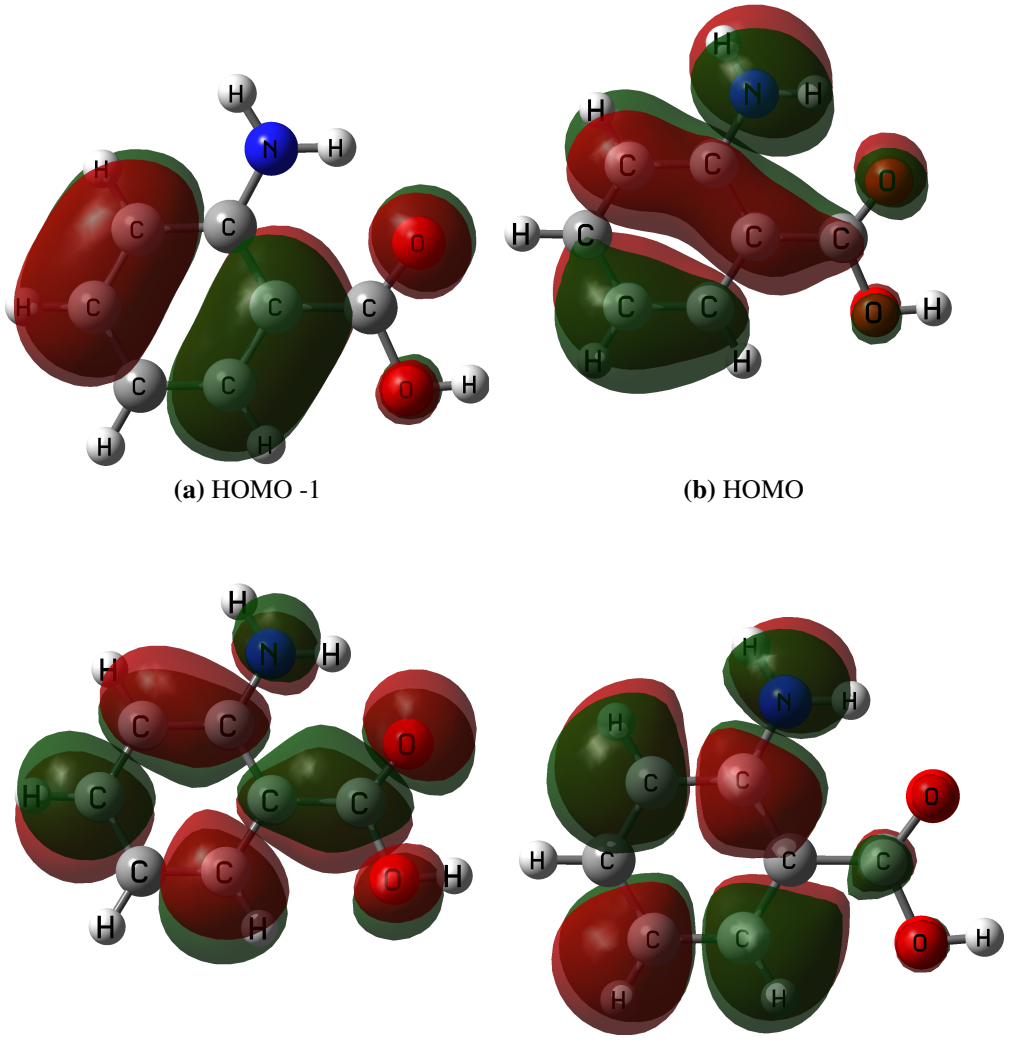
Quando analisamos a fluorescência, a transição $(S_0 \rightarrow S_1)$ tem a energia reduzida para 3,34 eV de modo que o comprimento de onda aumenta para 371,6 nm com força do oscilador de 0,0906. A transição eletrônica é caracterizada como HOMO $\rightarrow$ LUMO com coeficiente de 0,701.

Os valor referente ao pico de fluorescência quando calculado pelos métodos de química

quântica mostraram-se ruins se comparados com o dado experimental de 418 nm, apresentando erro relativo de 11%, isto pode ser explicado pois o valor experimental é referente à molécula na forma zwitteriônica. Algumas alternativas para encontrar um valor mais próximo do experimental seria a realização de simulações envolvendo dinâmica molecular quântica para o estado de protonação zwitteriônico, ou o estudo da protonação zwitteriônica através da microhidratação em estados fundamentais e excitados, no entanto estes procedimentos envolve um custo computacional grande e uma complexa teoria para tratamento de estados excitados.

Orbitais Moleculares

Apresentamos na Figura 5.17, os orbitais moleculares 35 (HOMO -1), 36 (HOMO), 37 (LUMO) e 38 (LUMO +1) para a conformação C1 utilizando efeitos de solvente. As imagens são bastante semelhantes aos orbitais mostrados na Figura 5.7c. Neste caso, considerando a molécula imersa em um solvente implícito com nível de teoria B3LYP/Aug-cc-pVTZ.



(a) HOMO -1 **(b)** HOMO

(c) LUMO **(d)** LUMO +1

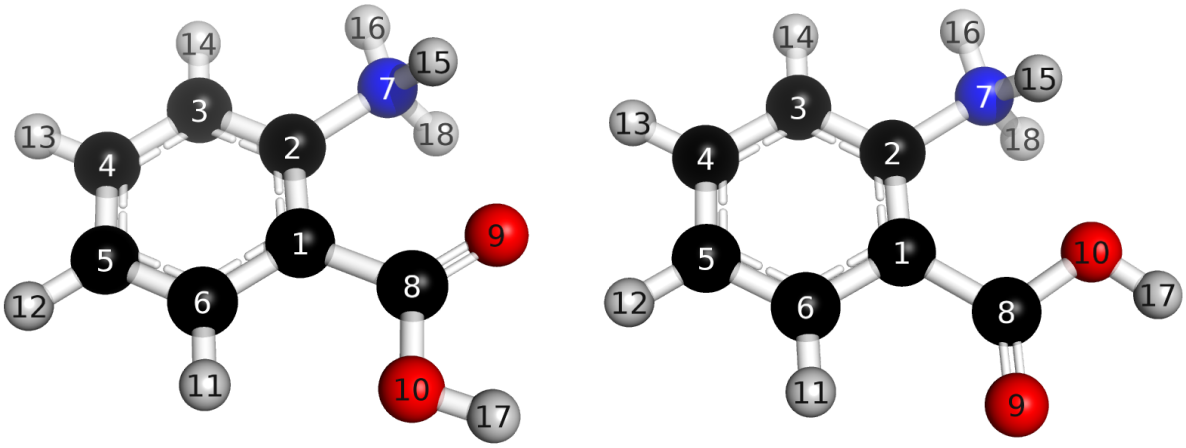
Figura 5.17 *– Orbitais Moleculares para a transição eletrônica HOMO → LUMO na molécula de o-Abz utilizando o modelo de meio contínuo e nível de teoria B3LYP/QZVP.*

5.6 Protonação Catiônica

Quando o pH da solução tende a zero, a forma puramente catiônica é dominante. Nesta seção mostramos resultados de energia, conformação, absorção e dinâmica molecular de modo a tentar simular regiões extremas. Inicialmente foi realizado um estudo de energia pois a molécula apresenta mais de uma conformação.

5.6.1 Energia relativa e população de Boltzmann

A molécula de o-Abz na conformação catiônica possui duas conformações estáveis, aqui representadas por C1 e C2 conforme a Figura 5.18. A diferença marcante na energia dessas moléculas esta relacionada à rotação do ângulo diedro $(C6-C1-C8-O9)$ em 180°.



(a) C1 **(b)** C2

Figura 5.18 *– Conformações C1 e C2 para a molécula do o-Abz.*

Inicialmente otimizamos, em fase gasosa, a geometria e verificamos o ponto de mínimo para frequências vibracionais para as duas conformações. Após esse passo, analizamos a energia relativa entre as conformações através de diversos conjuntos de bases e funcionais, obtendo assim a população relativa a cada conformação, como visto na Tabela 5.11.

A Tabela 5.11 indica que a conformação C1 é mais estável independente de qual funcional ou conjunto de bases é utilizado e também que a diferença de energia entre as moléculas é pequena. Com essa diferença de energia, a forma dominante para a população de Boltzmann é a conformação C1 com mais de 99% das moléculas nesta geometria.

Tabela 5.11 *– Energia para o o-Abz na conformações: Catiônica C1 em fase gasosa, com relação a Catiônica C2. Unidade de energia [kcal/mol].*

Método/Base	**Conformações**	
	C1	C2
MP2/TZVP	-223,34	-217,49
MP2/QZVP	-220,66	-216,55
MP2/CBSB7	-224,86	-219,03
M062X/TZVP	-216,63	-211,81
M062X/QZVP	-216,14	-213,02
M062X/CBSB7	-216,48	-213,71
TPSSh/TZVP	-219,95	-215,06
TPSSh/QZVP	-218,75	-215,51
TPSSh/CBSB7	-221,96	-217,07

5.6.2 Geometria

Conforme apresentado pela análise de energia, optamos pela apresentação de resultados referentes à conformação C1 do o-Abz na protonação catiônica. Apresentamos resultados referentes a distâncias, ângulos planares e ângulos diedros otimizadas em FG e PCM, utilizando em ambas o nível de teoria B3LYP/QZVP.

A protonação catiônica foi tratada igualmente às protonações anteriores, com a utilização de diversos conjuntos de bases. Nota-se uma drástica diferença entre os comprimentos das ligações quando comparados FG e PCM, sendo a única semelhança no grupo NH3, onde existe uma aproximação do hidrogênio (H15) com o oxigênio (O9) sendo padrão com ou sem o efeito de solvente. Quando otimizado em FG, a interação N-H15, tende a se romper para formar uma ligação de hidrogênio com o oxigênio (N-H15-O9), o que não ocorre quando utilizado o efeito de solvente. Podemos afirmar isto pela diminuição das distâncias entre os átomos.

Os valores dos ângulos planares apresentaram aumento quando comparados aos cálculos em FG, de forma semelhante as outras protonações. As comparações entre os modelos de FG e PCM para os ângulos planares mostram que são bastante parecidos. Os ângulos diedros apresentaram maior abertura no modelo implícito PCM com relação ao modelo FG, apesar destas pequenas diferenças podemos dizer que a forma estrutura do PCM é a mais estável do que a forma em FG.

Tabela 5.12 *– Geometria do o-Abz na conformação catiônica em FG e PCM. Unidade de distância [Å] e ângulo [°]. Geometria otimizada e verificada com DFT utilizando o funcional: B3LYP e a base: QZVP.*

Geometria	**Conformações**	
	FG	PCM
$C_1 - C_8$	1,478	1,528
$C_8 = O_9$	1,256	1,269
$C_8 - O_{10}$	1,342	1,256
$O_{10} - H_{17}$	1,496	1,256
$C_2 - N_7$	1,024	1,381
$N_7 - H_{15}$	1,070	1,008
$N_7 - H_{16}$	1,024	1,018
$N_7 - H_{18}$	1,024	1,018
$\theta(C_2 - N_7 - H_{15})$	115,5	116,5
$\theta(C_2 - N_7 - H_{16})$	109,9	112,7
$\theta(C_2 - N_7 - H_{18})$	105,7	107,8
$\theta(C_1 - C_8 - O_9)$	116,4	117,6
$\theta(C_1 - C_8 - O_{10})$	116,3	117,4
$\theta(O_{10} - C_8 - C_1 - C_2)$	-171,2	-172,1
$\theta(O_9 - C_8 - C_1 - C_2)$	5,9	8,6
$\theta(C_3 - C_2 - N_7 - C_{15})$	-14,8	-17,6
$\theta(C_3 - C_2 - N_7 - C_{16})$	-151,0	-157,7

5.6.3 Absorção Ótica, Fluorescência e Orbitais Moleculares

O estudo de atividade espectroscópica via métodos computacionais de estrutura eletrônica é uma tarefa bastante árdua, haja visto que nem sempre todas as propriedades podem ser simuladas com uma grande similaridade ao experimento real. Nesta seção apresentamos resultados referentes à absorção ótica. Quanto fluorescência não serão apresentados dados pois como indicado na etapa experimental a molécula não tem emissão no visível neste estado de protonação.

Absorção Ótica

Em pH muito abaixo do pk_1 surge a forma catiônica do o-Abz, neste meio o comportamento do sistema se torna muito complexo e consequentemente a obtenção de resultados computacionais. Dos dados experimentais vemos que uma terceira banda de absorção aparece para o novo estado de protonação cujo máximo esta em 272 nm.

Observando os resultados computacionais (Tabela 5.13), notamos que existe um deslocamento na faixa de $11 - 19nm$ em relação ao valor experimental. Apesar deste aparente erro, temos que ressaltar que todas as transições ocorreram dentro de um valor médio com características muito parecidas. As transições eletrônicas ocorreram predominantemente do orbital HOMO para o orbital LUMO, todas com uma força do oscilador menos intensa do que em outras protonações. A força do oscilador é relacionada com a intensidade da absorção ótica, que neste caso reflete o dado experimental. Outro fato interessante é notar o deslocamento para o azul que ocorre na forma catiônica em relação aniônica pôde ser reproduzida pelas simulações.

Tabela 5.13 *– Absorção ótica para o o-Abz em FG e PCM na conformação catiônica C1. O funcional utilizado foi o B3LYP.*

Conjunto de Bases	**Fase Gasosa**				
	λ (nm)	F. Oscilador	Transição	E. Excitado	Erro (%)
TZVP	253,24	0,0251	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	6,9
QZVP	258,26	0,0295	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	5,1
Aug-cc-pVDZ	257,90	0,0230	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	5,2
Aug-cc-pVTZ	254,26	0,0231	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	6,5
Def2-TZVP	253,37	0,0230	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	6,8
Conjunto de Bases	**Solvente Implícito - PCM**				
	λ (nm)	F. Oscilador	Transição	E. Excitado	Erro (%)
TZVP	255,01	0,0341	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	6,2
QZVP	261,53	0.0394	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	3,8
Aug-cc-pVDZ	259,90	0,0321	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	4,4
Aug-cc-pVTZ	256,37	0,0322	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	5,7
Def2-TZVP	254,93	0,0317	HOMO $\rightarrow$ LUMO	1º	6,3
Experimental	272	-	-	-	

Analisando específicamente a transição quando utilizamos o efeito de solvente e o conjunto de bases QZVP, podemos notar a complexidade do evento diante de uma combinação maior entre os estados eletrônicos. Em outras protonações apresentamos duas combinações, neste caso as combinações foram 35 $\rightarrow$ 37 com coeficiente -0,107, 35 $\rightarrow$ 38 com 0,233 e 36 $\rightarrow$ 37 com 0,657. Assim, caracterizamos a transição como HOMO $\rightarrow$ LUMO.

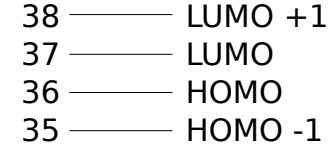
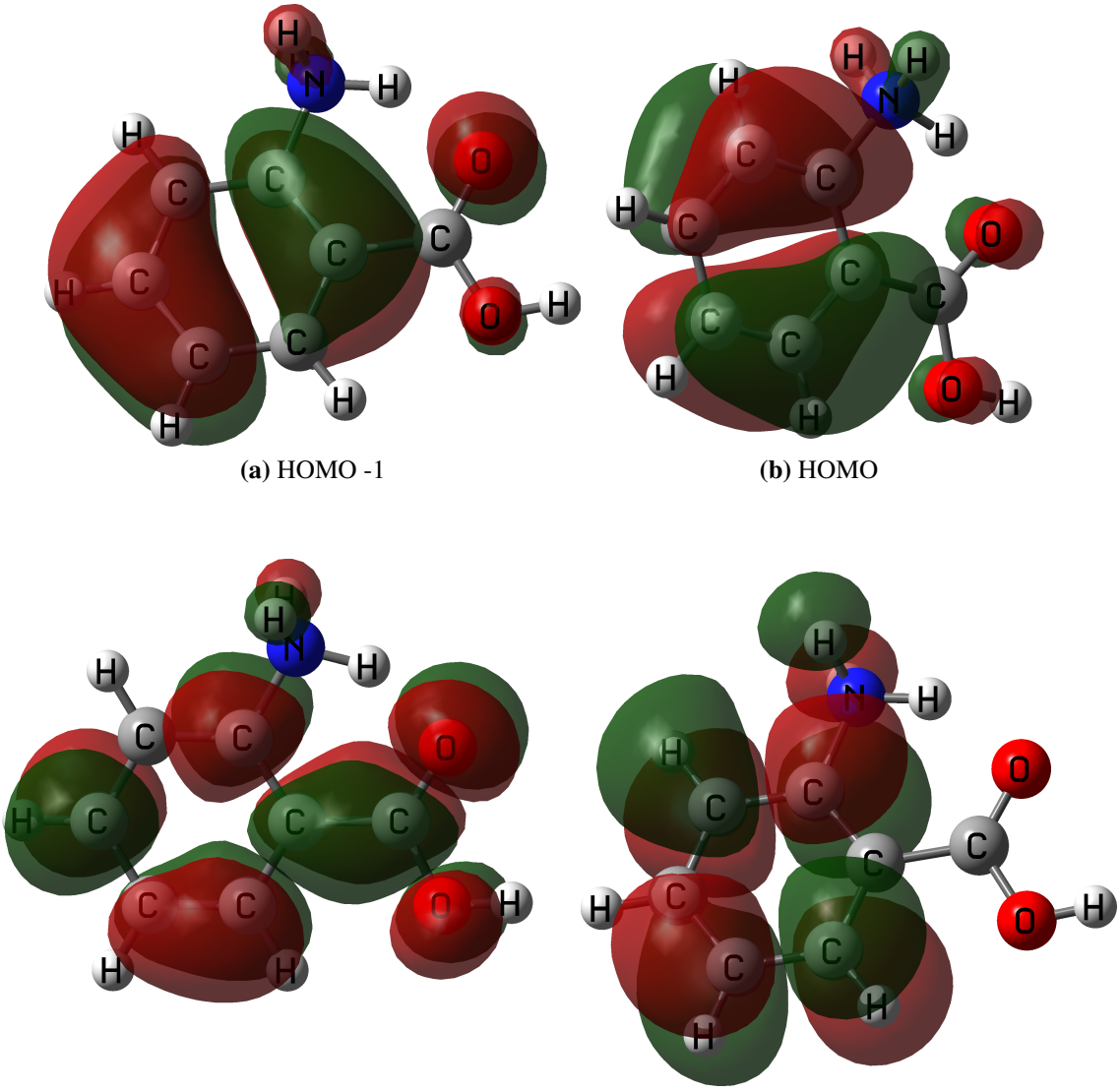


Figura 5.19 *– Representação dos orbitais HOMO, LUMO, HOMO -1 e LUMO +1.*

Na próxima seção apresentamos os orbitais 35 (HOMO -1), 36 (HOMO), 37 (LUMO) e 38 (LUMO +1).

Orbitais Moleculares

A transição eletrônica entre os estados fundamental e 1º excitado $(S_0 \rightarrow S_1)$ é uma combinação linear dos orbitais (Figura 5.20) com os coeficiente acima citados.



(a) HOMO -1 **(b)** HOMO

(c) LUMO **(d)** LUMO +1

Figura 5.20 *– Orbitais Moleculares ligados à transição eletrônica* $(S_0 \rightarrow S_1)$ *na molécula de o-Abz utilizando solvente implícito (PCM) com nível de teoria B3LYP/QZVP.*

5.6.4 Dinâmica Molecular

A execução de um experimento computacional exige diversas etapas, sendo que para a DM uma das mais importantes é a preparação do sistema, onde a representação das cargas parciais é de fundamental importância para uma boa representação das interações. A garantia de que um sistema está preparado para a simulação pode ser feita através de análises de parâmetros como temperatura, pressão, energia, e rmsd assim apresentamos alguns gráficos para mostrar que o sistema esta em equilíbrio. Além das etapas do cálculo de cargas e verificação da estabilidade do

sistema, serão apresentados resultados obtidos pelas simulações por DM sobre LH, distribuição radial de pares e RMSF.

Cargas Parciais

Uma molécula, tanto isolada quanto em um meio solvente, tem a sua distribuição de cargas que é alterada seja por mudanças conformacionais, ou pela interação com a vizinhança. Essas cargas serão em partes responsáveis pela forma como vão interarir a molécula com o meio circundante. Deste modo apresentamos na Figura 5.21 uma representação da distribuição de cargas paciais para a molécula de o-Abz na protonação catiônica calculadas em fase gasosa. Este conjunto de cargas será utilizado como padrão para as simulações por dinâmica molecular.

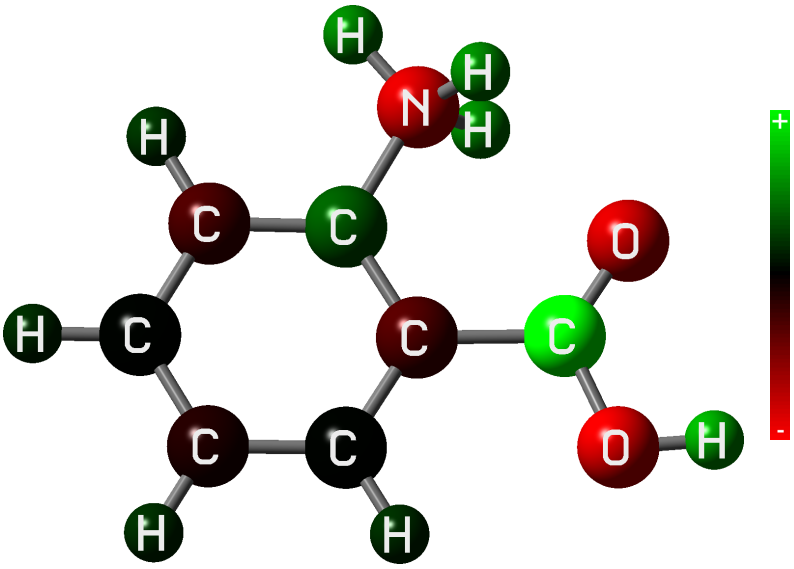


Figura 5.21 *– Distribuição de cargas parciais para o-Abz em fase gasosa na protonação neutra conformação C1*

Validação da Dinâmica Molecular

A validação dos resultados da DM, foi realizada através da análise de energia por átomo e do RMSD do sistema. Observamos que durante a simulação a energia média é aproximadamente $-34,5 kJ/mol$. Apesar de ser pouco maior que a energia média do sistema aniônico, isso pode ser justificado pelo tamanho do sistema que foi o maior a ser simulado.

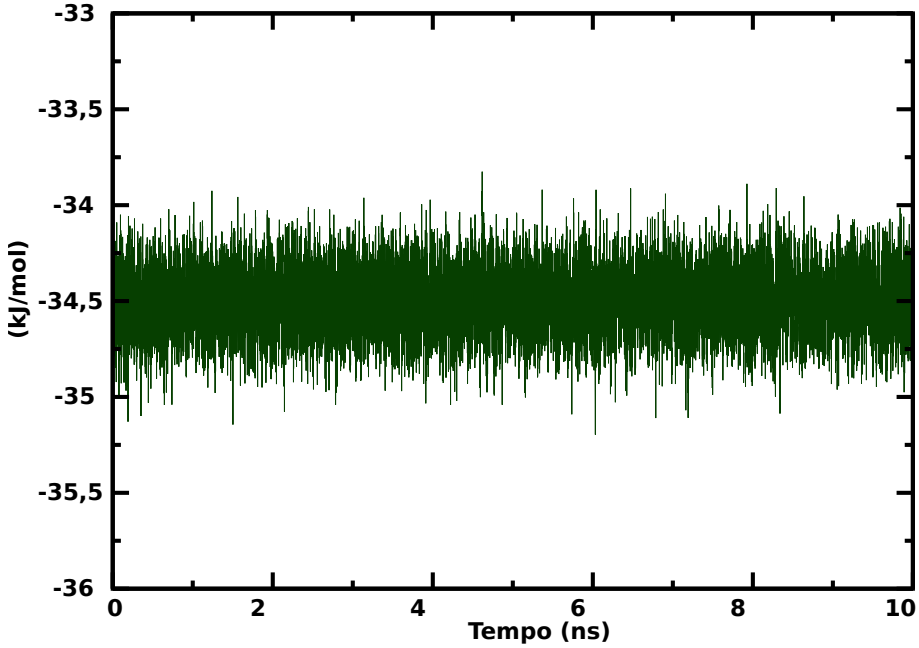


Figura 5.22 *– Energia média por átomo para o sistema o-Abz catiônico + íon + água.*

A energia média por átomo pode ser complementada pela Figura 5.23 cuja análise do sistema mostra um comportamento constante ao longo da simulação, indicando que o sistema está equilibrado e bem parametrizado. Podemos dessa forma analisar resultados para as LH que a molécula faz com o solvente durante a simulação, RMSF do o-Abz, dentre outras propriedades.

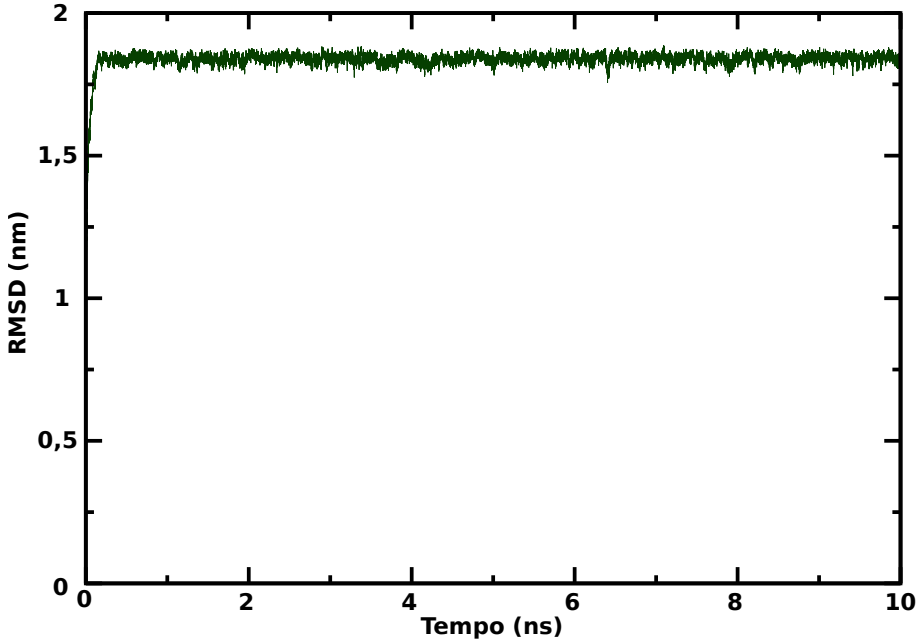


Figura 5.23 *– RMSD do sistema o-Abz catiônico + íon + água.*

Distribuição Radial, Ligações de Hidrogênio e RMSF

A distribuição radial considerando os centros de massa do *abz* e água nos ajuda a ter uma idéia de como a molécula esta solvatada. Observando a Figura 5.26 percebemos uma semelhança com a distribuição encontrada para a forma aniônica o que de certo modo mostra que os resultados estão consistentes.

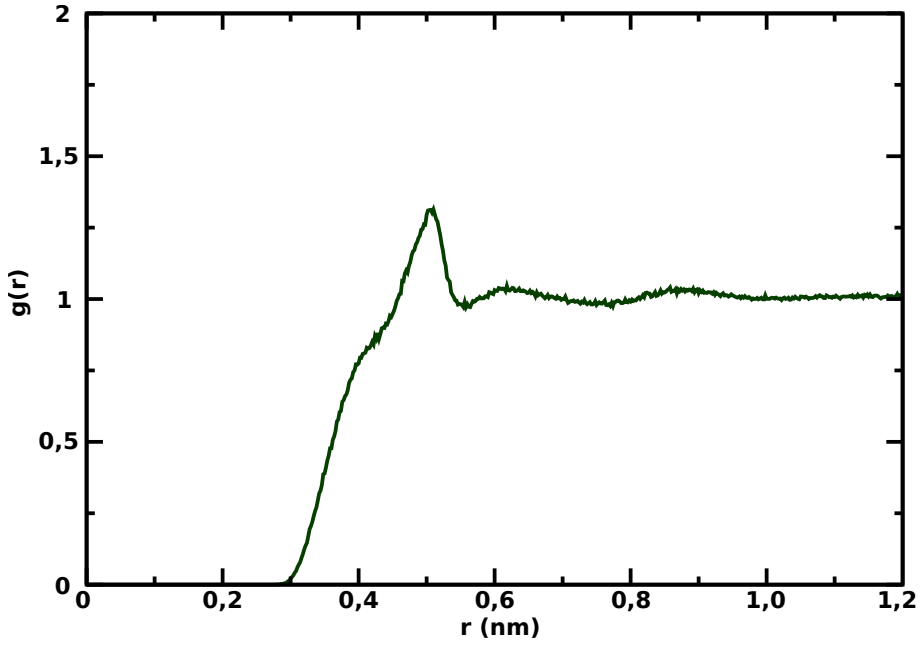


Figura 5.24 *– Distribuição radial da água em torno da molécula de o-Abz na protonação catiônica considerando o centro de massa.*

Observamos inicialmente um ombro em 0,45nm sendo um pico bem definido entre 0,45-0,56nm que possui em média 18,07 moléculas de água. Existem ainda dois picos bem menores, o segundo entre 0,56-0,77nm contém um número cumulativo de 57,79 moléculas e o terceiro pico entre 0,77-0,97nm conta com 120 moléculas de água. Estes resultados mostram grande semelhança com os valores encontrado na protonação aniônica, sendo explicado pela pequena diferença conformacional entre as moléculas.

Analisamos também as LH entre o sistema (o-Abz + Água), encontrando uma média de 4,71 LH ao longo da simulação, o que é uma redução brusca em relação à protonação aniônica, apresentando um tempo de vida de 0,96ps. Observando a Tabela 5.14 vemos que a distribuição se concentra entre 4 e 6 LH, ocorrendo em média 4 LH em 30,33% do tempo e 5 LH em 43,16%.

Tabela 5.14 *– Ligações de Hidrogênio formada entre o o-Abz catiônico e as moléculas de água.*

LH	1	2	3	4	5	6	7	8
%	0,03	0,77	7,70	30,33	43,12	16,58	1,44	0,03

Analisando o número cumulativo de moléculas de água (Figura 5.26) abaixo do ”ombro”até 0,45nm temos uma média de 5,5 moléculas. A comparação do número cumulativo (5,5 moléculas) à média de LH (4,71) ou então ao maior conjunto de LH (5 LH - 43,16%), pode indicar que existe uma região com moléculas disponíveis para ligações.

A solvatação do o-Abz é complementada analisando regiões específicas dos grupos amina e carboxila. Ao analisar a Figura 5.26, onde temos três grupos doadores N7-H15, N7-H16, N7-H18 e um aceitador OW, a primeira característica marcante é a bem definida curva de distribuição indicando uma organização do solvente e outra observação é que a distribuição em torno do par (N7-H15 - OW) difere dos demais.

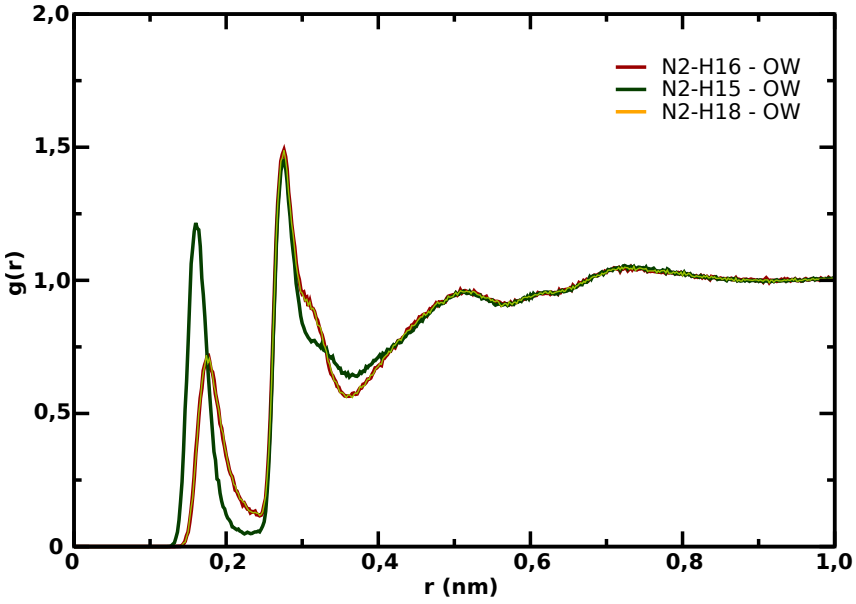


Figura 5.25 *– Distribuição radial de pares entre N7-H15, N7-H16, N7-H18 e OW.*

O par (N7-H15 - OW) possui dois picos bem definidos sendo o primeiro entre 0,12-0,23nm e o segundo entre 0,23-0,37nm com o número cumulativo de 0,48 átomos de OW no primeiro pico. Este valor quando comparado com os dados sobre LH (Tabela 5.15) mostra-se aparentemente discrepante pois a análise estatística apresenta 1 LH em 90,28% do tempo, mas se considerarmos o segundo pico com máximo em 0,27nm este dado sobe para 0,96 OW pare-

cendo dando assim mais coerências entre os resultados de LH e distribuição radial de pares. É importante ressaltar que pelos critérios geométricos o máximo para as LH nete grupo (N7-H15 - OW) está em 0,27nm.

Tabela 5.15 *– Ligações de Hidrogênio formada entre os pares N7-H15, N7-H16, N7-H18 e OW.*

LH	0	1	2	**Média**
% N7-H15	9,64	90,28	0,08	**0,90 LH**
% N7-H16	20,80	78,95	0,25	**0,77 LH**
% N7-H18	21,37	78,41	0,22	**0,79 LH**

A Tabela 5.15 e a Figura 5.26 nos indica que os resultados dos grupos (N7-H16 e N7-H18) são muito semelhantes, de modo que apresentaremos apenas a análise do par (N7-H16 - OW). Este par, conforme indicado nos dados estatísticos mostra uma média de 0,77 LH, sendo que em 78,95% do tempo apresentou 1 LH. A análise da distribuição radial apresenta um valor de 0,48 átomos de OW para o primeiro pico (0,13-0,24nm), mas no ponto máximo do segundo pico (0,28nm) tem cerca de 1,15 átomos, deste modo os dados se complementam indicando que os resultados estão coerentes.

Tabela 5.16 *– Ligações de Hidrogênio formada entre o par O10-H17 e OW.*

LH	0	1	2	**Média**
% O10-H17	0,69	99,29	0,02	**0,99 LH**

Na Tabela 5.16 analisamos outra região de interesse, o grupo (O10-H17 - OW) que em média realizou 0,99 LH durante a simulação, em 99,29% do tempo realizou 1 LH. Esses valores mostram que ocorrem apenas 1 LH durante a simulação com o grupo (O10-H17), sendo o tempo de vida média de cada ligação 10,62ps.

Analisando o tempo de vida média das LH do componente (N7-H15 - OW) com duração de 2,25ps e do componente (O10-H17 - OW) podemos dizer que a conformação onde grupo N7-H15 mantém-se voltado para o grupo carboxíla apresenta maior estabilidade, indicando uma possível LH intramolecular.

Uma análise interessante é sobre o quanto a molécula se modifica ao longo da simulação em relação a estrutura inicial, que como indicado na Figura 5.26 mostra uma alta movimentação

dos grupos amina e carboxílico. Existe uma muita semelhança com o RMSF da forma aniônica devido a serem esses grupos os que apresentam maior grau de liberdade.

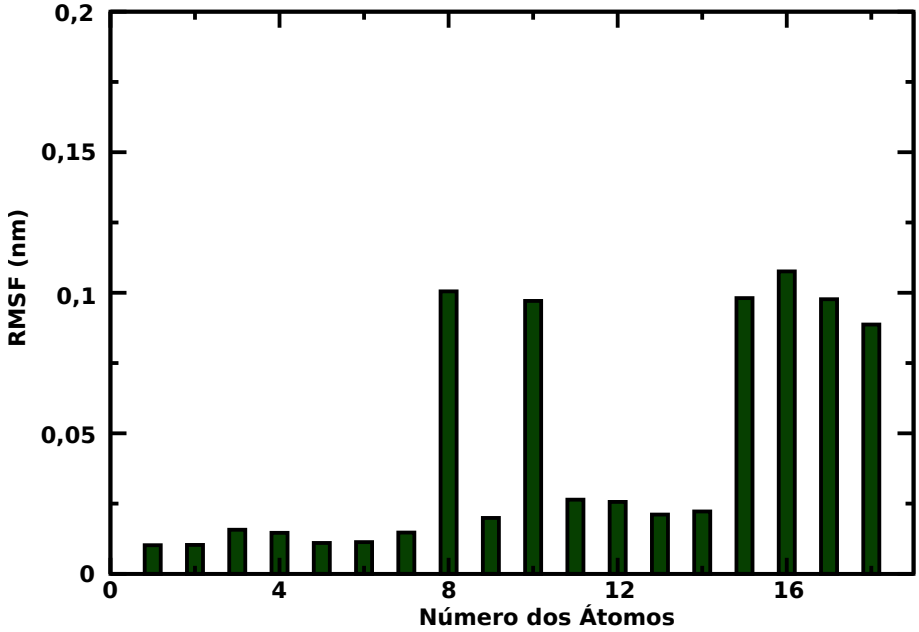


Figura 5.26 *– RMSF do o-Abz.*

5.7 o-Abz-NH(CH3)

Nesta etapa apresentamos resultados sobre a conformação, momento de dipolo e absorção ótica para a molécula de o-Abz-NH(CH3). O objetivo é reproduzir valores obtidos experimentalmente de absorção ótica em solventes polares e em micelas de SDS através da utilização de efeitos de solvente.

5.7.1 Energia relativa e população de Boltzmann

Inicialmente procuramos descobrir quais as conformações em que o o-Abz-NH(CH3) pode ser encontrado através da análise de energia.

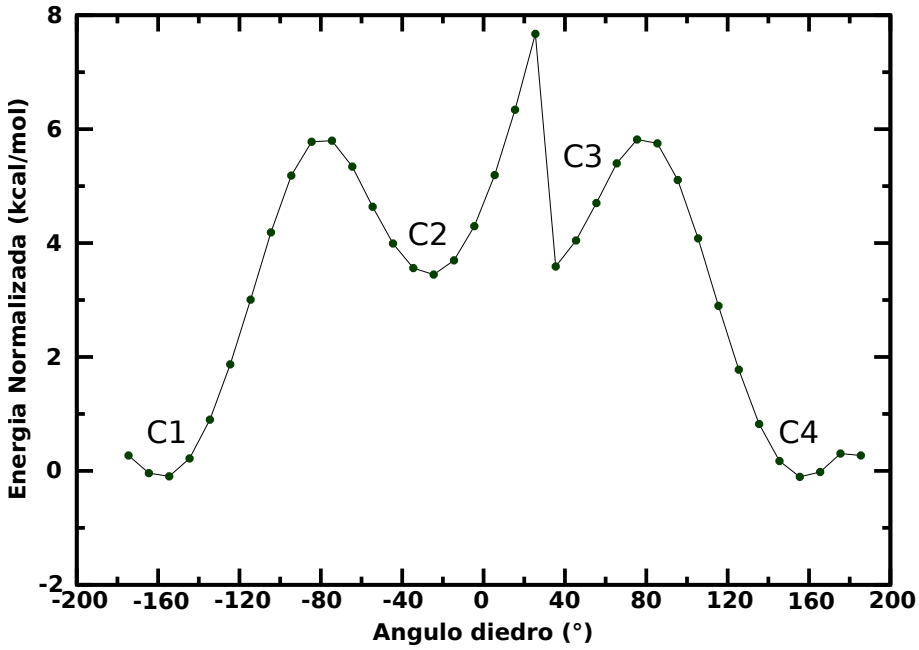
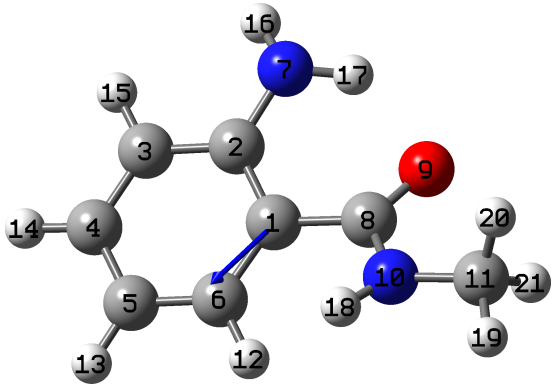


Figura 5.27 *– Gráfico da varredura do ângulo diedro (* C1 C8 *) para o o-Abz-NH(CH3).*

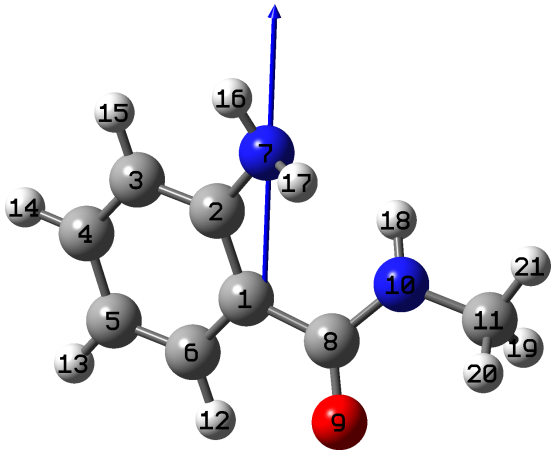
A Figura 5.27 mostra a existência de quatro mínimos de energia que contém duas conformações para a molécula, sendo que a energia de C2 é aproximadamente 3kcal/mol a mais que C1.

Através da população relativa de Boltzmann podemos atribuir um peso a cada uma das geometrias, indicando a porcentagem de moléculas encontradas com uma dada energia, onde para a conformação C1 temos um valor de 64,74% e para C2 35,26%.

Outro ponto de interesse é a diferença entre valores de dipolo para as conformações C1 e



(a) C1



(b) C2

Figura 5.28 *– Conformações C1 e C2 para o-Abz-NH(CH3).*

C2, sendo o momento de dipolo de C1 igual a 1,89D e C2 igual a 4,23D.

5.7.2 Geometria

Quando observamos a Figura 5.28 notamos uma grande diferença conformacional devido à ramificação -NH(CH3). Analisando especificamente as distâncias entre átomos não observamos grandes mudanças sendo a maior diferença a ligação C2-N7.

As diferenças encontradas nos ângulos planares são pequenas quando comparadas aos valores relacionados aos ângulos diedros. Neste caso a primeira grande diferença se dá no ângulo (C6-C1-C8-N10), onde para a conformação C1 vale -24,15° enquanto que para C2 vale 152,94°, isto é visivelmente perceptível pela figura pois nota-se a rotação do grupo -NH(CH3) por inteiro. A outra grande diferença está no ângulo diedro (C6-C1-C8-O9) que por estar ligado aos átomos (C6-C1-C8-) varia bastante. A relação entre os ângulos altera-se muito pois o ângulo diedro

pode caracterizado por várias combinações sendo importante determinar os átomos centrais, neste caso (*-C1-C8-*).

Tabela 5.17 *– Geometria do o-Abz na conformação aniônica em fase gasosa e PCM. Unidade de distância [Å] e ângulo [°]. Geometrias otimizadas e verificadas com DFT utilizando o funcional: B3LYP e o conjunto de bases: TZVP.*

Geometria	**B3LYP/TZVP**	
	C1	C2
$C_1 - C_8$	1,492	1,505
$C_8 = O_9$	1,234	1,223
$C_8 - N_{10}$	1,363	1,368
$N_{10} - H_{18}$	1,005	1,009
$N_{10} - C_{11}$	1,453	1,454
$C_{11} - C_{19}$	1,089	1,094
$C_{11} - C_{20}$	1,094	1,089
$C_{11} - C_{21}$	1,089	1,090
$C_2 - N_7$	1,370	1,404
$N_7 - H_{16}$	1,006	1,010
$N_7 - H_{17}$	1,012	1,011
$\theta(C_1 - C_8 - O_9)$	122,86	121,66
$\theta(C_1 - C_8 - N_{10})$	116,83	116,90
$\theta(C_1 - C_2 - N_7)$	121,89	122,42
$\theta(C_8 - N_{10} - C_{11})$	121,20	120,58
$\theta(C_8 - N_{10} - H_{18})$	118,72	118,01
$\theta(C_1 - C_2 - N_7 - H_{17})$	19,53	-37,73
$\theta(C_1 - C_2 - N_{10} - C_{11})$	-178,62	-172,40
$\theta(C_1 - C_2 - N_{10} - H_{18})$	-13,76	-25,73
$\theta(C_6 - C_1 - C_2 - N_7)$	179,80	179,85
$\theta(C_6 - C_1 - C_8 - N_{10})$	-24,15	153,94
$\theta(C_6 - C_1 - C_8 - O_9)$	155,74	-25,73

5.7.3 Absorção Ótica

Calculamos também as transições verticais usando diferentes valores para caracterizar o solvente implícito. A idéia é a reprodução de resultados experimentais quando a molécula está interagindo com micelas de SDS.

Pela Tabela 5.18 notamos que não há muita diferença quando muda-se os valores para a constante dielétrica, os resultados apresentados mostram um erro relativo baixo entre 0,7% e 0,9%. Embora estes resultados tenham se alterado pouco conforme a mudança de ambiente,

Tabela 5.18 *– Absorção ótica o-Abz-NH(CH3) utilizando diferentes valores de epsilon. Cálculo utilizando a teoria TD-DFT com o funcional B3LYP e conjunto de bases Def2-TZVP.*

Epsilon	λ(nm)	F. Oscilador	Erro (%)
10	306,86	0,0935	0,7
15	306,72	0,0934	0,7
20	306,55	0,0931	0,8
78	306,17	0,0924	0,9
Exp. - SDS	309	-	-
Exp. - PBS	309	-	-

existe uma necessidade de uma outra abordagem teórico-computacional para dar uma melhor descrição sobre o que acontece na vizinhança do o-Abz-NH(CH3), tendo em vista que o experimento não é tão sensível para notar diferenças tão sutis quanto os valores calculados.

Simulações por dinâmica molecular considerando o sistema (o-Abz-NH(CH3) em micelas de SDS), poderiam nos mostrar como a molécula interage com a micela, além de poder gerar várias geometrias que podem ser utilizadas para calcular os espectros de absorção ótica gerando assim um conjunto de pontos que representaria um espectro experimental.

6 Conclusão

Experimentos de titulação envolvendo a sonda *o*-Abz foram realizados para determinação dos estados de protonação conforme muda-se o pH, sendo encontrado dois pontos de pka. Abaixo de pk1=2,3 existe a forma catiônica, onde tanto a carbolixa como o grupo amina estão protonados. Acima de pk2=5.0 a molécula está na forma aniônica, protonação em que a carboxila e a amina estão desprotonadas. Na região entre pk1 e pk2 coexistem as formas zwitteriônicas, com amina protonada e carboxila desprotonada e a forma neutra com amina desprotonada e carboxila protonada.

Com os estados de protonação definidos, fizemos os cálculos quânticos utilizando o nível de teoria DFT para determinação da geometria de menor energia, sendo verificadas a partir dos resultados de frequências vibracionais em fase gasosa e utilizando solvente implícito PCM. Com a teoria TD-DFT realizamos os cálculos de transição vertical, obtendo assim resultados teóricos para a absorção ótica. Para obtenção da geometria no primeiro estado excitado empregamos o método TD-DFT em fase gasosa para a geometria do estado fundamental que obteve menor erro relativo quando comparados os picos de absorção teórico e experimental. Calculamos a fluorescência a partir da geometria otimizada empregando também o método TD-DFT.

No estado de protonação aniônico calculamos a absorção ótica utilizando FG, PCM e microhidratação, onde obtivemos o melhor resultado em FG com o nível de teoria (B3LYP/6-311++G(d,p)) apresentando $\lambda_{FG}^{abs} = 311,9nm$, com o PCM usando o nível de teoria (B3LYP/QZVP) o valor foi de $\lambda_{PCM}^{abs} = 305,1nm$ aumentando o erro relativo de 0,6% para 1,3%. Quando utilizamos o método de microsolvatação reduzimos o erro para aproximadamente 0,2% chegando a um valor de $\lambda_{M.Hidr.}^{abs} = 309,5nm$.

A fluorescência apresentou um erro relativo de apenas 3,4% com valor calculado de $\lambda_{FG}^{flu} = 407,2nm$ considerado satisfatório diante do dado experimental $\lambda_{exp}^{flu} = 394nm$. Para estes cálculos foi empregado o método TD-DFT (B3LYP/Def2-TZVP), partindo da geometria otimizada com mesmo funcional e conjunto de bases.

Para as simulações por DM apresentamos os gráficos de RMSD do sistema e energia média por átomo mostrando que o sistema estava equilibrado, a partir desta garantia de equilíbrio termodinãmico foi realizada a contagem das ligações de hidrogênio e gerado o gráfico da distribuição radial entre pares. As LH são verificadas utilizando parâmetros geométricos de distância e ângulo, depois tentamos mostrar uma relação entre o número de LH e o número cumulativo de moléculas de água encontrado no ”ombro”da curva de distribuição radial de pares. A complementação dos resultados é feita mostrando a flutuação da posição dos átomos do soluto durante a simulação.

No caso aniônico encontramos um número médio de 8,13 LH entre o *o*-Abz e as moléculas de solvente, que quando comparado com o número cumulativo de moléculas no ”ombro”da curva de distribuição radial de pares mostra-se compatível tendo cerca de 7,7 moléculas de água ou seja, temos aproximadamente 8 moléculas de água ”disponíveis”para fazer LH. Estes resultados são interessantes se vistos como uma previsão teórica, e poderiam ser corroboradas por experimentos de difração de neutrons. Finalizamos a parte de DM observando o RMSF para o *o*-Abz indicando uma grande movimentação de rotação nos grupos amino e carboxíla.

Para a molécula em estado de protonação neutra realizamos um estudo de energia para ver qual das conformações tem maior estabilidade, sendo o rotâmero C1 o de menor energia tendo 95% de presença na população relativa de Boltzmann. A molécula mais estável apresentou resultados de absorção ótica com erro relativo de aproximadamente 0,2% quando comparados FG e PCM ao experimento. Com um nível de teoria TD-DFT (B3LYP/QZVP) a FG apresentou $\lambda_{FG}^{abs} = 326,53nm$ enquanto que para o modelo de solvente implícito foi utilizado o nível de teoria (B3LYP/Aug-cc-pVTZ) apresentou $\lambda_{FG}^{abs} = 326,62nm$.

Quando analisamos a fluorescência para a protonação neutra nos deparamos com um valor

muito diferente do experimental, indicando um erro de 11% entre o valor calculado e o medido, sendo o $\lambda_{FG}^{flu} = 371,59nm$ contra o valor de $\lambda_{exp}^{flu} = 418nm$. Este aparente erro pode ser explicado, pois durante o experimento o estado de protonação dominante não é o neutro e sim a forma zwitteriônica que também possui carga zero. Deste modo como os cálculos partem de um sistema que não está em condições parecidas com o experimento é possível que os resultados não sejam coerentes entre si.

A justificativa neste caso para a não realização de simulações para a protonação zwitteriônica é a sua alta instabilidade em FG e PCM, sendo necessário um maior tempo de estudo e empregar outras técnicas como a otimização com uma ou algumas camadas de solvatação, no entanto estes cálculos quânticos requerem um elevado custo computacional.

A simulação da molécula abaixo de pk1 é complicada. Na conformação catiônica, procedemos inicialmente com o cálculo de população relativa determinando assim a conformação C1 como mais estável com 99% na população de Boltzmann. A partir da forma C1, realizamos os cálculos de otimização e verificação de mínima energia com diversos conjuntos de bases, de modo semelhante ao que foi feito com outras formas. Com o método TD-DFT calculamos as energias de transição vertical obtendo para a fase gasosa a absorção com $\lambda_{FG}^{abs} = 258,26nm$, quando comparado com dados experimentais tem um erro relativo de 5,1%. Para o cálculo obtido com o modelo de solvente implícito o erro diminui para 3,8% com $\lambda_{PCM}^{abs} = 261,53nm$, assim podemos comparar estes resultados ao experimento com $\lambda_{exp}^{abs} = 272nm$.

Durante a DM para o estado aniônico, o sistema manteve-se estável e em equilíbrio termodinâmico conforme apresentamos nos gráficos de RMSD e energia. Quando analisamos as LH para o estado catiônico vemos uma queda no número de LH quando comparado ao número de LH realizadas pela protonação aniônica, reduzindo de 8LH para 4,7LH em média ao longo da simulação. A obtenção do número cumulativo de moléculas na distribuição radial entre pares indica que não há muita diferença entre as protonações aniônica e catiônica, no entanto o número de moléculas abaixo do ”ombro”é menor tendo uma redução para 5,5 moléculas, indicando assim que este é possivelmente o número de moléculas disponíveis para LH.

De um modo geral as propriedades foram parcialmente reproduzidas pelos métodos computacionais para o conjunto de simulações até aqui discutidos, necessitando ainda da aplicação de outras técnicas como microhidratação, ou mecânica molecular quântica para melhorar os resultados.

Os espectros de absorção ótica para o derivado *o*-Abz-NH(CH3) foram obtidos em meio aquoso e interagindo com micelas de SDS, porém não foram verificadas diferenças na posição espectral do máximo de absorção tendo apenas mudanças na sua intensidade.

Obtivemos inicialmente a população relativa para saber qual das duas formas era dominante, de modo que encontramos 64,74% dos rotâmeros como C1 e 35,26% como C2. Realizamos a otimização de geometria e verificação de mínima energia utilizando modelos de solvente implícito (COSMO) com o método DFT (B3LYP/Def2-TZVP) variando os valores da constante dielétrica. Com o método TD-DFT obtivemos todas as energias de transição para os primeiros estados excitados encontrando um valor médio de $\lambda = 306nm$, sendo o erro de 0,7% em relação ao dado experimental com $\lambda = 309nm$.

Estes resultados são considerados bons, mas são necessários outros estudos para a obtenção dos espectros teóricos empregando metodologias como a obtenção de um conjunto de geometrias através da DM e posteriormente realizar o cálculo das energias de transição vertical.

De um modo geral conseguimos reproduzir de forma satisfatória as propriedades espectrais, tendo esclarecido também como se dá a organização do solvente em torno do soluto. Verificamos que são necessários novos estudos mais profundos para a resolução dos problemas encontrados com alguns estados de protonação como a forma zwitteriônica e o derivado *o*-Abz-NH(CH3).

Referências

[1] ROMANI, A. P.; MARQUEZIN, C. A.; ITO, A. S. Fluorescence spectroscopy of small peptides interacting with microheterogeneous micelles. *International journal of pharmaceutics*, v. 383, n. 1-2, p. 154–6, jan. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19761821>.

[2] TURCHIELLO, R. F. et al. Ortho-aminobenzoic acid as a fluorescent probe for the interaction between peptides and micelles. *Biophysical Chemistry*, p. 217–225, 1998.

[3] DIURéTICOS. *http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/04/23/papel-dos-diureticos/*. acesso em 15/fev/2012.

[4] SOUZA, E. S. de et al. End-to-end distance distribution in bradykinin observed by Förster resonance energy transfer. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1474, n. 2, p. 251–61, apr 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742606>.

[5] TAKARA, M.; ITO, A. S. General and specific solvent effects in optical spectra of ortho-aminobenzoic acid. *Journal of fluorescence*, v. 15, n. 2, p. 171–7, mar. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15883772>.

[6] TAKARA, M. et al. Solvent effects in optical spectra of ortho-aminobenzoic acid derivatives. *Journal of fluorescence*, v. 19, n. 6, p. 1053–60, nov. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19521751>.

[7] ITO, a. S. et al. Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry*, v. 32, n. 45, p. 12264–72, nov. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8218305>.

[8] ATKINS, PETER; FRIEDMAN, R. *Molecular Quantum Mechanics*. 4th. ed. [S.l.]: OXFORD, 2009. ISBN 0195672518.

[9] EVANS, D. F.; WARHURST, E.; ROE, E. M. F. The Effect of Environment on Singlet-Triplet Transitions of Organic Molecules [and Discussion]. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 255, n. 1280, p. 55–63, mar. 1960. Disponível em: <http://rspa.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspa.1960.0049>.

[10] GEPPERT, W. On the Quantum Theory of Molecules. v. 457, n. 1927, p. 1–32, 2002.

[11] VALEUR, B. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Wiley-VCH, 2002. ISBN 9783527299195. Disponível em: <http://books.google.co.ke/books?id=gwfwAAAAMAAJ>.

[12] LAKOWICZ, J. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 2006. (Principles of Fluorescence Spectroscopy, v. 1). ISBN 9780387312781. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=-PSybuLNxcAC>.

[13] EISBERG, R.; RESNICK, R. *Quantum physics of atoms, molecules, solids, nuclei, and particles*. Wiley, 1974. ISBN 9780471234647. Disponível em: <http://books.google.co.in/books?id=a_xQAAAAMAAJ>.

[14] BORN, M.; OPPENHEIMER, R. Quantum theory of molecules. *Annalen der Physik*, WILEY-V C H VERLAG GMBH, v. 84, n. 20, p. 457–484, 1927. Disponível em: <http://www.chm.bris.ac.uk/pt/manby/papers/bornop.pdf>.

[15] SUTCLI, B.; GEPPERT, W. On the quantum theory of molecules with emendations by. *Ann Physik*, v. 457, n. 1927, p. 1–32, 2002.

[16] COELHO, L. W. et al. Aplicações de mecânica molecular em química inorgânica. *Química Nova*, scielo, v. 22, p. 396 – 404, 06 1999.

[17] SLATER, J. Atomic shielding constants. *Physical Review*, v. 36, 1930. Disponível em: <http://prola.aps.org/abstract/PR/v36/i1/p57_1>.

[18] DAVIDSON, E.; FELLER, D. Basis set selection for molecular calculations. *Chemical Reviews*, ACS Publications, v. 86, n. 4, p. 681–696, 1986. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00074a002>.

[19] LEVINE, I. N. *Quantum Chemistry*. 5th. ed. [S.l.]: Prentice Hall, 2000.

[20] WEIGEND, F.; FURCHE, F.; AHLRICHS, R. Gaussian basis sets of quadruple zeta valence quality for atoms H–Kr. *The Journal of Chemical Physics*, v. 119, n. 24, p. 12753, 2003. Disponível em: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v119/i24/p12753/s1&Agg=doi>.

[21] SCHIAFER, A.; HORN, H.; AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms Li to Kr. *J. chem. Phys*, v. 97, n. March, p. 2571, 1992. Disponível em: <http://www.chemia.uj.edu.pl/ migda/Literatura/pdf/JCP02571.pdf>.

[22] SCHA¨FER, A.; HUBER, C.; AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *The Journal of Chemical Physics*, v. 100, n. 8, p. 5829, 1994. Disponível em: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v100/i8/p5829/s1&Agg=doi>.

[23] DUNNING, T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of Chemical Physics*, v. 90, n. 2, p. 1007, 1989. Disponível em: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v90/i2/p1007/s1&Agg=doi>.

[24] JENSEN, F. Polarization consistent basis sets: Principles. *The Journal of Chemical Physics*, American Institute of Physics, v. 115, n. 20, p. 9113, 2001. Disponível em: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v115/i20/p9113/s1&Agg=doi>.

[25] JENSEN, F. Erratum:“polarization consistent basis sets: principles. *Journal of Chemical Physics*, v. 116, n. 8, p. 9606–9606, 2002.

[26] MORGON, N.; CUSTODIO, R. Teoria do funcional de densidade. *Química Nova*, v. 18, n. 1, p. 44–55, 1995. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1995/vol18n1/v18_n1_10.pdf>.

[27] HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review*, APS, v. 136, n. 3B, p. B864–B871, 1964. Disponível em: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.136.B864>.

[28] RUNGE E.; GROSS, E. Density-functional theory for time-dependent systems. *Physical Review Letters*, v. 52, n. 12, p. 997–1000, 1984.

[29] VIERIA, D. *Correções de auto-interação na teoria do funcional da densidade: investigação em modelos de muitos corpos*. [S.l.]: Tese de Doutorado - IFSC/USP, 1984.

[30] IMPLICIT solvent models. *Biophysical chemistry*, v. 78, n. 1-2, p. 1–20, apr 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17348031>.

[31] JACQUEMIN, D. et al. Comparison of Microhydration Methods: Protonated Glycine as a Working Example. *The journal of physical chemistry. B*, v. 115, n. 13, p. 3604–3613, abr. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21410243>.

[32] CAR, R.; PARRINELLO, M. Unified approach for molecular dynamics and density functional theory. *Physical Review Letters*, v. 55, n. 22, p. 2471–2474, 1985.

[33] JENSEN, J. H. et al. Effective fragment method for modeling intermolecular hydrogen-bonding effects on quantum-mechanical calculations. In: ____. *Modeling the Hydrogen Bond*. Amer. Chem. Soc., 1994. v. 569, p. 139–151. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1994-0569.ch009>.

[34] VERLET, L. Computer "experiments" on classical fluids. i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Physical Review*, American Physical Society, v. 159, n. 1, p. 98–103, 1967. Disponível em: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.159.98>.

[35] GUNSTEREN, W. F. V.; BERENDSEN, H. J. C. A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*, Taylor Francis, v. 1, n. 3, p. 173–185, 1988. Disponível em: <http://cholla.wustl.edu/baker/papers/vanGunsterenWF$_B$*erendsenHJC*$_1$988.*pdf*¿.

[36] BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, v. 81, n. 8, p. 3684, 1984. Disponível em: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v81/i8/p3684/s1&Agg=doi>.

[37] HERRER, J. O. M. et al. Construção de campo de força empírico para estudo de complexos de Fe(III) com interesse bioinorgânico. *Química Nova*, scielo, v. 29, p. 269 – 276, 04 2006.

[38] WEINER, S. J. et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 106, n. 3, p. 765–784, fev. 1984. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00315a051>.

[39] BROOKS, B. R. et al. Charmm: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, John Wiley Sons, Inc., v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.540040211>.

[40] TAYLOR, J. et al. Validation of all-atom phosphatidylcholine lipid force fields in the tensionless npt ensemble. *Biochimica et Biophysica Acta*, Elsevier B.V., v. 1788, n. 3, p. 638–649, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19014902>.

[41] DAURA, X.; MARK, A. E.; Van Gunsteren, W. F. Parametrization of aliphatic CHn united atoms of GROMOS96 force field. *Journal of Computational Chemistry*, v. 19, n. 5, p. 535–547, abr. 1998. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/(SICI)1096-987X(19980415)19:5¡535::AID-JCC6¿3.0.CO;2-N>.

[42] JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, jan. 1996. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja9621760>.

[43] MARRINK, S. J. et al. The martini force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 111, n. 27, p. 7812–24, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569554>.

[44] SUN, H. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase ApplicationsOverview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *The Journal of Physical Chemistry B*, American Chemical Society, v. 102, n. 38, p. 7338–7364, 1998. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp980939v>.

[45] BUNTE, S. W.; SUN, H. Molecular Modeling of Energetic Materials: The Parameterization and Validation of Nitrate Esters in the COMPASS Force Field. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 104, n. 11, p. 2477–2489, 2000. ISSN 15206106. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp991786u>.

[46] SUN, H.; REN, P.; FRIED, J. R. The COMPASS force field: parameterization and validation for phosphazenes. *Computational and Theoretical Polymer Science*, v. 8, n. 1-2, p. 229–246, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VJ9-3V7J0WM-W/2/3428b549113bfc2279e680d58768bb7c>.

[47] DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N· log (N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, v. 98, n. April, p. 10089, 1993. Disponível em: <http://link.aip.org/link/?JCPSA6/98/10089/1?[U+FFFD]??>.

[48] ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, AIP, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995. ISSN 00219606. Disponível em: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v103/i19/p8577/s1&Agg=doi>.

[49] FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 09 Revision A.1*. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.

[50] KARLSRUHE, U. of; GMBH, F. K. *TURBOMOLE V6.2 2010*. 1989–2007.

[51] SPOEL, D. van der et al. *Gromacs-4.5.4*. Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands: [s.n.], 2011. Disponível em: <http://www.gromacs.org>.

[52] Van Der Spoel, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, v. 26, n. 16, p. 1701–18, dez. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211538>.

[53] SCHAFTENAAR, G. Molden: a pre-and post-processing program for molecular and electronic structures*. *Journal of Computer-Aided Molecular*, p. 123–134, 2000. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/R8X8576G2X142L59.pdf>.

[54] HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, p. 33–38, 1996.

[55] SCHRöDINGER, L. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre*.

[56] DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. *GaussView Version 5*. Semichem Inc. Shawnee Mission KS 2009.

[57] ORIGIN. *http://www.originlab.com*. OriginLab, Northampton, MA, 2011.

[58] GRACE. *http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/*. Technical report, 2011.

[59] BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *The Journal of Chemical Physics*, v. 98, n. 2, p. 1372, 1993. Disponível em: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v98/i2/p1372/s1&Agg=doi>.

[60] ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. *Theoretical Chemistry Accounts*, v. 120, n. 1-3, p. 215–241, jul. 2007. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00214-007-0310-x>.

[61] MACIEL, G.; GARCIA, E. Charges derived from electrostatic potentials: Exploring dependence on theory and geometry optimization levels for dipole moments. *Chemical Physics Letters*, v. 409, n. 1-3, p. 29–33, jun. 2005. ISSN 00092614. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261405006147>.

[62] RIBEIRO, A. A. S. T.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B. D. Mktop: a program for automatic construction of molecular topologies. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 7, p. 1433–1435, 2008.

[63] ABASCAL, J. L. F.; VEGA, C. A general purpose model for the condensed phases of water: TIP4P/2005. *The Journal of chemical physics*, v. 123, n. 23, p. 234505, dez. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16392929>.

[64] SPOEL, D. van der et al. Thermodynamics of hydrogen bonding in hydrophilic and hydrophobic media. *The journal of physical chemistry. B*, v. 110, n. 9, p. 4393–8, mar. 2006. ISSN 1520-6106. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16509740>.