Universidade de São Paulo
Instituto de Física

Estudos experimentais e teóricos dos espectros
eletrônicos das sondas fluorescentes Prodan e
Laurdan em solventes e bicamadas lipídicas

Cíntia Cristina de Vequi Suplicy

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy

Co-Orientador: Profa. Dra. Kaline Rabelo Coutinho

Tese de doutorado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy (IF/USP)

Profa. Dra. Elisabeth Andreoli de Oliveira (IF/USP)

Profa. Dra. Cássia Alessandra Marquezin (IF/UFG)

Prof. Dr. Hubert Karl Stassen (IQ/UFRGS)

Prof. Dr. Tertius Lima da Fonseca (IF/UFG)

São Paulo
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Suplicy, Cíntia Cristina de Vequi

Estudos experimentais e teóricos dos espectros eletrônicos das sondas fluorescentes Prodan e Laurdan em solventes e bicamadas lipídicas. São Paulo, 2010.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.
Instituto de Física – Depto. de Física Geral.

Orientador: Prof^{fa} Dr^a Maria Teresa Moura Lamy

Área de Concentração: Física da Matéria
Condensada

Unitermos: 1. Física da Matéria Condensada;
2. Biofísica; 3. Estrutura Molecular; 4. Fotoluminescência;
5. Física Computacional

USP/IF/SBI-052/2010

*Aos meus pais, Neusa e Wilson,
por todo apoio e dedicação. E ao
Marcelo, meu esposo, por todo
companheirismo.*

Agradecimentos

À Profa. Teresa, pela orientação durante todos esses anos, desde a iniciação científica (já é um bom tempo), por acreditar no meu potencial desde o início e contribuir para o meu desenvolvimento. Pelas longas e frutíferas discussões na nossa sala de reuniões, sempre muito elucidativas, com conselhos científicos ou não, que me ensinaram a ter um olhar crítico sobre os rumos do nosso trabalho e, principalmente, sobre a minha jornada até aqui.

À Profa. Kaline, pela orientação durante esses anos do doutorado, por ter a paciência de me iniciar e guiar na área de modelagem molecular. Por acreditar que eu conseguiria aprender e crescer dentro dessa área. Pelas longas e também frutíferas conversas na sua sala, científicas ou não, que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Às minhas duas orientadoras: muito obrigada! Principalmente por acreditarem que eu seria capaz de trabalhar nas duas frentes: experimental e teórica. Não foi fácil, mas foi possível devido à orientação de vocês! Obrigada pela confiança e amizade.

À Profa. Karin, pela oportunidade de estágio no Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, na Alemanha, pela paciência e orientação. Pelos ensinamentos na área de microscopia ótica e vesículas gigantes. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela amizade e confiança. E obrigada por ter me levado ao CoralUsp!

À Dra. Rumiana Dimova, por ter me acolhido no seu laboratório no Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, pela orientação durante esse período, e pelo trabalho que conseguimos publicar junto com a Karin.

Ao Dr. Evandro, pela ajuda constante com o fluorímetro temporal durante todo o doutorado. Sem a sua ajuda não seria possível terminar as medidas nesse equipamento. Obrigada pela ajuda e dedicação nessa fase final!

Ao Prof. Roberto, post-doc no nosso grupo quando eu comecei aqui na iniciação científica, por ter tido a paciência de me ensinar a preparar as primeiras amostras e experimentos no laboratório.

Aos ex-colegas de grupo, Benatti e Aline, que me ajudaram e apoiaram no início do meu doutorado, enquanto estavam por aqui.

Aos Profs. Amando e Iouri, pelas discussões de fluorescência e sugestões no meu trabalho durante esses anos.

Aos colegas experimentais de grupo, Tiago, Rafael e Thaís pelo companheirismo, ajuda no laboratório e discussões.

Aos colegas teóricos de grupo, Antônio, Marcus e Evanildo, pelas discussões sobre simulações computacionais e principalmente pelo tempo de máquina que precisei emprestar de todos vocês.

Às Profas. Carla e Cecil, pelas conversas no nosso corredor que sempre ajudaram a descontraír em dias mais complicados.

Às secretárias, Fátima, Dirce e Silvana, pela ajuda sempre que necessário.

Ao Valdir, técnico de informática do nosso departamento, pela ajuda constante com as máquinas de simulação.

À FAPESP pelo apoio financeiro desde o início, com a bolsa de iniciação (02/09298-8), depois com a bolsa de mestrado (05/52408-7,) que se transformou na bolsa de doutorado direto (06/55513-9).

Aos meus pais, Neusa e Wilson, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, principalmente durante o início dessa jornada. Por não me deixarem desistir durante os meus momentos iniciais na Física e por entenderem a minha ausência no último ano. Obrigada por toda ajuda, confiança e carinho!

Às minhas irmãs, Ana e Selma, que me apoiaram e entenderam a minha ausência nesse período. Obrigada pelo apoio, amizade e carinho!

A todos os meus amigos, Tati, Uri, Daniel, Michel, Kika, Thiago, ..., que acompanharam esse período final da minha tese e souberam entender a minha ausência e as minhas loucuras.

E por último, gostaria de agradecer o meu companheiro, amigo e marido, Marcelo. Por sempre me mostrar outro lado da vida que eu, com o meu pensamento racional demais, às vezes não consigo ver. Por me ajudar nos momentos mais difíceis desse doutorado, com ótimos conselhos e sugestões. Pelo apoio e incentivo durante todos esses anos que estamos juntos e pela dedicação integral ao nosso casamento e à minha carreira. Obrigada por estar ao meu lado sempre!

Muito Obrigada a Todos!

“...the prosaic materialism of the majority condemns as madness the flashes of super-sight which penetrate the common veil of obvious empiricism.”

The Tomb – H. P. Lovecraft

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Motivação e Objetivo	3
1.2 Sondas	5
1.2 Efeito do Solvente	8
1.4 Bicamadas Lipídicas	9
1.5 Sumário dos Capítulos Seguintes	14
Capítulo 2 – Metodologias Teóricas e Experimentais	17
2.1 Metodologias Teóricas	19
2.1.1 Cálculos Quânticos de Moléculas Isoladas	19
2.1.2 Simulações Computacionais de Moléculas Solvatadas	29
2.1.3 Cálculo de Propriedades Eletrônicas em Solução	40
2.2 Metodologias Experimentais	44
2.2.1 Absorção Eletrônica	44
2.2.2 Fluorescência Estática	52
2.2.3 Fluorescência Temporal	61
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	67
3.1 Materiais	69
3.1.1 Preparação da Dispersão Lipídica	69
3.1.2 Preparação da Dispersão de Sonda	70
3.2 Métodos Experimentais	70
3.2.1 Absorção Eletrônica	70
3.2.2 Fluorescência Estática	71
3.2.3 Fluorescência Temporal	71
3.2.4 Unidade dos Espectros Eletrônicos	72
3.2.5 Reprodutibilidade dos Experimentos	72
3.3 Métodos Teóricos	72
3.3.1 Cálculos Quânticos	72
3.3.2 Simulações Computacionais	73

Capítulo 4 – Resultados e Discussões	77
4.1 Efeito do Ambiente no Espectro de Absorção Eletrônica	79
4.1.1 Diferentes Solventes	79
4.1.1a Espectros Experimentais do Prodan e Laurdan	79
4.1.1b Comparação entre Prodan e Laurdan	84
4.1.1c Construção do Modelo Teórico para o Prodan	87
4.1.1d Agregação do Prodan em água	108
4.1.2 Bicamadas Lipídicas	117
4.1.2a Espectros Experimentais do Prodan e Laurdan	117
4.2 Efeito do Ambiente no Espectro de Emissão Fluorescente	123
4.2.1 Diferentes Solventes	123
4.2.1a Espectros de Emissão Fluorescente do Prodan e Laurdan	123
4.2.1b Equação de Lippert-Mataga	126
4.2.1c Decomposição dos Espectros de Emissão Fluorescente	131
4.2.2 Bicamadas Lipídicas	137
4.2.2a Prodan e Laurdan em Bicamadas de DLPC	138
4.2.2b Prodan e Laurdan em Bicamadas de DPPC	149
Capítulo 5 – Conclusões e Perspectivas	161
Capítulo 6 – Referências	169
Apêndice A – Descrição Teórica do Método INDO/S	A.183
Apêndice B – Descrição Teórica de Parâmetros de Fluorescência	A.197
Apêndice C – Descrição da Análise dos Dados	A.219
Apêndice D – Arquivos de Entrada dos Cálculos Teóricos	A.231
Apêndice E – Lista dos Artigos e Congressos	A.253

Resumo

As moléculas Prodan (6-propionil-2-dimetilamino-naftaleno) e Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilamina-naftaleno) são muito usadas como sondas fluorescentes em bicamadas lipídicas e, mais raramente, em membranas celulares. Esta tese de doutorado teve por objetivo realizar um estudo dessas sondas em diferentes ambientes, para ampliar o entendimento de suas estruturas e características espectroscópicas em diferentes solventes e em bicamadas lipídicas. Este estudo foi feito utilizando duas abordagens, uma experimental e outra teórica. Com resultados teóricos e experimentais, mostramos que o cromóforo é o mesmo para as duas moléculas. Experimentalmente, foram medidos e comparados os espectros de absorção eletrônica em solventes de diferentes polaridades e em bicamadas lipídicas. Foi construído um modelo teórico para o estado fundamental do Prodan em diferentes solventes, onde verificamos que a geometria molecular é planar e a molécula sofre uma grande polarização em solventes de maior polaridade. Teoricamente, reproduzimos os espectros de absorção em todos os solventes, mostrando que eles são compostos por três transições eletrônicas. Verificamos, experimental e teoricamente, que o Prodan forma agregados quando colocado em solução aquosa, em todas as concentrações estudadas (0.9 a 20.0 μM). Adicionalmente, foram medidos e comparados os espectros de emissão fluorescente, e mostramos que eles apresentam duas bandas de emissão em todos os solventes estudados e em bicamada lipídicas. Essas bandas estão relacionadas com dois tempos de vida, evidenciando a presença de dois estados excitados para essas sondas. Porém, a natureza dos estados excitados em solventes homogêneos e em bicamadas lipídicas parece ser diferente. Uma metodologia de análise dos espectros de emissão fluorescente foi proposta. A comparação dos espectros de emissão do Prodan e do Laurdan em bicamadas lipídicas mostrou que as sondas monitoram micro-ambientes ligeiramente diferentes. Nossos resultados indicam que os dois fluoróforos posicionam-se próximos à superfície da bicamada lipídica, porém o Prodan parece estar mais exposto à água. Além disso, o Prodan apresenta uma pequena partição em água, quando a bicamada está na fase gel.

Abstract

Prodan (6-propionyl-2-dimethylamino-naphthalene) and Laurdan (6-dodecanoyl-2-dimethylamino-naphthalene) molecules are frequently used as fluorescent probes in lipid bilayers and, more rarely, in cell membranes. The objective of this PhD thesis was to study these probes in several environments, to increase the understanding about its structures and spectroscopic characteristics in several solvents and lipid bilayers. This study was carried out using two approaches: experimental and theoretical. With experimental and theoretical results, we demonstrated that the two molecules have the same chromophore. Experimentally, electronic absorption spectra were measured and compared in solvents of several polarities and lipid bilayers, for both molecules. A theoretical model was constructed for Prodan's fundamental state in several solvents, in which we found that its molecular geometry is planar and that the molecule undergoes a great deal of polarization in solvents of higher polarity. Theoretically, we emulated the absorption spectra in all solvents studied, showing that they are well described by three electronic transitions. We verified, experimentally and theoretically, that Prodan aggregates in aqueous solution at all concentration ranges (0.9 a 20.0 μM). Additionally, the fluorescent emission spectra were measured and compared, and we demonstrated that they are composed by two emission bands in all solvents and lipid bilayers. These bands were related to two fluorescent lifetimes, evidencing the presence of two excitation states for these probes. However, the nature of the excited states in homogeneous solvents and in lipid bilayers seems to be different. A methodology to analyze the emission spectra was proposed. The comparison of Prodan's and Laurdan's emission spectra in lipid bilayers showed that the probes monitor a slightly different micro-environment. Our results indicated that both fluorophores are located near the bilayers surface, although Prodan seems to be more exposed to water molecules. Besides that, Prodan partitions in water, when the bilayer is in the gel phase.

1

INTRODUÇÃO

“Dubitando quipped ad inquisitionem venimus; inquirendo veritatem percipimus”
[By doubting we come to enquiry, and through enquiry we perceive truth.]
P. Abelard

Neste capítulo apresentamos o problema abordado neste trabalho. Descrevemos as motivações e objetivos, bem como as moléculas estudadas nesta tese e a importância delas dentro da Biofísica.

1.1 Motivação e Objetivo

Nas últimas décadas, muito esforço tem sido feito para investigar as propriedades das membranas celulares e de seus componentes, usando diferentes técnicas espectroscópicas como absorção ótica, fluorescência, ressonância paramagnética nuclear e eletrônica, espalhamento de luz, dentre outras [Isenberg *et al.*, 1997; Epand *et al.*, 1999; Winterhalter, 2000; Gruszecki *et al.*, 2003; Lindblom *et al.*, 2006; Chiang *et al.*, 2007; Flanders *et al.*, 2007; Demchenko *et al.*, 2009]. Entre essas diferentes técnicas, a fluorescência apresenta muitas vantagens. Alguns sistemas biológicos já contêm moléculas fluorescentes naturalmente, como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina (Figura 1.1 – 8, 9 e 10), são as chamadas sondas intrínsecas. Devido à grande sensibilidade das medidas de fluorescência, pequenas quantidades de moléculas fluorescentes podem ser detectadas. Para sistemas que não contêm moléculas fluorescentes intrínsecas, isto é uma grande vantagem, pois é necessário acrescentar apenas pequenas quantidades de moléculas extrínsecas, as chamadas sondas fluorescentes, e isso não leva a grandes alterações no ambiente a ser estudado. A escala temporal da emissão fluorescente, no intervalo dos nanossegundos, é apropriada para detectar a dinâmica e as propriedades de muitos componentes das membranas celulares. Porém, como é inerente a qualquer técnica com sondas, deve ser estabelecido que as propriedades que estão sendo monitoradas representam o sistema estudado, e que a sonda não está, por si só, alterando as propriedades do sistema. Para saber especificamente qual característica a sonda está monitorando, é preciso conhecer muito bem as suas propriedades estruturais e eletrônicas e a sua localização dentro do sistema a ser estudado.

Duas das sondas fluorescentes mais usadas em membranas lipídicas e celulares são o Prodan (6-propionil-2-dimetilamino-naftaleno) e o Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilamino-naftaleno) [Weber *et al.*, 1979; Parasassi *et al.*, 1986]. Apesar de serem muito usadas [Parasassi *et al.*, 1990; Parasassi *et al.*, 1991; Rottenberg, 1992; Ferretti *et al.*, 1993; Ambrosini *et al.*, 1994; Alleva *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Bagatolli *et al.*, 1997; Parasassi *et al.*, 1997; Bagatolli *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1999; Brunelli *et al.*, 2000; Ambrosini *et al.*, 2001; Karmakar *et al.*, 2002; Gaus *et al.*, 2003; Kindzelskii *et al.*, 2004; Pande *et al.*, 2005; Fidorra *et al.*, 2006; Moyano *et al.*, 2008; Bruckner *et al.*, 2009; Marsh, 2009], ainda existe na literatura a necessidade de um estudo detalhado de como essas sondas se apresentam no estado fundamental e no primeiro estado excitado em diferentes ambientes, ou seja, diferentes solventes e bicamadas lipídicas (Seção

1.4). Quando excitadas, essas sondas apresentam emissão fluorescente dupla e ainda não existe uma concordância na literatura sobre a origem desse processo. A emissão fluorescente de dois estados foi comprovada experimentalmente em alguns artigos [Lakowicz *et al.*, 1982b; Lakowicz *et al.*, 1982a; Balter *et al.*, 1988; Rowe *et al.*, 2008] para alguns solventes, porém a explicação para esses dois estados é controversa. Alguns artigos afirmam que existe a necessidade de duas estruturas no estado excitado, uma com geometria planar chamada de *LE* (*Locally Excited*) e outra com o grupo dimetilamino rotacionado em relação ao plano do naftaleno (Figura 1.2) chamada de *PICT/TICT* (*Planar/Twisted Internal Charge Transfer*), onde a separação de carga entre os grupos dimetilamino e propionil seria favorecida [Nowak *et al.*, 1986; Ilich *et al.*, 1989; Parusel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1997; Parusel, 1998; Parusel *et al.*, 1998; Kozyra *et al.*, 2003; Tomin, 2006; Tomin *et al.*, 2006; Novaira *et al.*, 2007; Novaira *et al.*, 2008; Adhikary *et al.*, 2009; Morozova *et al.*, 2009; Everett *et al.*, 2010]. Porém alguns artigos discordam, colocando que essa explicação não é necessária ou é insuficiente para explicar o estado excitado dessas moléculas [Balter *et al.*, 1988; Catalan *et al.*, 1991; Bunker *et al.*, 1993; Samanta *et al.*, 2000; Lobo *et al.*, 2003; Mennucci *et al.*, 2008; Rowe *et al.*, 2008] e afirmam que mais estudos são necessários para identificar esses dois estados excitados presentes nas moléculas de Prodan e Laurdan.

Este trabalho de doutorado teve por objetivo realizar um estudo detalhado dessas sondas em diferentes ambientes, para um maior entendimento de suas estruturas, características espectroscópicas, como os espectros de absorção e emissão eletrônicos em diferentes solventes. E também a caracterização e localização dessas sondas em bicamadas lipídicas. Para isto, utilizamos uma abordagem experimental, sob a orientação da Profa. Dra. M. Teresa Lamy, e outra teórica, sob a orientação da Profa. Dra. Kaline Coutinho. Experimentalmente, tivemos por objetivo caracterizar o espectro de absorção e emissão (fluorescência) eletrônico em diferentes solventes e também em diferentes bicamadas lipídicas. Teoricamente, o objetivo foi construir um modelo capaz de explicar os espectros de absorção eletrônica nos diferentes solventes, para isso realizamos a caracterização estrutural e eletrônica das duas sondas.

Com esses dois estudos, pretendemos colocar na literatura, com clareza, algumas propriedades eletrônicas e estruturais dessas sondas, assim como as suas características em diferentes membranas, para que elas possam ser melhor utilizadas no estudo de diferentes sistemas de interesse físico-químico e biológico.

1.2 Sondas

Devido às vantagens que a técnica de fluorescência apresenta (mencionadas na Seção 1.1), nos últimos anos cada vez mais moléculas fluorescentes são utilizadas para monitorar sistemas biológicos, tanto em medidas espectroscópicas como em medidas com microscopia de fluorescência. Essas moléculas são as chamadas sondas fluorescentes. Comumente, são moléculas formadas por anéis aromáticos ou ligações de carbono simples e duplas conjugadas, como mostradas na Figura 1.1.

As sondas fluorescentes podem ser divididas em três classes: intrínsecas, extrínsecas covalentemente ligadas e extrínsecas associadas. A primeira é uma parte do sistema a ser estudado que já é fluorescente, por exemplo, ao se estudar proteínas, vários aminoácidos, que contêm anéis aromáticos, já são fluorescentes, como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina (Figura 1.1 – 8, 9 e 10, respectivamente). A segunda e a terceira classe são utilizadas quando as moléculas do sistema de interesse não são fluorescentes. Na segunda classe, o sistema é quimicamente modificado para que um grupo molecular fluorescente extrínseco possa ser conectado a ele. Essa classe possui uma vantagem sobre a seguinte, pois é possível saber exatamente onde a sonda fluorescente está conectada. A terceira classe também é composta por moléculas fluorescentes extrínsecas ao sistema, mas nela as sondas não estão quimicamente ligadas às moléculas de interesse, estão apenas associadas. A localização dessas sondas é determinada por sua natureza química e pelas interações específicas que podem ser estabelecidas com a região do sistema a ser observada. O caráter hidrofílico, hidrofóbico ou anfifílico da molécula fluorescente é essencial para a sua localização, principalmente em bicamadas lipídicas. Nessa classe não é possível saber exatamente a posição da sonda, como na anterior, porém a probabilidade de haver interferência nas propriedades físico-químicas do sistema é menor do que com a utilização das sondas covalentemente ligadas. Devido à grande dificuldade em se produzir as moléculas de interesse com sondas fluorescentes covalentemente ligadas, as associadas são as mais utilizadas.

Uma crítica sempre feita ao uso de sondas extrínsecas, tanto em fluorescência como em outras técnicas que as utilizam, é a possibilidade delas levarem a uma perturbação no ambiente onde se encontram. A existência ou não dessa perturbação pode ser verificada comparando-se os resultados obtidos pelas sondas com técnicas que não as utilizam. Mas uma pequena perturbação sempre acontece e ela deve ser minimizada na escolha adequada da

sonda a ser utilizada. A sua geometria e tamanho devem ser analisados em comparação com o ambiente a ser estudado, de modo que a perturbação seja sempre mínima [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006].

Figura 1.1: Algumas moléculas usadas como sondas fluorescente em sistemas biológicos. 1– Quinino; 2 – Fluoresceína; 3 – Brometo de Etídio; 4 – Antraceno; 5- Rodamina B; 6 –Naftaleno; 7 –DPH; 8 – Triptofano; 9 – Tirosina; 10 – Fenilalanina.

Um critério importante na escolha da sonda fluorescente a ser utilizada é a sua sensibilidade às propriedades do ambiente ao seu redor, por exemplo, em relação à polaridade¹, acidez, fluidez, etc. e as propriedades que se deseja detectar. Para saber a quais propriedades uma molécula fluorescente é sensível, é preciso conhecer muito bem as suas características, ou seja, é preciso saber quais os efeitos de diferentes ambientes no seu estado fundamental e excitado.

Figura 1.2: Naftaleno e dois de seus derivados, as sondas estudadas nesta tese de doutorado, Prodan e Laurdan.

As duas sondas estudadas nesta tese de doutorado são derivadas da sonda naftaleno, como mostrado na Figura 1.2, o Prodan, com os grupos dimetilamino e propionil ligados nas posições 2 e 6 do naftaleno, respectivamente, e o Laurdan com o grupo propionil do Prodan substituído pelo grupo dodecanoil de modo a tornar a molécula mais hidrofóbica. Esses grupos possibilitam a separação de carga intramolecular, pois o grupo propionil ou dodecanoil, devido à presença da ligação C=O (grupo carbonila), tem afinidade para aceitar elétrons e o grupo dimetilamino tem afinidade para doar elétrons. A separação de carga vai ser maior quanto maior a distância entre esses dois grupos. Nesse caso, em posições opostas, podem levar a maior separação possível [Weber *et al.*, 1979]. Essas moléculas, nas quais existe a possibilidade de separação de carga, são muito utilizadas como sensores de

¹ Esse termo é muito genérico e difícil de ser definido, mas uma idéia seria a capacidade que o solvente tem de alterar as propriedades do soluto.

polaridade do ambiente, pois, em geral, quanto mais polar o ambiente maior o deslocamento espectral que elas sofrem. Porém, isso depende da estabilização do estado fundamental e excitado nos diferentes solventes (ver Seção 2.2.1e e 2.2.2a).

1.3 Efeito do Solvente

Quando espectros de absorção e emissão são medidos em solventes de diferentes polaridades, é possível verificar que a posição, o formato e a intensidade das bandas de absorção ou de emissão são comumente modificados pela presença do solvente. Essas mudanças são resultantes das interações intermoleculares soluto-solvente, como dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligações de hidrogênio, entre outras, que podem alterar a distribuição eletrônica e a geometria do estado fundamental e do estado excitado das moléculas absorvedoras ou emissoras que contém o cromóforo (grupo de átomos nas moléculas orgânicas, algumas vezes a molécula inteira, que é responsável pela absorção ou emissão de luz). Porém, por se tratarem de dois estados diferentes, o fundamental e o excitado, com estruturas eletrônicas e/ou geometrias moleculares diferentes, os efeitos podem ser mais evidentes na absorção ou emissão, dependendo de qual estado sofre mais influência do solvente [Reichardt, 2004].

Comumente, os efeitos do solvente são estudados considerando que o estado químico da molécula isolada e solvatada é o mesmo e ocorrem apenas redistribuições de cargas nos átomos, de modo a gerar um dipolo que se adapte melhor para cada solvente, ou seja, apenas efeitos gerais são considerados. Os casos onde acontecem transferência de próton ou elétron entre soluto e solvente (protonação/desprotonação), agregação do soluto dependente do solvente, entre outros, são em geral excluídos. Porém em muitos casos, esses efeitos específicos são importantes e cada um deles pode levar a uma alteração diferente na absorção ou emissão de luz. Um forte indício de que um cromóforo tem interações específicas com o solvente é dado quando os espectros de absorção e/ou emissão fluorescente não obedecem às relações que tratam dos efeitos gerais do solvente [Reichardt, 2004] (essas relações estão melhor desenvolvidas no Capítulo 2, tanto para a absorção eletrônica, Seção 2.2.1, como para a fluorescência, Seção 2.2.2.)

Para as moléculas usadas como sondas em ambientes biológicos, o efeito do solvente, sendo geral ou específico, é de extrema importância para se entender o que elas estão monitorando. Uma das características mais analisadas é o deslocamento da posição do máximo do espectro de absorção e/ou emissão em função da polaridade do solvente. Essa

característica é chamada de solvatocromismo. A compreensão do solvatocromismo pode fornecer informações importantes sobre o estado fundamental e excitado de moléculas e suas interações com o solvente [Valeur, 2001; Reichardt, 2004].

Em moléculas como o Prodan e o Laurdan é observado experimentalmente que o efeito do solvente é muito pronunciado, tanto na absorção como na emissão [Weber *et al.*, 1979; Catalan *et al.*, 1991; Bunker *et al.*, 1993; Nemkovich *et al.*, 2007; Rowe *et al.*, 2008].

1.4 Bicamadas Lipídicas

A célula, unidade primordial da vida complexa, é essencialmente determinada pelo seu envoltório de membrana plasmática. A função das membranas celulares é organizar os processos biológicos através da separação entre os mesmos. Membranas biológicas são organizadas em grupos de lipídios e proteínas com uma pequena quantidade de carboidratos. No entanto, elas não são barreiras impermeáveis à passagem de materiais. Elas regulam a composição intracelular, através do controle do fluxo de nutrientes, íons, água e outras substâncias para dentro e para fora da célula. Muitos dos processos biológicos fundamentais ocorrem envolvendo uma organela membranosa. Por exemplo, transporte de elétrons e processos de oxidação de nutrientes com produção de ATP^2 são mediados por algumas enzimas que são componentes da membrana mitocondrial. Igualmente, a fotossíntese, na qual a energia da luz é usada para promover a reação entre H_2O e CO_2 para formar carboidratos, ocorre dentro das membranas dos cloroplastos³. Os processos de troca da informação, como estímulos sensoriais ou comunicação intercelular, ocorrem geralmente através de uma membrana lipídica [Voet *et al.*, 1995; Stryer, 1996].

Um dos componentes essenciais das membranas biológicas são os lipídios. Por definição, lipídios são biomoléculas, altamente solúveis em solventes orgânicos, como o clorofórmio, mas pouco (ou quase nada) solúveis em água [Stryer, 1996]. Gorduras, óleos, certas vitaminas, hormônios e quase todos os componentes não-proteicos da membrana celular são lipídios. Os lipídios mais simples são os ácidos graxos, ácidos monocarboxílicos de fórmula geral $R - COOH$, onde R representa uma cauda hidrocarbônica. Os ácidos graxos são raramente encontrados isoladamente, mas são componentes de muitos tipos de lipídios mais complexos, incluindo triacilgliceróis (gorduras e óleos) e fosfolipídios (Figura 1.3). Os

² ATP (Adenosina Trifosfato) é a molécula que armazena energia da respiração celular e da fotossíntese.

³ Cloroplasto é uma organela presente nas células das plantas e outros organismos fotossintetizadores. É a organela que possui a clorofila e onde a fotossíntese é realizada.

fosfolipídios são os mais abundantes em membranas biológicas e foram os lipídios utilizados nesta tese, por isso será dada uma maior ênfase aos mesmos.

Os radicais $R1$ e/ou $R2$ são as cadeias hidrocarbônicas, que podem possuir ligações duplas ou triplas entre os carbonos, quando isso acontece, esse lipídio é chamado de insaturado. Se o lipídio possui apenas ligações simples entre os carbonos de suas cadeias, ele é chamado de saturado. O resíduo X dos fosfolipídios, colocado na Figura 1.3, pode ser substituído pelos grupos moleculares colocados na Figura 1.4. Esses grupos, o comprimento das cadeias hidrocarbônicas $R1$ e $R2$ e a presença ou não de insaturações definem as propriedades físico-químicas de cada fosfolipídio.

Figura 1.3: Estrutura genérica para os principais grupos de lipídios, 1 – ácidos graxos, 2 – fosfolipídios e 3 – triacilglicerol. $R1$, $R2$ e $R3$ indicam as cadeias hidrocarbônicas com ou sem ligações duplas. X são os resíduos colocados na Figura 1.4, que juntamente com o grupo fosfato, formam a cabeça polar.

Figura 1.4: Alguns exemplos de grupo moleculares que podem ser usados como os resíduos X colocado na Figura 1.3. Esses grupos, juntamente com o tamanho das cadeias hidrocarbônicas, determinam as propriedades físico-químicas dos fosfolipídios.

As moléculas de fosfolipídios podem ter cargas negativas. Como o grupo fosfato tem uma carga negativa (Figura 1.3), para a molécula ser neutra é preciso que o grupo X (Figura 1.4), tenha uma carga positiva, pois as cadeias hidrocarbônicas $R1$ e $R2$ são sempre neutras. Se o grupo X for, por exemplo, uma colina, o fosfolipídio será neutro (também chamado de zwitteriônico), porém se for um glicerol, o fosfolipídio será negativo.

Os fosfolipídios são denominados moléculas anfífilas, pois em sua composição molecular existem dois grupos distintos, um hidrofílico, também chamado de cabeça polar, formado pelo glicerol, o grupo fosfato (PO_4^-) e o resíduo X , e um hidrofóbico, formado pelas caudas hidrocarbônicas, representadas por $R1$ e $R2$ na Figura 1.3. Na verdade, o caráter anfílico não é específico dos fosfolipídios, mas está presente na maioria dos lipídios. Para outros tipos de lipídios, a cabeça polar pode ser totalmente modificada e as caudas hidrocarbônicas também, mas o caráter de cada grupo é mantido. Essa característica anfílica faz com que os lipídios sejam praticamente insolúveis em água. Quando colocados em meio aquoso, eles espontaneamente formam agregados numa fase separada da água, com os seus grupos hidrofóbicos em contato e os grupos hidrofílicos interagindo com a água ao redor.

Figura 1.5: Exemplo de agregados moleculares que podem ser formados pelas moléculas de lipídios em água. A região branca representa as cabeças polares, hidrofílicas, em contato com a água e as linhas pretas (região amarela) representam as cadeias hidrocarbônicas, a região hidrofóbica, sem contato com a água [Lodish et al., 2003].

A interação hidrofóbica entre as moléculas dos lipídios é a força motriz para a formação e manutenção desses agregados. Alguns desses agregados podem ser vistos na Figura 1.5. Lipídios com apenas uma cadeia hidrocarbônica, como os ácidos graxos, tendem a formar micelas, que são agregados sem volume interno. Porém os lipídios com duas cadeias hidrocarbônicas, como os fosfolipídios, tendem a formar bicamadas lipídicas que podem se fechar e formar lipossomos. É importante notar que a formação desses agregados depende da concentração de lipídio e também da hidratação da cabeça polar, ou seja, da proporção de tamanho entre a cabeça polar e a cauda hidrocarbônica. Nesta tese foram utilizados fosfolipídios na concentração necessária para a formação de bicamadas fechadas como lipossomos, portanto todas as estruturas lipídicas aqui estudadas formam bicamadas lipídicas.

Devido à grande complexidade das membranas celulares, o seu estudo com técnicas espectroscópicas é muito difícil, por isso os seus elementos são estudados separadamente. Para se estudar o comportamento dos lipídios, são usados sistemas modelo, compostos por um ou mais tipos de lipídios que formam bicamadas lipídicas, usualmente fechadas, formando lipossomos (Figura 1.5). Essas bicamadas lipídicas, contendo um só tipo de fosfolipídio saturado, possuem uma transição de fase bem definida numa determinada temperatura, onde os fosfolipídios passam de um estado muito ordenado, chamado de fase gel, para um estado desordenado, chamado de fase fluida ou líquido-cristalina. Bicamadas formadas por mais de um tipo de fosfolipídio podem possuir uma transição de fase, mas essa não é muito definida e as fases também são um pouco diferentes [Heimburg, 2007]. Trataremos nesta tese apenas com bicamadas homogêneas, contendo um único tipo de fosfolipídios.

A temperatura onde a transição de fase ocorre, numa bicamada homogênea, depende do tipo e tamanho da cabeça polar e das cadeias hidrocarbônicas. A principal alteração molecular que acontece na transição de fase é o aparecimento de conformações *cis*. Abaixo da temperatura de transição, as cadeias hidrocarbônicas estão principalmente na conformação *trans* (ver Figura 1.6). Acima dessa temperatura, as cadeias podem assumir a conformação *cis* com mais facilidade. Isto está exemplificado na Figura 1.6, onde à esquerda podemos ver uma cadeia de quatro carbonos na conformação *trans* e na conformação *cis*. À direita, podemos ver o efeito dessa mudança em um fosfolipídio. Essa alteração, nas conformações *cis-trans* nos lipídios, leva a alterações estruturais na bicamada. Em temperaturas acima da transição de fase, na fase fluída, a bicamada tem uma espessura mais fina e também uma área superficial maior do que na fase gel. As cadeias hidrocarbônicas com conformações *cis* ocupam maior

espaço lateral, o que leva a um afastamento das cabeças polares. Um esquema dessas alterações pode ser visto na Figura 1.7.

Figura 1.6 – À esquerda: exemplo das conformações *trans* e *cis*. À direita: exemplo dessas conformações nas cadeias de um fosfolípido.

Figura 1.7 – Esquema da organização dos lipídios em duas fases diferentes da bicamada. À esquerda, a bicamada abaixo da temperatura de transição, na fase gel. À direita, a bicamada após a transição de fase, na fase fluida ou líquido-cristalina.

Uma característica importante é a temperatura onde a transição gel-fluido ocorre. Essa temperatura vai ser tanto maior quanto maior a interação entre as cadeias hidrocarbônicas e cabeças polares dos lipídios, ou seja, quanto mais longa as cadeias hidrocarbônicas, maior a temperatura de transição. Essa temperatura é comumente chamada de T_m (*main transition temperature*), pois alguns lipídios apresentam uma pequena alteração na estrutura da bicamada numa temperatura anterior a T_m , que é chamada de temperatura de pré-transição (T_p). Entre a T_m e a T_p , as bicamadas apresentam o que se chama de uma fase “*ripple*”, ou seja, uma fase ondulada, onde apenas alguns pequenos domínios estão na fase fluida e o restante da bicamada permanece na fase gel (Figura 1.8) [Heimburg, 2007; Riske *et al.*, 2009].

Na Tabela 1.1, podemos ver essas duas temperaturas para alguns fosfolípidios saturados e insaturados. É possível verificar que a cada dois carbonos que são adicionados a cadeia hidrocarbônica, a temperatura de transição aumenta em ~ 20 °C. Ao se trocar a cabeça polar do grupo colina pelo glicerol, ou seja, uma cabeça zwitteriônica por uma cabeça aniônica, as temperaturas de transição não são muito alteradas. Os lípidios utilizados nesta tese estão marcados com asterisco. As estruturas moleculares desses lípidios estão colocadas no Capítulo 3, Figura 3.1.

Figura 1.8 – Esquema da organização dos lípidios na fase “ripple” das bicamadas presente entre a temperatura de pré-transição (T_p) e a temperatura de transição (T_m).

Tabela 1.1: Valor da transição de fase para alguns fosfolípidios. N_C é o número de carbonos na cadeia hidrocarbônica, N_{DL} é o número de duplas ligações nessas cadeias, T_p é a temperatura de pré-transição e T_m é a temperatura de transição gel-fluido [Marsh, 1990].

Lípido Saturados	Sigla	N_C	N_{DL}	T_p (°C)	T_m (°C)
DiLauroil-glicero-FosfoColina	DLPC*	12	0	-	-2
DiMiristoil-glicero-FosfoColina	DMPC	14	0	14	23
DiPalmitoil-glicero-FosfoColina	DPPC*	16	0	35	41
DiStearoil-glicero-FosfoColina	DSPC	18	0	50	54
DiLauroil-glicero-FosfoGlicerol	DLPG	12	0	-	0
DiPalmitoil-glicero-FosfoGlicerol	DPPG	16	0	35	40
DiStearoil-glicero-FosfoGlicerol	DSPG	18	0	-	55
Lípidios Insaturados					
DiOleoil-glicero-FosfoColina	DOPC	18	1	-	-20
DiOleoil-glicero-FosfoGlicerol	DOPG	18	1	-	-18

*Fosfolípidios utilizados nesta tese.

1.5 Sumário dos Capítulos Seguintes

Nos capítulos seguintes, apresentamos as metodologias aplicadas para estudarmos tanto o estado fundamental, como o estado excitado das sondas fluorescentes Prodan e Laurdan (Capítulo 2); descrevemos os materiais e métodos utilizados nas medidas e nas simulações (Capítulo 3); apresentamos e discutimos os resultados obtidos tanto teóricos como experimentais (Capítulo 4) e colocamos as conclusões e perspectivas (Capítulo 5).

Na descrição das metodologias, devido ao grande volume de técnicas experimentais e métodos teóricos utilizados nesta tese, optamos por uma descrição resumida, apenas colocando as equações quando extremamente necessário (Capítulo 2). Na parte teórica, foram descritas todas as técnicas de mecânica quântica e mecânica molecular utilizadas (Capítulo 2, Seção 2.1). Na parte experimental, foram descritas as duas técnicas utilizadas, a absorção eletrônica e a fluorescência, assim como o efeito do solvente nas duas técnicas. (Capítulo 2, Seção 2.2).

A descrição dos materiais e métodos utilizados foi separada em três partes: materiais, onde descrevemos os materiais utilizados, onde eles foram adquiridos e o preparo das amostras (Capítulo 3, Seção 3.1); na segunda parte, foram descritos os métodos experimentais utilizados, bem como os equipamentos utilizados (Capítulo 3, Seção 3.2); e na terceira parte descrevemos os detalhes dos métodos teóricos utilizados (Capítulo 3, Seção 3.3).

A apresentação dos resultados foi dividida em duas grandes partes: efeito do ambiente no espectro de absorção eletrônico (Capítulo 4, Seção 4.1) e o efeito do ambiente no espectro de fluorescência (Capítulo 4, Seção 4.2).

Foram anexados cinco apêndices: no primeiro apresentamos uma descrição detalhada do método utilizado para calcular as energias de absorção eletrônica (Apêndice A); no segundo colocamos uma descrição mais detalhada de algumas características da fluorescência (Apêndice B); no terceiro, descrevemos como analisamos os espectros de absorção eletrônicos em solventes e em bicamadas, como realizamos a decomposição em gaussianas dos espectros de emissão fluorescente e também como realizamos a análise global em dados de fluorescência temporal usando o programa *GEM* (Apêndice C); no quarto, colocamos os principais arquivos de entrada usados para os cálculos quânticos e simulações realizadas (Apêndice D); e no quinto listamos os trabalhos publicados e apresentados em congressos (Apêndice E).

2

METODOLOGIAS TEÓRICAS E EXPERIMENTAIS

“There are nearly as many approximations to the molecular Schrödinger equation as there are investigators that have ever tried to solve this equation.”

M. C. Zerner

Neste capítulo apresentamos as metodologias teóricas e experimentais utilizadas nesta tese de doutorado. Devido ao grande número de técnicas utilizadas, abordamos todas as metodologias de forma sucinta, colocando as referências mais importantes onde elas foram desenvolvidas e/ou estão descritas com todos os detalhes.

2.1 Metodologias Teóricas

2.1.1 Cálculos Quânticos de Moléculas Isoladas

O cálculo quântico de moléculas isoladas tem por objetivo determinar propriedades estruturais e eletrônicas de uma molécula, através da resolução da equação de Schrödinger independente do tempo, em sua maioria. Porém, a solução analítica exata dessa equação para sistemas maiores do que um ou dois átomos pequenos não é possível, então são necessárias algumas aproximações para se chegar a alguma solução. Essas aproximações levam a modelos que podem ser divididos em duas categorias: modelos *ab initio* ou de primeiros princípios e os modelos semi-empíricos. Na primeira categoria, todas as integrais eletrônicas são calculadas exatamente, sendo por métodos variacionais ou perturbativos (*HF*, *MP2*, *etc.*)¹. Na segunda, algumas dessas integrais são negligenciadas e/ou substituídas por valores que são parametrizados. A seguir faremos uma revisão das características e aproximações usadas nesses cálculos. Nesta tese de doutorado realizamos os cálculos *ab initio* usando o programa Gaussian03 [Frisch *et al.*, 2004] e os semi-empíricos usando o programa ZINDO [Zerner, 2000].

2.1.1a Aproximação de Bohr-Oppenheimer

A aproximação de Bohr-Oppenheimer (*BO*) é a primeira de muitas aproximações usadas para simplificar a solução da equação de Schrödinger para moléculas. Ela simplifica o problema molecular ao separar os movimentos nucleares e eletrônicos. Essa aproximação é razoável, já que as energias do movimento eletrônico e nuclear, em geral, têm ordens de grandeza diferentes. Assim, as distribuições eletrônicas em um sistema molecular dependem parametricamente das posições dos núcleos. Colocando de outra maneira, fixando as posições dos núcleos, a distribuição eletrônica pode ser descrita sob o potencial de núcleos. Usando essa aproximação, a equação de Schrödinger é resolvida separadamente para os núcleos e elétrons. A parte eletrônica é resolvida levando em conta um potencial efetivo nuclear que depende apenas das posições dos núcleos. Com a resolução da parte eletrônica, um potencial efetivo dos elétrons é obtido e utilizado para resolver a parte nuclear [Born *et al.*, 1927].

2.1.1b Método de Hartree-Fock (*HF*)

O método de *HF* [Hartree, 1928; Slater, 1929] é um conjunto de aproximações que levam a solução da equação de Schrödinger independente do tempo, com a obtenção da

¹ *HF*: Método de Hartree-Fock; *MP2*: Møller-Plesset 2ª. ordem.

equação de onda e energia de uma molécula no estado fundamental. Esse método fornece uma boa solução aproximada para o problema de muitos elétrons. O ponto de partida para o método de *HF* é a composição do determinante de Slater [Slater, 1929]. O determinante de Slater é a forma como as funções de onda dos elétrons são escritas no método de *HF*, ou seja, a função de onda (ϕ_0) de muitos elétrons é um determinante formado por funções das coordenadas espaciais e de spin de um único elétron, dado por:

$$\phi_0 = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\vec{x}_1) & \chi_2(\vec{x}_1) & \cdots & \chi_N(\vec{x}_1) \\ \chi_1(\vec{x}_2) & \chi_2(\vec{x}_2) & \cdots & \chi_N(\vec{x}_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(\vec{x}_N) & \chi_2(\vec{x}_N) & \cdots & \chi_N(\vec{x}_N) \end{vmatrix}, \quad (2.1.1)$$

onde χ são funções das coordenadas espaciais e de spin de um único elétron, chamadas de funções spin-orbitais moleculares. Com esse determinante, troca-se o problema de achar uma função de onda que depende das coordenadas de N elétrons pelo problema de encontrar N funções de onda de um elétron. As funções spin-orbitais moleculares são encontradas resolvendo a equação de Hartree-Fock, que é uma equação de autovalores para essas funções. A equação de Hartree-Fock é dada por:

$$\mathfrak{F}(x_1) \chi_a(x_1) = \varepsilon_a \chi_a(x_1). \quad (2.1.2)$$

A Eq. 2.1.2 é uma equação de autovalores e autofunções, onde $\mathfrak{F}(x_1)$ é conhecido como operador de Fock e é um operador hermitiano e ε_a é a auto-energia associada a χ_a . Esse operador é gerado pelas funções spin-orbitais moleculares. Isto é, esse é um hamiltoniano para um único elétron em um tipo de “campo efetivo” devido aos núcleos e ao restante dos elétrons.

Para resolver a Eq. 2.1.2, as funções spin-orbitais moleculares são expandidas em termos de um conjunto conhecidos de funções base de um elétron, chamadas de g_k :

$$\chi_a = \sum_k c_{ak} g_k \quad (2.1.3)$$

onde os coeficientes c_{ak} são desconhecidos. Substituindo essa equação na Eq. 2.1.2 e depois multiplicando por g_j^* e integrando sobre todo o espaço temos:

$$\sum_k (F_{jk} - \varepsilon_a S_{jk}) c_{ak} = 0, \quad j = 1, 2, \dots \quad (2.1.4)$$

onde $F_{jk} \equiv \langle g_j | \mathfrak{F} | g_k \rangle$ e $S_{jk} \equiv \langle g_j | g_k \rangle$. Para uma solução não trivial da Eq. 2.1.4, o determinante dos coeficientes, c_{ak} , deve sumir, levando a:

$$\det(F_{jk} - \varepsilon_a S_{jk}) = 0. \quad (2.1.5)$$

As Eqs. 2.1.3-2.1.5 foram propostas por Roothaan e por isso são chamadas de equações de Hartree-Fock-Roothaan [Roothaan, 1951].

Como o operador de Fock, $\mathfrak{F}(x_i)$, depende das funções spin-orbitais moleculares, χ , ele só é conhecido quando as funções χ forem determinadas. Por isso, para resolver as Eqs. 2.1.3-2.1.5, é utilizado um método chamado de auto-consistente, *SCF (Self-Consistent Field)*. Para iniciar a aplicação desse método, é preciso supor um valor inicial para os coeficientes c_{ak} , da Eq. 2.1.3, pois as funções bases, g_k , são conhecidas. Com isso é possível obter os valores iniciais das funções spin-orbital moleculares χ . Esses valores são utilizados para calcular um valor inicial do operador $\mathfrak{F}$, que por sua vez é utilizado na Eq. 2.1.5 para se obter as energias dos orbitais ε_a . Essa energia é colocada na Eq. 2.1.4 e novos valores de c_{ak} são calculados e o processo é repetido até atingir a convergência do operador de Fock e das soluções desejadas: as funções spin-orbitais (as autofunções) e as energias dos orbitais (os autovalores).

As aproximações usadas pelo método de *HF* e que levam à resolução da equação de Schrödinger são as seguintes:

- a. Assume-se a aproximação de *BO*.
- b. Os efeitos relativísticos são completamente desconsiderados, ou seja, o operador de momento é não relativístico.
- c. As funções spin-orbitais são combinações lineares de um número finito de funções base atômicas, que quase sempre são ortogonais.
- d. Cada função spin-orbital é um único determinante de Slater.
- e. A aproximação de campo médio está implícita. Efeitos que levam a desvios dessa aproximação, conhecidos como correlação eletrônica, são completamente negligenciados.

Para mais detalhes e informações consultar as referências [Slater, 1968; Levine, 2000; Vianna *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2007b].

2.1.1c Aproximação LCAO

Para iniciar o ciclo *SCF*, é preciso realizar a escolha das funções base g_k . Para moléculas poliatômicas, é usada uma aproximação chamada de combinação linear de orbitais atômicos, *LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals)*. Essa aproximação consiste em descrever os orbitais moleculares como combinação linear de funções centradas em cada átomo, que são as funções base (g_k) da expansão colocada na Eq. 2.1.3. Essas funções normalmente são orbitais do tipo Gaussiano, *GTO (Gaussian-Type-Orbitals)*, e contêm um

fator radial dado por $r^l \exp(-br^2)$, onde b e l são constantes que dependem do orbital, e também contêm um fator angular dado por harmônicos esféricos. Para cada cálculo realizado, é possível escolher um conjunto de funções base para compor os orbitais moleculares. Em geral, tenta-se utilizar o conjunto de funções base mais completo possível. Porém, quanto maior o conjunto de funções base, maior o tempo computacional de um cálculo. Então a escolha deve ser feita de modo a se obter um tempo computacional factível, sem perder informações nos resultados obtidos. Para mais informações, consultar [Foresman *et al.*, 1996; Levine, 2000].

Nesta tese de doutorado utilizamos duas funções base *6-31G** e *aug-cc-pVDZ*. A primeira foi utilizada para as otimizações de geometrias moleculares e a segunda para os cálculos de energias e momento de dipolo. A função base *6-31G** significa que seis funções gaussianas foram utilizadas para os elétrons das camadas internas e uma combinação linear de funções foi utilizada para os elétrons de valência. Os orbitais atômicos dos elétrons de valência são dados por uma combinação linear, nesse caso com dois termos (apenas dois números depois do seis, *31*), chamada de “*double-zeta*”. Essa combinação é feita utilizando três funções para compor o primeiro termo e uma para compor o segundo termo [Ditchfield *et al.*, 1971; Hehre *et al.*, 1972]. O asterisco indica que a polarização foi incluída nos orbitais atômicos de valência. Na segunda função base utilizada, *aug-cc-pVDZ*, *cc-p* significa “*correlation-consistent polarized*” indicando que eles acrescentam camadas maiores de funções de polarização (correlacionadas) para os orbitais atômicos de valência. O *V* significa que são apenas os orbitais de valência. *DZ* significa que são funções “*double-zeta*” e *aug* significa que mais funções de polarização foram acrescentadas [Dunning, 1989; Kendall *et al.*, 1992]. Para mais detalhes sobre funções base consultar as referências [Hehre *et al.*, 1986; Jensen, 1999; Levine, 2000].

2.1.1d Teoria de Perturbação de Møller-Plesset

Uma das teorias desenvolvidas para aprimorar os resultados obtidos com *HF* foi a Teoria de Perturbação de Møller-Plesset (*MP*). Essa teoria usa a Teoria de Perturbação de Rayleigh-Schrödinger [Schrödinger, 1926], considerando o hamiltoniano não perturbado como uma soma dos operadores de Fock para todos os elétrons do sistema e o potencial perturbativo sendo uma interação elétron-elétron exata menos duas vezes essa interação na forma de uma média. Esse potencial tem a função de incluir a descrição das interações entre os elétrons e também de corrigir a contagem dupla de interação elétron-elétron no hamiltoniano não perturbado [Moller *et al.*, 1934].

A grande vantagem desse método pós-*HF* é que ele inclui parcialmente a correlação eletrônica que é essencial em diversos casos. A energia de correlação eletrônica é obtida através da sua expansão numa série de perturbação, os termos de ordem zero e primeiro da expansão, somados, fornecem a energia de *HF* sem correlação eletrônica. O termo de segunda ordem fornece a correção de segunda ordem para a inclusão da energia de correlação. A energia total obtida com essa correção é menor que a energia de *HF*, pois a energia de correlação eletrônica é negativa.

Quando essa teoria é usada até a segunda ordem é chamada de *MP2*. Para maiores detalhes, verificar as seguintes referências: [Moller *et al.*, 1934; Leininger *et al.*, 2000; Vianna *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2007a]. Nesta tese de doutorado, essa metodologia foi utilizada para os cálculos de cargas atômicas e momentos de dipolo.

2.1.1e Teoria de Interação de Configuração

Outro método desenvolvido pós-*HF*, para incluir os efeitos de correlação, é chamado de Interação de Configuração, *CI* (*Configuration Interaction*) [Pople *et al.*, 1976; Pople *et al.*, 1977; Krishnan *et al.*, 1980; Raghavachari *et al.*, 1981]. Nesse método a função de onda, composta por um determinante de Slater no método de *HF*, é escrita como uma combinação de determinantes, nos quais um ou mais orbitais ocupados do determinante de *HF* são substituídos por orbitais desocupados (virtuais). A função de onda passa a ser do tipo:

$$\phi = b_0\phi_0 + \sum_n b_n\phi_n, \quad (2.1.6)$$

onde ϕ_0 é a função de onda de *HF*, ϕ_n é a função de onda de *HF* com os orbitais ocupados substituídos pelos orbitais desocupados, b são os coeficientes que precisam ser determinados, minimizando a energia da função de onda ϕ e n percorre todas as substituições desejadas. Se apenas um orbital ocupado for substituído por um virtual, temos uma substituição simples, chamada de *CIS*. Se dois orbitais forem substituídos no mesmo determinante, temos as interações duplas, chamadas de *CID*. Se três orbitais forem substituídos temos as interações triplas e assim por diante. Se todas as substituições possíveis forem feitas temos o chamado *full CI*. Nesta tese de doutorado essa metodologia foi utilizada para o cálculo das energias de absorção eletrônicas.

Para mais detalhes consultar as referências: [Jensen, 1999; Sherrill *et al.*, 1999; Levine, 2000; Vianna *et al.*, 2004; Ornellas, 2007].

2.1.1f Teoria do Funcional de Densidade

Para sistemas com muitos elétrons (por exemplo, mais de 40 átomos), o método *MP* colocado acima é muito custoso computacionalmente, dependendo do tipo de cálculo que se precisa realizar. Em 1964, foi desenvolvida uma nova metodologia por Hohenberg e Kohn [Hohenberg *et al.*, 1964], chamada de Teoria do Funcional Densidade, *DFT* (*Density Functional Theory*). Essa abordagem para resolver a equação de Schrödinger é baseada na estratégia de modelar a correlação eletrônica através de funcionais gerais da densidade eletrônica. Essa metodologia tem a sua origem nos teoremas de Hohenberg-Kohn [Hohenberg *et al.*, 1964], que determinam a energia do estado fundamental e a densidade exatamente, porém o teorema não fornece a forma do funcional. Em um trabalho seguinte, Kohn e Sham propuseram a forma aproximada dos funcionais utilizados atualmente pelos métodos *DFT* [Kohn *et al.*, 1965]. Esse funcional particiona a energia eletrônica em quatro termos:

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC}, \quad (2.1.7)$$

onde E^T é o termo de energia cinética dos elétrons, E^V inclui os termos que descrevem a energia potencial da atração elétron-núcleo e a repulsão entre os pares de núcleos, E^J é o termo de repulsão elétron-elétron e E^{XC} é o termo correlação-troca que inclui a parte restante das interações elétron-elétron. Nessa expressão todos os termos são calculados exatamente, com exceção dos termos E^J e E^{XC} . Para calcular esse termo, diferentes aproximações podem ser feitas. Algumas dessas aproximações são:

- a. *LDA* (*Local Density Approximation*): a energia de correlação-troca é assumida como sendo a mesma que a de um gás de elétrons de densidade homogênea. Ela é calculada usando um funcional de densidade homogênea.
- b. *LSDA* (*Local Spin Density Approximation*): a aproximação é a mesma que o *LDA*, mas inclui a polarização dos spins eletrônicos.
- c. *GGA* (*Generalized Gradient Approximation*): nesta aproximação o valor de E^{XC} é calculado através de um funcional que depende da densidade de elétrons e também do seu gradiente, permitindo maior precisão para sistemas com densidade não homogênea.
- d. *GGA* híbrido: este funcional mistura uma fração da energia de troca de *HF* na energia de troca do *DFT*. Os parâmetros para essa combinação são ajustados a partir de dados experimentais em moléculas conhecidas. Um desses funcionais é o *B3LYP* [Becke, 1988; Lee *et al.*, 1988; Stephens *et al.*, 1994; Hertwig *et al.*, 1997] usado nesta tese de doutorado para otimização de geometria molecular. O funcional *B3LYP*

apresenta ótimos resultados para geometria de estado fundamental, quando comparado com resultados experimentais e também com resultados calculados com *MP2* [Hertwig *et al.*, 1997; Riley *et al.*, 2007], além de ter uma grande vantagem em relação ao tempo computacional.

2.1.1g Método Semi-Empírico ZINDO

Os métodos semi-empíricos são normalmente formulados com os mesmos conceitos dos métodos de primeiros princípios, colocados nas Seções 2.1.1b-e, mas eles negligenciam algumas integrais para acelerar os cálculos. Para compensar os erros causados por essas aproximações, parâmetros empíricos são introduzidos nas integrais restantes e calibrados em relação a dados empíricos confiáveis ou dados teóricos usados como referência. Essa estratégia só pode ser bem sucedida, se os modelos semi-empíricos mantiverem a física essencial para descrever as propriedades de interesse. Esses métodos ganharam mais força com a publicação na década de 60 de uma série de artigos de Pople e colaboradores, onde os seguintes métodos foram propostos:

- *CNDO* (*Complete Neglect of Differential Overlap*): desconsidera todas as integrais de repulsão eletrônica que possuam produtos envolvendo orbitais distintos [Pople *et al.*, 1965a; Pople *et al.*, 1965b; Pople *et al.*, 1966; Santry *et al.*, 1967].
- *INDO* (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*): desconsidera todas as integrais de repulsão eletrônica, menos as do tipo troca ($\langle uv|uv \rangle$), quando todos os orbitais estão no mesmo centro [Pople *et al.*, 1967].
- *NDDO* (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*): todas as integrais de repulsão eletrônica que dependem do *overlap* de densidades de cargas de orbitais atômicos centrados em átomos diferentes são anulada [Pople *et al.*, 1965a].

Outros métodos foram e ainda são desenvolvidos: *CNDO/2* [Pople *et al.*, 1966], *CNDO/S* [Delbene *et al.*, 1968], *MINDO/3* [Bingham *et al.*, 1975], *INDO/S* [Ridley *et al.*, 1973; Bacon *et al.*, 1979], *SINDO1* [Nanda *et al.*, 1980; Jug *et al.*, 1987], *MSINDO* [Ahlswede *et al.*, 1999a; Ahlswede *et al.*, 1999b], *MNDO* [Dewar *et al.*, 1977a; Dewar *et al.*, 1977b], *MNDOC* [Thiel, 1981], *AMI* [Dewar *et al.*, 1985], *PM3* [Stewart, 1989a; Stewart, 1989b], *PM6* [Stewart, 2007], *RMI* [Rocha *et al.*, 2006], entre outros. Mas quase todos são definidos pelas seguintes especificações:

- a. O método teórico por trás: Os métodos semi-empíricos mais comuns e generalistas são baseados na teoria do orbital molecular, *MO* (do inglês, *Molecular Orbital*) e usam um conjunto de bases para os elétrons de valência.

- b. A aproximação das integrais e os tipos de interações incluídas: Os métodos mais tradicionais para a aproximação das integrais são três, *CNDO*, *INDO* e *NDDO*. Sendo que o *NDDO* é o que inclui menos aproximações.
- c. Cálculo das integrais: Em um dado nível de aproximação das integrais, elas são determinadas diretamente de dados experimentais ou calculadas através de suas fórmulas, ou ainda calculadas através de expressões parametrizadas.
- d. Parametrização: Os métodos semi-empíricos baseados em orbitais moleculares são parametrizados para reproduzir dados experimentais utilizados como referência, ou ainda cálculos teóricos feitos com grande precisão. A qualidade dos resultados de um método semi-empírico é altamente influenciada pela qualidade da parametrização.

Os itens 1-2 definem o método semi-empírico, 1-3 definem a implementação de um dado modelo e 1-4 definem um método em específico [Thiel, 2000]. Nessa tese de doutorado, utilizamos o método *INDO/S* [Ridley *et al.*, 1973; Bacon *et al.*, 1979], desenvolvido com parametrização espectroscópica para calcular as energias de absorção eletrônica, como implementado no programa ZINDO [Zerner, 2000]. Uma descrição detalhada sobre essa metodologia está colocada no Apêndice A.

2.1.1h Modelo contínuo para solvente

Todos os métodos colocados nas Seções 2.1.1b-g foram discutidos para moléculas isoladas, mas para calcular propriedades físico-químicas das moléculas em diferentes ambientes é preciso levar em conta o efeito do solvente. Os primeiros modelos teóricos para inclusão dos efeitos do solvente foram propostos no início do século XX, através de três trabalhos de Born [Born, 1920], Kirkwood [Kirkwood, 1934] e Onsager [Onsager, 1936]. Em todos esses modelos, o solvente é tratado como um material contínuo e dielétrico, caracterizado por parâmetros macroscópicos, principalmente a constante dielétrica ϵ .

A física desta interação soluto-solvente é simples: a distribuição de carga molecular (ρ_M) do soluto, dentro de uma cavidade no solvente, polariza o solvente, considerado como um dielétrico contínuo, que por sua vez polariza a distribuição de carga do soluto. Essa definição da interação corresponde a um processo auto-consistente de campo de reação, *SCRF* (*Self-Consistent Reaction Field*), que é resolvido numericamente através de um processo iterativo.

No trabalho original de Onsager, foi introduzida a idéia de campo de reação, ou seja, um dielétrico com cavidade esférica de raio a , na qual é colocado o soluto, com momento de dipolo μ , é polarizado pelo campo elétrico desse dipolo. A distribuição de cargas no dielétrico, resultante da polarização, dá origem ao campo de reação [Onsager, 1936]:

$$\vec{R} = \frac{2(\varepsilon - 1)}{2\varepsilon + 1} \frac{\vec{\mu}}{a^3}. \quad (2.1.8)$$

$\vec{R}$ é sempre paralelo ao momento de dipolo do soluto e aumentará a assimetria da distribuição de carga. Porém a Eq. 2.1.8, é apenas uma das aproximações para a interação soluto-solvente, outras aproximações mais sofisticadas foram desenvolvidas posteriormente, como a inclusão da polarização do meio contínuo juntamente com o soluto [Tomasi, 2004; Tomasi *et al.*, 2005].

Um importante aspecto entre todos os modelos contínuos desenvolvidos é o conceito de cavidade. Todos os modelos são compostos de uma molécula, o soluto, colocada em uma cavidade vazia dentro de um meio dielétrico contínuo, mimetizando o solvente. Cada modelo define diferentemente a forma e o tamanho da cavidade, por exemplo, no modelo de Onsager a cavidade é esférica ou elipsoidal [Onsager, 1936]. Alguns modelos calculam a superfície dessa cavidade, gerando uma superfície acessível ao solvente, mas isso é computacionalmente mais custoso. Uma aproximação, não tão simples como uma esfera, e nem tão complicada como calcular a superfície, é definir a cavidade como uma superposição aglutinada de esferas atômicas com o raio próximo dos valores de raio para as esferas de van der Waals [Tomasi *et al.*, 2005].

Nesta tese de doutorado utilizamos dois modelos de solvente contínuo. Para os cálculos de energia eletrônica de absorção utilizamos o modelo *SCRF* com a cavidade de Onsager esférica, como implementado no programa ZINDO [Zerner, 2000]. Para os cálculos de dipolo, usamos o modelo *PCM (Polarizable Continuum Model)*, proposto em 1981 por Tomasi e colaboradores [Miertus *et al.*, 1981], onde a cavidade é definida como a superposição dos raios de van der Waals acrescidos de aproximadamente 20 %, o potencial de reação é determinado de modo auto-consistente e entra no hamiltoniano molecular como uma perturbação, como implementado no programa Gaussian03 [Frisch *et al.*, 2004]. Para maiores detalhes consultar as seguintes referências [Miertus *et al.*, 1981; Tomasi *et al.*, 2005]. Um exemplo da cavidade usada pelo *PCM* pode ser visto na Figura 2.1.

Figura 2.1: Exemplo da cavidade usada pelo modelo PCM para o cálculo levando em conta um solvente contínuo. Parte vermelha é a cavidade, envolvendo o soluto e a parte azul representa um dielétrico contínuo como solvente.

2.1.1i Cálculo das Cargas Atômicas

É importante ressaltar que as interações soluto-solvente incluídas nos modelos contínuos são essencialmente eletrostáticas. Entretanto, também é possível incluir esse tipo de interação utilizando uma distribuição de cargas atômicas para descrever o potencial eletrostático do solvente, interagindo com as cargas do soluto. Para determinar as cargas atômicas, tanto do soluto como do solvente, podem ser utilizados cálculos quânticos.

Uma das primeiras maneiras de calcular as cargas atômicas em uma molécula usando Mecânica Quântica foi a chamada análise populacional de Mulliken [Mulliken, 1955]. Nesse cálculo, as cargas atômicas são estimadas utilizando os orbitais atômicos e os coeficientes que compõem a aproximação *LCAO*. Dessa forma, os valores obtidos são extremamente dependentes do conjunto de funções base escolhido para o cálculo [Levine, 2000] e adicionalmente não descrevem os momentos de multipolos da molécula. Por esse motivo, outros métodos foram desenvolvidos para a obtenção das cargas atômicas, com o objetivo de descrever o potencial eletrostático, como o método *CHELPG* (*Charges from a ELectrostatic Potencial using a Grid*) [Breneman *et al.*, 1990]. Nesse método as cargas atômicas são ajustadas para reproduzir o potencial eletrostático molecular em um certo número de pontos ao redor da molécula. Esse potencial é calculado usando a densidade eletrônica molecular, que por sua vez, é calculada usando a função de onda eletrônica para a geometria da molécula.

No primeiro passo do procedimento de ajuste, o potencial é calculado em um número de pontos de uma rede, espaçados de 0.3 - 0.8 Å, regularmente distribuídos ao redor da molécula. As dimensões ao redor da molécula são escolhidas de modo que a molécula fique localizada no centro, adicionando um espaço de 2.8 Å entre a molécula e o fim da rede em todas as três dimensões. Todos os pontos que estão dentro dos raios atômicos de van der Waals da molécula são desconsiderados no procedimento de ajuste, assim como, os pontos

que estiverem a uma distância maior que 2.8 Å. Os pontos restantes formam uma camada relativamente homogênea ao redor da molécula, onde toda a região fora do raio de van der Waals e dentro da distância de interação está igualmente representada. A Figura 2.2 descreve a situação para o caso da molécula de água.

Depois de calcular o valor do potencial em todos os pontos da rede, as cargas atômicas são obtidas para reproduzir esse potencial da melhor maneira possível. O único vínculo colocado para esse cálculo é que a soma das cargas atômicas obtidas seja igual a carga molecular. O método *CHELPG* foi utilizado para calcular todos os valores de cargas atômicas obtidas nesta tese de doutorado.

Figura 2.2: Exemplo de rede *CHELPG* para o caso da molécula de água, onde cada intersecção das linhas indica um ponto onde o potencial será calculado e a região azul indica o raio de van der Waals.

2.1.2 Simulações Computacionais de Moléculas Solvatadas

Para estudar moléculas em meio líquido, ou seja, em sistemas solvatados com a presença explícita do solvente, é necessário o uso de simulações computacionais. Isso é necessário, pois uma abordagem analítica leva a equações extremamente complexas do ponto de vista matemático, mesmo o potencial de interação entre as moléculas sendo simples [Allen *et al.*, 1991]. As simulações permitem a obtenção de diferentes configurações do sistema a ser estudado, usando essas configurações é possível obter propriedades microscópicas (posições atômicas e moleculares, velocidades, ligações de hidrogênio e etc.) e macroscópicas (pressão, energia interna, energia livre, etc.).

Existem duas maneiras de se realizar simulações computacionais, que foram desenvolvidas na década de 50, o Método Monte Carlo [Metropolis *et al.*, 1949; Metropolis *et al.*, 1953] e a Dinâmica Molecular [Alder *et al.*, 1957; Alder *et al.*, 1959; Alder *et al.*, 1960]. Uma comparação entre os dois tipos de simulação pode ser encontrada na referência [Coutinho, 1997]. A seguir será dada uma breve descrição de como esses métodos funcionam, acompanhada das referências mais importantes, para maiores detalhes.

2.1.2a Método Monte Carlo

O método Monte Carlo (MC) é uma maneira estocástica de gerar as configurações de um sistema molecular. Nesse método as configurações são geradas através de números aleatórios. Porém, a amostragem aleatória não é conveniente para muitos problemas, pois o número de configurações necessárias, para se obter os valores médios das propriedades desejadas, pode ser muito grande em um espaço multidimensional. Por exemplo, no caso de sistemas moleculares, novas configurações são geradas através de deslocamentos aleatórios das moléculas, e para um sistema condensado, isso pode levar com frequência a configurações onde as moléculas estão muito próximas ou até mesmo superpostas, onde as energias repulsivas são muito altas e o peso estatístico dessas configurações é muito pequeno.

Para resolver esse problema, Metropolis [Metropolis *et al.*, 1953] propôs um algoritmo de amostragem chamado de amostragem preferencial. Nesse algoritmo, a probabilidade para que um movimento possa acontecer é calculada, caracterizando a mudança de uma configuração para a outra, através de um processo de Markov. O processo de Markov é um processo probabilístico, onde é possível construir uma trajetória de pontos aleatórios, em que a configuração seguinte depende exclusivamente da configuração atual, sem levar em conta o histórico do sistema ou nenhuma lei de dinâmica [Tomé *et al.*, 2001]. No equilíbrio termodinâmico cada configuração possui uma probabilidade dada pelo fator de Boltzmann:

$$P(i) = \frac{\exp\left(\frac{-U_i}{k_B T}\right)}{Z}, \quad (2.1.9)$$

onde $P(i)$ é a probabilidade do estado i , U_i é a energia desse estado, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e Z é a função de partição do sistema. A probabilidade de transição, T_{ij} , de um estado i para um estado j é dada pela razão das probabilidades de cada um dos estados:

$$T_{ij} = \frac{\exp\left(\frac{-U_j}{k_B T}\right) / Z}{\exp\left(\frac{-U_i}{k_B T}\right) / Z} = \exp\left(\frac{-\Delta U}{k_B T}\right). \quad (2.1.10)$$

A probabilidade de transição depende apenas da diferença de energia entre os dois estados. Na prática, a amostragem é feita da seguinte maneira: uma configuração j é gerada através de um movimento aleatório na configuração i , a diferença de energia entre as duas configurações é calculada. Se a diferença de energia diminui, a configuração j é aceita, caso contrário, um número aleatório entre 0 e 1 é gerado. Se esse número for menor ou igual a T_{ij} ,

a configuração j é aceita e o processo recomeça usando essa configuração como ponto de partida. Se for maior, ela é rejeitada e se reinicia o processo com a configuração i . No final desse processo, durante a etapa de equilíbrio, as configurações obtidas já estão distribuídas de acordo com o fator de Boltzmann e as médias podem ser calculadas simplesmente, sem levar em conta o peso de cada uma delas [Frenkel *et al.*, 2001].

Esse método foi desenvolvido para o ensemble NVT (ensemble com Número de partículas, Volume e Temperatura constantes), no caso do ensemble NPT (ensemble com Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes), o mesmo procedimento é utilizado, mas a probabilidade de transição é alterada para levar em conta as alterações de volume, que também são feitas aleatoriamente:

$$T_{ij} = \exp\left(\frac{-(\Delta U + P\Delta V)}{k_B T} + N \ln\left(\frac{V_j}{V_i}\right)\right). \quad (2.1.11)$$

Nesta tese de doutorado usamos o programa DICE [Coutinho, 1997; Coutinho *et al.*, 2003], no qual a implementação do método Monte Carlo é dada por:

- a. As condições iniciais da simulação são lidas, como pressão, temperatura, densidade e número de partículas. A configuração inicial é gerada, na maioria dos casos, sorteando aleatoriamente a posição xyz de cada molécula dentro de uma caixa de tamanho definido de modo a se obter a densidade desejada. Condições periódicas de contorno e o método das imagens são aplicados.
- b. Uma nova configuração é gerada, sorteando uma molécula e realizando um deslocamento aleatório nos eixos x , y e z e uma rotação também aleatória ao redor de um eixo também sorteado. No caso do ensemble, NPT uma variação em todas as dimensões da caixa pode ser feita também aleatoriamente.
- c. A energia dessa nova configuração é calculada, através do potencial de interação molecular fornecido no início da simulação e usa-se o algoritmo de Metropolis para aceitar ou rejeitar a nova configuração. Se ela for aceita, as coordenadas cartesianas de todas as moléculas são armazenadas.
- d. Retorna-se ao item b e reinicia-se o processo.

Como colocado no item a , condições periódicas de contorno são aplicadas para evitar os efeitos de borda. Assim, se uma molécula sai por um lado da caixa, uma molécula idêntica entra pelo lado oposto. As interações são consideradas levando em conta o método das imagens, de modo que uma molécula sempre está cercada pelas outras $N - 1$ moléculas para interagir até um certo raio de corte, a partir do qual as interações são desprezadas. O potencial de interação molecular está discutido na Seção 2.1.2c.

Para maiores detalhes sobre as simulações com o método de Monte Carlo, consultar as seguintes referências: [Allen *et al.*, 1991; Frenkel *et al.*, 2001; Coutinho *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2007].

2.1.2b Dinâmica Molecular

Dinâmica Molecular (*MD*) é uma maneira determinística de se obter as configurações de um sistema molecular. É chamada de determinística, pois as posições e as velocidades de cada partícula do sistema são calculadas a cada passo da simulação usando as equações de Newton. Com esse tipo de simulação, é possível ter uma evolução temporal do sistema estudado. Essa técnica de simulação foi desenvolvida no final da década de 50 por Alder e Wainwright [Alder *et al.*, 1957; Alder *et al.*, 1959; Alder *et al.*, 1960]. Muito esforço tem sido feito para aprimorar e desenvolver essa técnica computacional. Mais referências podem ser encontradas em [Allen *et al.*, 1991].

Um programa de *MD* funciona da seguinte maneira:

- a. Os parâmetros que definem as condições da simulação são lidos, como temperatura inicial, número de partículas, densidade, intervalo temporal, etc.
- b. O sistema é inicializado, lendo as posições e as velocidades das partículas em um arquivo inicial (configuração do sistema). Se as velocidades não estão disponíveis, elas podem ser inicializadas com valor zero ou utilizando uma distribuição de Maxwell-Boltzmann. Condições periódicas de contorno e o método das imagens são aplicados, assim como para o método *MC*.
- c. Todas as forças são calculadas utilizando o potencial de interação molecular definido no início da simulação.
- d. As equações de movimento de Newton são integradas. Usando as forças e as posições em um tempo t , é possível calcular as posições e as velocidades num tempo $t + \Delta t$. Se o algoritmo de Verlet for utilizado, a velocidade e a posição de cada partícula são calculados em intervalos de tempos diferentes [Verlet, 1967; Tuckerman *et al.*, 1991]. Os passos *c* e *d* são repetidos até que se percorra um intervalo de tempo desejado para estudar o sistema.

Como no método *MC*, a *MD* precisa de um potencial de interação entre as moléculas para que a simulação seja realizada e esse potencial está descrito na Seção 2.1.2c.

As simulações de *MD* realizadas nesta tese de doutorado foram realizadas no ensemble *NPT*. Para manter a temperatura constante, o sistema deve ser acoplado a um banho térmico com temperatura fixa, que a cada passo da simulação re-escala as velocidades de

modo a obter a temperatura desejada (numa explicação simplificada). Para manter a pressão constante, alterações no volume podem ser realizadas, fazendo um escalonamento nas dimensões da caixa de modo a obter a pressão desejada. Esse escalonamento é feito acoplando-se ao sistema graus de liberdade externos que atuam como êmbolo ou pistão alterando o volume [Martyna *et al.*, 1994]. O termostato e o barostato, utilizados na simulações com MD desta tese, foram o de Berendsen [Berendsen *et al.*, 1984].

Nesta tese de doutorado, utilizamos o programa TINKER [Ponder *et al.*, 1987; Kundrot *et al.*, 1991; Hodsdon *et al.*, 1996; Pappu *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2003], para a realização das simulações de MD.

Mais detalhes sobre Dinâmica Molecular e sua implementação podem ser encontrados nas seguintes referências: [Allen *et al.*, 1991], [Frenkel *et al.*, 2001], [Martínez *et al.*, 2007] e nas referências citadas por eles.

2.1.2c Potencial de Interação Molecular

A escolha do potencial de interação molecular é de fundamental importância no preparo de uma simulação, pois ele determina as forças que atuam no sistema e determinam a evolução do sistema durante a simulação. Comumente, esse potencial é dado por uma soma de potenciais inter e intramoleculares. Esses potenciais são definidos na simulação pelo campo de força utilizado, onde campo de força é o conjunto de equações e parâmetros ajustados para reproduzir as interações moleculares. As Eqs. 2.1.12 e 2.1.13 são as usadas no campo de força OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) [Jorgensen *et al.*, 1996]. E elas podem sofrer alterações dependendo do campo de força utilizado.

Geralmente, o potencial intermolecular entre é dado pela interação de Lennard-Jones mais a interação de Coulomb:

$$U_{ij} = \sum_{ij} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{r_{ij}}, \quad (2.1.12)$$

onde r_{ij} é a distância entre o sítio i e o j , ε_{ij} é dado por $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$, σ_{ij} é dado por $\sigma_{ij} = \sqrt{\sigma_i \sigma_j}$ e q_i é a carga do sítio i . Na Figura 2.3, temos uma ilustração do potencial de Lennard-Jones. Os valores ε_i e σ_i são a profundidade do poço de potencial e a distância onde o potencial se torna repulsivo, respectivamente.

Figura 2.3: Gráfico do potencial de Lennard-Jones utilizado. Neste caso foi utilizado um $\epsilon_i = \epsilon_j = 0.8$ kcal/mol e $\sigma_i = \sigma_j = 2.42$ Å.

O potencial intramolecular pode ser dividido em duas partes, átomos considerados ligados, ou seja, até o terceiro vizinho, e átomos considerados não ligados, ou seja, além do terceiro vizinho. Para os átomos não ligados, o potencial pode ser o mesmo dado pela Eq. 2.1.12, multiplicado por um fator de atenuação apenas para o quarto e quinto vizinhos.

Para os átomos ligados, o potencial pode ser dado por uma soma de três termos, o potencial de interação das ligações atômicas ($V_{\text{ligação}}$), entre um átomo e seus primeiros vizinhos, o potencial de interação angular (V_{angular}), entre o átomo e seus segundos vizinhos, e o potencial de interação dos ângulos de torção ($V_{\text{torção}}$), entre um átomo e seus terceiros vizinhos, como colocados a seguir, para o campo de força *OPLS*:

$$\begin{aligned}
 V_{\text{ligação}} &= \sum_{\text{ligações}} K_r (r_{ij} - r_{eq})^2 \\
 V_{\text{angular}} &= \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 \\
 V_{\text{torção}} &= \frac{V_1}{2} [1 + \cos(\phi_{ijkl} + f_1)] + \frac{V_2}{2} [1 - \cos(2\phi_{ijkl} + f_2)] + \frac{V_3}{2} [1 + \cos(3\phi_{ijkl} + f_3)]
 \end{aligned} \quad . \quad (2.1.13)$$

Nas Eqs. 2.1.13, K_r , K_θ e V_n são as constantes de força que modulam a intensidade das interações, r_{eq} e θ_{eq} são os valores de equilíbrio para as ligações e os ângulos, respectivamente e f_n são as fases dos ângulos de torção. Uma ilustração desses potenciais pode ser vista na Figura 2.4. Quando a molécula apresenta grupos planares, é necessário acrescentar potenciais de ângulos de torção, chamados de potenciais de ângulos de torção impróprios. O potencial para esses ângulos é dado apenas pelo segundo termo da equação $V_{\text{torção}}$ e tem que ser definido de forma a ter 180° como a posição de equilíbrio.

Figura 2.4: Exemplo dos potenciais entre átomos ligados ou intramoleculares.

Os parâmetros usados nas simulações desta tese foram retirados do campo de força *OPLS*, pois esse campo de força é amplamente utilizado em sistemas biológicos, apresentando bons resultados quando comparados com resultados experimentais [Jorgensen *et al.*, 1988; Briggs *et al.*, 1990; Briggs *et al.*, 1991; Pranata *et al.*, 1991; Jorgensen *et al.*, 1993; Kaminski *et al.*, 1994; Kaminski *et al.*, 1996; Damm *et al.*, 1997].

Nas simulações com método *MC*, utilizamos moléculas rígidas, ou seja, o potencial de interação molecular é composto apenas pelo termo intermolecular (Eq. 2.1.12) para átomos em moléculas distintas, como implementado no programa DICE [Coutinho *et al.*, 2003]. Nas simulações de *MD* foram utilizados tanto o potencial intramolecular como o intermolecular (Eqs. 2.1.12 e 2.1.13), como implementado no programa TINKER [Ponder *et al.*, 1987; Kundrot *et al.*, 1991; Hodsdon *et al.*, 1996; Pappu *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2003] para o campo de força *OPLS*.

2.1.2d Função de Distribuição Radial, $g(r)$

Depois de realizada a simulação, *MC* ou *MD*, é preciso analisar as configurações resultantes. Uma maneira de analisar essas configurações é olhando como as moléculas estão organizadas usando a função de distribuição radial de pares, $g(r)$, ou *RDF* (*Radial Distribution Function*).

Para entender essa função, vamos considerar um líquido homogêneo de densidade ρ e temperatura T . Escolhendo uma partícula A , dentro do líquido, vamos contar quantas partículas estão colocadas ao redor dessa partícula A em diferentes distâncias. O número médio de partículas observado em um elemento infinitesimal de volume dv a uma distância r da partícula A não será, em geral, somente ρdv , porque a presença da partícula A perturba o ambiente ao seu redor.

Figura 2.5: Exemplo da função de distribuição radial de pares, calculada em simulações.

Por exemplo, se as partículas são esferas duras de diâmetro b , então nenhuma outra partícula seria observada em $r < b$. Ou no caso do potencial de Lennard-Jones, as partículas teriam a tendência de se acumularem no valor de r do mínimo do potencial (Figura 2.5). Em ambos os casos, quando r for grande e a influência da partícula A não for mais relevante, o número médio de partículas será aproximadamente ρdv .

Em geral, o número médio de partículas observadas em dv é dado por $\rho g(r)dv$. A $g(r)$ pode ser considerada como um fator pelo qual a densidade local média $\rho g(r)$ num ponto r é alterada em relação à densidade do líquido ρ . Devido ao fato que todas as moléculas se tornam “impenetráveis” para um r suficientemente pequeno, $g \rightarrow 0$ quando $r \rightarrow 0$. E também como dito anteriormente, $g \rightarrow 1$ quando $r \rightarrow \infty$ [Hill, 1986]. Um exemplo dessa função pode ser visto na Figura 2.5. Essa função pode ser obtida experimentalmente através de experimentos de espalhamento de raio-x e difração de nêutrons [Eisenstein *et al.*, 1942].

Figura 2.6: $g(r)$ (acima) e moléculas da 1ª. camada de solvatação (abaixo) para a molécula de Prodan. A esquerda usando a $g(r)$ de centro de massa (RDFCM) e a direita usando a $g(r)$ de mínima distância (MDDF).

Na simulação computacional, a *RDF* é calculada através do histograma de distâncias entre os pares de átomos. Normalmente, a distância utilizada é a distância entre os centros de

massa das moléculas, como colocado do lado esquerdo da Figura 2.6, o que gera uma contagem da distribuição esférica de moléculas ao redor da molécula central. Mas para algumas moléculas, onde uma dimensão é maior que a outra, essa distribuição esférica não reflete as camadas do solvente ao redor do soluto. Nesse caso, é melhor usar a função de distribuição de mínima distância, *MDDF* (*Minimum Distance Distribution Function*) [Canuto *et al.*, 2002], onde a distância considerada para calcular a $g(r)$ é a menor distância possível entre qualquer átomos das duas moléculas consideradas. Essa distribuição está colocada no lado direito da Figura 2.6.

Para moléculas alongadas, também pode ser utilizada na simulação uma caixa que permita um mesmo número de moléculas de solvente em todas as direções da molécula, ou seja, uma caixa retangular.

2.1.2e Cálculo da Energia Livre de Gibbs

Valores de energia livre são necessários para a caracterização da estabilidade relativa de diferentes sistemas fisico-químicos. Muitas das propriedades desses sistemas dependem da energia livre. Teoricamente, energias livres podem ser determinadas de diversas maneiras [Hill, 1986]. Porém o cálculo computacional dessas grandezas é muito complicado e normalmente, diferenças de energias livres são calculadas e não valores absolutos. Existem diversos métodos para realizar esses cálculos, como integração termodinâmica, perturbação da energia livre, entre outros [Pearlman *et al.*, 1998].

O método utilizado nesta tese de doutorado foi o método de perturbação da energia livre, *FEP* (*Free Energy Perturbation*), pois esse foi o método implementado no programa DICE que utilizamos para realizar essas simulações e obter as diferenças de energia livre.

Esse método é baseado na teoria de perturbação de Zwanzig [Zwanzig, 1954]. A energia livre de um estado A é dada por:

$$A_A = -k_B T \ln Z_A \quad (2.1.14)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e Z_A é a função de partição. Se $Z_A = \int e^{-U_A/k_B T}$, temos a energia livre de Helmholtz, se $Z_A = \int e^{-(U_A + pV)/k_B T}$, temos a energia livre de Gibbs. A diferença de energia livre entre o estado A e o estado C é dada por

$$\Delta G(A \rightarrow C) = G_C - G_A = -k_B T \ln \left(\frac{Z_C}{Z_A} \right). \quad (2.1.15)$$

A Eq. 2.1.15 pode ser expandida e reorganizada [Mark, 1998; Pearlman *et al.*, 1998] e ficar da seguinte maneira, no ensemble NVT :

$$\Delta H(A \rightarrow C) = -k_B T \ln \left\langle \exp \left[\frac{-(U_C - U_A)}{k_B T} \right] \right\rangle_A. \quad (2.1.16)$$

E no ensemble NPT :

$$\Delta G(A \rightarrow C) = -k_B T \ln \left\langle \exp \left[\frac{-[(U_C - U_A) + p(V_C - V_A)]}{k_B T} \right] \right\rangle_A. \quad (2.1.17)$$

A Eq. 2.2.16 no ensemble NVT e a Eq. 2.1.17 no ensemble NPT são fundamentais para os cálculos de energia livre utilizando simulações computacionais com esse método. A média, a ser calculada, envolve uma diferença na energia potencial total, $U_C - U_A$, calculada por amostragens de configurações no estado A e no caso do sistema com pressão constante a diferença $V_C - V_A$ precisa ser considerada como colocada na Eq. 2.1.17.

Embora a expressão seja simples, a convergência é lenta se os estados A e C forem muito diferentes. Para resolver esse problema, uma série de simulações é feita, nas quais o estado A é gradualmente mudado para o estado C , usando um fator de acoplamento λ , que muda todos os parâmetros geométricos e da função do potencial de A para C , quando λ vai de 0 a 1:

$$\xi(\lambda) = \xi_A + \lambda(\xi_C - \xi_A), \quad (2.1.18)$$

Onde ξ é o parâmetro que se deseja alterar de A para C . Os cálculos são feitos em séries de valores de λ , λ_p , com a perturbação feita para o próximo valor de λ_p , λ_{i+1} . Cada incremento de energia livre é, algumas vezes, chamado de “janela”. Em cada valor de λ_p , o sistema é equilibrado e depois a média é calculada. A energia livre total da mudança é a soma de todas as janelas com os valores de $\lambda = 0$ até 1. Na prática, dois incrementos na energia livre podem ser obtidos com apenas uma simulação, através da perturbação de λ_i para ambos os estados, λ_{i+1} e λ_{i-1} [Jorgensen *et al.*, 1985].

Uma particularidade interessante das Eqs. 2.1.16-17 é que se a alteração no sistema envolve apenas o soluto, a energia de interação solvente-solvente não é alterada do sistema A para o sistema C e se cancela com o cálculo da diferença $U_C - U_A$, e com isso a convergência é facilitada [Jorgensen, 1998].

Com o valor de $\Delta G(A \rightarrow C)$ é possível calcular a população de A e de C presentes no sistema. Considerando a reação $A \leftrightarrow C$, no equilíbrio, temos que [Chang, 2000]:

$$\Delta G(A \rightarrow B) = -RT \ln K, \quad (2.1.19)$$

onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura e K é a constante de equilíbrio da reação. A constante de equilíbrio é dada por [Chang, 2000]:

$$K = \frac{[C]}{[A]}. \quad (2.1.20)$$

Reescrevendo a Eq. 2.1.19, temos:

$$K = \exp[-\Delta G(A \rightarrow B)/kT], \quad (2.1.21)$$

onde k é a constante de Boltzmann e $\Delta G(A \rightarrow C)$ é usado em energia/mol. Utilizando a Eq. 2.1.21 é possível obter o valor de K , ou seja, da fração $[C]/[A]$. Sabendo que $[A] + [B] = 1$, pois ou o sistema está no estado A ou está no estado B , podemos calcular a população de cada estado presente no sistema.

2.1.3 Cálculo das Propriedades Eletrônicas em Solução

Muitas propriedades de interesse não podem ser calculadas com uma simulação computacional totalmente clássica como MC e MD , pois os potenciais clássicos não conseguem descrever propriedades eletrônicas, uma vez que os elétrons não estão explicitamente incluídos nos potenciais clássicos.

A maneira encontrada para se calcular as propriedades eletrônicas, como espectro de absorção e emissão, momento de dipolo, entre outras, foram os chamados métodos híbridos, QM/MM (*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*). Esses métodos podem ser divididos em duas grandes classes o QM/MM convencional e o QM/MM seqüencial, também chamado de $S-QM/MM$ (*Sequential Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*). Na primeira classe, o cálculo quântico e o clássico são feitos simultaneamente, ou seja, uma pequena parte do sistema é estudada usando métodos quânticos (a parte onde se deseja calcular as propriedades eletrônicas) e o restante é tratado classicamente [Lifson *et al.*, 1968; Warshel *et al.*, 1970; Warshel *et al.*, 1976; Singh *et al.*, 1986; Field *et al.*, 1990; Humbel *et al.*, 1996; Svensson *et al.*, 1996; Levitt, 2001]. A segunda classe foi a utilizada nesta tese de doutorado e será explicada a seguir.

2.1.3a QM/MM Seqüencial

O método QM/MM seqüencial [Coutinho *et al.*, 1997; Canuto *et al.*, 2000], como o próprio nome já diz, realiza cálculos quânticos e clássicos seqüencialmente e não simultaneamente, como o método convencional. Primeiramente, se realiza uma simulação clássica, onde todo o sistema é tratado de maneira clássica, com os potenciais descritos na Seção 2.1.2c para MC ou MD , depois os cálculos quânticos são realizados com as configurações resultantes dessas simulações. A vantagem desse método é que o tamanho do sistema a ser usado no cálculo quântico pode ser escolhido depois que a simulação já foi

realizada, dependendo da propriedade que se deseja calcular. Várias propriedades podem ser calculadas em sistemas de diferentes tamanhos. Porém, esse método desacopla a parte clássica e a parte quântica e propriedades que dependem desse acoplamento precisam ser consideradas utilizando o procedimento descrito na Seção 2.1.3c ou utilizando o *QM/MM* convencional.

Uma grande questão no *S-QM/MM* é como escolher as configurações que serão utilizadas no cálculo quântico. Deseja-se que o resultado final do cálculo quântico seja representativo do sistema estudado, ou seja, uma média estaticamente convergida. Se o cálculo quântico for realizado em todas as configurações resultantes da simulação, essa média será obtida, mas o custo computacional é muito elevado e muitas vezes impraticável. As configurações que realmente têm relevância para a média, são as configurações estatisticamente descorrelacionadas [Coutinho *et al.*, 1998].

As configurações descorrelacionadas em *MD* aparecem depois de um certo tempo de correlação, mas em *MC* o tempo não é levado em conta e por isso é necessário calcular uma correlação entre os ciclos de *MC* (em um ciclo, todas as moléculas são movimentadas, assim como o volume é alterado, no *NPT*), ou seja, determinar um certo número de ciclos necessários para que as configurações estejam descorrelacionadas. Esse número é determinado pela função de auto-correlação da energia,

$$C(n) = \frac{\langle \delta U_i \delta U_{i+n} \rangle}{\langle \delta U^2 \rangle}, \quad (2.1.22)$$

onde U_i é a energia da configuração i e U_{i+n} é a energia da configuração gerada após n ciclos de *MC*. Para processos de Markov, é conhecido que $C(n)$ tem a forma de decaimento exponencial, na verdade no caso das simulações de *MC*, a função de auto-correlação da energia tem a forma [Coutinho *et al.*, 2008]:

$$C(n) = \sum_i c_i e^{-n/\tau_i}. \quad (2.1.23)$$

Quando $n = 0$, $C(n) = 1$, temos configurações 100 % correlacionadas estatisticamente e quando $n \rightarrow \infty$, as configurações estão completamente descorrelacionadas. Como uma simulação tem um número finito de ciclos, duas configurações são consideradas descorrelacionadas quando $C(n) \leq 0.15$. Um exemplo da função $C(n)$ para um líquido pode ser visto na Figura 2.7, nessa função, num intervalo de 600 configurações (calculadas através da Eq. 2.1.23 ajustada aos dados da Figura 2.7), a correlação entre elas é de 12 %. Por tanto, para os cálculos quânticos, apenas configurações separadas de 600 ciclos de *MC* serão utilizadas. Numa simulação relativamente longa, de 120 000 ciclos, apenas 200 configurações serão utilizadas para os cálculos quânticos.

Maiores detalhes podem ser encontrados nas seguintes referências: [Coutinho, 1997; Georg *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2008] e suas referências.

Figura 2.7: Função de auto-correlação da energia para uma simulação de Prodan em ciclohexano.

2.1.3b Configuração Eletrostática Média

O método colocado na Seção 2.1.3a possibilita que diferentes tipos de sistemas sejam estudados, mas no final ainda são necessários aproximadamente 100 cálculos quântico para se obter o valor convergido de uma propriedade. Esse número, ainda grande, de cálculos quânticos, restringe tanto o tamanho do sistema como a metodologia quântica a ser utilizada, pois cada um desses cálculos quânticos pode demorar muito e para se obter a média convergida pode levar alguns meses.

Existem duas propostas para resolver esse problema. Em sistemas onde a interação mais importante é a interação eletrostática e as moléculas do solvente podem ser incluídas como cargas pontuais ao redor do soluto e não explicitamente: o *ASEP* (*Average Solvent Electrostatic Potential*) [Sanchez *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2002] e o *ASEC* (*Average Solvent Electrostatic Configuration*) [Coutinho *et al.*, 2007], a segunda baseada na primeira. O *ASEP* gera um potencial eletrostático baseado nas configurações da simulação. Uma implementação mais simples foi proposta com o *ASEC* e foi o método que utilizamos nesta tese para os cálculos de momento de dipolo.

O *ASEC* consiste em usar as configurações estatisticamente descorrelacionadas e gerar apenas uma configuração eletrostática média para o cálculo quântico. Isso é feito através da

superposição de n configurações, com o soluto fixo. As coordenadas de todas as m moléculas de solvente dentro de um raio de corte são superpostas e as moléculas do solvente são consideradas como cargas pontuais. Com essa superposição é necessário escalar as cargas pontuais por $1/n$ para que o potencial eletrostático não seja aumentado e apenas a estatística das diferentes posições seja levada em conta. No final, temos uma configuração com o soluto rodeado por $n \times m$ moléculas do solvente, como cargas pontuais, multiplicadas por $1/n$ (Figura 2.8).

Figura 2.8: Exemplo de uma configuração ASEC usada para realizar cálculos quânticos. A região azul são as cargas pontuais superpostas de todas as moléculas do solvente de todas as configurações decorrelacionadas superpostas.

2.1.3c Método Iterativo para Polarização do Solute

Como colocado na Seção 2.1.3a, ao se realizar simulações utilizando o *QM/MM* sequencial, a simulação clássica é desacoplada do cálculo quântico, por serem feitos separadamente. A desvantagem é a impossibilidade de considerar a redistribuição eletrônica do soluto devido ao solvente. Para reduzir ou eliminar esse problema, recentemente foi desenvolvido um procedimento para descrever a polarização de uma molécula em solução. Nesse procedimento, a metodologia *S-QM/MM* é aplicada iterativamente para calcular o momento de dipolo ou a distribuição de cargas atômicas de uma molécula de soluto na presença do solvente [Georg *et al.*, 2006].

No primeiro passo desse processo, as cargas do soluto isolado são calculadas usando o método quântico desejado e essa será a distribuição eletrônica da fase gasosa. Com essa distribuição para o soluto, realiza-se uma simulação de Mecânica Molecular (com *MC* ou

MD), usando moléculas explícitas para o soluto e solvente. Como descrito na Seção 2.1.3a, configurações estatisticamente descorrelacionadas do solvente ao redor do soluto são selecionadas para calcular o momento de dipolo médio. Após selecionar as configurações relevantes, existem duas maneiras de se obter o momento de dipolo. Na primeira, o dipolo é calculado em cada configuração e depois a média é calculada. Na segunda, as configurações são usadas para gerar uma configuração *ASEC* e o cálculo do dipolo é feito apenas uma vez na configuração *ASEC* (Seção 2.1.3b). A idéia desse passo é que o soluto irá responder ao potencial produzido pelo solvente, levando a uma nova redistribuição de carga e conseqüentemente a um novo momento de dipolo. Desse passo temos novas cargas atômicas para o soluto, agora calculadas na presença do solvente.

Essas novas cargas atômicas são utilizadas para uma nova simulação de Mecânica Molecular, na qual as moléculas de solvente vão se reorganizar, de acordo com o novo potencial eletrostático do soluto. Esse processo é realizado até a convergência do momento de dipolo, indicando que tanto soluto como solvente já estão em uma configuração de equilíbrio, em relação ao potencial eletrostático. Uma ilustração do processo pode ser vista na Figura 2.9. Outras referências: [Georg *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2008].

Figura 2.9: Esquema do processo de polarização para um soluto em meio a solvente explícito.

2.2 Metodologias Experimentais

2.2.1 Absorção Eletrônica

O processo de absorção eletrônica, no visível e ultravioleta próximo, é a excitação de um elétron da molécula para um nível de energia mais alto, ainda dentro da molécula. As

bandas, na região do visível e ultravioleta próximo, estão relacionadas com as frequências eletrônicas das moléculas.

Um exemplo de interação da luz com a matéria pode ser visto na Figura 2.10. Por simplicidade, consideramos apenas uma molécula diatômica, AB . A abscissa representa a separação entre os dois átomos, com o átomo A colocado na origem. A ordenada representa a energia potencial. No seu estado fundamental, ou estado de menor energia, a molécula AB é representada pelos pontos colocados como A e B na abscissa, onde o átomo A é considerado parado e o átomo B pode estar oscilando dentro da curva de potencial. As linhas horizontais dentro da curva de potencial indicam diferentes níveis vibracionais. No estado fundamental essa molécula está confinada aos níveis mais baixos da curva de potencial preta colocada na Figura 2.10. Para o caso de uma molécula poliatômica, essa curva passa a ser uma superfície, pois todas as coordenadas moleculares precisam ser consideradas.

Uma molécula excitada eletronicamente é uma molécula na qual um elétron foi levado para um nível de maior energia. Tal molécula tem a sua própria curva de energia potencial característica (curva vermelha, Figura 2.10). A diferença entre os mínimos de cada uma dessas curvas é da ordem de 50 - 150 kcal. O mínimo da curva vermelha também é mais afastado da ordenada, indicando que a ligação $A-B$ é quase sempre enfraquecida e por isso um pouco mais longa na molécula excitada.

Em temperatura ambiente, a maioria das moléculas, em uma substância, estará no estado de mais baixa energia eletrônico e vibracional, ou seja, na linha horizontal de menor energia da curva preta da Figura 2.10. O tempo que essa molécula leva para absorver a luz é $\sim 10^{-15}$ s. Nesse tempo, a distância $A-B$ não muda, pois o tempo das vibrações moleculares é maior ($10^{-10} - 10^{-12}$ s) e por isso a absorção é representada por uma linha vertical na Figura 2.10, sem mudança na posição atômica. Isso produz um estado excitado fora do equilíbrio, que começa a vibrar até atingir o mínimo de energia da curva vermelha na Figura 2.10. A molécula pode ficar alguns nanosegundos nesse estado excitado e depois ela pode emitir um fóton quando o elétron volta para o seu estado fundamental. Essa observação é a base do princípio de Franck-Condon [Franck, 1926; Condon, 1928] que diz: uma transição eletrônica é mais provável de acontecer sem a alteração nas posições dos núcleos da molécula e em seu ambiente. O estado resultante, ainda não relaxado, é chamado de estado de Franck-Condon e a transição é vertical. A emissão ocorre no mesmo tempo da absorção e também é vertical. Para mais detalhes consultar as referências [Bowen *et al.*, 1953; Valeur, 2001; Atkins *et al.*, 2005].

Figura 2.10: Curvas de energia potencial para uma molécula diatômica de átomos A e B. Linha preta é o estado fundamental e a linha vermelha é o estado excitado.

2.2.1a Tipos de transições eletrônicas em moléculas

Como colocado na Seção 2.2.1, uma transição eletrônica é quando um elétron sai de um orbital molecular do estado fundamental para um orbital molecular desocupado através da absorção de um fóton. Em sistemas moleculares, os elétrons estão localizados nos orbitais moleculares. Um orbital σ pode ser formado por dois orbitais atômicos do tipo s , ou um do tipo s e um do tipo p , ou ainda por dois do tipo p tendo um eixo de simetria colinear. Uma ligação formada por átomos com elétrons em um desses orbitais atômicos é chamada de ligação σ . Um orbital π é formado por dois orbitais p sobrepostos lateralmente e a ligação resultante é chamada de ligação π . A absorção de um fóton de energia adequada pode levar um elétron no orbital π para um orbital desocupado chamado de π^* e essa transição é chamada de $\pi \rightarrow \pi^*$. Em geral, para retirar o elétron do orbital σ é necessária uma energia muito maior, resultando numa absorção no ultravioleta distante.

Uma molécula também pode conter elétrons não ligados localizados em átomos como oxigênio e nitrogênio. Os orbitais moleculares formados por esses elétrons são chamados de orbitais n . Retirar um elétron desse orbital também é possível pela absorção de um fóton e a transição é chamada de transição $n \rightarrow \pi^*$. A energia dessas transições eletrônicas é geralmente dada na seguinte ordem: $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$. Uma ilustração dessas transições pode ser vista na Figura 2.11 para a molécula de formaldeído.

Figura 2.11: Ilustração dos níveis eletrônicos dos orbitais moleculares na molécula de formaldeído. (HOMO = orbital mais alto ocupado, LUMO = orbital mais baixo desocupado). Adaptada de [Valeur, 2001]

Em espectroscopia de absorção e fluorescência, dois tipos de orbitais são importantes: o mais alto ocupado, *HOMO* (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e o mais baixo desocupado, *LUMO* (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Na Figura 2.11, o *HOMO* é um orbital *n* e o *LUMO* é um orbital π^* . Quando um dos dois elétrons de spin opostos de um orbital molecular é excitado para um orbital molecular de maior energia e o seu spin não muda de orientação, essa transição é chamada de transição singleto-singleto. Para mais detalhes consultar [Valeur, 2001; Atkins *et al.*, 2005].

2.2.1b Interpretação Quântica

De acordo com a mecânica quântica, o elétron em um átomo deve estar em estados definidos, cada um com uma energia definida. Então, um elétron no estado *a* tem uma energia E_a . Quando o elétron passa de um estado *a* para um estado *b*, ele absorve (ou emite) a energia $E_b - E_a$, correspondendo à absorção ou emissão da luz com a frequência:

$$\nu_{ab} = \frac{E_b - E_a}{h} \quad (2.2.1)$$

onde *h* é a constante de Planck.

Então mostra-se que a taxa de transição na qual um elétron passa de um estado *b* para um estado *a* é dada por:

$$\frac{dP_b}{dt} = B_{ab} I(\nu) \quad (2.2.2)$$

onde P_b é a função densidade de probabilidade de encontrar o elétron no estado b , $I(\nu)$ é a intensidade da luz incidente na frequência ν e B_{ab} é dado por:

$$B_{ab} = \left(\frac{2}{3}\right) \left(\frac{\pi}{\hbar^2}\right) \left| \langle \Psi_b | \vec{\mu} | \Psi_a \rangle \right|^2 \quad (2.2.3)$$

onde $\Psi(r)$ é a função de onda do estado a ou b e $\langle \Psi_b | \vec{\mu} | \Psi_a \rangle = \int d^3r \Psi_b(r) \vec{\mu}(r) \Psi_a(r)$. A integral colocada acima é chamada de momento de dipolo de transição e ela mede a extensão com a qual o elétron no estado a é polarizado pela luz incidente de tal modo que a sua distribuição espacial seja similar a distribuição do estado b .

A taxa na qual a energia é removida da luz incidente depende do número de transições estimuladas de absorção de $a \rightarrow b$, do número de transições estimuladas de emissão de $b \rightarrow a$ e da energia por transição, $E_b - E_a = h\nu$ e é dada por,

$$-\frac{dI(\nu)}{dt} = h\nu (N_a B_{ab} - N_b B_{ba}) I(\nu) \quad , \quad (2.2.4)$$

onde N_a e N_b são o número de moléculas por cm^3 nos estados a e b , respectivamente. Então, a absorção de luz depende da concentração através dos fatores N_a e N_b . Essa taxa também é chamada de taxa de absorção de luz. As quantidades B_{ab} e B_{ba} são chamadas de coeficientes de Einstein para a absorção e emissão estimulada, respectivamente. Mais detalhes podem ser encontrados nas referências [Cantor *et al.*, 1980; Bransden *et al.*, 1996].

2.2.1c Lei de Lambert-Beer

Experimentalmente, a luz absorvida por uma molécula é medida através de medidas de absorbância, $A(\lambda)$, ou transmitância, $T(\lambda)$, em função do comprimento de onda da luz incidente. Essas grandezas são definidas como:

$$A(\lambda) = \log \left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda} \right) = -\log T(\lambda) \quad , \quad (2.2.5)$$

$$T(\lambda) = \frac{I_\lambda}{I_\lambda^0}$$

onde I_λ^0 é intensidade do feixe de luz incidente e I_λ é a intensidade do feixe de luz depois de atravessar a amostra.

É possível relacionar a absorbância com a concentração da amostra e o caminho percorrido pela luz dentro da mesma. Considerando uma parte da amostra suficientemente fina (dl) e perpendicular à direção de propagação da luz, a fração da luz absorvida ($-dl/I$) deve ser apenas proporcional às características e ao número de moléculas absorvedoras. A equação que resulta é dada por:

$$-\frac{dI}{I} = \varepsilon' C dl, \quad (2.2.6)$$

onde ε' é uma constante de proporcionalidade chamada de coeficiente de absorção molar, que depende apenas da molécula absorvedora e C é a concentração dessas moléculas na amostra. A constante ε' é independente da concentração para um conjunto de moléculas não-interagentes e contém a dependência com a frequência do espectro de absorção. Integrando a Eq. 2.2.6 para toda a extensão da amostra (o lado direito de 0 a l e o lado esquerdo de I_λ^0 até I_λ) temos:

$$\ln\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right) = \varepsilon' Cl, \quad (2.2.7)$$

convertendo para o logaritmo na base 10, temos a forma conhecida da Lei de Lambert-Beer, onde $\varepsilon = \varepsilon' / 2.303$:

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right) = \varepsilon Cl, \quad (2.2.8)$$

onde ε é novamente o coeficiente de absorção molar (normalmente dado em $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), C é a concentração (em mol.L^{-1}) de espécies absorvedoras e l (em cm) é o caminho ótico por onde a luz foi absorvida, ou seja, a espessura da amostra absorvedora. Tanto a absorbância, como o coeficiente de absorção molar são grandezas dependentes do comprimento de onda da luz incidente e normalmente são medidas como função do mesmo. Quando uma amostra não obedece a lei de Lambert-Beer, pode ser um indicativo de formação de agregados ou presença de uma outra espécie absorvedora.

A lei de Lambert-Beer é uma lei empírica e suas deduções podem ser encontradas nas seguintes referências: [Cantor *et al.*, 1980; Klessinger *et al.*, 1995; Valeur, 2001].

2.2.1d Força do Oscilador

O coeficiente de absorção molar, ε , definido pela Eq. 2.2.8, é um parâmetro que depende apenas das características específicas da molécula absorvedora, em um determinado ambiente. Para relacionar esse parâmetro medido empiricamente com as propriedades moleculares colocadas na Seção 2.2.1b, vamos usar a Eq. 2.2.4. Para a maioria das amostras, o número de moléculas excitadas N_b é desprezível. Então, para uma solução de 1 molar de moléculas absorvedoras, a taxa de energia retirada da luz por cm^3 da amostra é:

$$-\frac{dI(\nu)}{dt} = \left(\frac{h\nu N_0 B_{ab}}{1000}\right) I(\nu), \quad (2.2.9)$$

onde ν é a frequência usada para excitar a amostra, N_0 é o número de Avogadro e o fator 1000 aparece da transformação de 1 molar (1 mol/litro) em número de moléculas por cm^3 . Como a luz está se deslocando com velocidade c , o tempo para se deslocar dl é dado por $dt = dl/c$, colocando isso na Eq. 2.2.9, temos que a perda de energia numa distância dl é dada por:

$$-dI(\nu) = \left(\frac{h\nu N_0 B_{ab}}{1000c} \right) I(\nu) dl. \quad (2.2.10)$$

Comparando a Eq. 2.2.10 com a Eq. 2.2.6 para a concentração de 1 molar, temos que:

$$B_{ab} = \left(\frac{1000c}{N_0 h} \right) \int \left(\frac{\varepsilon'}{\nu} \right) d\nu, \quad (2.2.11)$$

onde a integração sobre ν é necessária, pois o espectro experimental foi medido em função de uma banda de frequências e B_{ab} foi deduzido para dois estados separados por uma única frequência ν [Birks, 1970].

Sabendo o valor de B_{ab} , podemos calcular o valor de $|\langle \Psi_b | \vec{\mu} | \Psi_a \rangle|^2$, usando a Eq. 2.2.3.

Essa grandeza é chamada de força de dipolo (D_{ab}) e é dada por

$$D_{ab} \equiv |\langle \Psi_b | \vec{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 = 9.180 \times 10^{-3} \int \left(\frac{\varepsilon'}{\nu} \right) d\nu, \quad (2.2.12)$$

onde $\varepsilon = \varepsilon' / 2.303$ e a unidade de D_{ab} é Debye.

Outra grandeza importante é a força de oscilador, f_{ab} . Na teoria clássica para a luz, a força do oscilador é definida como uma quantidade que mede a intensidade ou a probabilidade de uma transição eletrônica que é induzida pela interação de elétrons com o campo eletromagnético da onda de luz. Essa grandeza compara a intensidade da absorção com a intensidade esperada para um oscilador harmônico em três dimensões e é dada por:

$$f_{ab} = \left(\frac{8\pi^2 mc}{3h\nu} \right) |\langle \Psi_b | \vec{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 = 4.315 \times 10^{-9} \int \varepsilon(\nu) d\nu, \quad (2.2.13)$$

a força do oscilador é adimensional.

O texto acima foi baseado nas seguintes referências: [Birks, 1970; Cantor *et al.*, 1980; Hilborn, 1982]

2.2.1e Efeito do Solvente no Espectro de Absorção

Os efeitos do solvente no espectro de absorção eletrônica, na região do ultravioleta e visível (*UV/Vis*), são primeiramente dependentes do cromóforo e da natureza das suas transições eletrônicas. Para entender a natureza das transições eletrônicas é necessário entender quais são os níveis de energia que compõe essas moléculas.

Uma interpretação qualitativa do solvatocromismo (Ver Seção 1.3) é possível se considerarmos as seguintes características da molécula [Bayliss *et al.*, 1954]:

- a. o momento de dipolo de transição entre o estado fundamental e o estado excitado,
- b. a diferença entre o dipolo permanente desses dois estados,
- c. a mudança do dipolo do estado fundamental induzida pelo solvente,
- d. o princípio de Franck-Condon.

De acordo com [Bayliss *et al.*, 1954; Brady *et al.*, 1985; Brunschwig *et al.*, 1987], quatro casos podem ser separados, considerando as características colocadas acima :

- a. Solute apolar em solvente apolar: somente a interação de Van der Waals contribui para a solvatação do soluto. Essas forças causam um pequeno deslocamento para o vermelho e a amplitude desse deslocamento é uma função do índice de refração do solvente [Bayliss *et al.*, 1954; Mcrae, 1957].
- b. Solute apolar em solvente polar: na ausência do momento de dipolo do soluto, não ocorre nenhuma orientação significativa do solvente ao redor do soluto. E novamente um deslocamento para o vermelho dependente do índice de refração é esperado, pois somente as interações de van der Waals estão presente [Ghoneim *et al.*, 1995].
- c. Solute polar em solvente apolar: nesse caso as interações que contribuem para a solvatação são dipolo-dipolo induzido e as interações de van der Waals. O deslocamento para o vermelho ou para o azul depende se o momento de dipolo do soluto aumenta ou diminui durante a transição eletrônica. E o deslocamento também vai depender da amplitude da mudança do momento de dipolo e do índice de refração do solvente.
- d. Solute polar em solvente polar: a solvatação do soluto, nesse caso, depende muito da interação dipolo-dipolo. Existe ao redor do soluto um conjunto de moléculas orientadas de acordo com o seu dipolo, levando a uma estabilização do estado fundamental. Se o momento de dipolo do soluto aumenta durante a transição eletrônica, $\mu_G < \mu_E$ (μ_G é o momento de dipolo do estado fundamental e μ_E é o momento de dipolo do estado excitado), isso leva a uma maior estabilização do estado excitado. E com isso a diferença de energia diminui, levando a um deslocamento para o vermelho. Quando o momento de dipolo diminui com a transição eletrônica ($\mu_G > \mu_E$), temos o efeito contrário e o deslocamento para o azul acontece (Figura 2.12).

Para compostos onde o solvatocromismo é muito intenso, os deslocamentos dos espectros não podem ser explicados pela análise qualitativa colocada acima, pois muitas vezes a molécula sofre uma grande alteração no seu momento de dipolo devido à presença do solvente, que pode levar a alterações estruturais e isso não está sendo considerado [Reichardt, 2004] (Ver também Seção 2.1.3c).

Cálculos quantitativos para dependência do espectro de absorção com o solvente, baseados em diferentes modelos foram feitos por diversos autores. Um desses cálculos está colocado na referência [Reichardt, 2004], e outros estão citados nessa mesma referência.

Figura 2.12: Ilustração da dependência do solvatocromismo com a variação dos níveis de energia do estado fundamental e excitado vertical.

2.2.2 Fluorescência Estática

O fenômeno de luminescência é dividido em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. No estado excitado singlete, o elétron excitado está com spin oposto a um segundo elétron que está no estado fundamental. Conseqüentemente, retornar ao estado fundamental é muito rápido e pode ocorrer com a

emissão de um fóton. As taxas de emissão da fluorescência são da ordem de 10^8 s^{-1} , sendo o tempo de vida do estado excitado da ordem de 1 - 10 ns.

Fosforescência é emissão de luz do estado excitado tripleto, no qual o elétron excitado tem a mesma orientação de spin que o elétron do estado fundamental. As transições para o estado fundamental são proibidas e as taxas de emissão são muito lentas ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$), então o tempo de vida da fosforescência é da ordem de milisegundos a segundos.

A fluorescência e a fosforescência são apenas dois dos processos pelos quais uma molécula pode voltar ao estado fundamental. O diagrama de Perrin-Jablonski é uma maneira de visualizar esses processos. Esse diagrama está colocado na Figura 2.13, onde os estados eletrônicos singletos são chamados de S_0 (estado fundamental eletrônico), S_1 , S_2 ,... e os estados tripletos são chamados de T_1 , T_2 ... Níveis vibracionais foram associados a cada estado eletrônico (linhas mais finas).

Observando o diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 2.13) e também diversos dados experimentais foi possível formular algumas regras gerais para o espectro de emissão fluorescente:

- a. O espectro de uma substância pura, existindo em uma solução de uma forma única, é invariante com o comprimento de onda de excitação. Isso se deve ao fato que ao ser excitado para níveis de energia mais altos que o S_1 , a molécula sofre uma rápida termalização e a emissão sempre ocorre do estado vibracional de menor energia de S_1 (existem exceções a essa regra, mas são raras, uma delas pode ser encontrada em [Liu, 2002]).
- b. O espectro de emissão fluorescente está sempre em comprimentos de onda maiores do que a absorção eletrônica, ou seja, em energias menores, considerando a absorção de um único fóton. Essa regra é chamada de Regra de Stokes [Stokes, 1852] e ela acontece porque a molécula sempre perde energia no estado excitado devido à relaxação vibracional, *IC (Internal Conversion)*, mesmo sem considerar a interação com o solvente, a molécula isolada. O intervalo, em energia, entre o máximo da banda de absorção de menor energia e o máximo do espectro de emissão é chamado de deslocamento de Stokes.
- c. O espectro de emissão fluorescente é, em boa aproximação, uma imagem espelhada da banda de absorção de menor energia, quando os dois são graficados em função da energia ou número de onda. Essa regra aparece porque, em geral, as diferenças de energia entre os níveis vibracionais no estado fundamental e excitado são similares.

Figura 2.13: Diagrama de Perrin-Jablonski, esquematizando as transições entre o estado fundamental e o estado excitado. IC (Internal Conversion) significa conversão interna e ISC (InterSystem Crossing) significa cruzamento entre sistemas. Adaptada de [Valeur, 2001].

2.2.2a Efeito do Solvente no Espectro de Emissão

O deslocamento de Stokes é observado para todas as moléculas fluorescentes em vácuo ou em solução. Porém, outros efeitos podem intensificar o deslocamento de Stokes, sendo eles: o efeito do solvente, reações do estado excitado e transferência de energia. Aqui vamos analisar o efeito do solvente.

Os efeitos de solvente são complexos e não existe uma teoria simples que englobe todas as suas características. Deslocamentos dos espectros resultam de um efeito geral da polaridade do solvente, sendo que a energia do estado excitado diminui com o aumento da polaridade do solvente, se $\mu_G < \mu_E$, pois quanto mais polar o solvente, mais o estado excitado se estabiliza. Uma comparação entre o deslocamento de Stokes, em vácuo ou solventes de baixa polaridade, e a sua intensificação com o efeito de solventes de alta polaridade, pode ser vista na Figura 2.14.

Figura 2.14: Diagrama de Perrin-Jablonski adaptado para mostrar o efeito do solvente no espectro de emissão. Adaptada de [Lakowicz, 2006]

Quando estamos analisando a dependência da posição do espectro de emissão com o solvente, o tempo de relaxação do solvente (τ_R), ou seja, o tempo que o solvente leva para se reorientar ao redor do soluto após a absorção e o tempo que o soluto fica no estado excitado (τ_e) passam a ser importantes. No caso de $\tau_R \gg \tau_e$, a emissão ocorre antes que as moléculas do solvente tenham tempo de se organizar, com isso apenas o deslocamento de Stokes, devido à relaxação vibracional do soluto, é observado, sem nenhuma intensificação por parte do solvente. No caso de $\tau_R \ll \tau_e$, as moléculas do solvente ao redor do soluto têm tempo para se reorganizar e uma nova posição de equilíbrio é atingida e é dessa situação de equilíbrio que a emissão fluorescente ocorre, em temperatura ambiente. Em líquidos, o tempo de relaxação rotacional τ_R para as moléculas do solvente é da ordem de $10^{-10} - 10^{-12}$ s e o tempo de vida do estado excitado τ_e é da ordem de 10^{-9} s, em temperatura ambiente.

Uma explicação geral para os efeitos do solvente no espectro fluorescente é baseada na solvatação diferencial dos fluoróforos no estado fundamental e no estado excitado, mediada por várias forças intermoleculares específicas e não-específicas que atuam entre o soluto e o solvente [Reichardt, 2004]. Com isso vemos que a interpretação da dependência dos espectros de emissão com o solvente é um tópico muito complexo. Essa complexidade se deve a variedade de interações que podem levar a deslocamentos espectrais.

Uma descrição da dependência do espectro de emissão com o solvente é dada pela equação de Lippert-Mataga (Eq. 2.2.26) [Lippert, 1955; Mataga *et al.*, 1956], que descreve o deslocamento de Stokes através da variação do momento dipolar do soluto e de características

do solvente, como constante dielétrica (ϵ) e índice de refração (n). As interações específicas entre soluto e solvente normalmente aparecem como desvios da equação de Lippert-Mataga.

Apesar da descrição geral do solvente não incluir as interações específicas, essa teoria fornece uma boa base para o estudo dos deslocamentos espectrais. Nessa teoria, supõe-se que o soluto é um dipolo num meio homogêneo e de constante dielétrica uniforme (Figura 2.15).

Figura 2.15: Dipolo elétrico em um meio dielétrico. Adaptada de [Lakowicz, 2006].

As interações entre o solvente e o fluoróforo afetam a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Numa primeira aproximação, essa diferença de energia é uma propriedade do índice de refração (n) e da constante dielétrica (ϵ). O índice de refração depende da movimentação rápida dos elétrons nas moléculas do solvente, que ocorre rápido e pode acontecer durante a absorção da luz. A constante dielétrica é uma propriedade estática, que depende da movimentação eletrônica e molecular do solvente.

Para deduzir a equação de Lippert-Mataga é necessário definir a energia de um dipolo num meio dielétrico homogêneo, sendo esta dada por:

$$E_{\text{dipolo}} = -\mu R \quad (2.2.14)$$

onde R é o campo induzido pelo dipolo no meio [Onsager, 1936]. Esse campo é paralelo e oposto a direção do dipolo e proporcional ao módulo do momento dipolar,

$$R = \frac{2\mu}{a^3} f \quad (2.2.15)$$

nessa equação, f é a polarizabilidade do solvente e a é o raio da cavidade do fluoróforo. A polarizabilidade do solvente é um resultado da movimentação dos seus elétrons e da movimentação dos momentos dipolares das moléculas do mesmo, através da movimentação dos átomos. Cada uma dessas componentes tem um tempo de vida diferente, sendo que o primeiro é muito rápido e depende do índice de refração, dando origem à polarizabilidade de alta frequência $f(n)$,

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}. \quad (2.2.16)$$

A orientação dos momentos dipolares ocorre com um tempo maior e depende da constante dielétrica, sendo calculada através da polarizabilidade de baixa frequência $f(\varepsilon)$, dada por:

$$f(\varepsilon) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} . \quad (2.2.17)$$

A diferença entre as Eqs. 2.2.17 e 2.2.16 fornece

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2.2.18)$$

onde Δf é chamado de polarizabilidade de orientação.

A interação fluoróforo – solvente pode ser descrita pelos momentos dipolares no estado fundamental (μ_G) e no estado excitado (μ_E) e os campos induzidos. Esses campos podem ser divididos entre os causados pela movimentação eletrônica (R_{el}^G e R_{el}^E) e os campos devido à orientação molecular do solvente (R_{or}^G e R_{or}^E). Considerando o equilíbrio entre os momentos dipolares do estado fundamental e excitado esses campos são:

$$\begin{aligned} R_{el}^G &= \frac{2\mu_G}{a^3} f(n) & R_{el}^E &= \frac{2\mu_E}{a^3} f(n) \\ R_{or}^G &= \frac{2\mu_G}{a^3} \Delta f & R_{or}^E &= \frac{2\mu_E}{a^3} \Delta f \end{aligned} . \quad (2.2.19)$$

Analisando a Figura 2.16, podemos calcular a energia do estado fundamental e do estado excitado fora do equilíbrio:

$$E^E(abs) = E_v^E - \mu_E R_{or}^G - \mu_E R_{el}^E, \quad (2.2.20)$$

$$E^G(abs) = E_v^G - \mu_G R_{or}^G - \mu_G R_{el}^G, \quad (2.2.21)$$

onde E_v^G e E_v^E são as energias do fluoróforo sem o efeito do solvente. Usando a fórmula $\Delta E = h\nu$ e subtraindo a Eq. 2.2.21 da Eq. 2.2.20 temos,

$$h\nu_{ab} = h\nu_{ab}^v - (\mu_E - \mu_G) R_{or}^G - \mu_E R_{el}^E + \mu_G R_{el}^G, \quad (2.2.22)$$

onde o primeiro termo do lado direito é a diferença de energia sem o efeito do solvente. Analogamente, temos as mesmas considerações para a emissão:

$$E^E(em) = E_v^E - \mu_E R_{or}^E - \mu_E R_{el}^E, \quad (2.2.23)$$

$$E^G(em) = E_v^G - \mu_G R_{or}^E - \mu_G R_{el}^G. \quad (2.2.24)$$

Então a energia de emissão é dada por,

$$h\nu_{em} = h\nu_{em}^v - (\mu_E - \mu_G) R_{or}^E - \mu_E R_{el}^E + \mu_G R_{el}^G. \quad (2.2.25)$$

Figura 2.16: Efeitos dos campos de reação eletrônico e orientacional nas energias de um dipolo em um meio dielétrico, onde $\mu_G < \mu_E$. Os círculos menores representam as moléculas de solvente. O estado de Franck-Condon é o estado não relaxado. Adaptada de [Lakowicz, 2006].

Subtraindo a Eq. 2.2.22 da Eq. 2.2.25 e usando a Eq. 2.2.19, obtemos a equação de Lippert-Mataga:

$$\nu_{ab} - \nu_{em} = \frac{2\Delta f}{hca^3} (\mu_E - \mu_G)^2 + \text{constante.} \quad (2.2.26)$$

A sensibilidade de um fluoróforo a um solvente pode ser mostrada pelo gráfico da equação de Lippert-Mataga, onde se grafica a diferença $\nu_{ab} - \nu_{em}$ como função da polarizabilidade de orientação, Δf (Figura 2.17). Os fluoróforos com maior sensibilidade a polaridade do solvente são aqueles que têm as maiores alterações no momento dipolar depois da excitação. Com a equação de Lippert-Mataga, também é possível estimar um valor para a variação do momento dipolar entre o estado fundamental e o estado excitado, $\mu_E - \mu_G$. Essa análise é muito delicada e pode levar a diferentes valores da variação dipolar, como foi discutido na Seção 4.2.1b.

Para o Prodan, valores da literatura variam de 8.0 até 20.0 D [Weber *et al.*, 1979; Balter *et al.*, 1988; Catalan *et al.*, 1991; Samanta *et al.*, 2000], mostrando a grande dificuldade de análise desses dados.

Figura 2.17: Equação de Lippert-Mataga para a molécula de Prodan em diferentes solventes onde a equação é válida (■) e para alguns solventes onde ela não é válida (□). Os solventes são: 1 – ciclohexano, 2- benzeno, 3- trietilamina, 4 – clorobenzeno, 5 – clorofórmio, 6 – acetona, 7 – dimetilformamida, 8 – acetonitrila, 9 – etilenoglicol, 10 – propilenoglicol, 11 – etanol, 12 – metanol e 13 – água. Aos pontos que obedecem à equação, foi ajustada uma reta e o valor de $\mu_e - \mu_f$ foi estimado. Dados retirados de [Weber et al., 1979].

Os pontos que não obedecem a equação de Lippert-Mataga, mostram que para esses solventes, existe algo que não está sendo explicado por essa interpretação mais geral. Na interação desses solventes com o fluoróforo, provavelmente efeitos específicos estão acontecendo, como por exemplo, pontes de hidrogênio, mudança da estabilidade conformacional, interações de transferência de carga, agregação, entre outras interações possíveis. Os deslocamentos espectrais devido a essas interações específicas são consideravelmente grandes, e se não forem detectadas, podem limitar o estudo detalhado do espectro de emissão.

Interações específicas solvente-fluoróforo podem ocorrer tanto no estado fundamental como no estado excitado. Se essa interação só acontece no estado excitado, então esse fenômeno não altera o espectro de absorção. Se a interação acontece no estado fundamental, algumas mudanças no espectro de absorção podem ocorrer. A ausência de mudanças no espectro de absorção indicaria que uma interação no estado excitado está ocorrendo. [Lakowicz, 2006].

2.2.2b Anisotropia

Algumas amostras quando são excitadas com luz polarizada também emitem luz polarizada. O grau de polarização é descrito em termos da anisotropia, r . As amostras com anisotropia diferente de zero são interpretadas como tendo uma emissão polarizada. Em soluções homogêneas, os fluoróforos no estado fundamental estão espalhados randomicamente. Quando expostos à luz polarizada, os fluoróforos, que têm seus momentos de transição de absorção orientados na mesma direção do vetor campo elétrico da luz incidente, são preferencialmente excitados. Com isso, a população no estado excitado não está randomicamente orientada, mas temos um grande número de moléculas excitadas que possuem os seus momentos de transição na mesma direção do vetor campo elétrico da luz incidente. A despolarização da luz emitida pode ser causada por um grande número de fenômenos, onde a difusão rotacional pode ser um fator comum.

As medidas de anisotropia revelam uma média da movimentação angular da sonda que ocorre entre a absorção e a emissão. Essa movimentação angular é dependente da taxa e da extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. A difusão rotacional depende da viscosidade do solvente e também de propriedades intrínsecas da molécula como tamanho e forma. Para fluoróforos pequenos em solução de baixa viscosidade, a taxa de difusão rotacional é mais rápida que a taxa de emissão, nessas condições a emissão é despolarizada e a anisotropia é aproximadamente 0.

Uma medida de anisotropia é ilustrada na Figura 2.18. A amostra é excitada com a luz verticalmente polarizada (o vetor campo elétrico da luz de excitação é colocado verticalmente, paralelo ao eixo z). São medidas as intensidades de emissão através de um polarizador de duas maneiras, com o polarizador paralelo e perpendicular a direção de polarização da luz incidente, chamadas de $I_{//}$ e $I_{\perp}$, respectivamente. Esses valores são usados para calcular a anisotropia, dada por:

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}. \quad (2.2.27)$$

O valor calculado na Eq. 2.2.27 é adimensional e independente da intensidade total da amostra, pois a diferença $I_{//} - I_{\perp}$ é normalizada pela intensidade total, dada por $I_{//} + 2I_{\perp}$.

Figura 2.18: Exemplo de uma configuração para realização de medidas de anisotropia de fluorescência. Adaptada de [Valeur, 2001].

Se analisarmos alguns casos extremos para a anisotropia, teremos que, se a luz observada através de um polarizador de emissão é totalmente polarizada, então $I_{\perp} = 0$ e $r = 1.0$. Agora, se a emissão é completamente despolarizada, nesse caso $I_{\parallel} = I_{\perp}$ e $r = 0$. Esses valores dificilmente são observados devido a fatores como a dependência angular na foto-seleção, entre outros. Mais detalhes podem ser encontrados no Apêndice B e também nas referências: [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006].

2.2.3 Fluorescência Temporal

O tempo de vida do estado excitado pode ser medido utilizando a chamada fluorescência temporal. O tempo de vida do estado excitado determina o tempo que a molécula fica no estado excitado e com isso o tempo disponível para o fluoróforo interagir ou se movimentar nesse estado. Outra quantidade importante para as moléculas fluorescentes é o chamado rendimento quântico. Substâncias com um alto rendimento quântico têm uma emissão muito intensa. O significado dessas duas grandezas é representado por um diagrama de Perrin-Jablonski simplificado, como colocado Figura 2.19. Nesse diagrama estão representados apenas os processos para se retornar de S_1 para S_0 . Dois processos de retorno estão representados, a taxa de emissão radioativa do fluoróforo (a fluorescência), k_r , e a taxa de emissão não radioativa (representa todos os processos que causam a desexcitação sem emissão de um fóton), k_{nr} .

O rendimento quântico fluorescente é dado pela razão do número de fótons emitidos, k_r , pelo número total de fótons absorvidos. O total de fótons absorvidos é dado pela soma de todos os decaimentos do estado excitado, $k_r + k_{nr}$, então,

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}. \quad (2.2.28)$$

O rendimento quântico pode ser muito próximo de 1 se $k_{nr} \ll k_r$, mas ele raramente será 1 devido às taxas de relaxação que estão representadas pelo valor de k_{nr} .

O tempo de vida do estado excitado é definido como inverso das taxas de decaimento do estado excitado, dada por:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}. \quad (2.2.29)$$

Esse tempo de vida é interpretado como o tempo médio que a molécula fica no estado excitado antes de voltar para o estado fundamental. Normalmente, os tempos de vida de fluorescência são da ordem de 10^{-9} s.

Figura 2.19: Diagrama de Perrin-Jablonski simplificado para exemplificar o rendimento quântico e o tempo de vida. Adaptada de [Lakowicz, 2006].

A emissão fluorescente é um processo randômico e poucas moléculas emitem os seus fótons com um tempo exatamente igual a τ . O tempo de vida é um valor médio do tempo gasto no estado excitado. Para decaimentos que obedecem a uma exponencial simples, onde a intensidade de fluorescência é dada por:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}, \quad (2.2.30)$$

63 % das moléculas decaem antes de $t = \tau$ e 37 % decaem depois [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006].

As medidas de tempo de vida do estado excitado podem ser feitas através de duas técnicas diferentes, sendo elas, a contagem de um único fóton por correlação temporal, *TCSPC* (*Time Correlation Single Photon Counting*) ou por modulação de fase. Explicaremos a seguir o *TCSPC*, pois foi a técnica utilizada nesta tese de doutorado.

Nos experimentos usando *TCSPC*, é medido um decaimento fluorescente, onde a luz analisada é um pulso que começa intenso e depois rapidamente decai em intensidade, como mostrado na Figura 2.20.

O ponto no eixo x , onde o tempo é igual a zero, indica o momento no qual a amostra foi bombardeada com o pulso de luz que a excitou e começou a emissão fluorescente. A escala de intensidade do eixo y é realmente o número de fótons contados em cada intervalo de tempo do eixo x . Conceitualmente, o processo é muito direto e ao final de um experimento, o dado coletado é uma curva de contagens *versus* tempo, como a mostrada Figura 2.20. Mas devido à escala de tempo envolvida (a escala toda do eixo x é usualmente da ordem de centenas de nanossegundos, com cada intervalo representando um nanossegundo ou menos), simplesmente contar e guardar os dados não é possível. A eletrônica do sistema não pode operar dessa maneira.

Figura 2.20: Esquema de um decaimento fluorescente medido com a técnica de *TCSPC*.

Para resolver esse problema foi criada a *TCSPC*. Essa técnica aborda a aquisição de dados de um ponto de vista diferente, dado por:

- a. Para um dado evento fluorescente, somente um fóton é detectado.
- b. Para esse fóton, mede-se a diferença temporal entre o momento em que o pulso de excitação chegou à amostra e o momento em que o fóton é emitido pela mesma.
- c. No intervalo de tempo correspondente a essa diferença se adiciona uma contagem, no eixo x .

Esses três passos são realizados repetidamente (literalmente milhões de vezes), excitando a amostra a cada passo do processo. Devido à natureza randômica da emissão de

fótons depois da excitação, a curva resultante desse processo irá realmente representar a intensidade *versus* tempo de decaimento, mostrada na Figura 2.20. Uma medida realizada em um equipamento *TCSPC* está colocada na Figura 2.21

Figura 2.21: Decaimento fluorescente do Prodan medido com a técnica de *TCSPC*. O eixo vertical está colocado em escala logarítmica.

A análise das curvas de decaimento, ou seja, retirar propriedades físicas dos dados medidos na amostra é um aspecto crucial da técnica de *TCSPC*. Nesse tipo de análise, assume-se uma teoria *á priori* para definir a verdadeira função da curva de decaimento e depois a sua validade é testada.

Na prática, a análise das curvas de decaimentos envolve:

- a. Remover distorções introduzidas pela duração finita do pulso de excitação e pela resposta do sistema de detecção.
- b. Fazer uma avaliação dos parâmetros.
- c. Testar se o modelo adotado é apropriado aos dados experimentais.

Os passos *a* e *b* são realizados simultaneamente usando a técnica de deconvolução, que é baseada na integral de convolução:

$$F(t) = \int_0^t I(t - t') D(t') dt' . \quad (2.2.31)$$

Essa equação relaciona a lei de decaimento assumida, $D(t')$, a emissão de fluorescência medida experimentalmente, $F(t)$ e a função de resposta do equipamento $I(t)$,

algumas vezes chamada de “perfil da lâmpada”, que é a resposta do equipamento no limite em que $t \rightarrow 0$.

A função de resposta do equipamento precisa ser conhecida para ser usada na análise dos decaimentos fluorescentes. Essa função é medida através da substituição da amostra por uma solução espalhadora e colocando o monocromador de emissão no comprimento de onda de excitação. A validade da análise por convolução requer que tanto $F(t)$ quanto $I(t)$ tenham sido medidos sob as mesmas condições experimentais.

Para muitos sistemas o decaimento fluorescente pode ser representado por uma soma de exponenciais, isto é,

$$D(t) = \sum_i B_i e^{-t/\tau_i} . \quad (2.2.32)$$

A lei de decaimento, $D(t)$, é usualmente chamada de função de resposta imediata porque ela representa a emissão que seria produzida por uma resposta do equipamento infinitamente curta ou por uma função delta de excitação. O método para comparar a função ajustada aos dados experimentais medidos é o Método dos Mínimos Quadrados.

Desses decaimentos também é possível avaliar a população de sonda que emite com cada um dos tempos de vida, quando temos mais de um tempo de vida. Essa avaliação é feita através da integral da função dada na Eq. 2.2.32, pois essa integral fornece a população total que está emitindo para contribuir com a curva. Fazendo a integral da Eq. 2.2.32, temos:

$$\begin{aligned} I &= \int_0^{+\infty} F(t) dt = \int_0^{+\infty} (B_1 e^{-t/\tau_1} + B_2 e^{-t/\tau_2} + B_3 e^{-t/\tau_3} + \dots) dt \\ I &= \left(-\frac{B_1}{1/\tau_1} e^{-t/\tau_1} - \frac{B_2}{1/\tau_2} e^{-t/\tau_2} - \frac{B_3}{1/\tau_3} e^{-t/\tau_3} + \dots \right)_0^{+\infty} \\ I &= B_1 \tau_1 + B_2 \tau_2 + B_3 \tau_3 + \dots \end{aligned} \quad (2.2.33)$$

A fração p_i de cada população é dada por:

$$p_i = \frac{B_i \tau_i}{\sum_{i=1}^N B_i \tau_i} \quad (2.2.34)$$

Para mais detalhes sobre a técnica de *TCSPC* verificar Apêndice B e referências [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006]. Uma descrição detalhada da análise dos dados de decaimento temporal está colocada no Apêndice C.

3

MATERIAIS E MÉTODOS

“Science is far from a perfect instrument of knowledge. It’s just the best we have”

C. Sagan

Neste capítulo foi descrito o preparo das amostras utilizadas para as medidas experimentais e bem como essas medidas foram realizadas. Também foram descritos como realizamos os cálculos quânticos e as simulações computacionais.

3.1 Materiais

As sondas fluorescentes Prodan (6-propionil-2-dimetilamino-naftaleno) e Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilamino-naftaleno) foram adquiridas da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Os lipídios DLPC (dilauroil-glicero-fosfocolina) e DPPC (dipalmitoil-glicero-fosfocolina) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, USA). O tampão Hepes (ácido de N-(2-Hidroxietil)-Piperazina-N'-2-etano sulfônico) e o quelante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) foram comprados da Sigma Chemical Co. e usados em pH ~ 7.4. Água Milli-Q Plus (Millipore) pH ~ 6.5 foi usada em todos os experimentos. As estruturas das moléculas usadas estão colocadas na Figura 3.1. Os solventes foram comprados da Sigma Chemical Co. com pureza espectroscópica.

3.1.1 Preparação da Dispersão Lipídica

Os lipídios utilizados nesta tese de doutorado foram comprados em pó, assim como as sondas fluorescentes. O pó lipídico foi pesado para se obter a massa desejada para o preparo de no mínimo 2 amostras de 1 ml, com concentração de 1 mM, em seguida foi dissolvido em um volume de clorofórmio correspondente. Essa solução foi agitada, para garantir sua homogeneidade. A sonda fluorescente, já dissolvida em uma solução de clorofórmio, era acrescentada, para que a concentração final em 1 ml fosse de 1 μ M, ou seja para cada 1 000 lipídios temos 1 sonda fluorescente. O clorofórmio foi evaporado com um fluxo contínuo de nitrogênio gasoso, com 99,999% de pureza, formando um filme na parede do tubo de ensaio. As amostras ficaram sob baixa pressão, no mínimo, por 2 horas, para que qualquer traço de solvente orgânico fosse removido. As amostras foram suspendidas em solução aquosa com 10 mM de Hepes mais 1 mM de EDTA, com pH = 7.4, por meio de agitação mecânica em um vórtex (~ 2 minutos numa temperatura acima da temperatura de transição de fase do lipídio). As concentrações usadas foram sempre de 1 mM de lipídio e 1 μ M de sonda, Laurdan ou Prodan. Após o filme dissolvido no tampão Hepes, essa amostra era extrusada em um equipamento da Avanti Polar Lipids, Inc., onde a solução foi passada 11 vezes por um filtro de 0.4 μ m, 11 vezes por um filtro de 0.2 μ m e 25 vezes por um filtro de 0.1 μ m. Isso foi feito para garantir uma maior homogeneidade no diâmetro das vesículas lipídicas e eliminar qualquer turbidez das amostras.

Figura 3.1: Moléculas utilizadas neste trabalho. As duas primeiras são as sondas fluorescentes e as duas seguintes são os fosfolipídios que compõem as bicamadas utilizadas.

3.1.2 Preparação da Solução de Sonda

Uma solução de sonda fluorescente em clorofórmio com concentração de 1.50 mM foi usada como estoque. Dessa solução foi retirado o volume necessário para se obter a concentração final desejada para as medidas. Esse volume foi secado sob forte fluxo de nitrogênio gasoso com 99,999% de pureza para que o clorofórmio fosse evaporado. As amostras ficaram sob baixa pressão por, no mínimo, 2 horas para que o clorofórmio fosse removido. Após a secagem, o solvente desejado era acrescentado, no volume determinado. Para as medidas onde houve variação da concentração da sonda, a solução inicial de 20 μ M de Prodan foi diluída com Água Milli-Q Plus ou ciclohexano, usando pequenos volumes para se obter as concentrações desejadas.

3.2 Métodos Experimentais

3.2.1 Absorção Eletrônica

As medidas de absorção foram realizadas em um espectrofotômetro *HP 8452* e/ou *Cary50*, onde a amostra foi colocada em uma cubeta de quartzo de caminho óptico 10 mm. Em todas as medidas realizadas foi utilizado um banho térmico, se não havia variação da temperatura, esta foi mantida a 25 °C. Em todas as medidas o espectro do sistema sem a sonda fluorescente foi subtraído da medida realizada com a sonda, para eliminar a influência do solvente e cubeta. Em algumas medidas, uma dependência do tipo $a\lambda^{-n}$ aparecia somada ao

espectro de absorção. Isso é o espalhamento da luz, onde a e n são constantes para um determinado sistema, em uma temperatura fixa. O método de análise utilizado foi colocado no Apêndice C.

3.2.2 Fluorescência Estática

Para as medidas de fluorescência estática, a amostra foi colocada em uma cubeta de quartzo, com caminho óptico de 2 mm. As medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro *Fluorolog 3 Jobin Yvon SPEX*, modelo FL3-11 ou em um espectrofluorímetro *Varian Cary Eclipse*. Em todas as medidas, a temperatura foi controlada com um banho térmico *Julabo HP 25*, no caso do primeiro equipamento e com um peltier no caso do segundo. Os espectros de emissão foram medidos com o comprimento de onda de excitação fixado em 340 nm. As medidas de anisotropia de fluorescência foram realizadas com os mesmos espectrofluorímetros citados acima, apenas polarizadores foram colocados no caminho do feixe incidente na amostra e no do feixe emitido.

3.2.3 Fluorescência Temporal

As medidas de fluorescência resolvidas no tempo foram realizadas em um fluorímetro temporal baseado no método de contagem de um único fóton, composto por uma fonte de excitação feita com um laser de titânio-safira *Tsunami 3950* da *SpectraPhysics*, bombeado por um laser de estado sólido *Millenia Pro* modelo J80 também da *Spectra Physics*. A taxa de repetição dos pulsos foi colocada em 80 kHz usando um selecionador de pulso *SpectraPhysics* 3980-25. O laser foi ajustado para fornecer uma saída de 990 nm e um cristal gerador de terceiro harmônico (GWN-23PL *SpectraPhysics*) gerava o pulso de excitação com 330 nm que foi direcionado para um espectrofotômetro da *Edinburgh FL900CDT*. A configuração em T do espectrofotômetro permitia a detecção da emissão num ângulo de 90° em relação à direção de excitação. O comprimento de onda de emissão foi selecionado por um monocromador e os fótons emitidos foram detectados por uma fotomultiplicadora (*Hamamatsu R3809U*) refrigerada. A largura a meia altura do pico de resposta do equipamento foi de 90 - 110 ps, com uma resolução temporal de 12 ps por canal. As medidas foram realizadas usando essa mesma resolução temporal. Um software fornecido pela *Edinburgh Instruments* foi usado para analisar as curvas de decaimento e a qualidade do ajuste foi julgada através dos gráficos de resíduos e do valor do χ^2 reduzido.

Além das análises individuais dos decaimentos, também foi realizada uma análise global dos mesmos. Essa análise global consiste em fornecer ao software já citado um

conjunto de decaimentos, determinar quais parâmetros devem ser conectados para todos os decaimentos, ou seja, quais parâmetros devem ser ajustados com o mesmo valor para todos os decaimentos. Nas medidas realizadas, os parâmetros conectados foram os tempos de vida. Com esses dados, o software ajusta uma curva exponencial para cada decaimento, mas com os mesmos tempos de vida para todos os decaimentos. Esses ajustes se diferenciam pelo termo pré-exponencial, pelo valor do χ^2 e pelo gráfico dos resíduos. Em todas as análises dos decaimentos temporais o pulso do laser foi considerado na análise, devido à sua influência na parte inicial do decaimento. O controle de temperatura usado foi um banho térmico *Julabo HP 25*.

3.2.4 Unidade dos Espectros Eletrônicos

Os espectros eletrônicos, de absorção e de emissão, estão apresentados em duas unidades diferentes, comprimento de onda, em nanômetros, e inverso de comprimento de onda, em cm^{-1} . Nas discussões dos dados, a segunda unidade foi chamada de energia, pois é diretamente proporcional a mesma. A escolha da unidade foi feita de acordo com a melhor visualização dos dados.

3.2.5 Reprodutibilidade dos Experimentos

Todos os experimentos foram feitos no mínimo três vezes. Os espectros de absorção e emissão mostrados são representativos dessas medidas. Valores médios e o desvio padrão são apresentados para grandezas como A_2/A , anisotropia e tempo de vida. Quando o desvio não estiver visível no gráfico, significa que o erro é menor que o ponto médio mostrado.

3.3 Métodos Teóricos

3.3.1 Cálculos Quânticos

Para otimização das geometrias moleculares foram usados os métodos: Hartree-Fock (*HF*), Funcional de Densidade com funcional híbrido *B3LYP*, com o conjunto de funções base *6-31G** e o método semi-empírico *AM1*. Como ponto inicial foi utilizada a geometria determinada por raio-x na referência [Ilich *et al.*, 1989]. Para a otimização de geometria e cálculos de energia foi utilizado o método *B3LYP* com a mesma base. E para os cálculos de dipolo foi utilizado o método *MP2* com a base *aug-cc-pVDZ*. Esses cálculos foram realizados utilizando o programa Gaussian03 [Frisch *et al.*, 2004]. Os cálculos das energias de transição

eletrônica foram feitos utilizando o Método de Interação de Configurações com excitações simples (*CIS*), com o método semi-empírico INDO, que possui parametrização espectroscópica como implementado no programa ZINDO [Zerner, 2000]. Para descrever os efeitos dos solventes foi utilizado o modelo contínuo polarizável (*PCM*) na otimização de geometria, cálculos de momento de dipolo e cargas atômicas como implementado no Gaussian03. Para alguns cálculos das propriedades eletrônicas das sondas foi utilizado o modelo *SCRF*, como implementado no programa ZINDO.

3.3.2 Simulações Computacionais

Na tentativa de descrever o solvente de forma mais realista que o modelo contínuo, também utilizamos neste trabalho o modelo discreto de solventes através das simulações computacionais. Nessas simulações utiliza-se um potencial empírico para interação molecular e determina-se configurações acessíveis ao sistema numa dada condição termodinâmica. Dessa forma, identifica-se a distribuição do solvente ao redor do soluto, as possíveis interações específicas (como por exemplo, as ligações de hidrogênio), a polarização do soluto devido ao meio, entre outras propriedades. Em particular, neste trabalho foi utilizado o Método Monte Carlo (*MC*) implementado no programa DICE [Coutinho *et al.*, 2003] com modelo de moléculas rígidas. Para obter o efeito do solvente sobre as propriedades eletrônicas do soluto, utilizamos o método híbrido sequencial de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (*S-QM/MM*) que vem sendo utilizado com bastante sucesso na descrição dos deslocamentos das bandas espectrais de moléculas como formaldeído [Canuto *et al.*, 2000], N-metilacetamida [Duarte *et al.*, 2007], formamida [Duarte *et al.*, 2007], acetona [Coutinho *et al.*, 2003; Coutinho *et al.*, 2007], orto-betaina [Hernandes *et al.*, 2004], benzofenona [Georg *et al.*, 2007], entre outras. Para mais detalhes, verificar Capítulo 2, Seção 2.1.3a.

Para comparação também foram realizadas simulações em meio aquoso usando Dinâmica Molecular (*MD*), com o programa TINKER [Ponder *et al.*, 1987; Kundrot *et al.*, 1991; Hodsdon *et al.*, 1996; Pappu *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2003], com modelo de moléculas flexíveis.

Ambas as simulações, *MC* e *MD*, foram realizadas no ensemble *NPT*, com pressão de 1 atm, temperatura de 298 K. Foram utilizadas 1 moléculas de Prodan e 500 moléculas de solventes, com exceção da água onde foram utilizadas 1000 moléculas. Na simulação de dímeros de Prodan, 2 moléculas de Prodan foram utilizadas. Para a simulação com Monte Carlo, aproximadamente 120 000 ciclos foram realizados para a termalização do sistema e mais 150 000 ciclos foram realizados no equilíbrio para a obtenção das propriedades

desejadas, onde em um ciclo, todas as moléculas são movimentadas, bem como o volume é alterado. Dessas 150 000 configurações, apenas 75 foram utilizadas para os cálculos quânticos, pois apresentavam uma correlação estatística menor que 12 %. Para a configuração com a *MD* utilizamos uma configuração já em equilíbrio, obtida no final da simulação com *MC*. Uma termalização de 3 ns foi realizada e depois mais 6 ns de simulações foram realizados para a obtenção de 60 000 configurações utilizadas para a obtenção das propriedades desejadas. O intervalo entre cada passo da simulação foi de 1.0 fs e uma configuração foi guardada a cada 0.1 ps.

O tamanho da caixa utilizado para cada solvente está colocado na Tabela 3.1. Para obter essas dimensões, realizamos uma simulação com uma caixa cúbica, assim obtemos o volume correspondente do Prodan junto com cada solvente, de modo a obter a densidade de cada líquido. Com esse volume, calculamos um paralelogramo de modo que em todas as direções do Prodan, tivéssemos aproximadamente uma mesma quantidade de moléculas do solvente. A maior dimensão sempre corresponde à maior dimensão do Prodan (8.5 x 14.5 x 4.5 Å), ou seja, no eixo *y*.

Para os solventes utilizamos potenciais bem conhecidos: para a água *SPC/E* [Berendsen *et al.*, 1984], para a acetonitrila [Bohm *et al.*, 1983], para o diclorometano [Briggs *et al.*, 1990] e para o ciclohexano [Jorgensen *et al.*, 1996].

Tabela 3.1: Dimensões das caixas usadas para as simulações de Monte Carlo e Dinâmica Molecular, em Å.

Solvente	x	y	z
Ciclohexano	52.8	58.8	48.8
Diclorometano	38.2	44.2	34.2
Acetonitrila	34.4	40.4	30.4
Água	30.6	36.6	26.6

Para as simulações de Prodan líquido, utilizamos uma caixa cúbica, mas a simulação teve que ser iniciada com uma densidade muito baixa (0.1 g/cm³), para que as moléculas pudessem ser colocadas na caixa sem sobreposição. Isso foi necessário, pois no *MC* as moléculas são colocadas aleatoriamente na configuração inicial e como as moléculas de Prodan são muito grandes, se a densidade inicial fosse grande, não era possível gerar uma configuração sem sobreposição. Foram realizados 1 600 000 ciclos de Monte Carlo para que todas as propriedades fossem estabilizadas e a densidade de 0.953 g/cm³ fosse atingida.

Os cálculos de energia livre de solvatação foram realizados utilizando o método de perturbação de energia livre e considerando que a energia livre de solvatação é o negativo da

energia livre de aniquilação, ou evaporação. Nesta aproximação, é considerado que a energia livre interna da molécula é igual em fase gasosa e em solução. O estado inicial (A) é a molécula solvatada e o estado final é apenas o solvente, sem o soluto (C). Como descrito na Seção 2.1.2e, várias perturbações são realizadas para levar o sistema do estado A para o estado C . No caso da energia livre de solvatação, o cálculo é feito através da aniquilação da molécula em meio solvente, através da aniquilação de todas as suas interações. O cálculo é separado em três etapas diferentes, de acordo com os termos do potencial de Lennard-Jones, utilizado na interação intermolecular. Primeiramente, as interação Coulombianas são aniquiladas, ou seja, as cargas (q) do soluto são anuladas, através de uma série de perturbações, onde as cargas variam do seu valor total (100 %) até zero. No segundo passo, a interação de van der Waals é aniquilada, através da diminuição do parâmetro ε . Esse parâmetro não pode ser anulado totalmente nesse passo devido a natureza do potencial (Eq. 2.1.12). No terceiro passo, é feita a aniquilação do parâmetro σ e o restante do parâmetro ε . Os intervalos das perturbações estão colocados na Tabela 3.2. Eles são definidos de modo que as perturbações na energia potencial do sistema sejam pequenas. Em cada um desses passos o valor da energia livre é obtido através da soma de cada incremento obtido nos diferentes intervalos de perturbação.

Tabela 3.2: Valores percentuais dos λ de perturbação utilizados para os cálculos de energia livre de solvatação. ε' são os valores das perturbações para o caso do Prodan em líquido de Prodan.

Parâmetro	λ_1	λ_2	λ_3	λ_4	λ_5	λ_6	λ_7	λ_8	λ_9	λ_{10}
q	100	95*	90	80*	70	60*	40	20*	0	
ε	100	75*	50	40*	30	20*	1			
σ	100	-	50	-	25	-	0			
ε'	100	75*	50	40*	30	20*	15	10*	1	

*pontos onde a simulação foi realizada calculando a perturbação para ambos os lados, para valores maiores e menores.

Como colocado na Seção 2.1.2e, dois incrementos na energia livre podem ser obtidos com apenas uma simulação, através da perturbação de λ_i para ambos os estados, λ_{i+1} e λ_{i-1} [Jorgensen *et al.*, 1985], na Tabela 3.2, estão marcados com asterisco os valores onde as simulações foram realizadas, com o programa DICE, com método de MC. Cada uma delas foi composta por uma termalização com 120 000 ciclos e depois duas simulações de 300 000 ciclos. Para se obter a energia livre total de aniquilação é preciso somar os valores de energia obtidos para cada perturbação e depois somar os três valores obtidos para cada passo, lembrando que a perturbação para λ_{i+1} resulta em um incremento com sinal oposto da

perturbação realizada para λ_{i-1} e a soma precisa ser realizada com todos os incrementos com o mesmo sinal. Os valores da Tabela 3.2 foram utilizados para o cálculo da energia livre de aniquilação do Prodan em água e em líquido de Prodan, com exceção do ϵ , que para o líquido de Prodan foi necessário utilizar mais perturbações (ϵ').

A energia livre de polarização foi calculada considerando o estado inicial sendo a molécula não polarizada e o estado final a molécula polarizada, nos casos estudados, a única diferença entre as moléculas são as cargas atômicas. Perturbações foram realizadas no sistema de modo a mudar as cargas atômicas da molécula não polarizada para as cargas da molécula polarizada. Os valores percentuais λ_i necessários para essa mudança foram: 100, 75, 50, 25 e 0.

4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

“A good scientist is a person in whom the childhood quality of perennial curiosity lingers on. Once he gets an answer, he has other questions.”

F. Seitz

Neste capítulo apresentamos os resultados obtidos nesta tese, assim como as discussões sobre os mesmos. Este capítulo foi dividido em duas partes. Na primeira analisamos os espectros de absorção eletrônica em diferentes ambientes, utilizando métodos experimentais e teóricos. Na segunda parte analisamos os espectros de emissão fluorescente em diferentes ambientes, utilizando métodos experimentais.

4.1 Efeito do Ambiente no Espectro de Absorção Eletrônica

Nesta seção vamos analisar o efeito de ambientes homogêneos (diferentes solventes) e também o efeito de ambientes heterogêneos (bicamadas lipídicas) nos espectros de absorção eletrônica das sondas Prodan e Laurdan, com métodos experimentais e teóricos. Utilizamos como ambientes homogêneos diferentes solventes, pois para um bom entendimento das características espectroscópicas dessas sondas é importante conhecermos as interações entre elas e com solventes de diferentes polaridades. Para os ambientes heterogêneos, escolhemos as bicamadas lipídicas, pois essas sondas são muito usadas para estudar esses sistemas, como foi descrito no Capítulo 1 e foi melhor detalhado neste Capítulo (Seção 4.2.2a).

Experimentalmente, realizamos medidas do espectro de absorção eletrônica em diferentes solventes para as duas sondas e realizamos um estudo comparativo entre elas, tanto experimental como teórico, mostrando que o cromóforo é o mesmo para as duas moléculas. O cromóforo sendo o mesmo para as duas moléculas, realizamos a construção de um modelo teórico do Prodan no estado fundamental, para descrever os espectros de absorção nos diferentes solventes. O Prodan é uma molécula menor, com menos átomos (Prodan tem 34 átomos e o Laurdan 61 átomos) e por isso o tempo computacional para todos os cálculos quânticos e simulações computacionais é menor.

Como colocado na Seção 3.2.5, os espectros de absorção e emissão foram apresentados em duas unidades diferentes, comprimento de onda (λ), em nm, ou número de onda (λ^{-1}), em cm^{-1} , também chamado de energia. A escolha da unidade foi feita conforme a conveniência para as discussões dos resultados.

4.1.1 Diferentes Solventes

4.1.1a Espectros Experimentais do Prodan e Laurdan

Para um bom entendimento das características espectroscópicas do Prodan e Laurdan, é fundamental conhecermos as suas interações no estado fundamental em diferentes solventes. Com esse objetivo, medimos o espectro de absorção eletrônica de 4 μM de Prodan em seis solventes diferentes: ciclohexano, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, metanol e água. Esses solventes foram escolhidos por cobrirem um grande intervalo de polaridade, onde a água tem a maior polaridade e o ciclohexano tem a menor. Na Tabela 4.1, listamos os solventes utilizados, suas fórmulas químicas e algumas propriedades, como índice de refração (n), momento de dipolo (μ), constante dielétrica (ϵ), densidade (ρ) [Lide *et al.*, 2002] e dois parâmetros usados como escalas de polaridade, Af [Lippert, 1955; Mataga *et al.*, 1956] e E_T^N

[Reichardt, 1994]. O termo polaridade do solvente deve ser usado de maneira abrangente, para expressar a conexão de todos os tipos de interações entre o soluto e o solvente, por exemplo, interações dielétricas não específicas e possíveis interações específicas, como ligação de hidrogênio. Portanto, polaridade não pode ser caracterizada por um único parâmetro, apesar de ser constantemente associada à constante dielétrica ou ao momento de dipolo das moléculas de solvente. Essa simplificação não deve ser feita e quantificar a polaridade de um solvente é um assunto bastante controverso, existindo diversas escalas que tentam fazê-lo. Levando isso em consideração, algumas escalas de polaridade foram desenvolvidas, geralmente empíricas e baseadas no deslocamento solvatocrômico de algumas moléculas (mais detalhes podem ser encontrados nas referências [Valeur, 2001; Reichardt, 2004]). Nesta tese de doutorado, vamos utilizar a escala Δf para a polaridade, colocada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Solventes utilizados nas medidas do espectro de absorção óptico. ε é a constante dielétrica do meio, μ é o momento de dipolo em Debye (D), n é o índice de refração, ρ é a densidade, Δf é uma escala de polaridade e E_T^N é a escala de polaridade $E_T(30)$ normalizada. $T \sim 25^\circ\text{C}$.

Nome	Fórmula	ε^*	μ (D)*	n^*	ρ (g/cm ³)*	Δf^{**}	E_T^{N***}
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂	2.0	~0	1.43	0.779	0.00	0.006
Clorofórmio	CHCl ₃	4.8	1.0	1.45	1.210	0.15	0.259
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	8.9	1.6	1.42	1.330	0.22	0.309
Acetonitrila	C ₂ H ₃ N	36.6	3.9	1.34	0.786	0.30	0.460
Metanol	CH ₃ OH	33.0	1.7	1.33	0.790	0.31	0.762
Água	H ₂ O	78.9	2.7	1.00	1.000	0.32	1.000

* [Lide *et al.*, 2002], ** $\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$, ver Seção 2.2.2a. ***[Reichardt, 1994]

Na Figura 4.1, podemos ver os espectros medidos para o Prodan nos diferentes solventes. Esses espectros foram medidos em duas temperaturas diferentes (25 e 40 °C), e não observamos nenhuma alteração nos espectros com essa mudança. Analisando esses espectros, podemos observar que existe uma banda em ~ 250 nm em todos os solventes. Essa banda se separa em duas nos vários solventes (com exceção da água) e não apresenta grandes deslocamentos com a polaridade do solvente. Existe outra banda em ~ 280 nm e para qual também não é possível observar nenhum deslocamento com a polaridade do solvente. A única banda que realmente sofre a influência do solvente é a de maior comprimento de onda (menor energia), que está em 362 nm na água e em 344 nm em ciclohexano (deslocamento de $1.44 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). O formato dessa banda também muda com a polaridade do solvente. A largura a meia altura da banda de menor energia foi medida com o espectro em energia e mostra que em ciclohexano essa banda é mais estreita ($\sim 3.50 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) e conforme a

polaridade do solvente aumenta a largura dessa banda aumenta. Em água, essa largura é de $\sim 6.8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Na Figura 4.2, temos a comparação da banda normalizada de absorção de maior comprimento de onda nos diferentes solventes, onde a comparação entre a largura da banda de maior comprimento de onda fica mais evidente, mostrando que o ciclohexano tem a banda mais estreita e para solventes de maior polaridade a banda alarga-se, sendo em água a banda mais larga.

Figura 4.1: Espectro de absorção do Prodan ($4 \mu\text{M}$) medidos em diferentes solventes, a 25°C e com caminho ótico de 10 mm .

Na Figura 4.3, temos os espectros de absorção do Laurdan nos diferentes solventes. Devido à cauda hidrocarbônica do Laurdan (ver Figura 1.2), vemos que essa molécula não é solúvel em água e por isso não apresenta espectro de absorção nesse solvente. Nos outros solventes, os espectros são muito parecidos com os espectros mostrados para o Prodan, como comparado na Seção 4.1.1b. Assim como para o Prodan, a largura da banda é apenas mais estreita para o ciclohexano ($\sim 3.8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) e depois aumenta um pouco com a polaridade do solvente, como podemos ver na Figura 4.4. Uma comparação direta dos espectros do Prodan e Laurdan está colocada na Seção 4.1.1b.

Figura 4.2: Comparação da banda de maior comprimento de onda (menor energia) dos espectros de absorção do Prodan em diferentes solventes.

Figura 4.3: Espectro de absorção do Laurdan ($4 \mu\text{M}$) medidos em diferentes solventes, a 25°C e com caminho ótico de 1 cm .

Figura 4.4: Comparação da banda de maior comprimento de onda (menor energia) dos espectros de absorção do Laurdan em diferentes solventes.

Tabela 4.2: Valores das posições dos máximos de absorção (nm) da banda de maior comprimento de onda (menor energia) publicados na literatura para o Prodan e medidos nesta tese para o Prodan e Laurdan (duas últimas colunas à direita).

Solvente	Weber <i>et al.</i> , 1979	Catalan <i>et al.</i> , 1991	Bunker <i>et al.</i> , 1993	Moyano <i>et al.</i> , 2006	Prodan	Laurdan
Ciclohexano	342	343.2	341	342.6	344	344
Clorofórmio	357	354.9	355	361.0	360	360
Diclorometano	-	353.9	355	356.1	356	360
Acetonitrila	350	352.2	353	352.0	352	355
Metanol	362	361.4	365	363.4	363	365
Água	364	356.8	-	358.0	345/370	-

Existem na literatura alguns artigos que medem a absorção do Prodan em diferentes solventes [Weber *et al.*, 1979; Catalan *et al.*, 1991; Bunker *et al.*, 1993; Moyano *et al.*, 2006], mas apenas um deles mostra os espectros [Bunker *et al.*, 1993] para a banda de maior comprimento de onda (nenhum deles mostra os espectros como colocados na Figura 4.1). Os outros artigos apenas publicam a posição do máximo. Uma comparação entre as posições do máximo da banda de maior comprimento de onda obtidos na literatura e os medidos aqui estão colocados na Tabela 4.2. Podemos ver que aparecem diferença consideráveis entre os valores, por exemplo, em clorofórmio temos valores de 354.9 até 361 nm. Isso fica ainda mais evidente para o caso da água, o espectro mais largo (Figura 4.2), onde os valores variam de 356.8 até 364 nm. Para a nossa banda, mostramos dois valores, pois a banda em água parece

ser obviamente composta por duas bandas, com dois máximos diferentes, que alargam essa banda de maior comprimento de onda. Com isso, verificamos que analisar apenas a posição do máximo de absorção não é um bom método para analisar o espectro dessas sondas, é realmente importante olhar o espectro como um todo.

4.1.1b Comparação entre Prodan e Laurdan

Nessa seção vamos realizar uma comparação entre o Prodan e o Laurdan, com o objetivo de verificarmos se o cromóforo é o mesmo para as duas moléculas. A Figura 4.5 mostra uma comparação dos espectros de absorção das duas moléculas. Podemos ver que os espectros são extremamente parecidos para todos os solventes, exceto para a água, onde o Laurdan não é solúvel. A forma da banda de maior comprimento de onda se mantém como mostrado na Figura 4.6, indicando que o cromóforo é o mesmo nas duas moléculas. Os espectros experimentais mostrados na Figura 4.5, indicam fortemente que a parte responsável pela absorção de luz no Prodan e no Laurdan deve ser a mesma.

Figura 4.5: Comparação dos espectros de absorção do Prodan (linha preta) com os espectros de absorção do Laurdan (linha vermelha).

Figura 4.6: Comparação da banda normalizada de maior comprimento de onda (menor energia) de absorção do Prodan (linha preta) e Laurdan (linha vermelha). No gráfico da água, as duas medidas foram divididas pelo mesmo fator para manter a proporção.

Para identificar o cromóforo de ambas as moléculas, realizamos alguns cálculos teóricos. As geometrias foram obtidas com cálculo quântico *B3LYP/6-31G** (ver Seção 2.1.1f e 4.1.1c). Com essas geometrias, calculamos os valores de momento de dipolo e as cargas nos átomos, com cálculo quântico (*MP2/cc-pVDZ*) e também obtivemos os orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica de absorção utilizando o método semi-empírico *INDO/S* (Ver Seção 2.1.1g). Esses valores estão colocados na Tabela 4.3, onde podemos ver que todos os valores são semelhantes para as duas moléculas. Os orbitais *HOMO* (orbital mais alto ocupado) e *LUMO* (orbital mais baixo desocupado) das duas moléculas são semelhantes e estão representados graficamente na Figura 4.7.

Com os dados colocados nas Figura 4.5, Figura 4.6 e Figura 4.7 e na Tabela 4.3, podemos concluir que o cromóforo, responsável pela primeira banda de absorção de luz no Prodan e Laurdan, é o mesmo e envolve apenas os anéis aromáticos e os átomos O e N. A cauda hidrocarbônica, ligada ao Laurdan, não influencia na banda de absorção dessa molécula.

Tabela 4.3: Valores calculados do momento de dipolo, das cargas atômicas do oxigênio, nitrogênio e carbono ligado ao oxigênio (calculados com cálculo quântico usando MP2/cc-pVDZ e estão dadas em múltiplos da carga do elétron) e da transição *HOMO* – *LUMO* (calculados com o método INDO/S). A numeração dos átomos está colocada na Figura 4.8.

Nome	μ (D)	q O5	q N26	q C4	Transição (nm)	Transição ($\times 10^3$ cm ⁻¹)
Prodan	5.53	-0.398	-0.259	0.349	344	29.1
Laurdan	5.56	-0.417	-0.297	0.401	341	29.3

Alguns artigos na literatura [Parusel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1997; Parusel, 1998] classificam a transição *HOMO* – *LUMO* do Prodan e Laurdan como tendo um caráter de transferência de carga entre os átomos N e O. Analisando a Figura 4.7, podemos identificar um pequeno deslocamento dos orbitais (*HOMO* – *LUMO*) no sentido N $\rightarrow$ O. A forma perpendicular desses orbitais, com relação ao plano dos anéis aromáticos das moléculas, evidencia que o *HOMO* é um orbital do tipo π e o *LUMO* é um orbital do tipo π^* , delocalizados sobre os anéis aromáticos e com pouca localização nos átomos O e N. Portanto, essa transição pode ser classificada como $\pi - \pi^*$, com pequeno caráter de transferência de carga.

Figura 4.7: Comparação dos orbitais moleculares *HOMO* e *LUMO* calculados com o programa ZINDO para molécula de Prodan e Laurdan.

4.1.1c Construção do Modelo Teórico para o Prodan

A construção de um modelo teórico para explicar o deslocamento e a largura do espectro de absorção dessas sondas foi realizada para a molécula de Prodan, pois como vimos na Seção 4.1.1b, o cromóforo é o mesmo para as duas moléculas. E alguns cálculos ficariam impossibilitados computacionalmente devido ao tamanho da molécula de Laurdan, como discutido no início deste Capítulo.

Geometria Molecular e Definição dos Parâmetros

A construção do modelo começa com a definição da geometria mais estável para a molécula de Prodan. Utilizamos como ponto inicial a geometria de raios X dada por [Ilich *et al.*, 1989], que é planar e otimizamos com o método *B3LYP/6-31G**. Após a otimização, as frequências vibracionais foram calculadas e verificamos que todas eram positivas, mostrando que a geometria obtida era realmente um ponto de mínimo. Na Figura 4.8, temos um esquema da molécula com os seus átomos numerados.

Figura 4.8: Estrutura da molécula de Prodan com a numeração dos átomos que será usada no texto.

Porém, antes de usarmos a geometria otimizada com método *B3LYP*, um estudo foi realizado com diferentes métodos. Na literatura, alguns trabalhos já foram publicados usando métodos *ab initio* como Hartree-Fock (*HF*) [Parusel *et al.*, 1997] ou métodos semi-empíricos como o *AMI* [Nowak *et al.*, 1986; Parusel, 1998; Parusel *et al.*, 1998; Parusel *et al.*, 2001], por isso também realizamos a otimização com esses métodos. Na Tabela 4.4 (superior), temos a comparação de alguns valores importantes para a geometria do Prodan, como a distância O5-C4. Os valores encontrados para o *B3LYP* são os mais próximos da geometria experimental obtida por raios X [Ilich *et al.*, 1989]. Os outros métodos, *HF* e *AMI*, também apresentam uma pequena piramidização do grupo do N em relação ao plano dos anéis aromáticos, como podemos ver pelos valores de φ , que não está presente na geometria experimental e nem na obtida com *B3LYP*. Os valores aqui obtidos com *HF* e *AMI* são muito

semelhantes aos valores presentes na literatura. Após todas as otimizações, as frequências foram calculadas e os seus valores eram positivos. Os valores das energias para as geometrias obtidas com os diferentes métodos (Tabela 4.5) mostram que a geometria mais estável é a geometria calculada com *B3LYP*, que é planar como a de raios X. Essa geometria também é a que apresenta maior dipolo e o valor da transição eletrônica calculada no vácuo é o valor mais próximo do valor experimental para o ciclohexano ($29.1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), solvente que menos interage com o Prodan

Tabela 4.4: Comparação de alguns parâmetros da geometria do Prodan usando diferentes métodos de cálculo quântico (superior) e também utilizando o método *B3LYP* com o modelo *PCM* para diferentes solventes (inferior).

Geometria	R (Å)		θ (°)		ϕ (°)	
Em vácuo	C4O5	N26C20	O5C4C3	C31N26C20	O5C4C3C13	C31N26C20C18
X-Ray*	1.21	1.39	120.2	120.0	0.9	1.2
B3LYP	1.22	1.38	120.6	119.2	0.0	5.7
AM1	1.24	1.41	121.4	117.6	-3.5	10.4
HF	1.24	1.41	121.4	117.6	-3.5	10.4
Em solvente PCM						
Água	1.23	1.38	120.6	119.4	0.0	5.5
Acetonitrila	1.23	1.38	120.7	119.7	0.0	1.4
Diclorometano	1.23	1.38	120.7	119.5	0.1	3.9
Ciclohexano	1.23	1.38	120.6	119.3	0.0	5.6

*Retirada de [Ilich et al., 1989]

Tabela 4.5: Valores das energias relativas, momento de dipolo e transições eletrônicas das geometrias do Prodan obtidas com diferentes métodos de cálculo quântico (superior) e também utilizando o método *B3LYP* com o modelo *PCM* para diferentes solventes na otimização da geometria, nesse caso o dipolo e as transições foram calculado no vácuo (inferior). As energias e momentos de dipolo foram calculados com *B3LYP/6-31G** e a transição eletrônica com *INDO/S*.

	Em vácuo	E (kcal/mol)*	μ (D)	$\lambda^{-1} (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$
B3LYP		0.0	6.1	29.0
AM1		5.5	5.6	30.0
HF		3.9	4.4	31.2
Em solvente PCM				
Água		0.14	6.3	28.9
Acetonitrila		0.12	6.4	28.8
Diclorometano		0.08	6.3	28.9
Ciclohexano		0.02	6.2	29.0

*valores calculados em relação à energia mais baixa, obtida com *B3LYP/6-31G** em vácuo

Também foi realizado um estudo da influência do solvente na otimização da geometria. Usando o método *B3LYP*, a geometria do Prodan foi otimizada com os solventes: água, acetonitrila, diclorometano e ciclohexano como modelo contínuo (*PCM*). Como podemos ver na Tabela 4.4 (inferior), nenhum dos solventes conseguiu realizar mudanças geométricas no Prodan. Na Tabela 4.5, temos as energias relativas, os dipolos e os valores da transição eletrônica dessas geometrias otimizadas com *PCM* (calculados com a molécula em

vácuo após a otimização na presença do solvente, para verificar apenas a influência deste na otimização da geometria). Podemos ver que os valores são muito parecidos para todos os solventes. Esses dados indicam que a geometria é pouco alterada pelo solvente ou que se essas mudanças ocorrem, elas podem ser devido a interações específicas com o solvente, que não são contempladas com o modelo *PCM*. Além de analisarmos a influência do solvente na otimização da geometria, também analisamos a influência da rotação dos grupos dimetilamino ($-N-(CH_3)_2$) e propionil ($-C(=O)-CH_2-CH_3$) em relação ao plano do anel. A partir da geometria otimizada com *B3LYP/6-31G** e planar, esses grupos foram tirados do plano do naftaleno em $\sim 90^\circ$ e uma nova otimização foi realizada. Esse processo foi realizado para cada grupo separadamente e também para os dois grupos juntos. Em todos os casos a geometria final obtida era planar, como a otimizada sem rotação, mostrando que no estado fundamental a geometria mais estável é planar.

A geometria usada para o restante do trabalho foi a otimizada no vácuo com o método *B3LYP/6-31G** e as coordenadas dos átomos para essa geometria estão colocados no Apêndice D.

Além da posição de cada átomo da molécula, para realizar as simulações é necessário definir os parâmetros do potencial de interação (ver Seção 2.1.2c). Para o potencial intermolecular colocado na Eq. 2.1.12, são necessários, para cada átomo, os parâmetros utilizados no potencial de Lennard-Jones (responsável pelas interações intermoleculares não coulombianas, ϵ_i e σ_i) e para a interação coulombiana, as cargas atômicas. Os valores de ϵ_i e σ_i foram retirados do campo de força *OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations)*, por similaridade de grupos moleculares com outras moléculas, onde esses parâmetros foram calculados [Jorgensen *et al.*, 1996] e esses valores estão colocados no Apêndice D.

A obtenção das cargas atômicas é um pouco mais complicada. Os valores das cargas atômicas da molécula em vácuo foram obtidos através do cálculo quântico com método *MP2/aug-cc-pVDZ*. Porém quando a molécula é colocada em diferentes solventes, os valores das cargas podem mudar e para obter os valores convergidos, realizamos o processo de polarização iterativo, que utiliza simulações computacionais e cálculos quânticos iterativamente para obter as cargas e os momentos de dipolo do soluto em equilíbrio com o solvente, para mais detalhes ver a Seção 2.1.3.

Dos solventes colocados na Tabela 4.1, escolhemos quatro para realizarmos o processo de polarização: água, acetonitrila, diclorometano e ciclohexano. Esses quatro solventes cobrem um grande intervalo de polaridade e momentos dipolares, como pode ser visto na Tabela 4.1. Realizar o processo de polarização com todos os solventes seria muito

custoso computacionalmente, pois cada iteração desse processo é composta por três passos (Figura 2.9), onde dois deles são uma simulação computacional e um cálculo quântico do soluto com a distribuição de cargas do solvente ao redor. A simulação pode demorar de quatro a seis dias (utilizando o método de *MC*) e o cálculo quântico pode demorar de um a dois dias (sem a necessidade de moléculas explícitas do solvente nessa etapa e realizando apenas um cálculo quântico com o solvente como cargas pontuais, utilizando *ASEC* com *MP2/aug-cc-pVDZ*), então temos um tempo estimado de uma semana para cada iteração. A convergência do processo depende do solvente e pode precisar de muitos passos. Para o Prodan, o solvente que convergiu mais rápido foi o ciclohexano (três iterações) e os que mais demoraram foram água e a acetonitrila (nove iterações).

As simulações computacionais, que fazem parte do ciclo iterativo para a polarização (Seção 2.1.3c), foram realizadas utilizando o Método Monte Carlo. Essas simulações foram realizadas com uma molécula de Prodan embebida em 500 moléculas do solvente, com exceção da água, onde foram utilizadas 1000 moléculas.

Figura 4.9: Gráfico das funções de distribuição de mínima distância (*MDDF*) para o Prodan nos diferentes solventes.

Depois da simulação, determinamos quantas moléculas compõem a segunda camada de solvatação, analisando a distribuição de mínima distância (*MDDF*, Seção 2.1.2c) entre o Prodan e as moléculas do solvente. Na Figura 4.9, está colocada a *MDDF* entre o Prodan e os diferentes solventes. A distância da camada e o número de moléculas contidas nela estão

colocados na Tabela 4.6 (r e N_s , respectivamente). Consideramos o final da segunda camada de solvatação no ponto onde o segundo mínimo aparece na *MDDF*. Também estão colocados nessa tabela, os valores da densidade média obtidos após a simulação e podemos verificar que são valores semelhantes aos valores experimentais colocados na Tabela 4.1.

Tabela 4.6: Valores para densidade obtida após a simulação de Monte Carlo $\langle\rho\rangle$, distância da primeira (r_1) e da segunda (r_2) camada de solvatação e número de moléculas dentro das mesmas (N_{s1} para a primeira, N_{s2} para a segunda e N_s sendo o total das duas camadas). $T = 25^\circ\text{C}$ e pressão 1 atm.

Solvente	$\langle\rho\rangle$ (g/cm ³)	r_1 (Å)	r_2 (Å)	N_{s1}	N_{s2}	N_s
Ciclohexano	0.770(6)	4.15	9.35	20	77	97
Diclorometano	1.197(13)	4.65	8.55	24	80	104
Acetonitrila	0.834(9)	4.15	7.95	29	100	129
Água	1.022(8)	4.05	7.95	56	231	287

O processo de polarização foi iniciado com as cargas atômicas obtidas para o Prodan em vácuo, com cálculo quântico em nível *MP2/aug-cc-pVDZ/CHELPG*, através do qual obtivemos o momento de dipolo de 5.84 D. Esse valor para o momento de dipolo do Prodan está em concordância com os valores presentes na literatura até o momento (Tabela 4.7, superior), obtidos teoricamente, porém representa um avanço, pois o método quântico utilizado é mais preciso. Os valores obtidos experimentalmente (Tabela 4.7, inferior) apresentam valores muito diferentes, variando de 2.45 até 5.2 D, pois a determinação experimental do momento de dipolo é muito complicada e foi melhor discutida na Seção 4.2.1

Tabela 4.7: Valores dos dipolos presentes na literatura para o Prodan no estado fundamental. Na parte superior, temos os valores obtidos com métodos teóricos para a molécula em vácuo. Na parte inferior, estão colocados os valores obtidos com métodos experimentais.

Métodos Teóricos		
Referências	Método	μ_g (D)
Nowak <i>et al.</i> , 1986	<i>MNDO</i>	6.7
Balter <i>et al.</i> , 1988	<i>CNDO/2</i>	3.8
Parusel <i>et al.</i> , 1997	<i>HF/D95**</i>	5.6
	<i>HF/3-21+G*</i>	5.7
Parusel <i>et al.</i> , 1998	<i>AMI-DFT</i>	5.0-5.7
Parusel, 1998	<i>AMI (CISD = 10)</i>	6.0
	<i>AMI</i>	5.2
	<i>AMI</i>	4.5
Parusel <i>et al.</i> , 2001	<i>AMI</i>	4.5
Huang <i>et al.</i> , 2006	<i>TD-B3LYP/6-31+G*</i>	6.0
Mennucci <i>et al.</i> , 2008	<i>TD-B3LYP/6-311+G**</i>	6.1
Nosso Resultado	<i>MP2/aug-ccp-VDZ</i>	5.84
Métodos Experimentais		
Weber <i>et al.</i> , 1979	Eq. de Lippert – Solventes	5.0
Balter <i>et al.</i> , 1988	Eq. de Lippert – Solventes	2.9
Catalan <i>et al.</i> , 1991	Eq. de Lippert – Solventes	4.7
Bunker <i>et al.</i> , 1993	Eq. de Lippert – Solventes	2.9
Kawski, 1999	Pertubação do Solvente	2.4-2.5
Kawski <i>et al.</i> , 2000	Eq. de Lippert – Temperatura	2.45-2.80
Samanta <i>et al.</i> , 2000	Absorção de Microonda	5.2

Os cálculos quânticos feitos durante o processo de polarização foram realizados com as moléculas do solvente, que estavam dentro da segunda camada de solvatação como cargas pontuais e todas as 75 configurações descorrelacionadas foram sobrepostas em uma única configuração, utilizando a metodologia *ASEC* (*Average Solvent Electrostatic Configuration*), descrita na Seção 2.1.3b. Com isso, apenas um cálculo quântico foi realizado para a obtenção das novas cargas e dipolos a serem utilizados na nova simulação do processo. A quantidade de moléculas incluídas no cálculo quântico para cada solvente está na Tabela 4.6 ($N_s = N_{s1} + N_{s2}$).

A convergência do momento de dipolo para cada um dos solventes estudados está colocada na Figura 4.10. Para o solvente ciclohexano, com a primeira iteração obtivemos um valor de momento de dipolo de 6.07 D e para segunda e terceira iterações um valor de 6.09 D. Portanto, verificamos que o Prodan na presença do ciclohexano apresenta uma polarização muito pequena de apenas 5 % aproximadamente, saindo de um dipolo de 5.84 D, em fase gasosa, para 6.07 D, nesse solvente. Já para o solvente diclorometano, com a primeira iteração obtivemos um valor de momento de dipolo de 7.19 D que representa um aumento de 23 %. Para segunda iteração, esse valor foi para 7.55 D e convergiu a partir da terceira iteração com o valor de 7.70 D. Apresentando assim, um aumento final de cerca de 33 % no momento de dipolo, que é maior que a polarização provocada pelo ciclohexano. Para o solvente acetonitrila, com a primeira iteração obtivemos um valor de momento de dipolo de 7.43 D que representa um aumento de 27 %. Esse aumento do momento de dipolo continua até a iteração 5, onde converge para um valor de 8.00 D. Isso, representa 38 % de aumento no momento de dipolo comparativamente ao dipolo da molécula isolada. Finalmente, para a solução aquosa, com a primeira iteração obtivemos um valor de momento de dipolo de 8.00 D e esse valor continua aumentando até a iteração 7, onde convergiu para um valor de 10.20 D. Esse dipolo convergido em solução aquosa representa 76 % de aumento no momento de dipolo comparativamente ao dipolo da molécula isolada.

Na Figura 4.10, podemos ver que para os solventes de baixa polaridade, ciclohexano e diclorometano, o processo de polarização converge rapidamente e a polarização é pequena. Representando, um acréscimo do dipolo de 5 % e 33 %, respectivamente. Para os solventes de maior polaridade, é preciso mais iterações para que esse processo atinja a convergência e os momentos de dipolo aumentam mais, 38 % para acetonitrila e 76 % para água. Para comparação, realizamos cálculos quânticos do momento de dipolo e cargas usando o modelo contínuo polarizável para o solvente (*PCM*) com *MP2/aug-ccpVDZ*. Obtivemos os seguintes valores 6.2, 7.6, 7.9 e 8.2 D para ciclohexano, diclorometano, acetonitrila e água,

respectivamente (Tabela 4.8). É interessante notar que o único solvente onde realmente observamos uma grande diferença entre o valor do momento de dipolo calculado com o modelo contínuo e o modelo discreto, é a água. Com o *PCM* temos apenas um aumento de 41 % no valor do momento de dipolo em solução aquosa, já com o processo de polarização temos um aumento de 76 %.

Figura 4.10: Gráfico da convergência do momento de dipolo do Prodan durante o processo de polarização nos diferentes solventes: ciclohexano ($\blacklozenge$), diclorometano ($\blacktriangle$), acetonitrila ($\bullet$) e água ($\blacksquare$). A linha horizontal preta pontilhada é o valor do momento de dipolo do Prodan em vácuo.

Na Tabela 4.8, apresentamos os valores para o momento de dipolo usando os dois modelos de solvente, contínuo (μ_{PCM}) e discreto ($\mu_{Discreto}$). Também estão apresentados os valores de dipolo obtidos por [Mennucci *et al.*, 2008] com o modelo contínuo (*PCM*) para o solvente utilizando o método *B3LYP/6-311+G(d,p)* (μ_{PCM}^*). Nesse artigo, os autores também calcularam o dipolo de uma supermolécula, otimizando o Prodan com mais duas moléculas de água fazendo ligação de hidrogênio com o O5, com o mesmo método. Essa otimização foi realizada no vácuo ($\mu_{vácuo}$, Prodan+ 2H₂O) e na presença do solvente contínuo (μ_{PCM} , Prodan+ 2H₂O) e o dipolo foi calculado nas duas situações. Os valores de dipolos obtidos com *PCM* para os solventes ciclohexano e acetonitrila, no artigo de Mennucci *et al.* apresentam valores maiores que os valores obtidos nesta tese com o modelo discreto para o solvente, mostrando que provavelmente, com o método utilizado nesse artigo, a interação soluto – solvente está

sendo superestimada nesses solventes. Para a água, o momento de dipolo obtido é de 9.4 D, para o Prodan com o modelo contínuo, valor um pouco menor do que o valor obtido nesta tese com o modelo discreto do solvente. Quando as ligações de hidrogênio são consideradas isoladamente, o valor do dipolo se aproxima do obtido nesta tese, mas quando as ligações de hidrogênio são consideradas juntamente com o modelo contínuo para o solvente, o valor do dipolo é superestimado, provavelmente porque nesse caso a interação Prodan água é superestimada. Isso mostra que a interação específica entre a água e o Prodan é importante para a descrição do momento de dipolo neste solvente e que a melhor maneira de incluir esse efeito é considerando o modelo discreto para o solvente.

Tabela 4.8: Momento de dipolo (em D) do Prodan em solução, obtido com o modelo contínuo PCM (μ_{PCM}) e com o modelo discreto para o solvente ($\mu_{Discreto}$). Também estão apresentados os resultados dos dipolos obtidos por [Mennucci et al., 2008], utilizando o método B3LYP/6-311+G(d,p), com o modelo PCM para o solvente (μ_{PCM}). Para um agregado de Prodan + 2 moléculas de água formando ligação de hidrogênio no O5, otimizado com o mesmo método no vácuo e também para o mesmo agregado otimizado com o modelo PCM.

	Ciclohexano	Diclorometano	Acetonitrila	Água
μ_{PCM}	6.2	7.6	7.9	8.2
$\mu_{Discreto}$	6.1	7.7	8.0	10.2
Mennucci et al., 2008				
μ_{PCM}^*	7.7	-	9.3	9.4
$\mu_{vácuo}$, Prodan+ 2H ₂ O	-	-	-	9.75
μ_{PCM} , Prodan+ 2H ₂ O	-	-	-	13.21

Na Tabela 4.9 temos os valores das cargas atômicas obtidas após o processo de polarização para cada solvente estudado. Podemos observar nessa tabela que com o aumento da polarização do solvente (valores da esquerda para a direita), a carga no O5 fica cada vez mais negativa, mas esse aumento de carga negativa não está vindo do N26, o que caracterizaria um processo de transferência intramolecular de carga em solventes de maior polaridade. Essa carga negativa vem principalmente do C4 ligado ao O5 e de alguns outros átomos dos anéis aromáticos. Apesar do Prodan sofrer um grande processo de polarização em água, esse processo não caracteriza a transferência intramolecular de carga no sentido convencional, onde a carga sai de um grupo doador de elétron para um aceitador, como é sugerido por alguns artigos na literatura [Parusel et al., 1997; Viard et al., 1997; Parusel, 1998].

Tabela 4.9: As cargas atômicas obtidas após o processo de polarização na presença do solvente discreto para os solventes estudados

	Vácuo	Ciclohexano	Diclorometano	Acetonitrila	Água
H1	0.131	0.151	0.161	0.177	0.165
C2	-0.324	-0.272	-0.257	-0.269	-0.221
C3	0.014	-0.065	-0.093	-0.089	-0.157
C4	0.364	0.456	0.495	0.474	0.601
O5	-0.444	-0.537	-0.604	-0.590	-0.761
C6	0.208	0.189	0.183	0.191	0.162
H7	-0.042	-0.035	-0.024	-0.023	-0.011
H8	-0.043	-0.036	-0.025	-0.023	-0.010
C9	-0.156	-0.160	-0.150	-0.160	-0.138
H10	0.024	0.026	0.036	0.039	0.050
H11	0.035	0.041	0.033	0.033	0.018
H12	0.035	0.041	0.029	0.031	0.030
C13	-0.059	-0.009	0.000	-0.010	0.019
H14	0.083	0.109	0.102	0.100	0.097
C15	-0.198	-0.322	-0.340	-0.340	-0.356
H16	0.109	0.139	0.147	0.150	0.163
C17	0.133	0.294	0.297	0.303	0.322
C18	-0.376	-0.539	-0.566	-0.583	-0.608
H19	0.174	0.220	0.229	0.241	0.245
C20	0.274	0.395	0.415	0.426	0.430
C21	-0.146	-0.269	-0.273	-0.288	-0.274
H22	0.127	0.153	0.163	0.174	0.171
C23	-0.272	-0.204	-0.206	-0.215	-0.209
H24	0.129	0.146	0.156	0.164	0.168
C25	0.235	0.127	0.117	0.118	0.105
N26	-0.275	-0.284	-0.307	-0.328	-0.291
C27	0.056	0.046	0.056	0.054	0.034
H28	0.054	0.055	0.060	0.066	0.072
H29	0.010	0.015	0.019	0.020	0.026
H30	0.005	0.007	0.005	0.011	0.012
C31	0.109	0.069	0.090	0.096	0.069
H32	0.039	0.051	0.054	0.057	0.065
H33	-0.005	0.005	0.008	0.001	-0.004
H34	-0.008	-0.002	-0.010	-0.008	0.016

Após o processo de polarização, analisamos novamente as funções de distribuição de mínima distância (*MMDF*) mostradas na Figura 4.9 e verificamos que apenas para a água houve uma mudança considerável, onde as moléculas de solvente ficaram mais estruturadas ao redor do Prodan. Analisando a Figura 4.11, podemos ver que a *MMDF* em água, depois da polarização, apresenta um pico em ~ 1.70 Å e esse pico contém ~ 3 moléculas de água, indicando a presença de ligações de hidrogênio, *HB* (*Hydrogen Bond*). Uma análise mais detalhada dessa interação está colocada a seguir. A quantidade de moléculas na primeira e na segunda camada de solvatação, assim como o tamanho dessas camadas não foi alterado pelo processo de polarização, com exceção da água, onde a quantidade de moléculas na primeira camada de solvatação aumentou de 56 (Tabela 4.6) para 61.

Figura 4.11: Comparação das funções de distribuição de mínima distância, antes (preto) e depois (vermelho) do processo de polarização nos diferentes solventes.

Também analisamos as *HB* formadas entre o Prodan e os diferentes solventes usando critérios geométricos e energéticos [Rahman *et al.*, 1971; Stilling *et al.*, 1974; Mezei *et al.*, 1981; Jorgensen *et al.*, 1983; Malaspina *et al.*, 2002]. Para o Prodan, o único solvente que apresenta ligações de hidrogênio é a água. Consideramos que uma *HB* era formada quando a distância oxigênio do Prodan – oxigênio da água fosse $R_{OO} \leq 3.3 \text{ \AA}$, o ângulo $\theta(O\hat{H}O) \leq 41^\circ$ e a energia de interação fosse positiva. Esse mesmo critério foi usado antes e depois do processo de polarização. Antes do processo de polarização, encontramos 109 *HB* para as 75 configurações descorrelacionadas, o que leva a uma média de 1.45 *HB* para cada configuração. Depois do processo de polarização, encontramos 200 *HB*, levando a uma média de 2.67 *HB* por configuração. Na Tabela 4.10, podemos observar que depois da polarização a distância da ligação diminuiu (R_{OH}), a energia duplicou (E) e o ângulo ficou menor ($\theta_{O\hat{H}O}$), indicando uma ligação mais forte e mais orientada entre o Prodan e a água através de *HB*.

Tabela 4.10: Análise das ligações de hidrogênio antes e depois da polarização. R_{OH} é o valor médio da ligação entre o oxigênio do Prodan ($O5$) e o hidrogênio da água, $\theta_{O\hat{H}O}$ é o valor médio do ângulo formado entre o $O5$ do Prodan, o hidrogênio e o oxigênio da água, E é o valor médio da energia da ligação OH e HB é o número médio de ligações de hidrogênio por configuração descorrelacionada.

	R_{OH} (Å)	θ_{OHO}	E (kcal/mol)	HB
Antes da Polarização	1.98(3)	18(2)	4.4(2)	1.45
Depois da Polarização	1.86(3)	11(1)	8.2(2)	2.67

Na Tabela 4.11, temos as energias de interação, entre o Prodan e os diferentes solventes, obtidas antes e depois do processo de polarização. Podemos ver que a energia de interação de Coulomb sofre grandes alterações para todos os solventes, com exceção do ciclohexano, onde ela não é alterada. Para a acetonitrila e o diclorometano, o valor da energia é dobrado, para o caso da água essa energia aumenta ainda mais, aproximadamente quatro vezes. Porém, o termo da energia Lennard-Jones somente muda para a água, onde sofre uma pequena redução. Antes da polarização, interação Prodan-solvente era dominada pelo termo Lennard-Jones, após a polarização, isso continua sendo verdade para todos os solventes com exceção da água, onde a interação de Coulomb passa a ser o termo maior.

Tabela 4.11: Valores dos termos das energias de interação entre o Prodan e os diferentes solventes calculados durante a simulações de MC, antes e depois do processo de polarização.

Solvente	Antes da Polarização		Depois da Polarização	
	LJ (kcal/mol)	Coulomb (kcal/mol)	LJ (kcal/mol)	Coulomb (kcal/mol)
Água	-26.5	-12.7	-22.7	-49.9
Acetonitrila	-30.3	-7.2	-29.8	-13.7
Diclorometano	-31.0	-5.6	-30.6	-10.5
Ciclohexano	-34.6	0.1	-34.2	-0.1

Com isso podemos ver que as interações Prodan-solvente apenas estarão bem descritas após o processo de polarização, principalmente para o caso da água. A distribuição da água ao redor do Prodan também é alterada com o processo de polarização, pois inicialmente tínhamos 56 moléculas de água na primeira camada de solvatação e depois do processo de polarização temos 61, indicando uma nova estrutura da água ao redor do Prodan.

A variação da energia livre para ocorrer a polarização foi calculada usando a teoria de perturbação da energia livre (ver Seção 2.1.2e) com o método de MC. Onde o estado inicial foi considerado como a molécula não polarizada e o estado final a molécula polarizada. A diferença entre os dois estados, para os parâmetros do potencial de interação intermolecular, são as cargas atômicas. Portanto, foram realizadas perturbações nas cargas da molécula não polarizada até se obter as cargas da molécula polarizada. Para a interação soluto-solvente, obtivemos os valores de -14.4, -3.4, -2,6 e 0.0 kcal/mol para a água, acetonitrila, diclorometano e ciclohexano, respectivamente. Porém, esses valores levam em conta apenas a interação soluto – solvente e não a energia interna do Prodan para reorganizar suas cargas e se polarizar. Essa energia interna foi calculada quanticamente, onde foi realizado um cálculo da função de onda e da energia do Prodan em vácuo e depois na presença dos diferentes

solventes, como cargas pontuais (*ASEC*). Usando a função de onda calculada na presença do solvente, foi realizado novamente um cálculo da molécula de Prodan isolada. A diferença entre os dois cálculos em vácuo, um com a função de onda isolada e outra com a função de onda modificada pelo solvente, fornece a energia de auto-polarização do Prodan. Realizando a soma dos termos intermolecular (soluto-solvente) e intramolecular, obtivemos os valores finais para a variação da energia livre devido à polarização: -7.1, -2.0, -1.6 e 0.0 kcal/mol para água, acetonitrila, diclorometano e ciclohexano, respectivamente. Esses valores mostram que o processo de polarização é espontâneo em todos os solventes estudados.

Com esses valores de energia livre é possível calcular a porcentagem de equilíbrio do Prodan polarizado e não polarizado em cada solvente (Seção 2.1.2e). Em água 100 % das moléculas sofrem polarização, em acetonitrila 97 %, em diclorometano 94 % e em ciclohexano 50 %.

Cálculo do Espectro de Absorção nos Diferentes Solventes

Para calcular as transições, selecionamos as configurações descorrelacionadas, e nessas configurações consideramos a molécula de Prodan mais as moléculas da primeira camada de solvatação explicitamente e colocamos o restante das moléculas como cargas pontuais, até completar a segunda camada de solvatação (Tabela 4.6). Um exemplo de uma dessas configurações está colocado na Figura 4.12, para o solvente acetonitrila.

Figura 4.12: Exemplo de uma configuração da simulação que foi usada para o cálculo das transições eletrônicas. Prodan com 29 moléculas explícitas de acetonitrila, mais 100 moléculas como cargas pontuais, que completam a segunda camada de solvatação.

A Figura 4.13 contém os espectros de absorção medidos para o Prodan nos diferentes solventes e também os valores calculados utilizando dois métodos teóricos. Um com o modelo contínuo para o solvente e outro realizado após o processo de polarização, usando o

modelo discreto para o solvente. Nesse segundo método, os valores das transições são calculados para as 75 configurações descorrelacionadas estatisticamente, levando em conta a estrutura molecular do solvente ao redor do soluto. Por isso, para cada configuração temos um valor diferente para a transição eletrônica e mostramos esses dados na forma de um histograma.

Figura 4.13: Comparação dos espectros de absorção medidos experimentalmente e normalizados para a banda de maior energia (linhas preta contínua) com os valores calculados utilizando o modelo contínuo SCRF (linhas verticais pretas pontilhada) e com os valores obtidos pelo modelo discreto (histogramas azul e vermelho) nos diferentes solventes. No caso do modelo discreto, as alturas dos histogramas foram ajustadas para serem proporcionais a força do oscilador calculada para cada transição. Os histogramas azuis representam as transições $n - \pi^*$ e os histogramas vermelhos as transições $\pi - \pi^*$.

As transições calculadas, com o modelo discreto para todos os solventes, com exceção da água, representam muito bem as bandas dos espectros de absorção, inclusive para altas energias (maiores que $34.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, Figura 4.13) e a largura da banda de menor energia também é bem descrita com esse modelo (Figura 4.14). Essa banda de menor energia é composta por três transições diferentes (Tabela 4.12), que descrevem bem a largura dessa banda em todos os solventes, com exceção da água, onde as três transições que aparecem separadas para os outros solventes, estão todas juntas (Figura 4.13 e Figura 4.14) ao redor de $28.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Figura 4.14: Resultados apresentados na Figura 4.13, mas focalizando na banda de menor energia. As setas indicam os valores dos comprimentos de onda onde as amostras foram excitadas para medir os espectros de emissão fluorescente. Os histogramas azuis representam as transições $n - \pi^*$ e os histogramas vermelhos as transições $\pi - \pi^*$.

Na Tabela 4.12, temos os valores médios das energias de absorção eletrônica para a banda de menor energia, obtidos com o modelo discreto para o solvente (histogramas colocados nas Figura 4.13 e Figura 4.14). Os valores apresentados são valores médios das 75 configurações usadas no cálculo, para cada transição com o seu erro. Como analisado na Figura 4.14, vemos que em água, as três transições têm valores parecidos e por isso não descrevem a largura da banda. As transições são do tipo $\pi - \pi^*$, $n - \pi^*$ e $\pi - \pi^*$, para a primeira, segunda e terceira, respectivamente. Em acetonitrila, também temos três transições que compõe a banda de menor energia, sendo a primeira de menor energia (26.21×10^3 cm $^{-1}$) uma transição $\pi - \pi^*$, a segunda (28.45×10^3 cm $^{-1}$) é uma transição $n - \pi^*$ e a terceira (30.71×10^3 cm $^{-1}$) é novamente uma transição $\pi - \pi^*$. Em diclorometano, as duas primeiras transições (25.86×10^3 cm $^{-1}$ e 28.77×10^3 cm $^{-1}$) são transições $\pi - \pi^*$ e a terceira (30.83×10^3 cm $^{-1}$) é uma transição $n - \pi^*$. Em ciclohexano, também temos três transições: uma em 6.577×10^3 cm $^{-1}$ que é uma transição $n - \pi^*$ e duas em 28.950×10^3 cm $^{-1}$ e 30.214×10^3 cm $^{-1}$ que são transições do tipo $\pi - \pi^*$. Os valores dessas três transições para a molécula isolada são:

$26.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, $29.1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ e $30.4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Essas transições são muito semelhantes às obtidas em ciclohexano e os tipos de transições também são os mesmos em vácuo e em ciclohexano. O fato da banda de menor energia ser composta por três transições nos solvente acetonitrila, diclorometano e ciclohexano é uma das explicações para o alargamento da banda, pois as bandas são distantes e descrevem bem os espectros de absorção (Figura 4.14). Com modelo contínuo para o solvente, foi possível descrever o máximo do espectro de absorção em todos os solventes. Porém, a largura das bandas não é bem descrita para todos os solventes, somente para o ciclohexano o cálculo com esse modelo consegue descrever a largura das bandas.

Tabela 4.12: Valores das energias de absorção eletrônica calculadas para o Prodan nos diferentes solventes com dois métodos teóricos, usando o modelo discreto para o solvente e usando o modelo contínuo. Valores colocados na Figura 4.13 e Figura 4.14. Valores dados em $\times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Valores calculados para a molécula isolada: Transição 1: $26.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} (n - \pi^)$, Transição 2: $29.1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} (\pi - \pi^*)$ e Transição 3: $30.4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} (\pi - \pi^*)$.*

Transição	Modelo Discreto							
	Ciclohexano		Diclorometano		Acetonitrila		Água	
	λ^{-1}	Tipo	λ^{-1}	Tipo	λ^{-1}	Tipo	λ^{-1}	Tipo
1	26.577(4)	$n - \pi^*$	26.87(2)	$n - \pi^*$	26.21(3)	$\pi - \pi^*$	28.48(3)	$\pi - \pi^*$
2	28.950(4)	$\pi - \pi^*$	28.49(2)	$\pi - \pi^*$	28.45(5)	$n - \pi^*$	28.92(3)	$n - \pi^*$
3	30.214(5)	$\pi - \pi^*$	30.05(2)	$\pi - \pi^*$	30.71(3)	$\pi - \pi^*$	28.82(5)	$\pi - \pi^*$
Modelo Contínuo SCRF								
1	26.91	$n - \pi^*$	27.60	$n - \pi^*$	27.57	$\pi - \pi^*$	27.48	$\pi - \pi^*$
2	28.79	$\pi - \pi^*$	28.00	$\pi - \pi^*$	27.85	$n - \pi^*$	27.90	$n - \pi^*$
3	29.99	$\pi - \pi^*$	29.14	$\pi - \pi^*$	29.08	$\pi - \pi^*$	28.77	$\pi - \pi^*$

Tabela 4.13: Valores dos máximos de absorção da banda de menor energia medidos nesta tese colocados na Tabela 4.2, aqui eles foram transformados para energia.

Solvente	$\lambda^{-1} (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$
Ciclohexano	29.1(2)
Diclorometano	28.2(2)
Acetonitrila	28.4(2)
Água	29.0(2)/27.03(2)

Os resultados presentes na literatura para as transições eletrônicas do Prodan foram calculadas em vácuo, em sua maioria [Nowak et al., 1986; Ilich et al., 1989; Parusel et al., 1997; Huang et al., 2006], como colocado na Tabela 4.14. Os valores publicados para a molécula isolada, em sua maioria, superestimam o valor da primeira transição, λ_1^{-1} , e subestimam o valor da segunda transição, λ_2^{-1} , em comparação com o resultado obtido aqui, que é o resultado mais semelhante com as transições em ciclohexano (solvente que menos interage, pois não existe o espectro de gás do Prodan). A única exceção é a referência [Ilich et al., 1989], onde a energia da segunda transição foi subestimada. Em apenas dois artigos [Lobo et al., 2003; Mennucci et al., 2008], o efeito do solvente foi calculado, utilizando o modelo

contínuo, mas os valores não descrevem o valor máximo do espectro e nem a largura da banda, pois o modelo contínuo do solvente foi utilizado.

Tabela 4.14: Valores das energias de absorção eletrônica para duas transições obtidas na literatura para o Prodan em vácuo e em diferentes solventes considerando apenas o modelo contínuo para o solvente. Os métodos utilizados foram 1 – CNDO/S CI, 2 – INDO/S CISD, 3 – CIS/3-21+G, 4 – AM1/CISD, 5 – TDB3LYP/6-31G* e 6 – TDB3LYP/6-311+G**, 7 – TD MPWB1K/6-311+G** e 8 – INDO/S CIS com modelo discreto para solvente como descrito no texto. Valores dados em $\times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.*

Referências	Vácuo		Ciclohexano		Acetonitrila		Água	
	λ_1^{-1}	λ_2^{-1}	λ_1^{-1}	λ_2^{-1}	λ_1^{-1}	λ_2^{-1}	λ_1^{-1}	λ_2^{-1}
Nowak et al., 1986 ¹	30.6	33.6	-	-	-	-	-	-
Ilich et al., 1988 ²	28.2	27.4	-	-	-	-	-	-
Parusel et al., 1997 ³	39.8	-	-	-	-	-	-	-
Lobo et al., 2003 ⁴	-	-	27.1	28.3	26.7	27.6	-	-
Huang et al., 2006 ⁵	27.8	30.3	-	-	-	-	-	-
Mennucci et al., 2007 ⁶	28.1	30.2	27.0	29.8	26.2	29.3	26.2	29.3
Rowe et al., 2008 ⁷	32.1	34.1	30.9	33.4	-	-	-	-
Nosso Resultado ⁸	26.5	29.1	26.58(4)	28.95(4)	26.21(3)	28.45(5)	28.48(3)	28.92(3)

Na Figura 4.14 e comparando as Tabela 4.12 e Tabela 4.13, é possível verificar que os espectros de absorção do Prodan em ciclohexano, diclorometano e acetonitrila estão bem descritos pelos cálculos teóricos. No caso da água, verificamos que o modelo discreto do solvente com o Prodan rígido, em sua forma neutra e polarizada em água descreve bem a parte da banda de maior energia. Mas não descreve a largura da banda de menor energia, pois não consegue descrever a parte dessa banda referente a menores energias.

A água é o único solvente onde o Prodan forma ligação de hidrogênio, como discutido na Tabela 4.10. Após o processo de polarização, a quantidade de *HB* é ~ 3 no O do Prodan e a energia de ligação é dobrada, $\sim 8 \text{ kcal/mol}$. Essas ligações de hidrogênio podem levar a um alongamento da ligação C=O do Prodan, como foi visto em [Coutinho et al., 1999], para o caso da molécula de acetona em água. O alongamento da ligação pode levar a uma redistribuição de carga na molécula de Prodan como um todo, e pode causar o deslocamento e o alargamento do espectro em água.

Para investigar a influência da ligação de hidrogênio no alongamento na ligação C=O e no deslocamento do espectro de absorção, otimizamos a geometria do Prodan na presença de diferentes elementos, como mostrado na Tabela 4.15, e depois calculamos a energia de absorção dessa nova geometria obtida para o Prodan. O primeiro sistema que otimizamos foi o Prodan na presença de uma molécula de água formando uma *HB* no O5. Esse sistema não foi capaz de alongar muito a ligação C=O e nem de deslocar a transição para menores energias. Colocamos uma carga pontual, do valor da carga do H da água ($0.4238e$, modelo *SPC/E*), a uma distância de $\sim 1.0 \text{ \AA}$ do O5. Isso levou a um estiramento de $0.03 \text{ \AA}$ na ligação e um deslocamento de $0.34 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ na transição, para menores energias. Com isso, podemos

ver que a carga, presente no solvente, tem um papel importante no alongamento da ligação e no deslocamento da banda. Na tentativa de verificar se apenas a presença da carga era suficiente ou se precisávamos dos orbitais atômicos para que o deslocamento ocorresse, realizamos a otimização com um hidrônio (H_3O^+), com uma carga pontual de valor $1.00e$ e também apenas um íon de H^+ , todos colocados a $\sim 1.0 \text{ \AA}$ do O5. Podemos ver que esses sistemas levaram a um deslocamento de 0.08, 0.09 e 0.10 $\text{\AA}$, respectivamente, na ligação $\text{C}=\text{O}$ e deslocamentos de 1.15×10^3 , 1.33×10^3 e $1.50 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ na transição, tendo o maior deslocamento a presença de um íon de H^+ .

Na Tabela 4.15, podemos ver que ambos os efeitos, tanto a presença da carga como a de orbitais moleculares ao redor do átomo O5, levam ao estiramento da ligação e ao deslocamento da banda de absorção eletrônica. Na tentativa de verificar apenas a influência da distância da ligação, realizamos otimizações de geometria do Prodan, mantendo fixa a distância $\text{C}=\text{O}$ em valores entre 1.22 e 1.32 $\text{\AA}$, e para essas geometrias calculamos as transições eletrônicas. A variação da transição eletrônica, em relação ao valor obtido com 1.22 $\text{\AA}$ ($29.1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), em função da variação da distância pode ser visto na Figura 4.15. Podemos ver nessa figura que quanto maior a distância, menor o valor da energia da transição.

Tabela 4.15: Valores da distância da ligação $\text{C}=\text{O}$, após otimização dos sistemas descritos e valor da transição calculada com o Prodan isolado após essas otimizações. CP significa carga pontual. O valor em parênteses é o valor da carga pontual utilizada.

Sistema	C-O ($\text{\AA}$)	Transição ($\times 10^3 \text{ cm}^{-1}$)
Prodan	1.22	29.09
Prodan + $1\text{H}_2\text{O}$	1.23	29.02
Prodan + 1CP(0.4238)	1.25	28.75
Prodan + $1\text{H}_3\text{O}^+$	1.30	27.94
Prodan + 1CP (1.00)	1.31	27.76
Prodan + 1H^+	1.32	27.59

Analisando esses resultados, verificamos que a flexibilidade interna do Prodan pode ser importante, para o caso da água, onde as ligações de hidrogênio podem levar a um estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ e o espectro de absorção não foi bem descrito pela simulação da molécula rígida usando o método MC. Decidimos realizar uma simulação com Dinâmica Molecular do Prodan flexível em água, para verificar se a deformação interna da molécula poderia explicar o alargamento do espectro de absorção e também o seu maior deslocamento para menores energias.

Figura 4.15: Deslocamento da transição eletrônica de menor energia em função da distância C-O do Prodan. As otimizações de geometria foram realizadas com B3LYP/6-31G* com a distância C-O mantida fixa em cada ponto. Os deslocamentos foram obtidos subtraindo-se o valor da transição com a geometria otimizada livremente ($29.1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$).

Definição dos Parâmetros para Dinâmica Molecular (MD) em Água

Para a realização da MD é necessário definir os parâmetros colocados na Seção 2.1.2c nas Eqs. 2.1.12 e 2.1.13. Para os parâmetros do potencial de Lennard-Jones e da interação coulombiana, utilizamos os mesmos valores da simulação de MC, após o processo de polarização. Os valores dos parâmetros que permitem as deformações internas (Eq. 2.1.13) foram retirados do campo de força OPLS (K_r , K_θ e V_n) e os valores r_{eq} e θ_{eq} foram utilizados os obtidos com otimização da geometria com cálculo quântico. Porém, para três ângulos diedros presentes no Prodan, não foi possível encontrar os parâmetros V_n no campo de força OPLS e por esse motivo foi necessário parametrizar esses valores. Os ângulos que precisaram dessa parametrização foram os seguintes: O5-C4-C3-C2, O5-C4-C3-C13, C27-N26-C20-C21, C27-N26-C20-C18, H28-C27-N26-C20, H29-C27-N26-C20, H30-C27-N26-C20, H32-C31-N26-C20, H33-C31-N26-C20 e H34-C31-N26-C20. Esses ângulos podem ser divididos em três grupos, onde os parâmetros V_n são os mesmos: O-C-C-C, C-N-C-C e H-C-N-C.

Figura 4.16: Acima, curvas de energia potencial em função do ângulo de torção O5C4C3C2 para o Prodan, calculada quanticamente (azul), classicamente (vermelha) e a diferença entre elas, o potencial de torção desse ângulo (preto). Abaixo, o ajuste do potencial de torção para encontrar os parâmetros V_n desejados.

O cálculo desses parâmetros foi feito através da diferença de energia entre o potencial quântico e clássico para rotacionar esses ângulos em 360° [Hansson et al., 2010]. Calculamos a curva de energia potencial quântica para rodar o ângulo diedro em 360° , sem otimizar novamente o restante da geometria, apenas rodando o ângulo em passos de 10° . Em cada uma das 37 geometrias rotacionadas, calculamos o potencial clássico utilizado na dinâmica molecular com os termos intramolecular e intermolecular, mas colocando os valores de V_n desejados iguais a zero, para excluir a parte do potencial referente ao ângulo desejado. A diferença entre essas duas curvas de energia potencial é justamente a curva de energia potencial do ângulo desejado, pois ela está presente no cálculo quântico, mas foi excluída do cálculo clássico. Na Figura 4.16, temos um exemplo para o ângulo O5-C4-C3-C2. Acima, as curvas de potencial calculadas quântica e classicamente, assim como a diferença entre elas, que resulta no potencial de torção para esse ângulo. Abaixo, temos o ajuste realizado utilizando a Eq. 2.1.13 para se obter os valores de V_n . Na Tabela 4.16 estão colocados os valores de V_n encontrados para os três grupos de ângulos.

Tabela 4.16: Valores V_n utilizados na dinâmica molecular para os ângulos que pertencem a esses três grupos.

Ângulo	V_1 (kcal/mol)	V_2 (kcal/mol)	V_3 (kcal/mol)
O-C-C-C	1.141	10.331	0.000
C-N-C-C	1.473	17.406	1.293
H-C-N-C	-0.954	3.861	-10.395

Cálculo do Espectro de Absorção em Água após a MD

Para calcular o espectro de absorção após a realização da *MD*, analisamos a função de distribuição de mínima distância para as configurações resultantes da *MD* e verificamos que ela é muito parecida com a função obtida com o *MC* (Figura 4.17). A quantidade de moléculas na primeira e segunda camadas de solvatação também é igual ao obtido com *MC*, ficando em 60 e 226, respectivamente. Na Figura 4.17, podemos ver que na *MD*, o Prodan também forma ligações de hidrogênio com as moléculas de água, pois o mesmo pico em ~ 1.70 Å, que aparece na *MDDF* de *MC* apareceu com a *MD*.

Figura 4.17: Comparação da função de distribuição de mínima distância (MMDF) para a simulação realizada com método de Monte Carlo (linha preta) e com Dinâmica Molecular (linha vermelha).

Analisando as *HB* formadas entre o Prodan e água na simulação de *MD*, utilizando os mesmos critérios que utilizamos para a simulação de *MC* (*HB* se forma quando a distância oxigênio do Prodan – oxigênio da água fosse $R_{OO} \leq 3.3$ Å, o ângulo $\theta(O\hat{H}O) \leq 41^\circ$ e a energia de interação fosse positiva), obtivemos uma média de 2.33 ligações por configuração descorrelacionada. A energia média da ligação é metade do valor encontrado com *MC* (Tabela 4.20), isso acontece porque na simulação com Dinâmica Molecular as duas moléculas (Prodan

e água) têm mais graus de liberdade (flexibilidade interna), permitindo configurações intramoleculares inacessíveis com *MC* e que devem desfavorecer a formação de ligação de hidrogênio. Se o critério para analisar a ligação de hidrogênio for relaxado ($R_{OO} \leq 3.7 \text{ \AA}$, o ângulo $\theta(O\hat{H}O) \leq 50^\circ$), considerando que as moléculas têm maior flexibilidade, obtivemos o valor de 2.46 *HB*. Para termos o mesmo número de *HB* que em *MC*, é preciso que o critério seja $R_{OO} \leq 4.0 \text{ \AA}$, o ângulo $\theta(O\hat{H}O) \leq 50^\circ$, mostrando a influência da flexibilidade intramolecular nas ligações de hidrogênio. Os valores da energia da ligação não mudam muito com a mudança do critério.

*Tabela 4.17: Comparação da análise das ligações de hidrogênio entre os métodos de MC e MD. R_{OH} é o valor médio da ligação entre o oxigênio do Prodan (O5) e hidrogênio da água, $\theta_{O\hat{H}O}$ valor médio do ângulo formado entre o O5 do Prodan, o hidrogênio e o oxigênio da água, E é o valor médio da energia da ligação OH e *HB* é o número médio de ligações de hidrogênio por configuração descorrelacionada. 1 - $R_{OO} \leq 3.3 \text{ \AA}$, o ângulo $\theta(O\hat{H}O) \leq 41^\circ$, 2 - $R_{OO} \leq 3.7 \text{ \AA}$, o ângulo $\theta(O\hat{H}O) \leq 50^\circ$ e 3 - $R_{OO} \leq 4.0 \text{ \AA}$, o ângulo $\theta(O\hat{H}O) \leq 50^\circ$.*

	$R_{OH} \text{ (\AA)}$	$\theta_{O\hat{H}O}$	$E \text{ (kcal/mol)}$	<i>HB</i>
<i>MC</i>	1.86(3)	11.3(9)	8.2(2)	2.67
<i>MD</i> ¹	1.77(3)	11.2(1.0)	4.4(2)	2.33
<i>MD</i> ²	1.82(4)	12.2(1.2)	4.3(2)	2.46
<i>MD</i> ³	1.99(8)	15.6(1.8)	3.9(2)	2.69

Na Figura 4.18, podemos ver que ao incluirmos os graus de liberdade internos da molécula, o histograma das transições é alargado e as três transições que estavam juntas para o caso da molécula rígida em água (Figura 4.14) separam-se e conseguem explicar a largura e a parte da banda de menor energia que aparece em água ao redor de $26.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Com isso, concluímos que para descrever bem o espectro de absorção em água é preciso incluir a flexibilidade intramolecular nas simulações, pois esse solvente apresenta uma forte interação específica com a molécula de Prodan, através de ligações de hidrogênio, que podem causar pequenas alterações na geometria molecular, resultando em um espectro de absorção mais largo. Na Tabela 4.18, temos os valores médios das três transições que compõem a banda de menor energia para o Prodan em água, calculados após a simulação de *MC* e de *DM*. Considerando a flexibilidade interna da molécula, observamos que a primeira transição deslocou para menores energias e as transições têm um erro maior, mostrando a maior largura dos histogramas.

Figura 4.18: Comparação do espectro experimental (linha preta) com os resultados obtidos com a molécula rígida (MC, histograma vermelho aberto) e com a molécula flexível (MD, histograma vermelho fechado) em água. Os histogramas azuis representam as transições $n - \pi^*$ e os histogramas vermelhos as transições $\pi - \pi^*$.

Tabela 4.18: Valores médios das transições eletrônicas do Prodan em água, simulado com método de Monte Carlo (MC) e simulado com Dinâmica Molecular (MD).

Transição	MC	MD
	λ^{-1} (cm $^{-1}$)	λ^{-1} (cm $^{-1}$)
1	28.48(3)	27.15(12)
2	28.92(3)	28.5(7)
3	28.82(5)	28.48(11)

4.1.1d Agregação do Prodan em Água

Existem dois estudos na literatura que indicam que o Prodan forma agregados quando em concentrações superiores a 10 μM [Sun *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 2006]. Porém, realizando medidas em concentrações menores, observamos que uma dependência do tipo $a\lambda^{-n}$ aparecia somada ao espectro de absorção do Prodan em água, indicando, portanto, a presença de agregados que espalham a luz. Esse fato nos levou a considerar a possível agregação do Prodan nesse solvente, mesmo abaixo de 10 μM . Por esse motivo, um estudo mais detalhado da variação da concentração de Prodan em água foi realizado. Para comparação, também realizamos esse estudo no solvente ciclohexano.

Na Figura 4.19 estão colocados os espectros de absorção do Prodan, como função da concentração, medidos em água e em ciclohexano. Podemos observar que, em água, o

espectro muda a sua forma quando a concentração é aumentada. Para baixas concentrações, até $\sim 6 \mu\text{M}$, observamos uma banda em $\sim 280 \text{ nm}$, mas em concentrações maiores essa banda desaparece e aparece uma outra ao redor de 250 nm e essa banda está presente em todas as concentrações até $20 \mu\text{M}$. A banda em 360 nm sofre um pequeno aumento com o aumento da concentração, mas isso será melhor analisado na Figura 4.20. Em ciclohexano, podemos observar que a forma do espectro não muda com o aumento da concentração, somente a intensidade do espectro aumenta e para todas as concentrações, as mesmas bandas estão presentes com seus máximos em $256, 278$ e 344 nm .

Figura 4.19: Espectros de absorção do Prodan medidos em várias concentrações diferentes em (A) água e em (B) ciclohexano.

As modificações na forma do espectro de absorção que ocorrem em água indicam que quando o número de moléculas aumenta, algo acontece que altera a energia dos níveis eletrônicos. Nos espectros medidos em água (Figura 4.19, acima), podemos ver que nas curvas para concentrações mais altas aparece uma curva de espalhamento somada ao espectro de absorção, provavelmente devido a agregados de Prodan que aparecem na amostra. Porém, esse tipo de análise é muito complicado, porque não é possível separar completamente o

espectro de absorção da curva de espalhamento (a descrição de como esses espectros foram analisados está colocada no Apêndice C).

Para entender melhor como a banda de menor energia muda quando a concentração de Prodan é aumentada, os valores da absorbância, em 360 nm para a água e 344 nm para o ciclohexano, foram analisados em função da concentração e estão colocadas na Figura 4.20. A banda de menor energia foi escolhida porque ela tem a menor influência da luz espalhada. O valor da absorbância em função da concentração de centros absorvedores pode ser descrita pela Lei de Lambert-Beer, para um comprimento de onda específico, como colocado na Seção 2.2.1c. Se reações ou interações entre os centros absorvedores acontecem, então essa lei não é necessariamente obedecida e a absorbância não terá uma dependência linear com a concentração. Na Figura 4.20, podemos observar que para o Prodan em ciclohexano, a Lei de Lambert-Beer é válida. No entanto, para o Prodan em água, não existe nenhuma região de concentrações onde um comportamento linear foi observado, mesmo para concentrações muito baixas (Figura 4.20, abaixo). Então, podemos concluir que existe algum tipo de interação entre as moléculas de Prodan quando colocadas em água, mesmo nas menores concentrações aqui estudadas.

Figura 4.20: Valores das absorbâncias em 344 nm para o ciclohexano (preto) e em 360 nm para a água (vermelho) em função da concentração. Os valores são médias de quatro medidas e a barra de erro é o desvio padrão.

Para verificar a existência e a estabilidade dos agregados de Prodan em meio aquoso, calculamos a energia livre de solvatação do Prodan em água e em um líquido formado apenas por moléculas de Prodan. A simulação de um líquido de moléculas grandes, como o Prodan, pode ser iniciada de duas maneiras: partindo de um gás (densidade muito baixa) e deixar o sistema evoluir para a sua densidade de líquido, ou iniciar a simulação a partir de uma rede cristalina orientada e deixar o sistema evoluir para a conformação líquida. Os dois modos são muito custosos computacionalmente. Nesta tese decidimos partir de uma densidade baixa e deixar o sistema evoluir para a fase líquida, como descrito na Seção 3.3.2. Somente depois que o sistema atingiu a fase líquida e estava com densidade e energia estabilizadas, foi possível iniciar o cálculo da energia livre.

Cálculos de energia livre são bastante complicados computacionalmente e somente o cálculo de diferenças de energia pode ser obtido e não os valores absolutos. Como descrito na 2.1.2e, existem diversos métodos para realizar esses cálculos, como integração termodinâmica, perturbação da energia livre, entre outros [Pearlman *et al.*, 1998]. Nesta tese utilizamos o método de perturbação da energia livre, como implementado no programa DICE [Coutinho *et al.*, 2003]. Como descrito na Seção 3.3.2, esses cálculos precisam ser realizados em diversos passos, para que as variações de energia quem levam o sistema de um estado para outro sejam pequenas. A convergência das variações de energia também é bastante delicada e precisa de muitos ciclos de simulação para ser atingida. Mais detalhes de como foi realizado esse cálculo estão colocados nas Seções 2.1.2e e 3.3.2.

Uma ilustração do cálculo realizado está colocada na Figura 4.21. Por facilidade computacional, a energia de aniquilação é calculada e a energia de solvatação é o negativo desse valor. Os valores obtidos para essas energias estão colocados na Tabela 4.19.

Figura 4.21: Ilustração do cálculo da energia livre de solvatação para o Prodan em água (esquerda) e para o Prodan em líquido de Prodan (direita). A energia livre de aniquilação é o negativo da energia livre de solvatação, a ilustração seria com as setas invertidas para essa energia.

Tabela 4.19: Valores das energias de solvatação para o Prodan em água e em líquido de Prodan. Todos os valores estão em kcal/mol.

	Água	Prodan
Eletrostática	-19.5	-6.2
van der Waals	-20.3	-33.6
Cavitação	10.1	1.0
$\Delta G_{\text{solvatação}}$	-29.6	-38.8

Na Tabela 4.19, podemos ver que o Prodan solvata melhor em líquido de Prodan do que em água. A energia de interação eletrostática é mais forte em água, mas a energia de interação de van der Waals é mais forte no Prodan líquido. Porém, essas diferenças cancelam-se quando somamos os dois tipos de interações, para cada um dos solventes. A grande diferença entre os dois solventes é a energia de cavitação, ou seja, a energia necessária para

abrir o espaço necessário para colocar a molécula de Prodan em cada um dos solventes. Na água, essa energia é muito maior, pois é necessário perturbar muito as moléculas de água para colocar a molécula de Prodan, é preciso deslocar muitas moléculas. Já no líquido de Prodan isso não acontece. Movimentando poucas moléculas, já é possível abrir espaço para colocar o Prodan. Esse resultado mostra que moléculas de Prodan preferem interagir com outras moléculas de Prodan do que com as moléculas de água.

Na tentativa de descrever os espectros de absorção medidos em alta e baixa concentração de Prodan em água, realizamos cálculos quânticos de dímeros de Prodan selecionados da simulação do líquido de Prodan. Esses cálculos foram realizados para 75 configurações de dímeros de Prodan selecionadas dentro do líquido entre as moléculas mais próximas. Realizar simulações desses dímeros em água, para a obtenção dos seus espectros nesse solvente, é computacionalmente muito custoso. Como os resultados obtidos para uma molécula de Prodan com o modelo contínuo (Tabela 4.12), foram razoáveis para descrever a posição da banda, utilizamos essa metodologia para obter as posições das bandas do dímero. Foram realizados 75 cálculos, um para cada configuração de dímero retirados do líquido de Prodan. Os valores médios das transições para os dímeros e para uma molécula de Prodan em água simulada com *DM* estão colocados na Tabela 4.20. Analisando os orbitais envolvidos nessas transições, podemos ver que para o monômero temos apenas uma transição $n - \pi^*$ (transição 2) e para o dímero temos duas transições desse tipo (transições 1 e 2), as outras transições são todas $\pi - \pi^*$, para ambos os casos. Na Tabela 4.20, podemos ver que o monômero em água tem apenas três transições abaixo de $31.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, enquanto o dímero tem cinco transições nessa região. Os valores para energias maiores são diferentes entre o monômero e o dímero.

Tabela 4.20: Valores médios das transições eletrônicas para uma molécula de Prodan em água simulada com Dinâmica Molecular (MD) e dímeros de Prodan retirados da simulação do líquido de Prodan, com transições calculadas com SCRF em água.

Monômero		Dímero	
Transição	$\lambda^{-1} (\text{cm}^{-1})$	Transição	$\lambda^{-1} (\text{cm}^{-1})$
1	27.15(12)	1*	27.23(5)
2*	28.5(7)	2*	27.31(5)
3	28.48(11)	3	28.88(4)
4	35.64(8)	4	29.04(4)
5	37.34(8)	5	30.86(10)
6	37.64(9)	6	31.38(8)
7	40.18(7)	7	36.6(3)
8	42.54(7)	8	38.0(2)
		9	39.2(2)
		10	39.72(14)
		11	40.9(2)

Transições $n - \pi^$

Figura 4.22: Comparação entre os valores calculados teoricamente para as transições do monômero (linha vertical tracejada preta, acima) e do dímero (linha vertical tracejada vermelha, abaixo) e os espectros experimentais medidos em duas concentrações diferentes, 1.2 μM (linha preta) e 20.0 μM (linha vermelha). As alturas verticais dos valores teóricos são proporcionais às forças de oscilador obtidas para cada transição.

Na Figura 4.22, as linhas verticais são os valores teóricos e as suas alturas são proporcionais à força de oscilador obtida para cada transição, indicando a intensidade da transição. Para comparação um espectro em alta concentração (20.0 μM) e um em baixa concentração (1.2 μM) também estão mostrados na Figura 4.22. Comparando as linhas verticais com os espectros, podemos ver que as linhas pretas tracejadas, devido às transições do monômero, estão mais presentes nas bandas do espectro em baixa concentração (linha preta), quando provavelmente temos mais monômeros em solução (Figura 4.22A). Para o dímero (linhas verticais vermelhas), as transições estão mais deslocadas para maiores energias (menores comprimentos de onda). Existem duas transições para o dímero, que são muito semelhantes à banda experimental que aparece para concentrações acima de $\sim 8.0 \mu\text{M}$, em $\sim 40.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ (250 nm) transições 10 e 11 (Figura 4.22B). Essas transições não estão presentes no espectro teórico do monômero. O dímero também tem quatro transições presentes na banda de menor energia ($33.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), que podem estar presentes nos dados experimentais, superposta pelas outras bandas, levando ao pequeno aumento dessa banda com

o aumento da concentração. Podemos verificar que a banda em $\sim 35.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ (280 nm), que diminui com o aumento da concentração, é melhor descrita pelas transições no monômero, pois temos mais transições nessa região, levando a uma banda mais intensa (Figura 4.22A). Porém, ela também está presente no espectro em altas concentrações e pode ser descrita por duas transições do dímero que aparecem nessa região, transições 7 e 8 (Figura 4.22B). Essas comparações mostram que o espectro do Prodan em altas concentrações pode ser descrito pelas transições de agregados de Prodan, indicando a presença dos mesmos em soluções de Prodan. Provavelmente, os espectros em baixas concentrações são melhores descritos por uma única molécula de Prodan, porque essas são mais abundantes nessas concentrações. Para concentrações maiores, mais agregados são formados e o espectro fica mais parecido com o espectro de agregados de Prodan.

Na Figura 4.23, podemos ver a variação do espectro de emissão com a concentração de Prodan. A normalização dos espectros mostra que eles têm o mesmo formato, com as mesmas bandas. Portanto, diferente do que acontece para a absorção (Figura 4.19), o formato do espectro de emissão não muda com a variação da concentração do Prodan, sugerindo que as mesmas bandas estão presentes em todas as concentrações.

Figura 4.23: Variação do espectro de emissão com a variação da concentração de Prodan em água. O gráfico na parte interna mostra os espectros normalizados. A banda que aparece em $\sim 410 \text{ nm}$ é o Raman da água devido a excitação da luz feita em 360 nm .

Analizamos também a variação da área do espectro de emissão fluorescente em função da concentração, tanto para o Prodan em água (espectros da Figura 4.23) como para o Prodan em ciclohexano (espectro não mostrado aqui, mas a sua forma também não muda com o aumento da concentração). Essas áreas em função da concentração estão colocadas na Figura 4.24 e podemos ver que para o ciclohexano temos um comportamento linear dessa área em função da concentração, do mesmo modo como aconteceu para a absorção (Figura 4.20). Porém para a água, o comportamento do espectro de emissão em função da concentração é muito diferente do comportamento observado no espectro de absorção (Figura 4.20).

Figura 4.24: Variação da área total do espectro de emissão em função da concentração de Prodan em água (pontos vermelho) e em ciclohexano (pontos preto). As linhas pontilhadas são ajustes lineares, na região linear.

Na Figura 4.24, observamos que a área do espectro de emissão em água aumenta quase linearmente com o crescimento da concentração. Esse é um comportamento surpreendente, já que a absorção de luz ($\lambda_{exc} = 360$ nm), não cresce linearmente (Figura 4.20). Podemos tentar explicá-lo, considerando que ao agregar, alguns graus de liberdade vibracionais e rotacionais podem ser impedidos, devido à proximidade das moléculas de Prodan. Esse impedimento pode eliminar alguns decaimentos não-radioativos relacionados

com esses graus de liberdade, levando a um aumento no rendimento quântico do Prodan agregado. Apesar de estar absorvendo a mesma quantidade de luz, com o aumento da concentração (Figura 4.20), devido ao aumento no rendimento quântico ao formar agregados, a emissão fluorescente aumenta com a variação da concentração.

Os artigos que determinam 10 μM como uma concentração de agregação do Prodan [Sun *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 2006], fazem isso analisando o espectro de emissão. Eles afirmam que ao agregar, o Prodan apresenta uma banda de emissão fluorescente em 430 nm, deslocada do máximo de emissão em água, que é em 520 nm. Essa banda varia a sua intensidade com a concentração de Prodan adicionada e a razão I_{430}/I_{520} é usada para definir a concentração de agregação. Porém, nos nossos dados (Figura 4.23) não observamos essa banda em 430 nm com o aumento da concentração. Uma explicação para esse fato está dada na referência [Sun *et al.*, 1997], onde as amostras são preparadas de duas maneiras diferentes e apenas uma delas apresenta esse pico em 430 nm. As amostras, onde a alíquota da solução estoque da sonda em solvente orgânico, foi adicionada diretamente ao volume desejado de água, apresentam essa banda e eles também mostram que a intensidade da banda depende do solvente orgânico, no qual a sonda estava armazenada. Porém, as amostras onde o solvente orgânico foi totalmente evaporado, ou seja, sem vestígios do mesmo na solução final, não apresentam esse pico. Neste trabalho, preparamos as amostras desse segundo modo e trabalhamos sempre diluindo da concentração mais alta para a mais baixa e esperando o tempo necessário para a estabilização do sistema (~ 10 min), antes de realizar as medidas.

4.1.2 Bicamadas Lipídicas

4.1.2a Espectro de Absorção Experimental do Prodan e Laurdan

Apenas um artigo na literatura mostra o espectro de absorção do Prodan e Laurdan em bicamadas lipídicas de DLPC e DPPC, mas apenas a 20 °C para ambos os lipídios [Parasassi *et al.*, 1991]. Por isso decidimos realizar um estudo mais detalhado. A medida desses espectros é bastante delicada, pois essas sondas têm um coeficiente de absorção (ϵ , Eq. 2.2.8) pequeno e a presença das vesículas lipídicas espalha a luz. Portanto, o espectro de absorção aparece somado a uma curva de espalhamento de luz, dificultando as medidas. A análise detalhada utilizada para obter os espectros de absorção mostrados nas figuras seguintes está colocada no Apêndice C.

Para estudar o espectro de absorção do Prodan e Laurdan em bicamadas lipídicas, utilizamos as bicamadas de DLPC ($T_m \sim 0$ °C) [Marsh, 1990] e DPPC ($T_m \sim 41$ °C) [Riske *et*

al., 2009]. Nas temperaturas estudadas (10, 20 e 45 °C), a bicamada de DLPC está na fase fluída e a bicamada de DPPC está na fase gel em 10 e 20 °C e na fase fluída em 45 °C.

Figura 4.25: Espectro de absorção de 4 μM Prodan (linha preta) e de 4 μM Laurdan (linha vermelha) em 1 mM de DLPC, a diferentes temperaturas.

Na Figura 4.25, temos os espectros de absorção do Laurdan e Prodan em bicamadas de DLPC, nas três temperaturas medidas. Podemos ver que os espectros são muito semelhantes para as duas sondas, apresentando as mesmas bandas de absorção. O espectro do Laurdan apresenta um pequeno deslocamento para menores energias em relação ao espectro do Prodan e isso fica mais evidente na Figura 4.26, onde está destacada a banda de menor energia. Nessa figura também podemos observar que a banda de menor energia é bastante larga ($\sim 5.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) e parece apresentar dois picos, um em $\sim 355 \text{ nm}$ e outro em $\sim 385 \text{ nm}$.

Figura 4.26: Banda de menor energia do espectro de absorção de 4 μM Prodan (linha preta) e de 4 μM Laurdan (linha vermelha) em 1 mM de DLPC formando bicamadas em diferentes temperaturas.

Na Figura 4.27, vemos que os espectros medidos nas diferentes temperaturas, para as duas sondas em DLPC não sofrem alterações em sua forma e intensidade, com a variação da temperatura. Como sabemos que a bicamada de DLPC tem mais mobilidade com o aumento da temperatura [De Vequi-Suplicy *et al.*, 2006], concluímos que os espectros de absorção do Prodan e Laurdan não são sensíveis a esse aumento de mobilidade/desordem do micro-ambiente onde elas estão localizadas.

Comparando os espectros medidos para as duas sondas, concluímos que o estado fundamental do Laurdan e do Prodan são muito semelhantes em bicamadas de DLPC (Figura 4.25 e Figura 4.26). Este resultado é semelhante ao resultado obtido com as sondas nos diferentes solventes (Figura 4.5 e Figura 4.6).

Figura 4.27: Comparação dos espectros de absorção do Prodan (acima) e Laurdan (abaixo) em DLPC medidos nas várias temperaturas.

Na Figura 4.28, temos os espectros de absorção do Laurdan e Prodan em bicamadas de DPPC ($T_m = 41\text{ °C}$), também nas três temperaturas medidas. Como esse lipídio está na fase gel às temperaturas de 10 e 20 °C, a bicamada lipídica apresenta um grande espalhamento, o que dificulta a obtenção dos espectros de absorção, não sendo possível a análise do espectro em menores comprimentos de onda. Por isso, tanto a posição das bandas em baixo comprimento de onda (maior influência do espalhamento) como a intensidade das bandas não podem ser analisadas. Na Figura 4.28, podemos ver que os espectros a 20 e 45 °C, os espectros do Prodan e do Laurdan são muito semelhantes, apesar de a 20 °C, o DPPC ainda estar na fase gel. A 10 °C, os espectros não são tão semelhantes, o espectro do Laurdan está deslocado para maiores comprimentos de onda em relação ao espectro do Prodan nessa mesma temperatura. Porém, analisar esse deslocamento é muito complicado, devido à grande dificuldade de obter esses espectros experimentalmente.

Figura 4.28: Banda de menor energia normalizada do espectro de absorção de 4 μM Prodan (linha preta) e de 4 μM Laurdan (linha vermelha) em 1 mM de DPPC formando bicamadas em diferentes temperaturas.

A comparação desses espectros nas diferentes temperaturas está colocada na Figura 4.29. Para o Prodan (Figura 4.29), os espectros não são alterados com a variação da temperatura, que no caso desse lipídio, implica na mudança da fase do lipídio ($T_m \sim 41^\circ\text{C}$, [Riske *et al.*, 2009]). Isso mostra que o espectro de absorção do Prodan não é sensível à fase da bicamada lipídica. Os espectros de absorção do Laurdan (Figura 4.29) parecem apresentar um deslocamento para menores comprimentos de onda com o aumento da temperatura, mas esse deslocamento não parece estar diretamente relacionado com a transição de fase do lipídio, que acontece em 41°C . Essa variação do espectro pode estar relacionada com a mobilidade da bicamada que aumenta com o aumento da temperatura, mesmo o lipídio estando na fase gel [Riske *et al.*, 2009]. Porém, essa conclusão deve ser considerada com muito cuidado, devido à grande dificuldade experimental em obter esses espectros.

Figura 4.29: Comparação dos espectros de absorção do Prodan e Laurdan em DPPC medidos nas várias temperaturas.

Uma comparação dos espectros medidos em bicamadas e em solventes está colocada na Figura 4.30. Para o Laurdan colocamos o solvente metanol, como de maior polaridade para comparação, pois o espectro dessa sonda não pode ser medido em água. Podemos verificar que os espectros medidos em bicamadas são muito diferentes do espectro medido em ciclohexano e muito parecidos com o espectro medido em metanol e em água, para o caso do Prodan. Isso confirma a proposta colocada na referência [Parasassi *et al.*, 1998], que essas sondas não estão no interior da bicamada, mas estão numa posição mais superficial, num ambiente com maior polaridade. Também podemos observar que os espectros medidos em bicamadas são largos, assim como os medidos em solventes de maior polaridade. Portanto, essa banda de absorção deve também ser composta de várias transições eletrônicas, assim como acontece nos diferentes solventes, onde essas transições foram calculadas (Figura 4.14 e Figura 4.18), indicando que as sondas são excitadas para três estados diferentes. Como está discutido na Seção 4.2, o espectro de emissão fluorescente dessas sondas é muito mais sensível ao ambiente e à região da bicamada monitorada.

Figura 4.30: Comparação dos espectros de absorção do Prodan e Laurdan em bicamadas de DLPC e DPPC com os espectros de absorção medidos em ciclohexano e em metanol. O metanol foi usado para comparação, pois não é possível medir o espectro de absorção do Laurdan em água.

4.2 Efeito do Ambiente no Espectro de Emissão Fluorescente

Nesta seção vamos analisar o efeito de ambientes homogêneos (diferentes solventes) e ambientes heterogêneos (bicamadas lipídicas) nos espectros de emissão fluorescente das sondas Prodan e Laurdan e também nos tempos de vida do estado excitado. Também conseguimos propor um método para analisar os espectros dessas sondas nos diferentes ambientes.

4.2.1 Diferentes Solventes

4.2.1a Espectros de Emissão Fluorescente do Prodan e Laurdan

Os espectros de emissão fluorescente do Prodan e do Laurdan foram medidos nos mesmos solventes onde medimos a absorção eletrônica (Seção 4.1.1). Na Figura 4.31, estão colocados os espectros para o Prodan. Podemos ver que, em geral, com o aumento da polaridade do solvente, o espectro desloca-se para maiores comprimentos de onda, ou seja, menores energias. Ao contrário do que acontece na absorção, onde o deslocamento do

espectro de absorção com a polaridade do solvente é pequeno, o espectro de emissão desloca-se em ~ 125 nm ($\sim 6.0 \times 10^3$ cm^{-1}) com o aumento da polaridade do solvente, indo de ~ 395 nm em ciclohexano até ~ 520 nm em água. Para o Laurdan (Figura 4.32), também observamos o mesmo deslocamento, porém o espectro em água não pode ser medido e o deslocamento é visto até o solvente metanol, sendo de ~ 100 nm ($\sim 5.0 \times 10^3$ cm^{-1}), indo de ~ 395 nm em ciclohexano até 495 nm em metanol. Esses espectros mostram que o estado excitado dessas sondas é mais sensível à polaridade do solvente do que o estado fundamental, onde os espectros de absorção não sofrem grandes deslocamentos, como colocado nas Figura 4.2 e Figura 4.4. Isso está de acordo com os resultados colocados na Seção 4.1.1a e também com os resultados da literatura [Weber *et al.*, 1979; Catalan *et al.*, 1991; Bunker *et al.*, 1993; Moyano *et al.*, 2006]. Os espectros da Figura 4.31 e Figura 4.32 foram medidos em três temperaturas diferentes (10, 25 e 45 °C) e não observamos nenhuma alteração na forma do espectro, apenas na intensidade, assim como observamos para a absorção. Para maiores temperaturas os espectros são menos intensos, pois as taxas de decaimentos não-radioativo aumentam com a temperatura [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006].

Figura 4.31: Espectro de emissão fluorescente de 4 μM de Prodan em diferentes solventes normalizados e medidos a 25 °C.

Figura 4.32: Espectro de emissão fluorescente de 4 µM de Laurdan em diferentes solventes, normalizados e medidos a 25 °C. A medida realizada em água não apresenta nenhum pico, como observado para a absorção, devido à insolubilidade dessa sonda nesse solvente.

Comparando os espectros do Prodan e Laurdan nos diferentes solventes (Figura 4.33), vemos que eles são semelhantes em todos os solventes, apresentando apenas pequenas diferenças em acetonitrila e ciclohexano. Isso indica que o estado excitado, ou estados excitados, dessas duas sondas também são muito semelhantes e são alterados do mesmo modo pela variação da polaridade do solvente.

Diversos artigos na literatura apresentam os espectros de emissão fluorescente do Prodan em diferentes solventes [Weber *et al.*, 1979; Heisel *et al.*, 1987; Balter *et al.*, 1988; Catalan *et al.*, 1991; Bunker *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1997; Lobo *et al.*, 2003; Moyano *et al.*, 2006; Tomin *et al.*, 2006; Artukhov *et al.*, 2007; Rowe *et al.*, 2008] e os resultados apresentados aqui são semelhantes aos já publicados. Porém, para o Laurdan, apenas um artigo mostra os espectros de emissão fluorescente, em apenas quatro solventes diferentes [Kawski *et al.*, 2000b]. Não existe na literatura, até o momento, uma comparação entre os espectros das duas sondas, o que possibilita saber se os estados excitados das duas sondas são semelhantes.

Figura 4.33: Comparação dos espectros de emissão do Prodan (linha preta) com o Laurdan (linha vermelha) nos diferentes solventes.

4.2.1b Equação de Lippert-Mataga

Diversos artigos na literatura aplicam a equação de Lippert-Mataga (Eq. 4.1 e Seção 2.2.2a) ou uma adaptação dela (que usa os espectros no mesmo solvente, mas em diferentes temperaturas, chamado de deslocamento termocrômico), para obter a diferença de dipolos entre o estado fundamental e o estado excitado do Prodan [Weber *et al.*, 1979; Balter *et al.*, 1988; Catalan *et al.*, 1991; Bunker *et al.*, 1993; Kawski, 1999; Kawski *et al.*, 2000a] :

$$\nu_{ab} - \nu_{em} = \frac{2\Delta f}{hca^3} (\mu_E - \mu_G)^2 + \text{constante} . \quad (4.1)$$

Porém, os valores encontrados são bastante diferentes, variando de 4.0 D [Kawski, 1999] até 20 D [Weber *et al.*, 1979], como mostrado na Tabela 4.21. Acharmos que essa variação é tão grande por dois motivos. O primeiro é a variação do valor utilizado como o valor máximo do espectro de absorção (ν_{ab}) que entra no cálculo do deslocamento de Stokes da equação de Lippert-Mataga (Seção 2.2.2a), pois os espectros de absorção são bastante largos, dificultando a obtenção da posição exata do valor máximo da banda (Figura 4.34 e Figura 4.35). O segundo é a definição do raio da cavidade do soluto (a), usado nessa mesma

equação. Como o Prodan e o Laurdan são moléculas que têm uma dimensão maior do que a outra, sendo assim moléculas alongadas (Tabela 4.22), a definição de um raio para uma cavidade esférica é muito complicada. Na maioria dos artigos o valor utilizado para esse raio da cavidade é de 4.2 Å (Tabela 4.21), com o argumento que dados cristalográficos em moléculas derivadas do naftaleno mostram que a distância entre o N e O é 8.4 Å e por isso o raio deve ser 4.2 Å [Weber *et al.*, 1979].

Tabela 4.21: Valores das diferenças entre o dipolo do estado excitado e o dipolo do estado fundamental presentes na literatura para o Prodan.

Artigo	Método	a (Å)	$\mu_e - \mu_g$ (D)
Weber <i>et al.</i> , 1979	Eq. de Lippert – Solventes	4.2	20
	Eq. de Lippert – Temperatura	4.2	14.8
Balter <i>et al.</i> , 1988	Eq. de Lippert – Solventes	4.2	10
Catalan <i>et al.</i> , 1991	Eq. de Lippert – Solventes	4.7	7.0
Bunker <i>et al.</i> , 1993	Eq. de Lippert – Solventes	4.2	6.3
Kawski, 1999	Perturbação do Solvente	4.2/4.6	4.0/5.0
Kawski <i>et al.</i> , 2000a	Eq. de Lippert – Temperatura	4.2/4.6	4.2/4.8

Tabela 4.22: Valores das maiores distâncias intermoleculares das moléculas Prodan e Laurdan, em cada um dos eixos cartesianos, após a otimização da geometria molecular. A molécula foi colocada no plano xy, com a sua maior dimensão no eixo x. Valores medidos na geometria otimizada com cálculos quânticos como descrito na Seção 4.1.1c.

Molécula	x	y	z
Prodan	12.5	5.6	1.8
Laurdan	24.7	5.6	1.8

Na Figura 4.34 e Figura 4.35, temos os espectros de emissão (linha preta) e os espectros de absorção (linha vermelha) do Prodan e do Laurdan, respectivamente, para cada solvente. Nessas figuras, é possível verificar o deslocamento de Stokes para cada solvente. Os valores dos deslocamentos medidos estão colocados na Tabela 4.23, assim como os valores de ν_{ab} , ν_{em} e Δf para cada solvente. Podemos ver nessa tabela que os valores de deslocamento para o Prodan e Laurdan são muito semelhantes, pois tanto os espectros de absorção como os espectros de emissão são muito semelhantes.

Figura 4.34: Deslocamento de Stokes para o Prodan nos diferentes solventes. Os espectros estão colocados em função da energia. Linha preta é o espectro de emissão fluorescente e linha vermelha é o espectro de absorção. As linhas verticais são os valores utilizados para calcular o deslocamento de Stokes.

Figura 4.35: Deslocamento de Stokes para o Laurdan nos diferentes solventes. Os espectros estão colocados em função da energia. Linha preta é o espectro de emissão fluorescente e linha vermelha é o espectro de absorção. As linhas verticais são os valores utilizados para calcular o deslocamento de Stokes.

Tabela 4.23: Valores dos máximos de absorção (ν_{ab}) e de emissão (ν_{em}) usados para calcular o deslocamento de Stokes ($\nu_{ab} - \nu_{em}$) para o Prodan (acima) e para o Laurdan (abaixo) e o valor da polarizabilidade de orientação (Δf) de cada solvente.

Prodan				
Solvente	Δf	$\nu_{ab} (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$	$\nu_{em} (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$	$(\nu_{ab} - \nu_{em}) (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$
Água	0.32	27.8	19.1	8.7
Metanol	0.31	27.5	20.0	7.5
Acetonitrila	0.30	28.4	21.1	7.3
Diclorometano	0.22	28.1	22.5	5.6
Clorofórmio	0.15	27.8	22.7	5.1
Ciclohexano	0.00	29.1	25.0	4.1
Laurdan				
Solvente	Δf	$\nu_{ab} (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$	$\nu_{em} (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$	$(\nu_{ab} - \nu_{em}) (\times 10^3 \text{ cm}^{-1})$
Metanol	0.31	27.4	20.0	7.4
Acetonitrila	0.30	28.2	21.2	6.9
Diclorometano	0.22	27.8	22.6	5.2
Clorofórmio	0.15	27.8	22.7	5.1
Ciclohexano	0.00	29.1	25.2	3.9

Para discutir melhor porque a equação de Lippert-Mataga não é um bom método para a obtenção da diferença de dipolo entre o estado fundamental e o estado excitado, vamos aplicá-la aos dados da Tabela 4.23. Na Figura 4.36, temos o ajuste da equação de Lippert-Mataga para os deslocamentos colocados na Tabela 4.23, para o Prodan (direita) e Laurdan (esquerda). Para todos os solventes, com exceção da água (ponto 6) no Prodan, é possível ajustar uma reta e obter os valores da diferença entre os dipolos do estado fundamental e excitado (Tabela 4.24). Como citado anteriormente, o raio da cavidade (a) considerado na equação de Lippert-Mataga é um fator importante na determinação dessa diferença de dipolos. Então, analisamos como a diferença de dipolo varia com diferentes valores para o raio da cavidade, considerando o valor mais utilizado na literatura, 4.2 Å (Tabela 4.21), e também considerando o raio da cavidade como metade da maior dimensão das sondas colocadas na Tabela 4.22.

Figura 4.36: Ajuste da equação de Lippert-Mataga para os deslocamentos de Stokes mostrados na Tabela 4.23 para o Laurdan (esquerda) e o Prodan (direita). Os pontos mostrados são 1 – ciclohexano, 2 – clorofórmio, 3 – diclorometano, 4 – acetonitrila, 5 – metanol e para o Prodan: 6 – água.

Na Tabela 4.24, temos os valores da diferença $\mu_E - \mu_G$ obtidos para os diferentes valores de a . Como o raio da cavidade entra na expressão de determinação de $\mu_E - \mu_G$ elevado a $3/2$, uma pequena variação nesse parâmetro leva a uma variação considerável na diferença dos dipolos. Uma variação de $1.4 \text{ \AA}$ em a , leva a uma variação de 47% no valor de $\mu_E - \mu_G$ (Tabela 4.24). Observando que os espectros de emissão e os deslocamentos de Stokes para o Prodan e o Laurdan são muito parecidos (Figura 4.33 e Tabela 4.23), a diferença $\mu_E - \mu_G$ deve ser parecida para as duas moléculas, pois o fluoróforo deve ser o mesmo para as duas sondas. Porém, se usamos metade da maior dimensão para cada uma delas, os valores são muito diferentes, para o Prodan 15.0 D e para o Laurdan 46.7 D, mostrando que nesse caso devemos considerar apenas o raio do cromóforo para o Laurdan, que seria o mesmo que para o Prodan.

Considerando os dois motivos que levam a uma variação tão grande nos valores de $\mu_E - \mu_G$, a largura dos espectros de absorção e emissão, que dificultam a determinação de $v_{ab} - v_{em}$ e a dificuldade de determinar o raio da cavidade para moléculas alongadas, podemos concluir que para essas duas moléculas, essa metodologia não é boa para a determinação da diferença $\mu_E - \mu_G$ e conseqüentemente para a obtenção dos valores de μ_E e μ_G , experimentalmente. Para entender melhor as alterações que ocorrem quando essas moléculas são excitadas, é

necessário realizar a construção de um modelo teórico para as mesmas no estado excitado. Essa modelagem é mais complicada, do que a modelagem para o estado fundamental (Seção 4.1.1c) realizada para o Prodan e pretendemos realizá-la.

Tabela 4.24: Valores da diferença de dipolo do estado fundamental e do estado excitado calculadas utilizando a equação de Lippert-Mataga, para diferentes valores do raio da cavidade esférica (a).

	Prodan	Laurdan
a (Å)	$\mu_E - \mu_G$ (D)	$\mu_E - \mu_G$ (D)
4.2	8.6	8.4
5.6	13.2	12.9
6.1	15.0	14.7
8.4	24.2	23.7
12.4	47.7	46.7

4.2.1c Decomposição dos Espectros de Emissão Fluorescente

Os espectros de emissão fluorescente medidos para as duas sondas são assimétricos, o que pode indicar a presença de duas ou mais bandas de emissão na composição desses espectros, ou seja, a presença de vários estados excitados. Na literatura existem alguns artigos que mencionam que o Prodan teria duas bandas de emissão em solventes homogêneos [Lakowicz *et al.*, 1982b; Lakowicz *et al.*, 1982a; Heisel *et al.*, 1987; Balter *et al.*, 1988; Moyano *et al.*, 2006; Tomin *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2008]. Porém, eles analisam apenas solventes de polaridade mais alta, como água ou acetonitrila e, em geral, atribuem o aparecimento de uma segunda banda à relaxação com o solvente de maior polaridade. Apenas um artigo propõe a existência de duas bandas de emissão tanto em solventes de baixa polaridade (ciclohexano e tolueno), como de alta polaridade (água e metanol), medindo o tempo de vida do estado excitado de duas bandas e também a posição delas [Rowe *et al.*, 2008].

Figura 4.37: Ajuste das gaussianas nos espectro de emissão fluorescente de $4 \mu\text{M}$ de Prodan em diferentes solventes, medidos a 25°C . Espectro experimental (preto), gaussiana total (vermelho), gaussiana 1 (verde) e gaussiana 2 (azul).

Figura 4.38: Ajuste das gaussianas nos espectro de emissão fluorescente de $4 \mu\text{M}$ de Laurdan em diferentes solventes medidos a 25°C . Espectro experimental (preto), gaussiana total (vermelho), gaussiana 1 (verde) e gaussiana 2 (azul).

Para analisar esses espectros de modo a quantificar as duas bandas de emissão, propusemos um método de análise que consiste em decompor os espectros de emissão em duas gaussianas e analisar a porcentagem da área de cada gaussiana em relação à área total do espectro. Desse modo, é possível analisar como a população de cada banda está variando, por exemplo, quando variamos a polaridade do solvente, pois a população de um estado excitado está diretamente relacionada à área do seu espectro de emissão [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006]. Todos os espectros medidos em solventes foram bem decompostos em duas gaussianas com $\chi^2 = 1.00$, como mostrado na Figura 4.37, para o Prodan, e na Figura 4.38, para o Laurdan. Uma descrição detalhada de como esses ajustes foram realizados está colocada no Apêndice C. O fato dos espectros das duas sondas, em todos os solventes, serem bem descritos por duas gaussianas, indica que o estado excitado dessas sondas é composto por, pelo menos, dois estados excitados.

Como resultado do ajuste de cada espectro, obtemos as áreas das duas gaussianas, sendo elas A_1 para a banda que emite em menor comprimento de onda (maior energia) e A_2 para a banda de maior comprimento de onda (menor energia). A fração:

$$\frac{A_2}{A_T} = \frac{A_2}{A_1 + A_2}, \quad (4.2)$$

indica a porcentagem de contribuição dessa banda de emissão para o espectro total, onde A_T é a área total do espectro dada pela soma das áreas das duas bandas. Essa fração é um bom parâmetro para quantificar qual das duas bandas está mais presente em diferentes ambientes.

Na Figura 4.39A, temos uma ilustração de como esse parâmetro é calculado para um espectro do Prodan em clorofórmio. O ajuste das duas gaussianas precisa ser realizado com o espectro de emissão em função da energia, pois somente dessa maneira, as áreas das gaussianas são proporcionais à emissão de cada estado excitado [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006].

Figura 4.39: A – Ilustração do cálculo da fração da área da gaussiana de maior comprimento de onda em relação a área total do espectro do Prodan em clorofórmio. B – Cálculo da fração da área da gaussiana de menor energia (maior comprimento de onda) para o Prodan e o Laurdan nos diferentes solventes em função da polaridade Δf . Os pontos mostrados são 1 – ciclohexano, 2 – clorofórmio, 3 – diclorometano, 4 – acetonitrila, 5 – metanol e para o Prodan: 6 – água.

Na Figura 4.39B, temos a fração da área (A_2/A_T) da banda de menor energia em função da polaridade do solvente e podemos observar que esse estado excitado é desfavorecido com o aumento da polaridade do solvente, para as duas sondas. Isso pode indicar que a excitação para esse estado excitado é desfavorecida com o aumento da polaridade do solvente e/ou que a transição do estado de maior energia (A_1) para o estado de menor energia (A_2) é desfavorecida. As pequenas diferenças observadas, entre os espectros de emissão das duas sondas em acetonitrila e ciclohexano, estão quantificadas na Figura 4.39B, onde podemos observar uma diferença de $\sim 10\%$ entre a emissão do Prodan e do Laurdan nesses dois solventes.

Outro parâmetro que podemos analisar, depois da decomposição em gaussianas, é a posição de cada uma das bandas em função da polaridade do solvente, colocadas na Figura 4.40 e na Tabela 4.25. As duas bandas deslocam-se juntas com o aumento da polaridade do solvente, levando ao deslocamento total do espectro, mostrado na Seção 4.2.1a. Também

podemos observar que a separação das duas bandas para cada solvente ($\Delta\lambda^{-1}$) varia de $\sim 1.15\times 10^3$ até $\sim 1.40\times 10^3\text{ cm}^{-1}$ em todos os solventes, para as duas sondas, mostrando que as duas bandas são igualmente afetadas pelo solvente. O fato das posições das bandas serem muito parecidas, para o Prodan e Laurdan, nos leva a conclusão de que os dois estados excitados dessas sondas são muito parecidos.

Figura 4.40: Posições dos máximos das gaussianas ajustadas para a banda de maior energia (λ_1^{-1}) e também para a banda de menor energia (λ_2^{-1}) para Prodan (preto) e o Laurdan (vermelho) nos diferentes solventes em função da polaridade Δf .

Tabela 4.25: Valores das posições das bandas que compõem os espectros de emissão fluorescente do Prodan e Laurdan nos diferentes solventes. À esquerda, em energia (λ^{-1}) e a direita em comprimento de onda (λ). $\Delta \lambda^{-1}$ é a diferença de energia entre as duas bandas e $\Delta \lambda$ é a mesma diferença em comprimento de onda.

Prodan						
Solvente	λ_1^{-1} ($\times 10^3\text{ cm}^{-1}$)	λ_2^{-1} ($\times 10^3\text{ cm}^{-1}$)	$\Delta \lambda^{-1}$ (cm^{-1})	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	$\Delta \lambda$ (nm)
Água	19.1(2)	17.3(2)	1.87	522	579	-57
Metanol	20.1(2)	18.9(3)	1.21	496	528	-32
Acetonitrila	21.4(5)	20.3(5)	1.15	467	493	-26
Diclorometano	22.9(5)	21.5(2)	1.40	437	466	-28
Clorofórmio	23.1(3)	21.8(2)	1.32	433	459	-26
Ciclohexano	25.5(3)	24.1(2)	1.37	393	415	-22

Laurdan						
Solvente	λ_1^{-1} ($\times 10^3\text{ cm}^{-1}$)	λ_2^{-1} ($\times 10^3\text{ cm}^{-1}$)	$\Delta \lambda^{-1}$ (cm^{-1})	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	$\Delta \lambda$ (nm)
Água	-	-	-	-	-	-
Metanol	20.1(2)	19.0(3)	1.15	496	527	-30
Acetonitrila	21.8(3)	20.5(3)	1.34	458	488	-30
Diclorometano	22.9(8)	21.5(2)	1.40	436	465	-28
Clorofórmio	23.1(4)	21.7(2)	1.36	434	461	-27
Ciclohexano	25.7(2)	24.5(2)	1.26	389	409	-20

Para confirmar a presença das duas bandas de emissão, os decaimentos temporais do Prodan foram medidos em água, acetonitrila e ciclohexano e do Laurdan em ciclohexano. Usando o ajuste de exponenciais (Seção 2.2.3), só foi possível conseguir um bom ajuste usando duas exponenciais, mostrando a presença de dois tempos de vida, ou seja, confirmando a presença de dois estado excitados emitindo nesses solventes. A presença de dois tempos de vida em água já foi mostrada em [Balter *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2008] e os valores medidos aqui (Tabela 4.26) são compatíveis com os publicados nesses artigos. Porém em ciclohexano, apenas dois artigos medem o tempo de vida do Prodan, um artigo publicado em 1988 [Balter *et al.*, 1988] apresentou um tempo de vida (0.18 ns) e outro publicado em 2008 [Rowe *et al.*, 2008] apresentou dois tempos de vida com valores de 0.2 e 0.8 ns, mas não mencionou a temperatura na qual esses tempos de vida foram medidos. É interessante notar que a variação da temperatura de 10 para 40 °C, em ciclohexano, não causa grandes alterações nos valores dos tempos de vida. Porém, em água, vemos uma pequena redução nos valores de tempo de vida com a variação da temperatura, como esperado, pois com o aumento da temperatura as taxas de decaimento não-radioativo aumentam, diminuindo o tempo de vida fluorescente.

Os tempos de vida em ciclohexano são menores do que em água. Como a interação dos fluoróforos com o ciclohexano deve ser desprezível (ver Tabela 4.12), provavelmente isso acontece porque as taxas de decaimento não-radioativo intramoleculares são maiores nesse solvente, levando a uma diminuição nos tempos de vida. Essa diminuição não é comum nas sondas fluorescentes, mas acontece para algumas delas, onde, em solventes de menor polaridade, relaxações internas da molécula favorecem o decaimento por processos não-radioativos [Lim, 1986; Lakowicz, 2006]. Esse pode ser o caso do Prodan em ciclohexano. Em solventes de maior polaridade as taxas de decaimento não-radioativo são dadas principalmente por interações entre sonda – solvente, fazendo com que o tempo de vida seja menor em solventes de maior polaridade, como deve ser o caso do Prodan em acetonitrila e água, onde os tempos de vida na acetonitrila são maiores que os tempos de vida e água (Tabela 4.26).

Tabela 4.26: Valores dos tempos de vida medidos para o Prodan em água e ciclohexano e também para o Laurdan em ciclohexano. T é a temperatura onde as medidas foram realizadas, τ_1 é o tempo de vida mais curto e τ_2 é o tempo de vida mais longo, dados em nanosegundos (ns).

Prodan				
Solvente	T = 10 °C		T = 40 °C	
	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
Água	0.6(1)	2.1(2)	0.3(1)	1.5(1)
Acetonitrila	2.9(2)	3.7(1)	2.6(5)	3.5(1)
Ciclohexano	0.2(1)	0.8(1)	0.2(3)	0.6(1)

Laurdan				
Solvente	T = 10 °C		T = 40 °C	
	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
Ciclohexano	0.19(1)	0.80(11)	0.17(1)	0.73(10)

Com os dados da decomposição dos espectros em gaussianas e as medidas de tempo de vida do estado excitado, podemos concluir que o estado excitado do Prodan e do Laurdan nos diferentes solventes é, na verdade, composto por dois estados, que devem ser igualmente afetados pela polaridade do solvente. A presença de dois estados excitados, mesmo em solventes de baixa polaridade, como o ciclohexano, pode ser explicada se analisarmos os espectros de absorção, colocados na Figura 4.14 e na Tabela 4.12. Esses espectros de absorção são compostos por três transições diferentes na banda de menor energia (maior comprimento de onda), mostrando que ao excitarmos o Prodan nessa banda, ele poderá ir para três estados excitados diferentes. A presença de dois estados excitados, nos diferentes solventes, indica que desses três estados excitados, dois são capazes de decair emitindo fóton, ou seja, através de fluorescência e o terceiro, provavelmente decai rapidamente para um dos outros dois estados excitados ou tem uma taxa de emissão fluorescente muito pequena.

Com o aumento da polaridade do solvente, as posições dos máximos de emissão dos dois estados excitados fluorescentes, deslocam-se para menores energias (Tabela 4.25 e Figura 4.40). Esse comportamento é típico de transições do tipo $\pi - \pi^*$ [Valeur, 2001], indicando que em solventes podemos ter dois estados excitados emitindo por fluorescência provavelmente com essa característica.

4.2.2 Bicamadas Lipídicas

Nesta seção vamos analisar os espectros de emissão fluorescente do Prodan e Laurdan em ambientes heterogêneos, as bicamadas lipídicas. Essa análise é mais delicada, pois as duas sondas podem estar em micro-ambientes diferentes, por exemplo, devido ao fato do Laurdan ser mais hidrofóbico que o Prodan. Também foram discutidas as diferenças e semelhanças nas propriedades espectroscópicas das duas sondas. Inicialmente, analisamos essas duas sondas

em bicamadas de DLPC, pois esse lipídio não tem transição de fase nas temperaturas estudadas ($T_m \sim 0^\circ\text{C}$), ficando mais simples a comparação entre as duas sondas. Depois, analisamos a influência da fase da bicamada lipídica na incorporação e posicionamento das duas sondas, colocando-as em bicamadas de DPPC ($T_m \sim 41^\circ\text{C}$).

4.2.2a Prodan e Laurdan em Bicamadas de DLPC

Na literatura, existem duas afirmações sobre a diferença entre o Prodan e o Laurdan, uma delas diz que o Laurdan se localiza mais internamente nas bicamadas do que o Prodan e também que esse último, por não ter cadeia hidrocarbônica, pode particionar em água [Parasassi *et al.*, 1998]. Para verificar essas duas afirmações, vamos utilizar o lipídio DLPC, cuja transição de fase acontece em $\sim 0^\circ\text{C}$, para que nas temperaturas estudadas, não tenhamos influência da transição de fase do lipídio. Assim, em todos os espectros medidos, a bicamada está na fase fluida. Os espectros de emissão fluorescente para essas medidas estão colocados na Figura 4.41. Observando essa figura, vemos que existe um deslocamento dos espectros de emissão com a variação da temperatura, quando essas sondas são colocadas em bicamadas de DLPC. Em baixas temperaturas, o espectro tem o seu máximo em $\sim 430\text{ nm}$, com o aumento da temperatura esse máximo desloca-se para $\sim 480\text{ nm}$, indicando a presença de duas bandas no espectro de emissão em DLPC.

O deslocamento, com a variação da temperatura, dos espectros da Figura 4.41, é devido às alterações que ocorrem na bicamada com a variação da temperatura, pois os espectros dessas sondas, nos diferentes solventes, não sofrem mudança na sua posição com a mudança da temperatura (Seção 4.2.1a). As alterações na bicamada lipídica de DLPC, com a variação da temperatura, foram verificadas com medidas de ressonância paramagnética eletrônica e mostram que a bicamada fica cada vez mais fluída com o aumento da temperatura [De Vequi-Suplicy *et al.*, 2006].

Para verificar se as duas sondas estão monitorando o mesmo ambiente na bicamada lipídica, realizamos, primeiramente, uma comparação dos seus espectros de emissão. Na Figura 4.42, é possível observar que os espectros das duas sondas em bicamada de DLPC são parecidos, mostrando apenas algumas pequenas diferenças (20 e 30°C), como observado na Figura 4.33. Isso acontece para todas as temperaturas estudadas, sugerindo que elas monitoram ambientes muito semelhantes dentro da bicamada de DLPC, considerando que ambas têm o mesmo centro fluorescente (nos diferentes solventes, os espectros são muito parecidos) e por isso serão sensíveis às mesmas características do micro-ambiente onde estão.

Figura 4.41: Espectro de emissão fluorescente de 1 μM de Prodan e Laurdan em 1 mM de DLPC, a várias temperaturas.

Figura 4.42: Comparação dos espectros de emissão do Prodan (linha preta) e do Laurdan (linha vermelha) em bicamadas de DLPC em diferentes temperaturas.

Os artigos existentes na literatura [Parasassi *et al.*, 1990; Parasassi *et al.*, 1991; Bagatolli *et al.*, 1997; Bagatolli *et al.*, 1998; Parasassi *et al.*, 1998; Epand *et al.*, 1999], relacionam essas duas bandas com a transição de fase do lipídio, pois apenas lipídios com transição de fase foram estudados. Eles afirmam que a banda em ~ 440 nm está relacionada com a sonda localizada numa região onde os lipídios estão na fase gel e a banda em ~ 490 nm está relacionada com a sonda localizada numa região onde os lipídios estão na fase fluida. Mas as medidas apresentadas aqui não mostram isso. Mesmo o lipídio estando em uma só fase, as duas populações de sonda estão presentes e o deslocamento acontece. Esse fato foi verificado primeiro para o Laurdan, em artigo já publicado por nós [De Vequi-Suplicy *et al.*, 2006].

Para analisar essas duas bandas, vários artigos propõem um parâmetro chamado de Polarização Generalizada (*GP*, *Generalized Polarization*). Esse parâmetro é uma razão normalizada das intensidades dos espectros de emissão nos comprimentos de onda de 440 e 490 nm, dada pela equação:

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (4.1)$$

onde I_{440} é a intensidade do espectro medido no comprimento de onda de 440 nm e I_{490} é a intensidade do espectro medido em 490 nm. Como na literatura essas duas bandas são relacionadas com as fases dos lipídios (440 nm com a fase gel e 490 nm com a fase fluída), é proposto que se o valor de *GP* for positivo, ou seja, $I_{440} > I_{490}$, a bicamada está na fase gel e se o valor de *GP* for negativo ($I_{440} < I_{490}$), a bicamada está na fase fluída [Parasassi *et al.*, 1990], sendo o *GP* um indicador do balanço entre as duas fases lipídicas. Uma ilustração desse parâmetro está colocada na Figura 4.43A. Nessa figura, podemos ver que esse parâmetro analisa apenas dois pontos do espectro (Figura 4.43A), aproximadamente nos máximos de cada banda de emissão. Lembrando que o DLPC está na fase fluída em todas as temperaturas estudadas, apenas valores negativos deveriam ser encontrados, de acordo com o proposto pela literatura [Parasassi *et al.*, 1990; Parasassi *et al.*, 1991]. Mas ao analisarmos a variação do *GP* com a temperatura (Figura 4.43B), vemos que o seu valor varia de ~ 0.25 a 10°C até ~ -0.45 a 60°C , tanto para o Prodan como para o Laurdan. Indicando, portanto, a presença da banda de emissão com máximo em 440 nm mesmo na fase fluída, como mostrado na Figura 4.41. Com isso, vemos que o *GP* não é um bom parâmetro para analisar a presença das duas bandas de emissão presentes nos espectros de emissão do Prodan e Laurdan em bicamadas de DLPC. E que as bandas não podem ser diretamente associadas com as fases da bicamada lipídica.

Figura 4.43: A – Ilustração do cálculo do parâmetro GP para o espectro de Prodan em DLPC a 10 °C. B – Cálculo do parâmetro GP para o Prodan e para o Laurdan em bicamadas de DLPC.

Para analisar esses espectros de modo a realmente quantificar as duas bandas de emissão, vamos utilizar a mesma metodologia proposta para analisar os espectros de emissão em solventes homogêneos, que consiste em decompor os espectros de emissão em duas gaussianas e analisar a porcentagem da área de cada gaussiana em relação à área total do espectro. Desse modo, é possível analisar como a população de cada banda está variando, com a mudança da temperatura em bicamada lipídica. Na Figura 4.44A, temos uma ilustração de como esse parâmetro é calculado para um espectro do Prodan em DLPC. Como colocado na Seção 4.2.1b, o ajuste das duas gaussianas foi realizado com o espectro de emissão em função da energia, para que as áreas das gaussianas fossem proporcionais às emissões das populações de cada estado excitado.

Figura 4.44: A – Ilustração do cálculo da fração da área da gaussiana de menor energia (maior comprimento de onda) em relação a área total do espectro do Prodan em bicamadas de DLPC a 10 °C. B – Cálculo da fração da área da gaussiana de maior comprimento de onda (menor energia) para o Prodan e o Laurdan em bicamadas de DLPC.

Na Figura 4.44B, temos o cálculo da fração (A_2/A_T , Eq. 4.2) para os espectros de emissão do Prodan e do Laurdan em bicamadas de DLPC em função da temperatura. Na temperatura de 10 °C, podemos ver que essa fração é de 0.775(9) para o Prodan e 0.752(13) para o Laurdan, indicando que 77.5 % da emissão fluorescente que compõe o espectro total está vindo da população que emite em maior comprimento de onda para o Prodan e 75.2 % para o Laurdan. Essa fração aumenta para temperaturas maiores, para as duas sondas, mas os valores para o Laurdan sempre são um pouco menores que os valores para o Prodan, aproximadamente 5 %, mostrando uma pequena diferença entre os espectros das duas sondas em DLPC. O *GP* também consegue medir essa diferença (Figura 4.43B), porém a interpretação dos dados com a decomposição em gaussianas é mais evidente, as emissões fluorescentes das duas bandas estão sendo quantificadas. Essa diferença pode indicar que as duas sondas estão monitorando micro-ambientes ligeiramente diferentes na bicamada lipídica ou que elas possuem estados excitados ligeiramente diferentes.

Como discutido na Seção 4.2.1c, da composição em gaussianas também obtemos valores para as posições de cada uma das bandas, que estão colocados na Figura 4.45. A posição da banda de menor energia (λ_2^{-1}), que corresponde a população com máximo em ~ 480 nm, tem um deslocamento de $\sim 1.0 \times 10^3$ cm^{-1} para menores energias com a variação da temperatura, para as duas sondas. Com o aumento da temperatura, existe um aumento da mobilidade das cadeias hidrocarbônicas [De Vequi-Suplicy *et al.*, 2006], possivelmente levando a um aumento de polaridade interna na bicamada, ou seja, mais moléculas de água conseguem entrar na bicamada. O deslocamento dessa banda para menores energias com o aumento da polaridade da bicamada mostra que a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado está diminuindo. Isso sugere que essa transição seja do tipo $\pi - \pi^*$, cuja diferença de energia diminui com o aumento da polaridade do solvente [Valeur, 2001; Reichardt, 2004]. Esse comportamento é parecido com o observado para as bandas de emissão nos solventes homogêneos (Figura 4.40), com o aumento da polaridade, as bandas se deslocam para menores energias, sugerindo que a transição seja $\pi - \pi^*$.

Porém, a banda que emite em maior energia (λ_1^{-1}), que corresponde a população com máximo em ~ 430 nm), tem um pequeno deslocamento de $\sim 0.4 \times 10^3$ cm^{-1} para maiores energias, nas duas sondas, mostrando que a diferença de energia entre esse estado excitado e o estado fundamental está aumentando com o aumento da temperatura, ou seja, com o aumento da mobilidade e/ou da polaridade na bicamada. Esse deslocamento da banda para maiores energias com o aumento da polaridade sugere que essa transição seja do tipo $n - \pi^*$ e não do tipo $\pi - \pi^*$, como observado para a banda de menor energia, pois a transição $n - \pi^*$ aumenta a sua energia com o aumento da polaridade do ambiente [Valeur, 2001; Reichardt, 2004]. Esse comportamento é diferente do comportamento observado nos solventes homogêneos e de diferentes polaridades, onde as duas bandas se deslocam para menores energias com o aumento da polaridade do solvente (Figura 4.40). Isso sugere que os estados excitados observados em bicamada lipídica e nos solventes homogêneos podem ser diferentes. Em bicamada lipídica, pode existir alguma outra interação entre sonda e ambiente (provavelmente devido à mudança de mobilidade), diferente de apenas mudança de polaridade, que altera a natureza dos estados excitados dessas sondas.

Comparando as posições das bandas na Figura 4.45, entre o Prodan e o Laurdan, vemos que na banda de menor energia o comportamento é muito parecido entre as duas sondas até 45 °C, acima dessa temperatura o Prodan passa a ter uma energia um pouco menor, sugerindo que essa sonda estaria em um ambiente de maior polaridade/mobilidade. Para a banda de maior energia, o Prodan apresenta uma energia um pouco maior que o Laurdan em

todas as temperaturas estudadas ($\sim 1\%$). Essa diferença está fora do erro, como podemos ver na Figura 4.45 (erros menores que os símbolos para quatro medidas diferentes). Como essa banda aumenta a sua energia com o aumento da polaridade/mobilidade da bicamada, podemos sugerir que o Prodan está num ambiente de maior polaridade/mobilidade, como observado para a banda de menor energia a altas temperaturas. Assim, a posição das duas bandas presentes em Prodan sugere que essa sonda está em um micro-ambiente de maior polaridade e/ou mobilidade nas bicamadas de DLPC, ou seja, numa posição mais superficial, mais próximo das cabeças polares dos lipídios

Figura 4.45: Valores das posições dos máximos das gaussianas ajustadas que correspondem a cada uma das bandas que compõe o espectro de emissão fluorescente.

Uma comparação dos espectros medidos para o Prodan e Laurdan em bicamadas de DLPC com os espectros medidos em solventes está colocada na Figura 4.46. Podemos ver que, tanto para o Prodan como para o Laurdan, existe uma certa similaridade entre o espectro medido em DLPC a 10°C e o espectro medido em clorofórmio na região de altas energias (entre 23.0 e $26.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), mesmo as bandas sendo muito diferentes.

Também podemos observar que, para os espectros medidos em DLPC a 50°C , existe uma certa similaridade com o espectro dessas sondas medidos em metanol, apesar de estarem um pouco deslocados. Porém, a comparação dos espectros de emissão e também das bandas

de emissão obtidas pela decomposição em gaussianas nos diferentes solventes e em bicamadas lipídicas não pode ser feita de maneira direta. Como mostrado nas Figura 4.40 e Figura 4.45, a natureza das bandas de emissão nesses dois ambientes pode ser diferente. Em solventes homogêneos, as evidências indicam que as duas transições podem ser do tipo $\pi - \pi^*$ e em bicamadas lipídicas uma transição pode ser do tipo $\pi - \pi^*$ e a outra, do tipo $n - \pi^*$. Mostrando que a presença da bicamada lipídica pode alterar os estados excitados das sondas, Prodan e Laurdan, e que as conclusões obtidas para as sondas nos diferentes solventes homogêneos precisam ser analisadas cuidadosamente, antes de serem diretamente transmitidas para as sondas em bicamadas lipídicas.

Figura 4.46: Comparação dos espectros de emissão medidos em 10 °C e em 50 °C em bicamadas de DLPC com os espectros medidos nos diferentes solventes para o Prodan (acima) e para o Laurdan (abaixo).

Para confirmar a viabilidade do método proposto de decomposição do espectro de emissão das sondas Prodan e Laurdan em gaussianas, realizamos medidas de fluorescência temporal, para obter o chamado *DAS* (*Decay Associated Spectrum*) de cada uma das bandas, como descrito na Seção 2.2.3. Com os decaimentos temporais medidos em diferentes comprimentos de onda, é possível, através da Eq. 2.2.42, obter a porcentagem de cada população que contribui para intensidade naquele comprimento de onda (Eq. 2.2.42). Multiplicando-se essa porcentagem pela intensidade do espectro medido com a fluorescência estática, é possível reconstruir o espectro de emissão fluorescente de cada banda separadamente.

Alguns dos decaimentos medidos para a realização do *DAS* estão colocados na Figura 4.47. Os decaimentos foram medidos em 12 comprimentos de ondas diferentes, de 390 a 500 nm, em intervalos de 10 nm. Podemos verificar que os decaimentos medidos em comprimentos de onda menores (até 440 nm) obviamente não apresentam comportamento linear, o que indica que eles são decaimentos multi-exponenciais e os decaimentos medidos em comprimentos de onda maiores parecem ser lineares. Também podemos observar que com o aumento da temperatura os decaimentos são mais rápidos, indicando menores tempos de vida. Para analisar esses decaimentos usamos a análise global (Seção 3.2.3 e Apêndice C), onde os mesmos tempos de vida são ajustados para todos os decaimentos (os tempos de vida não devem mudar com a variação do comprimento de onda) e os fatores pré-exponenciais são ajustados individualmente.

Figura 4.47: Decaimentos temporais da emissão fluorescente para o Prodan (acima) e o Laurdan (abaixo), em bicamadas de DLPC, medidos em três temperaturas diferentes. A ordenada está na escala logarítmica.

Na Tabela 4.27 e na Figura 4.48 temos os resultados da análise global realizada nos 12 decaimentos, nos diferentes comprimentos de onda e também nas diferentes temperaturas. Na Tabela 4.27, temos os tempos de vida obtidos para as duas sondas em três temperaturas. Para todos os decaimentos foi possível ajustar uma curva composta por duas exponenciais (Eq. 2.2.40), porém para os decaimentos com comprimentos de onda maiores que 470 nm, o fator pré-exponencial do menor tempo de vida (correspondente à banda de menor energia) foi igual

a zero, indicando que essa população não está mais presente nesses comprimentos de onda, e temos apenas um tempo de vida. O maior tempo de vida encontrado para o Prodan e para o Laurdan (τ_2) são muito parecidos, indicando que o tempo de vida desse estado não está sensível às diferenças observadas nos espectros de emissão das sondas, analisados com a decomposição em gaussianas (Figura 4.44B e Figura 4.45). Porém, o tempo de vida mais curto (τ_1) do Prodan é $\sim 14\%$ menor que o tempo de vida mais curto do Laurdan, ou seja, as taxas de decaimentos não-radioativo desse estado excitado são maiores para o Prodan do que para o Laurdan. Isso pode sugerir que o Prodan está numa região da bicamada que permite mais esses decaimentos (maior polaridade/mobilidade) do que o Laurdan, ou seja, as sondas estão em micro-ambientes ligeiramente diferentes, assim como indicado pela posição dessa banda através da decomposição em gaussianas (Figura 4.45).

Tabela 4.27: Valores de tempo de vida para o Prodan e Laurdan em bicamadas de DLPC. Os valores em parênteses é o desvio da média.

T (°C)	Prodan		Laurdan	
	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
10	2.22(1)	4.48(1)	2.67(1)	4.46(2)
20	2.17(6)	3.82(1)	2.48(5)	3.81(1)
45	1.05(2)	3.10(1)	1.213(4)	3.16(1)

Figura 4.48: Comparação das duas bandas encontradas com a análise do DAS (Decay Associated Spectrum) com as bandas encontradas com a decomposição em gaussianas.

Na Figura 4.48, temos o *DAS* para o tempo de vida mais curto (τ_1 , quadrados verdes) e para o tempo de vida mais longo (τ_2 , quadrados azuis). Com essa análise conseguimos verificar que o tempo de vida mais curto emite apenas em comprimentos de onda menores (maiores energias, acima de $21.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) e para comprimento de onda maiores (menores energias) temos apenas um estado excitado emitindo. A comparação do cálculo do *DAS* com a decomposição em gaussianas, mostrada na Figura 4.48, para as duas sondas, confirma que a decomposição em gaussianas é um bom método para analisar o espectro dessas sondas em bicamada, assim como um método de análise mais simples do que a medida do *DAS*.

Outro parâmetro interessante que pode ser analisado nessas sondas é a anisotropia de fluorescência (Seção 2.2.2b e Apêndice B), colocada na Figura 4.49. As medidas de anisotropia de fluorescência foram realizadas em dois comprimentos de onda de emissão diferentes, em 430 nm e em 480 nm, na tentativa de monitorar a mobilidade da sonda nas duas bandas de emissão. Porém, para a medida realizada em 430 nm, temos uma combinação da anisotropia das duas populações, pois nesse comprimento de onda temos as duas populações presentes, como podemos ver na Figura 4.49A. Já a medida realizada em 480 nm, monitora apenas uma banda (ver Figura 4.49A), e por isso pode ser considerada como a anisotropia da população de menor energia.

Para a anisotropia medida nos dois comprimentos de onda, temos uma diminuição com o aumento da temperatura, indicando que a bicamada está ficando mais fluida, como foi mostrado usando a técnica de *RPE* (ressonância paramagnética eletrônica) [De Vequi-Suplicy *et al.*, 2006]. A variação da anisotropia com a temperatura é mais evidente para a banda de maior comprimento de onda (menor energia), provavelmente porque essa banda tem um tempo de vida mais longo, o que permite que ela despolarize mais a luz no estado excitado. Os valores das anisotropias do Prodan e do Laurdan nas duas bandas são muito parecidos, apesar da decomposição em gaussianas (Figura 4.45) e os tempos de vida (Tabela 4.27) indicarem que as duas sondas estão monitorando micro-ambientes ligeiramente diferentes da bicamada.

Figura 4.49: A – Exemplificação da contribuição de cada banda para as medidas de anisotropia. B – Medidas de anisotropia realizadas em dois comprimentos de onda diferentes, para o Prodan e o Laurdan em bicamadas de DLPC.

4.2.2b Prodan e Laurdan em Bicamadas de DPPC

Os espectros de emissão do Prodan e do Laurdan em bicamadas de DPPC estão colocados na Figura 4.50, para diferentes temperaturas. É possível verificar que o espectro sofre um deslocamento com a variação da temperatura, assim como no caso do DLPC (Figura 4.41). Porém, no DPPC esse deslocamento tem um comportamento mais brusco, próximo de 40 $^{\circ}\text{C}$, que é perto da temperatura de transição do DPPC. Como isso, vemos que o deslocamento dos espectros é sensível a transição de fase do DPPC, que acontece em $\sim 41^{\circ}\text{C}$. Para analisar melhor o deslocamento dos espectros, usaremos a metodologia de análise proposta na Seção 4.2.1c, com a decomposição dos espectros em gaussianas. Os espectros da Figura 4.50, para o Prodan nas temperaturas de 10 a 37 $^{\circ}\text{C}$, parecem apresentar uma banda em $\sim 520 \text{ nm}$, que não está presente nos espectros do Laurdan nessas temperaturas. Por isso antes de aplicarmos a metodologia de análise proposta na Seção 4.2.2a, realizamos uma comparação dos espectros do Prodan e Laurdan em diferentes temperaturas (Figura 4.51).

Figura 4.50: Espectro de emissão fluorescente de 1 μM de Prodan e Laurdan em 1 mM de DPPC, à várias temperaturas.

Na Figura 4.51, para as temperaturas de 40 a 60 $^{\circ}\text{C}$, os espectros do Prodan e do Laurdan são semelhantes ao observado para as sondas em DLPC (Figura 4.42), com apenas pequenas diferenças. Porém, para as temperaturas de 10 a 30 $^{\circ}\text{C}$, eles são diferentes, indicando que nas bicamadas de DPPC na fase gel (abaixo de 41 $^{\circ}\text{C}$), as duas sondas podem estar monitorando ambientes diferentes. Nos espectros de emissão do Prodan, a banda que aparece em baixas temperaturas na região de 520 nm, pode ser uma banda de emissão do Prodan em água. Para verificar essa hipótese, comparamos os espectros do Prodan em DPPC na fase gel com o espectro do Prodan em água (Figura 4.52).

Figura 4.51: Comparação dos espectros de emissão fluorescente do Prodan (preto) e do Laurdan (vermelho) em bicamadas de DPPC.

Na parte superior da Figura 4.52, podemos ver que a banda, que aparece em ~ 520 nm (19.2×10^3 cm $^{-1}$) nos espectros do Prodan em DPPC na fase gel, é muito semelhante ao espectro do Prodan em água. Subtraindo o espectro medido em água do espectro medido em DPPC, verificamos que os espectros do Prodan ficam mais parecidos com os espectros do Laurdan nessas temperaturas (Figura 4.52, abaixo), apesar de ainda serem mais diferentes do que os obtidos na fase fluida do DPPC (Figura 4.51, abaixo), ou na fase fluida do DLPC (Figura 4.42). Assim, podemos concluir que o Prodan está particionando em água nas bicamadas de DPPC na fase gel. Porém, subtrair o espectro medido em água de todos os espectros do Prodan em DPPC não é muito preciso, pois a fração de sonda em água deve variar com a temperatura e é difícil de ser estimada.

Figura 4.52: Acima - Comparação dos espectros do Prodan em DPPC com o espectro do Prodan em água, este último multiplicado por um fator que permitisse a comparação. Abaixo - Comparação dos espectros de emissão do Prodan em DPPC (preto) depois de subtraído o espectro dessa sonda em água com os espectros medidos para o Laurdan em DPPC.

Para analisar os espectros do Prodan em DPPC, decidimos realizar a decomposição em três gaussianas, com uma delas com o seu máximo fixado em 520 nm ($19.2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), que corresponde à banda de emissão da sonda em água. A aproximação da banda em água por uma gaussiana é razoável, apesar do espectro dessa sonda ser composto por duas gaussianas, porque a intensidade da gaussiana de menor energia em água é muito pequena (Seção 4.2.1a). Na Figura 4.53A, temos um exemplo dessa decomposição em três gaussianas, onde a Gaussiana 3 corresponde à população de sonda em água. Na Figura 4.53B, temos a fração da área dessa gaussiana em função da temperatura, mostrando que a população de sonda em água vai diminuindo de 10 até 37 °C e após 40 °C, ela não existe mais e o espectro passa a ser novamente composto por apenas duas gaussianas, como no caso do DLPC. A população de Prodan em água apenas existe até a transição de fase do DPPC, ou seja, na fase gel. Portanto, quando o lipídio passa para a fase fluida, o Prodan é totalmente incorporado à bicamada lipídica. Esse comportamento já foi observado para marcadores de spin, que particionam em água na fase gel do lipídio e são totalmente incorporados quando o lipídio passa para a fase fluida (ver por exemplo, [Temprana *et al.*, 2010])

Figura 4.53: A – Exemplo de um ajuste de gaussianas para o Prodan em bicamada de DPPC na fase gel, com a componente particionada em água. B – Valor da área A_3 em relação à área total do espectro de emissão fluorescente do Prodan em DPPC.

Na Figura 4.54A, temos a fração A_2/A_T proposta na Seção 4.2.2A para analisar os espectros dessas sondas em bicamadas. Esse parâmetro mostra que, mesmo na fase gel (abaixo de 41 $^{\circ}\text{C}$), a emissão fluorescente é composta, por $\sim 60\%$ para o Laurdan e $\sim 70\%$ para o Prodan, da banda que tem o seu máximo em $\sim 480 \text{ nm}$ (menor energia). Dessa forma, evidenciando o fato de que essa banda não pode estar relacionada somente com a sonda na fase fluida do lipídio, como colocado na literatura [Parasassi *et al.*, 1986; Parasassi *et al.*, 1990; Parasassi *et al.*, 1991]. O valor de A_2/A_T é capaz de monitorar a transição de fase do lipídio, tanto para o Laurdan como para o Prodan, apesar de apresentarem valores diferentes para as duas sondas. Para o DLPC, observamos uma diferença de $\sim 5\%$ entre os valores de A_2/A_T das duas sondas (Figura 4.44B). Para as sondas em DPPC, essa diferença é $\sim 10\%$ entre o Prodan e o Laurdan, o Prodan sempre apresenta valores maiores, assim como no DLPC. Essa diferença é aproximadamente constante durante a variação de temperatura (Figura 4.54A). Indicando, como no DLPC, que as duas sondas estão monitorando micro-ambientes ligeiramente diferentes na bicamada lipídica.

Analisando a anisotropia de fluorescência medida em 480 nm (Figura 4.54B), é possível observar que a anisotropia do Laurdan é sensível à transição de fase do lipídio, mas a anisotropia do Prodan não é. Isso pode acontecer devido ao fato analisado na Figura 4.53A, pois em 480 nm ($20.8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) não temos apenas a população da banda de menor energia do Prodan em bicamada lipídica, como acontece para o caso do Laurdan ou das sondas em DLPC (Figura 4.49), mas temos uma contribuição do Prodan em água. Isso deve levar a uma diminuição da anisotropia do Prodan medida a baixas temperaturas (fase gel da bicamada) e provavelmente a não sensibilidade à transição de fase.

Figura 4.54: A – Variação da fração da área da população de menor energia (A_2/A_T) com a temperatura, para o Prodan e o Laurdan em bicamadas de DPPC. B – Valores da anisotropia de fluorescência para o Prodan e o Laurdan em bicamadas de DPPC. A linha tracejada indica a temperatura de transição de fase do lipídio. Para o Prodan na fase gel, a área total foi considerada como sendo $A_1 + A_2$, ou seja, apenas as populações em bicamada lipídica, sem considerar a população em água (A_3)

Figura 4.55: A – Posição da banda de maior energia para as sondas Prodan e Laurdan em bicamadas de DPPC. B – Posição da banda de menor energia para o Prodan e o Laurdan em DPPC.

A posição das bandas obtidas com a decomposição em gaussianas está colocada na Figura 4.55. Podemos verificar que as duas posições são sensíveis à transição da bicamada lipídica ($T_m \sim 41$ °C), sendo a banda de menor energia mais sensível a essa transição. Na fase fluida da bicamada de DPPC, o comportamento da posição das bandas é parecido com o observado para as posições das bandas em DLPC (Figura 4.45). Ocorre um pequeno aumento da energia com a variação da temperatura, para a banda de maior energia (λ_1^{-1} , menor comprimento de onda, Figura 4.55A) e o Prodan apresenta valores de energias maiores que o Laurdan. Na banda de menor energia (λ_2^{-1} , maior comprimento de onda, Figura 4.55B), os valores da posição das bandas são muito parecidos entre as duas sondas, nas temperaturas onde a bicamada está na fase fluida ($T > 41$ °C), e sofrem uma pequena diminuição com o aumento da mesma, assim como observado para as duas sondas em DLPC.

Porém na fase gel da bicamada de DPPC, os valores da posição das duas bandas para o Prodan e o Laurdan são muito diferentes. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato que nessa fase o Prodan está particionado em água, o que dificulta a análise do espectro, pois não é possível separar totalmente a influência da banda em água. Como o comportamento na fase fluida do lipídio é parecido com o comportamento obtido para as duas sondas em bicamadas de DLPC, as conclusões podem ser as mesmas. Ou seja, as bandas observadas podem ter natureza diferente e por isso se comportarem diferentemente com o aumento da polaridade/mobilidade.

Figura 4.56: Comparação dos espectros de emissão medidos em 10 °C e em 50 °C em bicamadas de DPPC com os espectros medidos nos diferentes solventes para o Prodan (acima) e para o Laurdan (abaixo).

Uma comparação dos espectros medidos para o Prodan e Laurdan em bicamadas de DPPC com os espectros medidos em solventes está colocada na Figura 4.56. Para as duas sondas existe uma similaridade, entre o espectro medido em DPPC a 10 °C e o espectro medido em clorofórmio, para altas energias (entre 23.0 e 25.0 $\times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), para energias menores os espectros são diferentes, semelhante ao observado em DLPC. Também podemos observar que, para os espectros medidos em DPPC a 50 °C, existe uma certa similaridade com o espectro dessas sondas medido em metanol, apesar de estarem um pouco deslocados, assim como aconteceu para o DLPC (Figura 4.46). Porém, assim como no caso do DLPC, a natureza das transições que ocorrem em bicamadas de DPPC pode ser diferente da natureza das transições que acontecem em solventes homogêneos. Por isso, conclusões tiradas diretamente

da comparação dos espectros e das bandas que os compõem, em ambientes homogêneos e heterogêneos, devem ser feitas com muita cautela.

Tabela 4.28: Valores de tempo de vida para o Prodan e Laurdan em bicamadas de DPPC. Os valores são médias de duas medidas e os valores em parênteses são os erros obtidos.

T (°C)	Prodan		Laurdan	
	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)
10	4.5(2)	7.9(8)	3.4(5)	7.3(3)
20	4.4(2)	7.8(5)	3.0(3)	7.1(6)
45	2.4(5)	3.2(1)	2.0(1)	3.5(1)

As medidas de tempo de vida (Tabela 4.28) e a reconstrução das bandas de emissão (DAS, Figura 4.57) também foram realizadas. Assim como para o DLPC, em DPPC foram medidos 12 decaimentos, cada um em comprimentos de ondas diferentes, de 390 a 500 nm, em intervalos de 10 nm. Essas medidas foram feitas em três temperaturas diferentes, 10, 20 e 45 °C, as duas primeiras na fase gel e a última na fase fluida da bicamada. Durante a análise, foi possível notar que os decaimentos medidos em comprimentos de onda acima de 460 nm ($21.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), para o Prodan na fase gel, precisavam ser ajustados com três tempos de vida. Um dos tempos de vida obtido foi o maior tempo de vida medido para o Prodan em água, de 2.06 ns à 10 °C e 1.94 ns à 20 °C. Para realização da análise global do Prodan em DPPC, nessas duas temperaturas, um tempo de vida foi fixado no valor obtido para a sonda em água e o restante dos parâmetros foram ajustados, apenas com a condição de que os tempos de vida fossem os mesmos para todos os decaimentos, como descrito na Seção 3.2.3 e Apêndice C.

Ao analisar os decaimentos na fase fluida, ou seja, a 45 °C, observamos o mesmo comportamento encontrado para o DLPC, onde os decaimentos com comprimento de onda menores que 460 nm ($21.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) são ajustados com dois tempos de vida e nos outros decaimentos o fator pre-exponencial do τ_1 é zero, ou seja, o decaimento passa a ser ajustado com apenas um tempo de vida, o da banda de menor energia, τ_2 . Na fase fluida, os tempos de vida são cerca de 50 % menores do que na fase gel, indicando um aumento das taxas de decaimento não-fluorescente com a temperatura, como esperado [Valeur, 2001; Lakowicz, 2006]. Os tempos de vida das duas sondas na fase fluida são muito parecidos, considerando os erros encontrados. Mostrando que nessa fase da bicamada, os tempos de vida não estão sensíveis às diferenças encontradas entre as duas sondas com a decomposição dos espectros de emissão (Figura 4.54 e Figura 4.55). Tanto para o Prodan, como para o Laurdan, na fase gel, foi obtido um tempo de vida longo, ~ 7.5 ns, para banda de menor energia (τ_2) e um tempo mais curto para a banda de maior energia (τ_1), esse segundo tempo de vida é maior para

o Prodan do que para o Laurdan. Esses tempos de vida parecem não serem sensíveis as diferenças observadas entre os espectros de emissão do Prodan e do Laurdan em DPPC.

Figura 4.57: Comparação das bandas obtidas com a análise do DAS (Decay Associated Spectrum) com a decomposição em gaussianas utilizada para analisar os espectros de emissão fluorescente nas bicamadas de DPPC.

Na Figura 4.57, temos a comparação das bandas obtidas com o DAS e a decomposição em gaussianas. Para o Prodan (Figura 4.57, parte superior) nas temperaturas de 10 e 20 °C, podemos observar que o ajuste foi feito com três gaussianas (Figura 4.57) e que a componente temporal referente à sonda em água (quadrados vermelhos), só aparece para energias menores que $22.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$, acompanhando o ajuste da gaussiana (linha vermelha) referente a água, mostrando que essa componente é realmente a sonda em água. As outras bandas encontradas com o DAS são muito parecidas com a decomposição realizada para o Prodan nas três temperaturas. Para o Laurdan a 10 e 20 °C, a posição das bandas obtidas com o DAS são muito parecidas com as posições das gaussianas, mas a área é um pouco diferente. A 45 °C, as bandas obtidas com o DAS e com a decomposição em gaussianas são extremamente parecidas.

Esse resultado reforça que a decomposição em gaussianas é um bom método e também mais fácil de ser aplicado do que o DAS, para analisar o espectro dessas sondas em bicamadas lipídicas. Porém, em bicamadas com transição de fase, o Prodan particiona em

água, na fase gel da bicamada lipídica, dificultando o monitoramento da bicamada. O Laurdan, por possuir a cauda hidrocarbônica, está todo ancorado na bicamada, permitindo um melhor estudo da mesma. Com isso, concluimos que para bicamadas com transição de fase, o Laurdan é um marcador melhor do que o Prodan.

5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

“A man should look for what is, and not for what he thinks should be.”

A. Einstein

Neste Capítulo apresentamos as conclusões desta tese, evidenciando a sua colaboração para o conhecimento dentro da Biofísica e colocamos as perspectivas futuras.

Nesta tese de doutorado estudamos duas sondas fluorescentes, Prodan e Laurdan, desenvolvidas por G. Weber [Weber *et al.*, 1979]. Realizamos um estudo detalhado das características espectroscópicas dessas sondas, tanto em ambientes homogêneos (solventes) como em ambientes heterogêneos (bicamadas lipídicas), e também apresentamos um estudo comparativo entre as duas sondas, que não está presente na literatura até o momento. Construímos um modelo teórico para o estado fundamental da molécula de Prodan, capaz de explicar as características espectroscópicas do estado fundamental dessa molécula nos diferentes solventes homogêneos. Apresentamos uma proposta para analisar os espectros de emissão fluorescente dessas duas moléculas em bicamadas lipídicas.

5.1 Conclusões Sobre o Efeito do Ambiente no Espectro de Absorção Eletrônica

Estudando os espectros de absorção eletrônica do Prodan e Laurdan em solventes homogêneos, foi possível observar que esses espectros não são tão sensíveis à polaridade do solvente como os espectros de emissão, variando pouco a posição do máximo de absorção ($\Delta\lambda_{ab} = \sim 1.3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$), quando a polaridade varia de ciclohexano para água, se comparado com o espectro de emissão ($\Delta\lambda_{em} = \sim 5.9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$).

O estudo comparativo dos espectros de absorção eletrônica dessas moléculas mostrou que as duas moléculas têm espectros muito parecidos nos diferentes solventes, com exceção da água, pois o Laurdan não é solúvel nesse solvente. Através de medidas experimentais e alguns cálculos teóricos, foi possível mostrar que o cromóforo é o mesmo para as duas moléculas, mostrando que a cadeia hidrocarbônica conectada ao Laurdan não influencia as características espectroscópicas dessa molécula em solventes homogêneos. A sua influência mais significativa é tornar a molécula mais hidrofóbica, o que faz o Laurdan insolúvel em água.

Como o cromóforo é o mesmo para as duas moléculas, realizamos a construção de um modelo teórico do Prodan no estado fundamental, pois o Prodan é uma molécula menor, com menos átomos (Prodan tem 34 átomos, Laurdan tem 61 átomos). Com isso o tempo computacional é razoável, para a utilização de técnicas de modelagem molecular mais robustas e ainda não utilizadas nessa molécula.

A construção do modelo teórico para o Prodan mostrou que essa molécula é planar no estado fundamental. Na presença dos diferentes solventes, com diferentes polaridades, essa molécula sofre uma grande polarização, tendo o momento de dipolo do estado fundamental alterado de 5.8 D, em vácuo, para 10.2 D em meio aquoso. Mostramos também que para os solventes ciclohexano, diclorometano e acetonitrila, o modelo contínuo polarizável para o

solvente (*PCM*), isto é, sem interações específicas, é capaz de causar a mesma polarização que a obtida com a utilização do modelo discreto para o solvente. Porém, para o caso da água, a polarização foi melhor descrita com o modelo discreto para o solvente, mostrando a importância de interações específicas, como ligações de hidrogênio nesse solvente. Apesar do Prodan sofrer um grande processo de polarização em meio aquoso, esse processo não caracteriza a transferência intramolecular de carga no estado fundamental, no sentido convencional, onde a carga sai de um grupo doador de elétrons (no caso do Prodan seria o nitrogênio) e vai para um grupo aceitador de elétrons (o oxigênio), como é sugerido por alguns artigos na literatura [Parusel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1997; Parusel, 1998]. Analisando as cargas atômicas obtidas após o processo de polarização, foi possível verificar que existe uma separação de carga entre o oxigênio (O5) e o carbono (C4) a ele conectado e não com o nitrogênio (N26), no estado fundamental.

Utilizando o modelo discreto para as moléculas de solvente ao redor do Prodan, apenas com interações intermoleculares entre o soluto e o solvente (moléculas sem flexibilidade interna), foi possível descrever os espectros de absorção eletrônica medidos experimentalmente nos solventes ciclohexano, diclorometano e acetonitrila. Nesses solventes, tanto as posições das bandas, como a largura das mesmas, foram bem descritas. Para o caso da água, a banda de menor energia ($< 33.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) não foi bem descrita, considerando apenas as interações intermoleculares. Foi preciso considerar as interações intramoleculares e com isso incluir a flexibilidade interna da molécula, para se obter uma boa descrição do espectro de absorção eletrônica nesse solvente.

A construção do modelo teórico para o Prodan mostrou que a banda de menor energia (maior comprimento de onda) dos espectros de absorção do Prodan e do Laurdan é composta na verdade por três transições diferentes, duas do tipo $\pi - \pi^*$ e uma do tipo $n - \pi^*$, em todos os solventes estudados. Mostrando que ao excitarmos essas moléculas nessa banda, três estados excitados estão sendo ocupados.

Um estudo detalhado do espectro de absorção do Prodan em água, utilizando a lei de Lambert-Beer, mostrou que essa molécula agrega nesse solvente em todas as concentrações estudadas (0.9 até 20.0 μM), diferentemente do observado na literatura, onde foi descrita uma concentração de agregação de 10 μM [Sun *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 2006]. De acordo com esse resultado, cálculos teóricos de energia livre de solvatação mostraram que o Prodan solvata melhor entre as moléculas de Prodan do que entre moléculas de água. Os espectros de absorção em baixas concentrações ($\sim 1.2 \mu\text{M}$) são bem descritos por cálculos teóricos de apenas uma molécula em água, pois monômeros devem ser mais abundantes do que os

agregados em concentrações baixas. Os espectros medidos em concentrações mais altas ($\sim 20.0 \mu\text{M}$) são melhores descritos com os cálculos teóricos realizados em dímeros de Prodan, mostrando que nessas concentrações, agregados de Prodan são mais abundantes em solução aquosa. As medidas do espectro de emissão do Prodan em água apresentam um comportamento curioso: ao aumentar a concentração, a sua intensidade aumenta quase linearmente. Isso sugere que ao agregar o Prodan pode ter o seu rendimento quântico aumentado, pois apesar de absorver pouca luz, a sua emissão fluorescente continua aumentando. Esse aumento no rendimento quântico talvez esteja associado com o impedimento de alguns decaimentos não-radioativos, associados a graus de liberdade moleculares que são impedidos quando a agregação ocorre.

Os espectros de absorção eletrônica do Prodan e Laurdan em bicamadas lipídicas de DLPC e DPPC são muito semelhantes para as duas sondas e não são sensíveis à variação de temperatura, ou seja, à mobilidade da bicamada, com exceção do espectro de absorção do Laurdan em bicamadas de DPPC, onde uma pequena variação com a temperatura é observada. A comparação dos espectros de absorção medidos em bicamadas com os medidos nos diferentes solventes indica que essas sondas não estão localizadas no interior da bicamada, ou seja, entre as monocamadas lipídicas, mas elas estão numa posição mais superficial, num ambiente de maior polaridade, onde moléculas de água podem penetrar.

5.2 Conclusões Sobre o Efeito do Ambiente no Espectro de Emissão Fluorescente

A comparação dos espectros de emissão fluorescente do Prodan e Laurdan nos diferentes solventes mostra que os espectros são muito parecidos, indicando que os estados excitados dessas duas sondas são muito semelhantes em solventes homogêneos, assim como aconteceu para o estado fundamental.

Os espectros de emissão fluorescente do Prodan e do Laurdan são muito sensíveis a polaridade do solvente, tanto na sua posição como na sua forma. O deslocamento dos espectros de emissão fluorescente com a polaridade do solvente é muito maior do que o deslocamento observado para o espectro de absorção eletrônica. Para os espectros de absorção, um deslocamento de $\sim 1.3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ para menores energias é observado, ao mudar a polaridade de água até ciclohexano. Para os espectros de emissão, um deslocamento de $\sim 5.9 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ é observado. Isto mostra que o estado excitado dessas sondas é mais sensível à polaridade do solvente do que o estado fundamental.

Para analisar os espectros de emissão fluorescente dessas sondas, propusemos a decomposição dos espectros em duas gaussianas e a análise das duas bandas através da razão da área da banda de menor energia pela área total do espectro, obtendo a fração:

$$\frac{A_2}{A_T} = \frac{A_2}{A_1 + A_2},$$

que indica a porcentagem de contribuição dessa banda de emissão para o espectro total, onde A_T é a área total do espectro dada pela soma das áreas das duas bandas.

Mostramos que os espectros medidos nos diferentes solventes homogêneos podem ser decompostos em duas gaussianas, indicando a presença de dois estados excitados, a partir dos quais essas moléculas emitem fluorescência. A presença desses dois estados foi confirmada por medidas de decaimento temporal fluorescente, onde foi possível verificar a presença de dois tempos de vida, tanto em água como em ciclohexano. A presença de dois estados excitados que emitem fluorescência em ciclohexano foi mostrada apenas por um artigo na literatura [Rowe *et al.*, 2008]. Indicando que mesmo com uma interação muito pequena com o solvente, ou seja, sem relaxação com o solvente, essas moléculas emitem de dois estados excitados. Portanto, não podemos relacionar essas bandas com um estado não relaxado e outro estado relaxado com o solvente, como propõem alguns artigos na literatura [Heisel *et al.*, 1987; Viard *et al.*, 1997; Kozyra *et al.*, 2003]. Com o aumento da polaridade, as duas bandas do espectro de emissão deslocam-se juntas para menores energias, indicando que ambas estão sofrendo mais relaxação com o solvente.

A presença de dois estados excitados deve estar diretamente relacionada com o fato da banda de absorção, onde essas sondas são excitadas, ser composta de três transições, levando a sonda a três estados excitados diferentes. É possível que desses três estados excitados, dois sejam fluorescentes, levando ao aparecimento de duas bandas de emissão. Analisando a variação da posição do máximo de cada banda com a polaridade do solvente, foi possível verificar que os dois estados excitados podem ser de mesma natureza. Isto porque ambos tiveram as suas energias deslocadas para menores energias com o aumento da polaridade, sugerindo que essas bandas podem ser caracterizadas por transições do tipo $\pi - \pi^*$.

Na literatura é conhecido que o espectro de emissão dessas sondas em bicamadas é composto por duas bandas. Uma delas é analisada como sendo a sonda localizada em uma região onde os lipídios estão na fase gel (banda de maior energia) e a outra é analisada como a sonda localizada em uma região onde os lipídios estão na fase fluida. As bandas estariam relacionadas com a fase da bicamada lipídica [Parasassi *et al.*, 1990; Parasassi *et al.*, 1991;

Bagatolli *et al.*, 1997; Bagatolli *et al.*, 1998]. Os espectros de emissão fluorescente do Prodan e Laurdan em bicamadas lipídicas, medidos nesta tese, mostram que essa relação não é verdadeira, pois mesmo o lipídio estando em apenas uma das fases, gel ou fluida, os espectros de emissão do Prodan e do Laurdan são compostos por duas bandas. Mostramos que a fração (A_2/A_T) é um parâmetro melhor para quantificar as duas bandas de emissão do que o parâmetro usado atualmente na literatura, chamado de *GP* (*Generalized Polarization*), proposto por [Parasassi *et al.*, 1990; Parasassi *et al.*, 1991].

Analizando a variação da posição do máximo de cada banda, em função da temperatura (quanto maior a temperatura, maior a mobilidade da bicamada e maior a quantidade de água no seu interior, aumentando a polaridade), verificamos que um estado excitado, o de maior energia, tem a sua energia aumentada com o aumento da polaridade/mobilidade. Esse comportamento é inverso do observado para as bandas em solventes homogêneos. Sugerindo que essa banda em bicamada possa ser caracterizada por uma transição $n - \pi^*$. O outro estado excitado, o de menor energia, tem a sua energia diminuída com o aumento da polaridade/mobilidade da bicamada, do mesmo modo que as bandas presentes nos solventes homogêneos. Sugerindo que ela possa ser caracterizada, como as bandas em solvente, por uma transição $\pi - \pi^*$.

A presença das duas bandas de emissão foi confirmada por medidas dos tempos de vida das duas sondas em bicamadas de DLPC e DPPC e também pela reconstrução dos espectros de emissão de cada banda pelo método *DAS* (*Decay Associated Spectrum*). Essa reconstrução é compatível com as decomposições em gaussianas para todos os sistemas estudados. Analisando a posição das bandas que compõem os espectros de emissão fluorescente das duas sondas em bicamadas de DLPC e DPPC, na fase fluida, foi possível verificar que o Prodan deve estar em um micro-ambiente de maior polaridade/mobilidade do que o Laurdan, ou seja, mais superficial na bicamada lipídica.

A análise dos espectros de emissão do Prodan, em bicamadas de DPPC na fase gel, mostra que essa sonda está parte na bicamada e parte em meio aquoso nessa fase da bicamada. Porém, quando a bicamada passa pela transição de fase, com a variação da temperatura, a sonda é toda incorporada à bicamada. Essa partição foi observada nas medidas do espectro de emissão fluorescente e também nas medidas de tempo de vida dos estados excitados. Para o Laurdan isso não é observado, devido ao seu caráter mais hidrofóbico.

A comparação entre as bandas observadas em solventes homogêneos e bicamadas lipídicas é bastante complicada, pois a natureza dos estados excitados observados parece ser diferente. Em solventes homogêneos, os dois estados parecem ser de mesma natureza

(apresentando o mesmo comportamento com o aumento da polaridade, provavelmente transições do tipo $\pi - \pi^*$). Porém, em bicamadas lipídicas, os estados excitados parecem ser de naturezas diferentes (apresentando comportamento diferente com a variação da polaridade/mobilidade da bicamada, provavelmente uma transição $n - \pi^*$ e outra $\pi - \pi^*$). Cálculos teóricos do estado excitado dessas sondas poderiam esclarecer a natureza desses dois estados excitados. Pretendemos realizar esses cálculos para molécula de Prodan nos próximos anos.

6

REFERÊNCIAS

- Adhikary, R., Barnes, C. A. e Petrich, J. W. *Solvation Dynamics of the Fluorescent Probe PRODAN in Heterogeneous Environments: Contributions from the Locally Excited and Charge-Transferred States*. Journal of Physical Chemistry B, **113**, 11999-12004, (2009).
- Ahlswede, B. e Jug, K. *Consistent modifications of SINDO1: I. Approximations and parameters*. Journal of Computational Chemistry, **20**, 563-571, (1999a).
- Ahlswede, B. e Jug, K. *Consistent modifications of SINDO1: II. Applications to first- and second-row elements*. Journal of Computational Chemistry, **20**, 572-578, (1999b).
- Alder, B. J. e Wainwright, T. E. *Phase Transition for a Hard Sphere System*. Journal of Chemical Physics, **27**, 1208-1209, (1957).
- Alder, B. J. e Wainwright, T. E. *Studies in Molecular Dynamics .1. General Method*. Journal of Chemical Physics, **31**, 459-466, (1959).
- Alder, B. J. e Wainwright, T. E. *Studies in Molecular Dynamics .2. Behavior of a Small Number of Elastic Spheres*. Journal of Chemical Physics, **33**, 1439-1451, (1960).
- Allen, M. S. e Tildesley, D. J. Computer Simulations of Liquids. Oxford: Oxford Science Publications, (1991).
- Alleva, R., Ferretti, G., Borghi, B., Pignotti, E., Bassi, A. e Curatola, G. *Physicochemical Properties of Membranes of Recovered Erythrocytes in Blood Autologous Transfusion - a Study Using Fluorescence Technique*. Transfusion Science, **16**, 291-297, (1995).
- Ambrosini, A., Bertoli, E., Tanfani, F., Wozniak, M. e Zolese, G. *The Effect of N-Acyl Ethanolamines on Phosphatidylethanolamine Phase-Transitions Studied by Laurdan Generalized Polarization*. Chemistry and Physics of Lipids, **72**, 127-134, (1994).
- Ambrosini, A., Zolese, G., Balercia, G., Bertoli, E., Arnaldi, G. e Mantero, F. *Laurdan* fluorescence: a simple method to evaluate sperm plasma membrane alterations*. Fertility and Sterility, **76**, 501-505, (2001).
- Artukhov, V. Y., Zharkova, O. M. e Morozova, J. P. *Features of absorption and fluorescence spectra of prodan*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **68**, 36-42, (2007).
- Atkins, P. e Friedman, R. Molecular Quantum Mechanics. Oxford: Oxford University Press, (2005).
- Bacon, A. D. e Zerner, M. C. *Intermediate Neglect of Differential Overlap Theory for Transition-Metal Complexes - Fe, Co and Cu Chlorides*. Theoretica Chimica Acta, **53**, 21-54, (1979).
- Bagatolli, L. A., Gratton, E. e Fidelio, G. D. *Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence*. Biophysical Journal, **75**, 331-341, (1998).
- Bagatolli, L. A., Maggio, B., Aguilar, F., Sotomayor, C. P. e Fidelio, G. D. *Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures: A comparative fluorescence and calorimetric study*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, **1325**, 80-90, (1997).
- Balter, A., Nowak, W., Pawelkiewicz, W. e Kowalczyk, A. *Some Remarks on the Interpretation of the Spectral Properties of Prodan*. Chemical Physics Letters, **143**, 565-570, (1988).
- Bayliss, N. S. e Mcrae, E. G. *Solvent Effects in Organic Spectra - Dipole Forces and the Franck-Condon Principle*. Journal of Physical Chemistry, **58**, 1002-1006, (1954).
- Becke, A. D. *Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic-Behavior*. Physical Review A, **38**, 3098-3100, (1988).
- Bell, J. D., Burnside, M., Owen, J. A., Royall, M. L. e Baker, M. L. *Relationships between bilayer structure and phospholipase A(2) activity: Interactions among temperature, diacylglycerol, lysolecithin, palmitic acid, and dipalmitoylphosphatidylcholine*. Biochemistry, **35**, 4945-4955, (1996).
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A. e Haak, J. R. *Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath*. Journal of Chemical Physics, **81**, 3684-3690, (1984).
- Bingham, R. C., Dewar, M. J. S. e Lo, D. H. *Ground-States of Molecules .25. Mindo-3 - Improved Version of Mindo Semiempirical Scf-Mo Method*. Journal of the American Chemical Society, **97**, 1285-1293, (1975).
- Birks, J. B. Photophysics of Aromatics Molecules. New York: Wiley-Interscience, (1970).
- Bohm, H. J., McDonald, I. R. e Madden, P. A. *An Effective Pair Potential for Liquid Acetonitrile*. Molecular Physics, **49**, 347-360, (1983).

- Born, M. *Volumes and hydration warmth of ions*. *Zeitschrift Fur Physik*, **1**, 45-48, (1920).
- Born, M. e Oppenheimer, R. *Quantum theory of molecules*. *Annalen Der Physik*, **84**, 0457-0484, (1927).
- Bowen, E. J. e Wokes, F. *Fluorescence of Solutions*. Londres: Longmans, Green and Co., (1953).
- Brady, J. E. e Carr, P. W. *An Analysis of Dielectric Models of Solvatochromism*. *Journal of Physical Chemistry*, **89**, 5759-5766, (1985).
- Bransden, B. H. e Joachain, C. J. *Physics of Atoms and Molecules*. Edinburgh: Longman, (1996).
- Breneman, C. M. e Wiberg, K. B. *Determining Atom-Centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potentials - the Need for High Sampling Density in Formamide Conformational-Analysis*. *Journal of Computational Chemistry*, **11**, 361-373, (1990).
- Briggs, J. M., Matsui, T. e Jorgensen, W. L. *Monte-Carlo Simulations of Liquid Alkyl Ethers with the Opls Potential Functions*. *Journal of Computational Chemistry*, **11**, 958-971, (1990).
- Briggs, J. M., Nguyen, T. B. e Jorgensen, W. L. *Monte-Carlo Simulations of Liquid Acetic-Acid and Methyl Acetate with the Opls Potential Functions*. *Journal of Physical Chemistry*, **95**, 3315-3322, (1991).
- Bruckner, R. J., Mansy, S. S., Ricardo, A., Mahadevan, L. e Szostak, J. W. *Flip-Flop-Induced Relaxation of Bending Energy: Implications for Membrane Remodeling*. *Biophysical Journal*, **97**, 3113-3122, (2009).
- Brunelli, R., Mei, G., Krasnowska, E. K., Pierucci, F., Zichella, L., Ursini, F. e Parasassi, T. *Estradiol enhances the resistance of LDL to oxidation by stabilizing apoB-100 conformation*. *Biochemistry*, **39**, 13897-13903, (2000).
- Brunschwig, B. S., Ehrenson, S. e Sutin, N. *Solvent Reorganization in Optical and Thermal Electron-Transfer Processes - Solvatochromism and Intramolecular Electron-Transfer Barriers in Spheroidal Molecules*. *Journal of Physical Chemistry*, **91**, 4714-4723, (1987).
- Bunker, C. E., Bowen, T. L. e Sun, Y. P. *A Photophysical Study of Solvatochromic Probe 6-Propionyl-2-(N,N-Dimethylamino)Naphthalene (Prodan) in Solution*. *Photochemistry and Photobiology*, **58**, 499-505, (1993).
- Cantor, C. R. e Schimmel, P. R. *Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. New York: W.H. Freeman and Company, (1980).
- Canuto, S., Coutinho, K. e Trzesniak, D. *New developments in Monte Carlo/quantum mechanics methodology. The solvatochromism of beta-carotene in different solvents*. *Advances in Quantum Chemistry*, **41**, 161-183, (2002).
- Canuto, S., Coutinho, K. e Zerner, M. C. *Including dispersion in configuration interaction-singles calculations for the spectroscopy of chromophores in solution*. *Journal of Chemical Physics*, **112**, 7293-7299, (2000).
- Castro, M. A. e Canuto, S. *Métodos perturbativos para a obtenção de correlação eletrônica*. In: N. H. Morgon e K. Coutinho (Ed.). *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo: Livraria da Física, (2007a).
- Castro, M. A. e Canuto, S. *O Método de Hartree-Fock*. In: N. H. Morgon e K. Coutinho (Ed.). *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo: Livraria da Física, (2007b).
- Catalan, J., Perez, P., Laynez, J. e Blanco, F. G. *Analysis of the Solvent Effect on the Photophysics Properties of 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene (PRODAN)*. *Journal of Fluorescence*, **1**, 215-223, (1991).
- Chang, R. *Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences*. Sausalito, CA: University Science Books, (2000).
- Chiang, Y., Costa-Filho, A. e Freed, J. *Two-dimensional ELDOR in the study of model and biological membranes*. *Applied Magnetic Resonance*, **31**, 375-386, (2007).
- Condon, E. U. *Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules*. *Physical Review*, **32**, 0858-0872, (1928).
- Coutinho, K. *Modelo Discreto do Solvente. Solvatocromismo no Espectro de Absorção Molecular*. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, (1997). 161 p.
- Coutinho, K. e Canuto, S. *Solvent effects from a sequential Monte Carlo - Quantum mechanical approach*. *Advances in Quantum Chemistry*, **28**, 89-105, (1997).
- Coutinho, K. e Canuto, S. *DICE: A Monte Carlo program for molecular liquid simulation*. São Paulo, Brazil 2003.

- Coutinho, K., De Oliveira, M. J. e Canuto, S. *Sampling configurations in Monte Carlo simulations for quantum mechanical studies of solvent effects*. International Journal of Quantum Chemistry, **66**, 249-253, (1998).
- Coutinho, K., Georg, H. C., Fonseca, T. L., Ludwig, V. e Canuto, S. *An efficient statistically converged average configuration for solvent effects*. Chemical Physics Letters, **437**, 148-152, (2007).
- Coutinho, K., Rivelino, R., Georg, H. C. e Canuto, S. *The Sequential QM/MM Method and Its Applications to Solvent Effects in Electronic and Structural Properties of Solutes*. In: S. Canuto (Ed.). Solvation Effects on Molecules and Biomolecules: Springer, v.6, (2008).
- Coutinho, K., Saavedra, N. e Canuto, S. *Theoretical analysis of the hydrogen bond interaction between acetone and water*. Journal of Molecular Structure-Theochem, **466**, 69-75, (1999).
- Damm, W., Frontera, A., Tiradorives, J. e Jorgensen, W. L. *OPLS all-atom force field for carbohydrates*. Journal of Computational Chemistry, **18**, 1955-1970, (1997).
- De Vequi-Suplicy, C. C., Benatti, C. R. e Lamy, M. T. *Laurdan in fluid bilayers: Position and structural sensitivity*. Journal of Fluorescence, **16**, 431-439, (2006).
- Delbene, J. e Jaffe, H. H. *Use of Cnd Method in Spectroscopy .I. Benzene Pyridine and Diazines*. Journal of Chemical Physics, **48**, 1807-&, (1968).
- Demchenko, A. P., Mely, Y., Duportail, G. e Klymchenko, A. S. *Monitoring Biophysical Properties of Lipid Membranes by Environment-Sensitive Fluorescent Probes*. Biophysical Journal, **96**, 3461-3470, (2009).
- Dewar, M. J. S. e Thiel, W. *Ground-States of Molecules .38. Mndo Method - Approximations and Parameters*. Journal of the American Chemical Society, **99**, 4899-4907, (1977a).
- Dewar, M. J. S. e Thiel, W. *Ground-States of Molecules .39. Mndo Results for Molecules Containing Hydrogen, Carbon, Nitrogen, and Oxygen*. Journal of the American Chemical Society, **99**, 4907-4917, (1977b).
- Dewar, M. J. S., Zebisch, E. G., Healy, E. F. e Stewart, J. J. P. *The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. Am1 - a New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular-Model*. Journal of the American Chemical Society, **107**, 3902-3909, (1985).
- Ditchfield, R., Hehre, W. J. e Pople, J. A. *Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .9. Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules*. Journal of Chemical Physics, **54**, 724-&, (1971).
- Duarte, H. A. e Rocha, W. R. *Teoria do Funcional Densidade*. In: N. H. Morgon e K. Coutinho (Ed.). Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular São Paulo: Livraria da Física, (2007).
- Dunning, T. H. *Gaussian-Basis Sets for Use in Correlated Molecular Calculations .I. The Atoms Boron through Neon and Hydrogen*. Journal of Chemical Physics, **90**, 1007-1023, (1989).
- Eisenstein, A. e Gingrich, N. S. *The diffraction of x-rays by argon in the liquid, vapor, and critical regions*. Physical Review, **62**, 261-270, (1942).
- Epand, R. M. e Kraayenhof, R. *Fluorescent probes used to monitor membrane interfacial polarity*. Chemistry and Physics of Lipids, **101**, 57-64, (1999).
- Everett, R. K., Nguyen, A. A. e Abelt, C. J. *Does PRODAN Possess an O-TICT Excited State? Synthesis and Properties of Two Constrained Derivatives*. Journal of Physical Chemistry A, **114**, 4946-4950, (2010).
- Ferretti, G., Taus, M., Dousset, N., Solera, M. L., Valdiguie, P. e Curatola, G. *Physicochemical Properties of Copper-Oxidized High-Density-Lipoprotein - a Fluorescence Study*. Biochemistry and Molecular Biology International, **30**, 713-719, (1993).
- Fidorra, M., Duelund, L., Leidy, C., Simonsen, A. C. e Bagatolli, L. A. *Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol*. Biophysical Journal, **90**, 4437-4451, (2006).
- Field, M. J., Bash, P. A. e Karplus, M. *A Combined Quantum-Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular-Dynamics Simulations*. Journal of Computational Chemistry, **11**, 700-733, (1990).
- Flanders, B. N., Dunn, R. C. e Toyoko, I. *Chapter 5 Near-Field Scanning Optical Microscopy of Lipid Membranes*. In: (Ed.). Interface Science and Technology: Elsevier, v. Volume 14, (2007).

- Foresman, J. B. e Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Pittsburgh: Gaussian, Inc., (1996).
- Franck, J. *Elementary processes of photochemical reactions*. *Transactions of the Faraday Society*, **21**, 0536-0542, (1926).
- Freitas, L. C. G., Moura, A. F. e Barlette, V. E. *O Método de Monte Carlos: Aplicações no Estudo de Líquidos e Soluções*. In: N. H. Morgon e K. Coutinho (Ed.). *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo: Livraria da Física, (2007).
- Frenkel, D. e Smit, B. *Understanding Molecular Simulation* London: Academic Press, (2001).
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, J. A., Jr., T. V., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., T. Nakajima, Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C. e Pople, J. A. GAUSSIAN. Wallingford CT: Gaussian, Inc. 2004.
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E. P. W., Jones, A. S., Gelissen, I., Kritharides, L. e Jessup, W. *Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 15554-15559, (2003).
- Georg, H. C. e Canuto, S. *Métodos Híbridos para Modelagem do Ambiente Molecular*. In: N. H. Morgon e K. Coutinho (Ed.). *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo: Livraria da Física, (2007a).
- Georg, H. C., Coutinho, K. e Canuto, S. *Converged electronic polarization of acetone in liquid water and the role in the $n\text{-}\pi^*$ transition*. *Chemical Physics Letters*, **429**, 119-123, (2006).
- Georg, H. C., Coutinho, K. e Canuto, S. *Solvent effects on the UV-visible absorption spectrum of benzophenone in water: A combined Monte Carlo quantum mechanics study including solute polarization*. *Journal of Chemical Physics*, **126**, -, (2007b).
- Ghoneim, N. e Suppan, P. *Solvatochromic Shifts of Nondipolar Molecules in Polar-Solvents*. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **51**, 1043-1050, (1995).
- Gruszecki, W. I., Gagos, M., Herec, M. e Kernen, P. *Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **8**, 161-170, (2003).
- Hansson, A., Souza, P. C. T., Silveira, R. L., Martínez, L. e Skaf, M. S. *CHARMM force field parameterization of rosiglitazone (p NA)*. *International Journal of Quantum Chemistry*, **In press**, (2010).
- Hartree, D. R. *The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field Part I theory and methods*. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, **24**, 89-110, (1928).
- Hehre, W. J., Ditchfie, R. e Pople, J. A. *Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .12. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular-Orbital Studies of Organic-Molecules*. *Journal of Chemical Physics*, **56**, 2257-&, (1972).
- Hehre, W. J., Radom, L., Schleyer, P. V. e Pople, J. A. *Abinitio Molecular Orbital Theory* New York: Wiley-Interscience, (1986).
- Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*. Weinheim: Wiley-VCH, (2007).
- Heisel, F., Miehe, J. A. e Szemik, A. W. *Experimental-Evidence of an Intramolecular Reaction in Excited Prodan Solution*. *Chemical Physics Letters*, **138**, 321-326, (1987).
- Hernandes, M. Z., Longo, R., Coutinho, K. e Canuto, S. *Solute relaxation on the solvatochromism of ortho-betaine dyes. A sequential Monte Carlo/quantum mechanics study*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **6**, 2088-2092, (2004).

- Hertwig, R. H. e Koch, W. *On the parameterization of the local correlation functional. What is Becke-3-LYP?* Chemical Physics Letters, **268**, 345-351, (1997).
- Hilborn, R. C. *Einstein Coefficients, Cross-Sections, F Values, Dipole-Moments, and All That.* American Journal of Physics, **50**, 982-986, (1982).
- Hill, T. L. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. New York: Dover, (1986).
- Hodsdon, M. E., Ponder, J. W. e Cistola, D. P. *The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: Application of a novel distance geometry algorithm.* Journal of Molecular Biology, **264**, 585-602, (1996).
- Hohenberg, P. e Kohn, W. *Inhomogeneous Electron Gas.* Physical Review B, **136**, B864-&, (1964).
- Huang, Y., Li, X. Y., Fu, K. X. e Zhu, Q. *New formulation for non-equilibrium solvation: Spectral shifts and cavity radii of 6-propanoyl-2(N,N-dimethylamino) naphthalene and 4-(N,N-dimethylamino) benzonitrile.* Journal of Theoretical & Computational Chemistry, **5**, 355-374, (2006).
- Humbel, S., Sieber, S. e Morokuma, K. *The IMOMO method: Integration of different levels of molecular orbital approximations for geometry optimization of large systems: Test for n-butane conformation and S(N)2 reaction: RCl+Cl-.* Journal of Chemical Physics, **105**, 1959-1967, (1996).
- Ilich, P. e Prendergast, F. G. *Singlet Adiabatic States of Solvated PRODAN: A Semiempirical Molecular Orbital Study.* J. Phys. Chem., **93**, 4441-4447, (1989).
- Isenberg, G., Niggli, V. e Kwang, W. J. *Interaction of Cytoskeletal Proteins with Membrane Lipids.* In: (Ed.). International Review of Cytology: Academic Press, v. Volume 178, (1997).
- Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*. New York: Wiley, (1999).
- Jorgensen, W. L. *Free Energy Changes in Solutions.* In: P. R. Schleyer (Ed.). Encyclopedia of Computational Chemistry. New York: John Wiley & Sons, v.V. 2, (1998).
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. e Klein, M. L. *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water.* Journal of Chemical Physics, **79**, 926-935, (1983).
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. e Tiradorives, 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, **118**, 11225-11236, (1996).
- Jorgensen, W. L. e Nguyen, T. B. *Monte-Carlo Simulations of the Hydration of Substituted Benzenes with Opls Potential Functions.* Journal of Computational Chemistry, **14**, 195-205, (1993).
- Jorgensen, W. L. e Ravimohan, C. *Monte-Carlo Simulation of Differences in Free-Energies of Hydration.* Journal of Chemical Physics, **83**, 3050-3054, (1985).
- Jorgensen, W. L. e Tirado-Rives, J. *The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin.* J. Am. Chem. Soc., **110**, 1657-1666, (1988).
- Jug, K., Iffert, R. e Schulz, J. *Development and Parametrization of Sindol for 2Nd-Row Elements.* International Journal of Quantum Chemistry, **32**, 265-277, (1987).
- Kaminski, G., Duffy, E. M., Matsui, T. e Jorgensen, W. L. *Free-Energies of Hydration and Pure Liquid Properties of Hydrocarbons from the Opls All-Atom Model.* Journal of Physical Chemistry, **98**, 13077-13082, (1994).
- Kaminski, G. e Jorgensen, W. L. *Performance of the AMBER94, MMFF94, and OPLS-AA force fields for modeling organic liquids.* Journal of Physical Chemistry, **100**, 18010-18013, (1996).
- Karmakar, R. e Samanta, A. *Steady-state and time-resolved fluorescence behavior of C153 and PRODAN in room-temperature ionic liquids.* Journal of Physical Chemistry A, **106**, 6670-6675, (2002).
- Kawski, A. *Ground- and excited-state dipole moments of 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene determined from solvatochromic shifts.* Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences, **54**, 379-381, (1999).
- Kawski, A., Kuklinski, B. e Bojarski, P. *Thermochromic shifts of absorption and fluorescence spectra and excited state dipole moment of PRODAN.* Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences, **55**, 550-554, (2000a).
- Kawski, A., Kuklinski, B., Bojarski, P. e Diehl, H. *Ground and excited state dipole moments of LAURDAN determined from solvatochromic and thermochromic shifts of absorption and*

- fluorescence spectra. Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences*, **55**, 817-822, (2000b).
- Kendall, R. A., Dunning, T. H. e Harrison, R. J. *Electron-Affinities of the 1St-Row Atoms Revisited - Systematic Basis-Sets and Wave-Functions. Journal of Chemical Physics*, **96**, 6796-6806, (1992).
- Kindzelskii, A. L., Sitrin, R. G. e Petty, H. R. *Cutting edge: Optical microspectrophotometry supports the existence of gel phase lipid rafts at the lamellipodium of neutrophils: Apparent role calcium signaling. Journal of Immunology*, **172**, 4681-4685, (2004).
- Kirkwood, J. G. *Theory of Solutions of Molecules Containing Widely Separated Charges with Special Application to Zwitterions. J. Phys. Chem.*, **2**, 351-361, (1934).
- Klessinger, M. e Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. New York: VHC Publishers, Inc., (1995).
- Kohn, W. e Sham, L. J. *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. Physical Review*, **140**, 1133-&, (1965).
- Kozyra, K. A., Heldt, J. R., Heldt, J., Engelke, M. e Diehl, H. A. *Concentration and temperature dependence of Laurdan fluorescence in glycerol. Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences*, **58**, 581-588, (2003).
- Krishnan, R., Schlegel, H. B. e Pople, J. A. *Derivative Studies in Configuration-Interaction Theory. Journal of Chemical Physics*, **72**, 4654-4655, (1980).
- Kundrot, C. E., Ponder, J. W. e Richards, F. M. *Algorithms for Calculating Excluded Volume and Its Derivatives as a Function of Molecular-Conformation and Their Use in Energy Minimization. Journal of Computational Chemistry*, **12**, 402-409, (1991).
- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Publishers, (2006).
- Lakowicz, J. R. e Balter, A. *Analysis of Excited-State Processes by Phase-Modulation Fluorescence Spectroscopy. Biophysical Chemistry*, **16**, 117-132, (1982a).
- Lakowicz, J. R. e Balter, A. *Differential-Wavelength Deconvolution of Time-Resolved Fluorescence Intensities - a New Method for the Analysis of Excited-State Processes. Biophysical Chemistry*, **16**, 223-240, (1982b).
- Lee, C. T., Yang, W. T. e Parr, R. G. *Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. Physical Review B*, **37**, 785-789, (1988).
- Leininger, M. L., Allen, W. D., Schaefer, H. F. e Sherrill, C. D. *Is Moller-Plesset perturbation theory a convergent ab initio method? Journal of Chemical Physics*, **112**, 9213-9222, (2000).
- Levine, I. N. *Quantum Chemistry*. New Jersey: Prentice Hall, (2000).
- Levitt, M. *The birth of computational structural biology. Nature Structural Biology*, **8**, 392-393, (2001).
- Lide, D. R., Weast, R. C. e Chemical Rubber Company. *CRC Handbook of chemistry and physics : a ready reference book of chemical and physical data*. Boca Raton, Fla. : CRC Press, (2002).
- Lifson, S. e Warshel, A. *Consistent Force Field for Calculations of Conformations Vibrational Spectra and Enthalpies of Cycloalkane and N-Alkane Molecules. Journal of Chemical Physics*, **49**, 5116-&, (1968).
- Lim, E. C. *Proximity Effect in Molecular Photophysics - Dynamic Consequences of Pseudo-Jahn-Teller Interaction. Journal of Physical Chemistry*, **90**, 6770-6777, (1986).
- Lindblom, G. e Gröbner, G. *NMR on lipid membranes and their proteins. Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **11**, 24-29, (2006).
- Lippert, E. *Dipolmoment Und Elektronenstruktur Von Angeregten Molekullen. Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie*, **10**, 541-545, (1955).
- Liu, R. S. H. *Colorful azulene and its equally colorful derivatives. Journal of Chemical Education*, **79**, 183-185, (2002).
- Lobo, B. C. e Abelt, C. J. *Does PRODAN possess a planar or twisted charge-transfer excited state? Photophysical properties of two PRODAN derivatives. Journal of Physical Chemistry A*, **107**, 10938-10943, (2003).
- Lodish, H., Darnell, J., Matsudaira, P., Berk, A. e Scott, M. P. *Molecular Cell Biology*: W. H. Freeman Company, (2003).

- Malaspina, T., Coutinho, K. e Canuto, S. *Ab initio calculation of hydrogen bonds in liquids: A sequential Monte Carlo quantum mechanics study of pyridine in water.* Journal of Chemical Physics, **117**, 1692-1699, (2002).
- Mark, A. E. *Free Energy Perturbation Calculations.* In: P. R. Schleyer (Ed.). Encyclopedia of Computational Chemistry. New York: John Wiley & Sons, v.V. 2, (1998).
- Marsh, D. *CRC Handbook of Lipids Bilayers.* Boca Raton, (1990).
- Marsh, D. *Reaction Fields in the Environment of Fluorescent Probes: Polarity Profiles in Membranes.* Biophysical Journal, **96**, 2549-2558, (2009).
- Martínez, L., Borin, I. A. e Skaf, M. S. *Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular.* In: N. H. Morgon e K. Coutinho (Ed.). Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo: Livraria da Física, (2007).
- Martyna, G. J., Tobias, D. J. e Klein, M. L. *Constant-Pressure Molecular-Dynamics Algorithms.* Journal of Chemical Physics, **101**, 4177-4189, (1994).
- Mataga, N., Kaifu, Y. e Koizumi, M. *Solvent Effects Upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules.* Bulletin of the Chemical Society of Japan, **29**, 465-470, (1956).
- Mcrae, E. G. *Theory of Solvent Effects on Molecular Electronic Spectra - Frequency Shifts.* Journal of Physical Chemistry, **61**, 562-572, (1957).
- Mennucci, B., Caricato, M., Ingrosso, F., Cappelli, C., Cammi, R., Tomasi, J., Scalmani, G. e Frisch, M. J. *How the environment controls absorption and fluorescence spectra of PRODAN: A quantum-mechanical study in homogeneous and heterogeneous media.* Journal of Physical Chemistry B, **112**, 414-423, (2008).
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. e Teller, E. *Equation of State Calculations by Fast Computing Machines.* Journal of Chemical Physics, **21**, 1087-1092, (1953).
- Metropolis, N. e Ulam, S. *The Monte Carlo Method.* Journal of the American Statistical Association, **44**, 335-341, (1949).
- Mezei, M. e Beveridge, D. L. *Theoretical-Studies of Hydrogen-Bonding in Liquid Water and Dilute Aqueous-Solutions.* Journal of Chemical Physics, **74**, 622-632, (1981).
- Miertus, S., Scrocco, E. e Tomasi, J. *Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum - a Direct Utilization of Abinitio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects.* Chemical Physics, **55**, 117-129, (1981).
- Moller, C. e Plesset, M. S. *Note on an approximation treatment for many-electron systems.* Physical Review, **46**, 0618-0622, (1934).
- Morozova, Y. P., Zharkova, O. M., Balakina, T. Y. e Artyukhov, V. Y. *Effect of proton-donor solvent and structural flexibility of prodan and laurdan molecules on their spectral-luminescent properties.* Journal of Applied Spectroscopy, **76**, 312-318, (2009).
- Moyano, F., Biasutti, M. A., Silber, J. J. e Correa, N. M. *New insights on the behavior of PRODAN in homogeneous media and in large unilamellar vesicles.* Journal of Physical Chemistry B, **110**, 11838-11846, (2006).
- Moyano, F., Silber, J. J. e Correa, N. M. *On the investigation of the bilayer functionalities of 1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) large unilamellar vesicles using cationic hemicyanines as optical probes: A wavelength-selective fluorescence approach.* Journal of Colloid and Interface Science, **317**, 332-345, (2008).
- Mulliken, R. S. *Electronic Population Analysis on Lcao-Mo Molecular Wave Functions .I.* Journal of Chemical Physics, **23**, 1833-1840, (1955).
- Nanda, D. N. e Jug, K. *Sindol - a Semi-Empirical Scf-Mo Method for Molecular-Binding Energy and Geometry .I. Approximations and Parametrization.* Theoretica Chimica Acta, **57**, 95-106, (1980).
- Nemkovich, N. A. e Baumann, W. *Molecular Stark-effect spectroscopy of Prodan and Laurdan in different solvents and electric dipole moments in their equilibrated ground and Franck-Condon excited state.* Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, **185**, 26-31, (2007).

- Novaira, M., Biasutti, M. A., Silber, J. J. e Correa, N. M. *New insights on the photophysical behavior of PRODAN in anionic and cationic reverse micelles: From which state or states does it emit?* Journal of Physical Chemistry B, **111**, 748-759, (2007).
- Novaira, M., Moyano, F., Biasutti, M. A., Silber, J. J. e Correa, N. M. *An example of how to use AOT reverse micelle interfaces to control a photoinduced intramolecular charge-transfer process.* Langmuir, **24**, 4637-4646, (2008).
- Nowak, W., Adamczak, P., Balter, A. e Sygula, A. *On the Possibility of Fluorescence from Twisted Intramolecular Charge-Transfer States of 2-Dimethylamino-6-Acylnaphthalenes - a Quantum-Chemical Study.* Theochem-J Mol Struc, **139**, 13-23, (1986).
- Onsager, L. *Electric moments of molecules in liquids.* Journal of the American Chemical Society, **58**, 1486-1493, (1936).
- Ornellas, F. R. *O Método de Interação de Configuração.* In: N. H. Morgon e K. Coutinho (Ed.). Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo: Livraria da Física, (2007).
- Pande, A. H., Qin, S. e Tatulian, S. A. *Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase.* Biophysical Journal, **88**, 4084-4094, (2005).
- Pappu, R. V., Hart, R. K. e Ponder, J. W. *Analysis and application of potential energy smoothing and search methods for global optimization.* Journal of Physical Chemistry B, **102**, 9725-9742, (1998).
- Parasassi, T., Conti, F. e Gratton, E. *Time-Resolved Fluorescence Emission-Spectra of Laurdan in Phospholipid-Vesicles by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry.* Cellular and Molecular Biology, **32**, 103-108, (1986).
- Parasassi, T., Destasio, G., Dubaldo, A. e Gratton, E. *Phase Fluctuation in Phospholipid-Membranes Revealed by Laurdan Fluorescence.* Biophysical Journal, **57**, 1179-1186, (1990).
- Parasassi, T., Destasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. e Gratton, E. *Quantitation of Lipid Phases in Phospholipid-Vesicles by the Generalized Polarization of Laurdan Fluorescence.* Biophysical Journal, **60**, 179-189, (1991).
- Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W. M., Wilson, P. e Levi, M. *Two-photon fluorescence microscopy of Laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes.* Biophysical Journal, **72**, 2413-2429, (1997).
- Parasassi, T., Krasnowska, E. K., Bagatolli, L. e Gratton, E. *LAURDAN and PRODAN as polarity-sensitive fluorescent membrane probes.* Journal of Fluorescence, **8**, 365-373, (1998).
- Parusel, A. *Semiempirical studies of solvent effects on the intramolecular charge transfer of the fluorescence probe PRODAN.* Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, **94**, 2923-2927, (1998).
- Parusel, A. B. J., Nowak, W., Grimme, S. e Kohler, G. *Comparative theoretical study on charge-transfer fluorescence probes: 6-propanoyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene and derivatives.* Journal of Physical Chemistry A, **102**, 7149-7156, (1998).
- Parusel, A. B. J., Schamschule, R. e Kohler, G. *Nonlinear optics. A semiempirical study of organic chromophores.* Journal of Molecular Structure-Theochem, **544**, 253-261, (2001).
- Parusel, A. B. J., Schneider, F. W. e Kohler, G. *An ab initio study on excited and ground state properties of the organic fluorescence probe PRODAN.* Theochem-Journal of Molecular Structure, **398**, 341-346, (1997).
- Pearlman, D. A. e Rao, B. G. *Free Energy Calculations: Method and Applications.* In: P. R. Schleyer (Ed.). Encyclopedia of Computational Chemistry. New York: John Wiley & Sons, v.V. 2, (1998).
- Ponder, J. W. e Richards, F. M. *An Efficient Newton-Like Method for Molecular Mechanics Energy Minimization of Large Molecules.* Journal of Computational Chemistry, **8**, 1016-1024, (1987).
- Pople, J. A., Beveridge, D. I. e Dobosh, P. A. *Approximate Self-Consistent Molecular-Orbital Theory .5. Intermediate Neglect of Differential Overlap.* Journal of Chemical Physics, **47**, 2026-&, (1967).
- Pople, J. A., Binkley, J. S. e Seeger, R. *Theoretical Models Incorporating Electron Correlation.* International Journal of Quantum Chemistry, 1-19, (1976).
- Pople, J. A., Santry, D. P. e Segal, G. A. *Approximate Self-Consistent Molecular Orbital Theory .I. Invariant Procedures.* Journal of Chemical Physics, **43**, S129-&, (1965a).

- Pople, J. A., Seeger, R. e Krishnan, R. *Variational Configuration Interaction Methods and Comparison with Perturbation-Theory*. International Journal of Quantum Chemistry, 149-163, (1977).
- Pople, J. A. e Segal, G. A. *Approximate Self-Consistent Molecular Orbital Theory .2. Calculations with Complete Neglect of Differential Overlap*. Journal of Chemical Physics, **43**, S136-+, (1965b).
- Pople, J. A. e Segal, G. A. *Approximate Self-Consistent Molecular Orbital Theory .3. Cndo Results for Ab2 and Ab3 Systems*. Journal of Chemical Physics, **44**, 3289-&, (1966).
- Pranata, J., Wierschke, S. G. e Jorgensen, W. L. *Opls Potential Functions for Nucleotide Bases - Relative Association Constants of Hydrogen-Bonded Base-Pairs in Chloroform*. Journal of the American Chemical Society, **113**, 2810-2819, (1991).
- Raghavachari, K. e Pople, J. A. *Calculation of One-Electron Properties Using Limited Configuration-Interaction Techniques*. International Journal of Quantum Chemistry, **20**, 1067-1071, (1981).
- Rahman, A. e Stilling, F. H. *Molecular Dynamics Study of Liquid Water*. Journal of Chemical Physics, **55**, 3336-&, (1971).
- Reichardt, C. *Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators*. Chemical Reviews, **94**, 2319-2358, (1994).
- Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, (2004).
- Ren, P. Y. e Ponder, J. W. *Consistent treatment of inter- and intramolecular polarization in molecular mechanics calculations*. Journal of Computational Chemistry, **23**, 1497-1506, (2002).
- Ren, P. Y. e Ponder, J. W. *Polarizable atomic multipole water model for molecular mechanics simulation*. Journal of Physical Chemistry B, **107**, 5933-5947, (2003).
- Ridley, J. e Zerner, M. *Intermediate Neglect of Differential Overlap Technique for Spectroscopy - Pyrrole and Azines*. Theoretica Chimica Acta, **32**, 111-134, (1973).
- Riley, K. E., Op't Holt, B. T. e Merz, K. M. *Critical assessment of the performance of density functional methods for several atomic and molecular properties*. Journal of Chemical Theory and Computation, **3**, 407-433, (2007).
- Riske, K. A., Barroso, R. P., Vequi-Suplicy, C. C., Germano, R., Henriques, V. B. e Lamy, M. T. *Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, **1788**, 954-963, (2009).
- Rocha, G. B., Freire, R. O., Simas, A. M. e Stewart, J. J. P. *RMI: A reparameterization of AMI for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I*. Journal of Computational Chemistry, **27**, 1101-1111, (2006).
- Roothaan, C. C. J. *New Developments in Molecular Orbital Theory*. Reviews of Modern Physics, **23**, 69-89, (1951).
- Rottenberg, H. *Probing the Interactions of Alcohols with Biological-Membranes with the Fluorescent-Probe Prodan*. Biochemistry, **31**, 9473-9481, (1992).
- Rowe, B. A., Roach, C. A., Lin, J., Asiago, V., Dmitrenko, O. e Neal, S. L. *Spectral Heterogeneity of PRODAN Fluorescence in Isotropic Solvents Revealed by Multivariate Photokinetic Analysis*. Journal of Physical Chemistry A, **112**, 13402-13412, (2008).
- Samanta, A. e Fessenden, R. W. *Excited state dipole moment of PRODAN as determined from transient dielectric loss measurements*. Journal of Physical Chemistry A, **104**, 8972-8975, (2000).
- Sanchez, M. L., Aguilar, M. A. e Delvalle, F. J. O. *Study of solvent effects by means of averaged solvent electrostatic potentials obtained from molecular dynamics data*. Journal of Computational Chemistry, **18**, 313-322, (1997).
- Sanchez, M. L., Aguilar, M. A. e Olivares Del Valle, F. J. *A mean field approach that combines quantum mechanics and molecular dynamics simulation: the water molecule in liquid water*. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, **426**, 181-190 (1998).
- Sanchez, M. L., Martin, M. E., Galvan, I. F., Del Valle, F. J. O. e Aguilar, M. A. *Theoretical calculation of the Stark component of the solute-solvent interaction energy. Validity of the mean field approximation in the study of liquids and solutions*. Journal of Physical Chemistry B, **106**, 4813-4817, (2002).
- Santry, D. P. e Segal, G. A. *Approximate Self-Consistent Molecular Orbital Theory .4. Calculations on Molecules Including Elements Sodium through Chlorine*. Journal of Chemical Physics, **47**, 158-&, (1967).

- Schrödinger, E. *Quantification of the eigen value problem*. *Annalen Der Physik*, **80**, 437-490, (1926).
- Sherrill, C. D., Schaefer III, H. F. e Per-Olov Löwdin, J. R. S. M. C. Z. A. E. B. *The Configuration Interaction Method: Advances in Highly Correlated Approaches*. In: (Ed.). *Advances in Quantum Chemistry*: Academic Press, v. Volume 34, (1999).
- Singh, U. C. e Kollman, P. A. *A Combined Abinitio Quantum-Mechanical and Molecular Mechanical Method for Carrying out Simulations on Complex Molecular-Systems - Applications to the $\text{CH}_3\text{Cl} + \text{Cl}^-$ Exchange-Reaction and Gas-Phase Protonation of Polyethers*. *Journal of Computational Chemistry*, **7**, 718-730, (1986).
- Slater, J. C. *The theory of complex spectra*. *Physical Review*, **34**, 1293-1322, (1929).
- Slater, J. C. *Quantum Theory of Matter*. New York: McGraw-Hill, (1968).
- Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F. e Frisch, M. J. *Ab-Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular-Dichroism Spectra Using Density-Functional Force-Fields*. *Journal of Physical Chemistry*, **98**, 11623-11627, (1994).
- Stewart, J. J. P. *Optimization of Parameters for Semiempirical Methods .1. Method*. *Journal of Computational Chemistry*, **10**, 209-220, (1989a).
- Stewart, J. J. P. *Optimization of Parameters for Semiempirical Methods .2. Applications*. *Journal of Computational Chemistry*, **10**, 221-264, (1989b).
- Stewart, J. J. P. *Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements*. *Journal of Molecular Modeling*, **13**, 1173-1213, (2007).
- Stilling, F. H. e Rahman, A. *Improved Simulation of Liquid Water by Molecular-Dynamics*. *Journal of Chemical Physics*, **60**, 1545-1557, (1974).
- Stokes, G. G. *On the Change of Refrangibility of Light*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **142**, 463-562, (1852).
- Stryer, L. *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Company, (1996).
- Sun, S. Y., Heitz, M. P., Perez, S. A., Colon, L. A., Bruckenstein, S. e Bright, F. V. *6-Propionyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene (PRODAN) revisited*. *Applied Spectroscopy*, **51**, 1316-1322, (1997).
- Svensson, M., Humbel, S., Froese, R. D. J., Matsubara, T., Sieber, S. e Morokuma, K. *ONIOM: A multilayered integrated MO+MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-Alder reactions and $\text{Pt}(\text{P}(\text{t-Bu})(3))(2)+\text{H}_2$ oxidative addition*. *Journal of Physical Chemistry*, **100**, 19357-19363, (1996).
- Temprana, C. F., Duarte, E. L., Taira, M. C., Lamy, M. T. e Alonso, S. D. *Structural Characterization of Photopolymerizable Binary Liposomes Containing Diacetylenic and Saturated Phospholipids*. *Langmuir*, **26**, 10084-10092, (2010).
- Thiel, W. *The Mndoc Method, a Correlated Version of the Mndo Model*. *Journal of the American Chemical Society*, **103**, 1413-1420, (1981).
- Thiel, W. *Semiempirical Methods*. In: J. Grotendorst (Ed.). *Modern Methods and Algorithms in Quantum Chemistry*. Julich: John von Neumann Institute for Computing, v.3, (2000).
- Tomasi, J. *Thirty years of continuum solvation chemistry: a review, and prospects for the near future*. *Theoretical Chemistry Accounts*, **112**, 184-203, (2004).
- Tomasi, J., Mennucci, B. e Cammi, R. *Quantum mechanical continuum solvation models*. *Chemical Reviews*, **105**, 2999-3093, (2005).
- Tomé, T. e Oliveira, M. J. *Dinâmica Estocástica e Irreversibilidade*. São Paulo: Edusp, (2001).
- Tomin, V. I. *Nonradiative energy transfer in a concentrated solution of prodan*. *Optics and Spectroscopy*, **101**, 563-567, (2006).
- Tomin, V. I. e Hubisz, K. *Inhomogeneous spectral broadening and the decay kinetics of the luminescence spectra of prodan*. *Optics and Spectroscopy*, **101**, 98-104, (2006).
- Tuckerman, M. E., Berne, B. J. e Martyna, G. J. *Molecular-Dynamics Algorithm for Multiple Time Scales - Systems with Long-Range Forces*. *Journal of Chemical Physics*, **94**, 6811-6815, (1991).
- Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, (2001).
- Verlet, L. *Computer Experiments on Classical Fluids .1. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules*. *Physical Review*, **159**, 98-&, (1967).

- Vianna, J. D. M., Fazzio, A. e Canuto, S. *Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos. Simulação Computacional*. São Paulo: Livraria da Física, (2004).
- Viard, M., Gallay, J., Vincent, M., Meyer, O., Robert, B. e Paternostre, M. *Laurdan solvatochromism: Solvent dielectric relaxation and intramolecular excited-state reaction*. *Biophysical Journal*, **73**, 2221-2234, (1997).
- Voet, D. e Voet, J. G. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc. , (1995).
- Warshel, A. e Bromberg, A. *Oxidation of 4a,4B-Dihydrophenanthrenes .3. A Theoretical Study of Large Kinetic Isotope Effect of Deuterium in Initiation Step of Thermal Reaction with Oxygen*. *Journal of Chemical Physics*, **52**, 1262-+, (1970).
- Warshel, A. e Levitt, M. *Theoretical Studies of Enzymic Reactions - Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of Carbonium-Ion in Reaction of Lysozyme*. *Journal of Molecular Biology*, **103**, 227-249, (1976).
- Weber, G. e Farris, F. J. *Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent-Probe - 6-Propionyl-2-(Dimethylamino)Naphthalene*. *Biochemistry*, **18**, 3075-3078, (1979).
- Wilson, H. A., Waldrip, J. B., Nielson, K. H., Judd, A. M., Han, S. K., Cho, W. W., Sims, P. J. e Bell, J. D. *Mechanisms by which elevated intracellular calcium induces S49 cell membranes to become susceptible to the action of secretory phospholipase A(2)*. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 11494-11504, (1999).
- Winterhalter, M. *Black lipid membranes*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **5**, 250-255, (2000).
- Yu, W. M., So, P. T. C., French, T. e Gratton, E. *Fluorescence generalized polarization of cell membranes: A two-photon scanning microscopy approach*. *Biophysical Journal*, **70**, 626-636, (1996).
- Zeng, J. W. e Chong, P. L. G. *Effect of Ethanol-Induced Lipid Interdigitation on the Membrane Solubility of Prodan, Acdan and Laurdan*. *Biophysical Journal*, **68**, 567-573, (1995).
- Zerner, M. C. INDO/UF: A semi-empirical package. Gainesville, FL 32611, USA: University of Florida 2000.
- Zwanzig, R. W. *High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method .I. Nonpolar Gases*. *Journal of Chemical Physics*, **22**, 1420-1426, (1954).

A

APÊNDICE

Descrição do Método INDO/S Implementado no Programa Zindo

O texto apresentado foi baseado principalmente na referência [Zerner, 1991].

Métodos de química quântica semi-empíricos, como o *INDO* (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*), ganham velocidade computacional ao negligenciarem algumas das integrais mais complicadas presentes em um método *ab initio*. O erro introduzido ao se usar métodos semi-empíricos é compensado através do uso de parâmetros determinados através de comparações dos cálculos com experimentos. A seguir, foi feita uma revisão do método de Hartree-Fock e depois foram descritos alguns métodos semi-empíricos e para o método INDO/S colocamos a parametrização realizada.

A.1 Teoria de Hartree-Fock (HF)

Considerando a equação de Schrödinger,

$$H\Psi = E\Psi, \quad (\text{A.1})$$

com H o hamiltoniano não-relativístico, independente do tempo e com os núcleos fixos [Szabo *et al.*, 1996]:

$$H = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_i \sum_A Z_A/R_{Ai} + \sum_{i<j} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A<B} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}, \quad (\text{A.2})$$

onde A , B , etc., nomeiam os núcleos e i , j , etc, os elétrons, Z são os números atômicos e unidades atômicas foram utilizadas.

Na aproximação dos orbitais, uma função de onda de muitos elétrons, Ψ , pode ser escrita como um produto de funções de um elétron, $\varphi(i)$, chamadas de orbitais.

$$\Psi(1,2,3, \dots i, \dots n) = O(S)A[\varphi_1(1)\varphi_2(2)\varphi_3(3) \dots \varphi_i(i) \dots \varphi_n(n)] \quad (\text{A.3})$$

Onde A é o operador anti-simétrico, assegurando que a função de onda muda de sinal na troca de dois elétrons (obedecendo ao princípio de exclusão de Pauli) e $O(S)$ é o operador de projeção do spin que assegura que a função de onda continue sendo uma auto-função do operador de spin quadrático, S^2 :

$$S^2\Psi = S(S+1)\Psi, \quad (\text{A.4})$$

Vamos assumir um sistema de camada fechada, ou seja, com todos os elétrons em pares nos orbitais moleculares. Nesse caso $O(S) = 1$. Cada orbital molecular, φ , é expandido como uma combinação linear de orbitais atômicos, χ_u ,

$$\varphi_i = \sum_u \chi_u C_{ui} = X C_i. \quad (\text{A.5})$$

Os orbitais atômicos, χ_u , constituem o conjunto de bases utilizados para os cálculos,

Utilizando o princípio variacional que diz que:

$$\frac{\langle \Psi | H | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} = W \geq E(\text{expt}). \quad (\text{A.6})$$

a função de onda Ψ é variada em relação a C para derivar

$$f \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i \quad (\text{A.7})$$

uma equação de autovalores que leva aos orbitais moleculares φ_i e as energias dos orbitais moleculares, ε_i . Onde f é um operador efetivo de um elétron, chamado de operador de Fock com o elemento de matriz dado por

$$\begin{aligned} F_{uv} &= \langle \chi_u | f | \chi_v \rangle = \langle u | f | v \rangle \\ &= H_{uv} + \sum_{s,t} P_{st} [\langle us | vt \rangle - \langle us | tv \rangle / 2] \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

com os elementos de matriz de um elétron, H , dados por

$$H_{uv} = \langle u | -1/2 \nabla^2 | v \rangle - \sum_B Z_B \langle u | 1/R_B | v \rangle \quad (\text{A.9})$$

e as integrais de dois elétrons dadas por

$$\langle uv | st \rangle = \iint d\tau(1) d\tau(2) \chi_u(1) \chi_v(2) (1/r_{12}) \chi_s(1) \chi_t(2) \quad (\text{A.10})$$

P é a matriz de densidade de Fock-Dirac em primeira ordem

$$P_{uv} = \sum_d C_{ud} C_{vd} n_d \quad (\text{A.11})$$

onde n_d é a matriz diagonal de número de ocupação, 2 ou 0 para o caso de camada fechada.

As equações de Fock podem ser resolvidas através da equação matricial

$$FC = SCE \quad (\text{A.12})$$

onde F é definido na Eq. A.8, S é a matriz de *overlap*,

$$S_{uv} = \langle \chi_u | \chi_v \rangle = \langle u | v \rangle \quad (\text{A.13})$$

e C é uma matriz quadrada, na qual i -éssima coluna são os coeficientes dos orbitais moleculares da Eq. A.5. Usando a Eq. A.12, temos:

$$\begin{aligned} S^{(-1/2)} F C &= S^{(1/2)} C E \\ S^{(-1/2)} F S^{(-1/2)} C S^{(1/2)} &= S^{(1/2)} C E \end{aligned} \quad (\text{A.14})$$

$$F' V = V E$$

onde $F' = S^{(-1/2)} F S^{(-1/2)}$ e $V = S^{(1/2)} C$. Então os passos colocados a seguir são iguais para a maioria dos procedimentos com os orbitais moleculares.

1. Calcular as integrais necessárias para formar a matriz de Fock, F .
2. Calcular a matriz de *overlap*, S .
3. Diagonalizar S .

$$W^+SW = D = \begin{vmatrix} d_1 & 0 & 0 & 0 & \dots \\ 0 & d_2 & 0 & 0 & \dots \\ 0 & 0 & d_3 & 0 & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & \dots & \dots & d_n \end{vmatrix} \quad (\text{A.15})$$

4. Construir:

$$S^{(-1/2)} = WD^{(-1/2)}W^+ \quad (\text{A.16})$$

onde $D^{(-1/2)}$ é a matriz diagonal formada da raiz quadrada de d_u .

5. Construir a matriz F da Eq. 8.

6. Construir:

$$F' = S^{(-1/2)}FS^{(-1/2)} \quad (\text{A.17})$$

7. Diagonalizar F' para os autovalores dos orbitais moleculares E

$$V^+F'V = E \quad (\text{A.18})$$

8. Retransformar V para obter os coeficientes dos orbitais moleculares C

$$C = S^{(-1/2)}V \quad (\text{A.19})$$

9. Construir a matriz densidade P

$$P = CnC^+ \quad (\text{A.20})$$

onde n é novamente a matriz diagonal dos números de ocupação.

10. Verificar P para a convergência. Se P para o n -ésimo ciclo estiver compatível com o P do ciclo anterior, dentro de uma certa tolerância, parar o processo. Se não estiver, estimar ou extrapolar uma nova matriz P e repetir os passos de 5 a 10, até que um campo eletrônico auto-consistente (*SCF*, *Self-Consistent Field*) seja obtido.

Apesar desse esquema ser genérico e usado para resolver as equações de Fock (Hartree-Fock *SCF*), outros esquemas são possíveis.

A.2 Formas Aproximadas para as Equações de Fock

Em 1965, Pople e colaboradores introduziram uma série de aproximações chamadas de *ZDO* (*Zero Differential Overlap*) [Pople *et al.*, 1965a; Pople *et al.*, 1965b]. Nessa aproximação é importante ressaltar que ela implica em algumas exigências de consistência. Uma das mais importantes, entre essas exigências, está a necessidade de invariância rotacional: isto é, a mesma resposta deve ser obtida, independente da orientação da molécula. Apesar de parecer uma exigência óbvia, a maneira de obter essa invariância nos métodos semi-empíricos não é tão óbvia.

A seguir, sem colocar as parametrizações, estão descritas as aproximações sugeridas por Pople e colaboradores e o efeito que essas aproximações têm na matriz de Fock.

Complete Neglect of Differential Overlap (CNDO)

Nessa aproximação ocorre a substituição:

$$\chi_u^A(1)\chi_v^B(1)d\tau(1) \rightarrow \delta_{uv}\chi_{\bar{u}}^A(1)\chi_{\bar{v}}^B(1)d\tau(1) \quad (\text{A.21})$$

sempre que esse termo apareça em uma integral sobre um operador esfericamente simétrico. Os índices sobre-escritos A e B se referem aos centros atômicos e os sub-escritos u e v a orbitais individuais. A barra em cima dos índices sub-escritos indica que o orbital χ_u é substituído por um orbital de simetria s com a mesma extensão espacial. Essa última condição é uma exigência para o método manter a invariância rotacional [Pople *et al.*, 1965a]. Com essa aproximação, a matriz de *overlap* S torna-se a matriz unidade,

$$S = 1 \quad (\text{A.22})$$

e

$$F_{uu}^{AA} = U_{uu} + \sum_v P_{vv} \langle \bar{u}\bar{v} | \bar{u}\bar{v} \rangle - P_{uu} \langle \bar{u}\bar{u} | \bar{u}\bar{u} \rangle / 2 - \sum_{B \neq A} Z_B \langle \bar{u} | 1/R_B | \bar{u} \rangle \quad (\text{A.23})$$

$$F_{uv}^{AB} = H_{uv} - P_{uv} \langle \bar{u}\bar{v} | \bar{u}\bar{v} \rangle / 2 \quad (\text{A.24})$$

A integral U é chamada de integral de caroço e é definida como a integral de um elétron atômico,

$$U_{uu} = \langle u | -1/2\nabla^2 - Z_A/R_A | u \rangle + V_{uu} \quad (\text{A.25})$$

onde u é um orbital atômico no átomo A . O termo V na Eq. A.25 é um potencial efetivo de caroço. O seu papel é impedir que os elétrons de valência penetrem na região das camadas mais internas. Se U é obtido através de um procedimento empírico ou das informações atômicas somente dos elétrons de valência, então a parte de um centro de V é incluída naturalmente na parametrização [Zerner, 1972]. A parte de dois centros dessa repulsão das camadas interna com as externas é incluída através de várias formas de aproximações das equações de Fock explicitamente, como descrito em [Zerner, 1975; Nanda *et al.*, 1980]. Ou ela pode ser incluída efetivamente pelo escalonamento da atração nuclear eletrônica de dois centros $\langle u | 1/R | v \rangle$ [Coffey, 1974].

Intermediate Neglect of Differential Overlap (INDO)

A aproximação *INDO* contém todos os termos que a aproximação *CNDO* e mais todas as integrais de um centro dois elétrons. A matriz de Fock para camadas fechadas torna-se:

$$F_{uu}^{AA} = U_{uu} + \sum_{s,t}^A P_{st} (\langle us|ut \rangle - \langle us|tu \rangle / 2) + \sum_{B \neq A}^B \sum_s P_{ss} \langle \bar{u}\bar{s}|\bar{u}\bar{s} \rangle - \sum_{B \neq A} Z_B \langle \bar{u}|1/R_B|\bar{u} \rangle \quad (\text{A.26})$$

$$F_{uv}^{AA} = H_{uv} + \sum_{s,t}^A P_{st} (\langle us|vt \rangle - \langle us|tv \rangle / 2) \quad (\text{A.27})$$

$$F_{uv}^{AB} = H_{uv} - P_{uv} \langle \bar{u}\bar{v}|\bar{u}\bar{v} \rangle / 2 \quad (\text{A.28})$$

É mais direto escrever esses termos explicitamente para moléculas que contêm apenas em seu conjunto de bases atômicas orbitais s ou (s,p) , pois existem poucas integrais de um centro dois elétrons por átomo pesado. Elas são:

$$\langle ss|ss \rangle = F^0(ss) \quad (\text{A.29})$$

$$\langle sp_x|sp_x \rangle = 1/3 G^1(sp)$$

$$\langle p_x p_x|p_x p_x \rangle = F^0(pp) + 2F^{(2)}(pp)/25$$

$$\langle p_x p_x|p_x p_y \rangle = F^0(pp) - 4F^{(2)}(pp)/25$$

$$\langle p_x p_y|p_y p_x \rangle = 3F^{(2)}(pp)/25$$

e aquelas que estão relacionadas por simetria. Nas Eqs. A.29 F^k e G^k são as integrais de Slater-Condon comumente utilizadas para ajudar no cálculo das integrais de um centro dois elétrons [Brown *et al.*, 1970; Van Der Lugt, 1972; Zerner *et al.*, 1980; Schulz *et al.*, 1985; Culberson *et al.*, 1987]. Não é fácil escrever essas equações para átomos que contêm uma base do tipo (s,p,d) . Nesses casos, para manter a invariância rotacional é preciso fazer médias sobre classes de integrais [Schulz *et al.*, 1985], ou incluir todas as integrais de Slater-Condon F^k e G^k , ou ainda incluir todas as integrais do tipo F^k , G^k e R^k [Zerner *et al.*, 1980; Schulz *et al.*, 1985; Culberson *et al.*, 1987].

Construir a matriz de Fock é um processo com N^2 passos, como no caso do *CNDO*, mas o *INDO* tem algumas vantagens importantes. A mais importante delas é o cálculo de propriedades espectrais moleculares. Com os termos que são acrescentados no *INDO* têm um papel fundamental no cálculo dessas propriedades moleculares.

A.3 Parametrização

Tradicionalmente existem duas filosofias diferentes em como parametrizar métodos aproximados. Uma é parametrizar a teoria diretamente dos dados experimentais e a outra modelar os cálculos nos resultados que teriam sido obtidos se a teoria *ab initio* tivesse sido aplicada. A seguir estão colocadas as parametrizações para os métodos *CNDO* e *INDO*.

Complete Neglect of Differential Overlap (CNDO)

Esse método foi introduzindo por Pople e colaboradores em 1965 [Pople *et al.*, 1965a; Pople *et al.*, 1965b]. E foi parametrizado diretamente dos cálculos *ab initio* com conjunto de bases mínimo.

Para um esquema bem sucedido, Pople introduziu as seguintes suposições, adicionalmente às considerações teóricas feitas na Seção A.2:

1. Todas as integrais de dois centros dois elétrons foram ajustadas para as integrais sobre orbitais de simetria *s*, uma exigência para a invariância rotacional já discutida:

$$\langle uv|uv\rangle = \langle \bar{u}\bar{v}|\bar{u}\bar{v}\rangle = \gamma_{AB} \quad (\text{A.30})$$

2. As integrais não diagonais de um elétron ou integrais de ressonância foram colocadas proporcionais a integral de *overlap*:

$$H_{uv}^{AB} = (\beta_A + \beta_B) S_{uv} / 2. \quad (\text{A.31})$$

Onde β_A é um parâmetro que depende apenas da natureza do átomo A.

3. As integrais de caroço de um centro U_{uu} foram estimadas considerando processos de ionização dos átomos. Assumindo o mesmo orbital atômico para átomo e para o íon positivo, sob a aproximação *CNDO* temos:

$$U_{uu} = -I_u - (Z_A - 1)\gamma_{AA} \quad (\text{A.32})$$

4. Um conjunto de bases mínimo para os orbitais de valência foi suposto. Os orbitais de valência foram escolhidos com orbitais do tipo Slater (*STOs*, *Slater Type Orbitals*) [Slater, 1930]:

$$\chi_{nlm} = N e^{-\zeta r} Y_l^m(\theta, \phi) r^{n-1} \quad (\text{A.33})$$

onde ζ é o expoente do orbital e $Y_l^m(\theta, \phi)$ são os harmônicos esféricos reais. Os expoentes que caracterizam o tamanho do orbital, ou extensão, são obtidos através das “regras de Slater”, que são baseadas em cálculos atômicos no modelo *ab initio*.

As aproximações colocadas nos itens 1-4 resultam na seguinte forma para as equações de Fock:

$$F_{uu}^{AA} = -I_u - Q_A \gamma_{AA} - (P_{uu} - 1) \gamma_{AA} - \sum_{B \neq A} Z_B V_{AB} + \sum_{B \neq A} P_{BB} \gamma_{AB} \quad (\text{A.34})$$

$$F_{uv}^{AA} = -P_{uv} \gamma_{AA} / 2 \quad (\text{um centro}) \quad (\text{A.35})$$

$$F_{uv}^{AB} = (\beta_A - \beta_B) S_{uv} / 2 - P_{uv} \gamma_{AB} / 2 \quad (\text{dois centros}) \quad (\text{A.36})$$

onde Q_A é dado através da análise populacional de Mulliken:

$$Q_A = Z_A - M_A; M_A = \sum_u^A M_{uu}; M_{uu} = \sum_v P_{uv} S_{vu},$$

$$V_{AB} = \langle u^A | Z_B / R | u^A \rangle \text{ e}$$

$$P_{AA} = \sum_u^A P_{uu}.$$

Nas Eq. A.34-A.36, o traço de P é igual ao número total de elétrons, P_{uu} é geralmente associado com o número de elétrons no orbital χ_u . Então P_{AA} é associado com o número total de elétrons no átomo A . Essa interpretação é consistente com a análise populacional de Mulliken, se a matriz de *overlap* S for unitária, como é o caso na aproximação *CNDO*.

5. O método descrito nos itens 1-4 foi chamado de *CNDO/1* e uma deficiência foi identificada. Quando dois átomos neutros estavam separados por uma distância de alguns angstroms, eles permaneciam fortemente atraídos um pelo outro. Isto era resultado da inadequação da atração elétron-carço e da repulsão elétron-eletron. Para corrigir isso, a atração elétron-carço foi ajustada igual a integral de dois centros dois elétrons:

$$V_{AB} = \langle u^A | Z_B / R | u^A \rangle = Z_B \langle u^A v^B | u^A v^B \rangle \quad (\text{A.37})$$

Essa exigência foi essencial para não ligar demais a maioria dos sistemas e foi justificada examinando as consequências da ortogonalização [Pople *et al.*, 1965b] e a retirada da consideração explícita dos elétrons de carço [Zerner, 1972; Coffey, 1974].

6. O método *CNDO/2*, além de conter a correção da Eq. A.37, também utilizou as afinidades eletrônicas. Argumentando que um átomo em uma molécula tinha a mesma probabilidade de perder um elétron do que ganhar um elétron, a integral de carço poderia ser obtida de uma afinidade eletrônica atômica, A ,

$$U_{uu} = -A_A - Z_A \gamma_{AA} \quad (\text{A.38})$$

Então uma média das Eqs. A.32 e A.38 é usada para aproximar U ,

$$U_{uu} = -(1/2)(I_u + A_u) - (Z_A - 1/2)\gamma_{AA} \quad (\text{A.39})$$

Para o *CNDO/2*, isso resulta nos elementos diagonais iguais a:

$$F_{uu}^{AA} = -(1/2)(I_u - A_u) - Q_A \gamma_{AA} + (1 - P_{uu}) \gamma_{AA} / 2 - \sum_{B \neq A} Q_B \gamma_{AB} \quad (\text{A.40})$$

A interpretação da Eq. A.40 diz que a energia de um elétron no orbital χ_u é igual a menos a sua eletronegatividade de Mulliken, $(I + A)/2$, corrigida pela carga acrescentada no átomo A , $Q_A \gamma_{AA}$, ao qual o elétron “pertence”, corrigido ainda pelo

número de elétrons em no orbital χ_u ($I - P_{uu}$) e então corrigido pelas atrações e repulsões de Coulomb por toda a molécula, $Q_B \gamma_{AB}$.

Logo após a introdução do método CNDO/2, Jaffé e Del Bene [Delbene *et al.*, 1968] reconheceram o potencial de utilização desse método para o cálculo dos espectros eletrônicos. Eles propuseram o uso de duas aproximações. A primeira foi utilizar a forma de Pariser-Parr [Pariser *et al.*, 1953a; Pariser *et al.*, 1953b] para as integrais de dois elétrons, que era baseada na observação de Pariser [Pariser, 1956] que:

$$\gamma_{uu} \approx I_u - A_u \quad (\text{A.41})$$

A segunda aproximação estava associada com a observação que as várias energias dos orbitais moleculares dos elétrons π e elétrons σ não tinham a relação correta: a interação entre os orbitais π estava muito grande quando comparada com a interação dos orbitais σ . Eles corrigiram esse artefato modificando os elementos da matriz de um elétron dois centros, para:

$$H_{uv}^{AB} = (\beta_A + \beta_B) \bar{S}_u / 2 \quad (\text{A.42})$$

$$\bar{S}_u = f_\sigma g_{uv} \langle \sigma | \sigma \rangle + f_\pi (g'_{uv} + g''_{uv}) \langle \pi | \pi \rangle \quad (\text{A.43})$$

na Eq. A.43, g são os fatores de Euler necessários para a rotação do sistema de coordenadas local usado para calcular o overlap para o sistema de coordenada molecular e f são fatores que foram ajustados para:

$$f_\pi = 0.585 \quad (\text{A.44})$$

$$f_\sigma = 1.000 \quad (\text{A.45})$$

para se obter a ordem certa das energias dos orbitais π e σ . Esse método *CNDO* foi chamado de *CNDO/S*.

Os métodos *CNDO* se tornaram popular muito rapidamente, mas tão rápido quanto foram substituídos pelos modelos *INDO* descritos a seguir. Outras versões do *CNDO/S* usam a forma de Mataga-Nishimoto [Mataga *et al.*, 1957] para as integrais de dois centros, dois elétrons ao invés da forma de Pariser-Parr, dadas por:

$$\gamma_{AB} = f_y / (G_{AB} + R_{AB}) \quad (\text{A.46})$$

$$G_{AB} = 2 f_y / (\gamma_{AA} + \gamma_{BB}) \quad (\text{A.47})$$

$$f_y = 1 \quad (\text{A.48})$$

com γ_{AA} dado pela aproximação de Pariser (Eq. A.41). *CNDO/S* foi parametrizado diretamente do espectro de compostos aromáticos de tamanho médio no nível de teoria de interação de configuração com excitações simples (*CIS*).

Intermediate Neglect of Differential Overlap (INDO)

O método *INDO* contém todos os termos que o método *CNDO*, mais todos os termos de um centro, dois elétrons. A versão *INDO/2* foi parametrizada semelhantemente ao método *CNDO/2*, com as equações adequadamente modificadas para as integrais adicionais [Pople *et al.*, 1967]. Na aplicação, era claro que as integrais adicionais melhoravam parâmetros geométricos, principalmente ângulos de ligação.

Em 1973 Ridley e Zerner modificaram o *INDO* para reproduzir espectros eletrônicos, generalizando o método *CNDO/S* [Ridley *et al.*, 1973]. *INDO/S* utilizava as integrais de dois elétrons de Mataga-Nishimoto (Eqs. A.46, A.47 e A.48) e escolheu ajustar a energia máxima da transição eletrônica. Assim como no *CNDO/S*, a parametrização foi feita no nível *CIS*. O peso do *overlap* da Eqs. A.44 e A.45 foram utilizados, mas $f_\sigma = 1.267$, o que melhorou os resultados obtidos para as transições $n - \pi^*$. Adicionalmente, na Eq. A.48, o valor de $f_y = 1.2$ forneceu melhores resultados para moléculas grandes usando *CIS*.

Parâmetros adicionais são necessários no *INDO/S*. Eles são as integrais de Slater-Condon [Slater, 1968], Eqs. A.29, e é necessário determinar, por exemplo, $\langle sp|ps \rangle$ e $\langle p_x p_y | p_y p_x \rangle$ e elas são obtidas da espectroscopia atômica. O *INDO* obtém melhores para as excitações $n - \pi^*$ e também para moléculas com elementos pesados, onde as integrais de Slater-Condon são maiores.

As forças do oscilador são calculadas no método *INDO/S* utilizando o operador momento de dipolo de transição [Ridley *et al.*, 1973] incluindo todos os termos de um centro:

$$f(osc)_{0,1} = 4.7092 \times 10^{-7} \mu_{0,1}^2 (E_1 - E_0) \quad (\text{A.49})$$

$$\mu_{0,1} = \langle \Psi(0) | \mu | \Psi(1) \rangle = \sum_A Q_A R_{0,1} + \sum_{u,v} G_{uv} \langle u | r | v \rangle \quad (\text{A.50})$$

onde μ é o valor esperado do momento de dipolo de transição em *Debye*, Q_A a carga de transição entre os dois estados $\Psi(0)$ e $\Psi(1)$, E_1 a energia de $\Psi(1)$ em cm^{-1} e G_{uv} a densidade de transição.

A descrição alguns parâmetros para o *INDO/S* estão colocadas a seguir:

$\beta(s) = \beta(p)$ um para cada átomo (Eq. A.42)

$\beta(d)$ um para cada átomo com orbitais d

$\beta(f)$ um para cada átomo com orbitais f

$f_y = 1.2$ um parâmetro universal

$f_\pi = 0.585$ um parâmetro universal

$f_{\sigma} = 1.267$ um parâmetro universal

Os outros parâmetros necessários são utilizados de informações atômicas:

U_{uu} obtido dos potenciais de ionização atômicos[Karlsson *et al.*, 1973], usando o *INDO* é equivalente a Eq. A. 32.

γ_{AA} obtido dos potenciais de ionização atômicos e da afinidade eletrônica, Eq. A.41.

F^k, G^k fatores de Slater-Condon obtidos da espectroscopia atômica ou calculados com *ab initio* e escalonados por 0.6 (Eqs. A.29).

R^k fatores de Slater-Condon generalizados, calculados com *ab initio* e escalonados por 0.6.

Para mais detalhes sobre a parametrização do método *INDO/S* verificar as referências:

[Ridley *et al.*, 1973; Bacon *et al.*, 1979].

A.4 Referências

- Bacon, A. D. e Zerner, M. C. *Intermediate Neglect of Differential Overlap Theory for Transition-Metal Complexes - Fe, Co and Cu Chlorides*. Theoretica Chimica Acta, **53**, 21-54, (1979).
- Brown, R. D., James, B. H. e Odwyer, M. F. *Molecular Orbital Calculations on Transition Element Compounds .I. Method*. Theoretica Chimica Acta, **17**, 264-+, (1970).
- Coffey, P. *Potential-Energy Integrals in Semiempirical Mo Methods*. International Journal of Quantum Chemistry, **8**, 263-266, (1974).
- Culberson, J. C., Knappe, P., Rosch, N. e Zerner, M. C. *An Intermediate Neglect of Differential-Overlap (Indo) Technique for Lanthanide Complexes - Studies on Lanthanide Halides*. Theoretica Chimica Acta, **71**, 21-39, (1987).
- Delbene, J. e Jaffe, H. H. *Use of Cndo Method in Spectroscopy .I. Benzene Pyridine and Diazines*. Journal of Chemical Physics, **48**, 1807-&, (1968).
- Karlsson, G. e Zerner, M. C. *Determination of One-Center Core Integrals from Average Energies of Atomic Configurations*. International Journal of Quantum Chemistry, **7**, 35-49, (1973).
- Mataga, N. e Nishimoto, K. *Electronic Structure and Spectra of Nitrogen Heterocycles*. Z. Phys. Chem. (Frankfurt), **13**, 140, (1957).
- Nanda, D. N. e Jug, K. *Sindo I - a Semi-Empirical Scf-Mo Method for Molecular-Binding Energy and Geometry .I. Approximations and Parametrization*. Theoretica Chimica Acta, **57**, 95-106, (1980).
- Pariser, R. *Theory of the Electronic Spectra and Structure of the Polyacenes and of Alternant Hydrocarbons*. Journal of Chemical Physics, **24**, 250-268, (1956).
- Pariser, R. e Parr, R. G. *A Semi-Empirical Theory of the Electronic Spectra and Electronic Structure of Complex Unsaturated Molecules .I.* Journal of Chemical Physics, **21**, 466-471, (1953a).

- Pariser, R. e Parr, R. G. *A Semi-Empirical Theory of the Electronic Spectra and Electronic Structure of Complex Unsaturated Molecules* .2. Journal of Chemical Physics, **21**, 767-776, (1953b).
- Pople, J. A., Beveridge, D. L. e Dobosh, P. A. *Approximate Self-Consistent Molecular-Orbital Theory* .5. *Intermediate Neglect of Differential Overlap*. Journal of Chemical Physics, **47**, 2026-&, (1967).
- Pople, J. A., Santry, D. P. e Segal, G. A. *Approximate Self-Consistent Molecular Orbital Theory* .I. *Invariant Procedures*. Journal of Chemical Physics, **43**, S129-&, (1965a).
- Pople, J. A. e Segal, G. A. *Approximate Self-Consistent Molecular Orbital Theory* .2. *Calculations with Complete Neglect of Differential Overlap*. Journal of Chemical Physics, **43**, S136-+, (1965b).
- Ridley, J. e Zerner, M. *Intermediate Neglect of Differential Overlap Technique for Spectroscopy - Pyrrole and Azines*. Theoretica Chimica Acta, **32**, 111-134, (1973).
- Schulz, J., Iffert, R. e Jug, K. *On the Rotational Invariance of the Fock Equations in Indo Methods Using D-Functions*. International Journal of Quantum Chemistry, **27**, 461-464, (1985).
- Slater, J. C. *Atomic shielding constants*. Physical Review, **36**, 0057-0064, (1930).
- Slater, J. C. *Quantum Theory of Matter*. New York: McGraw-Hill, (1968).
- Szabo, A. e Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry*. New York: Dover, (1996).
- Van Der Lugt, W. T. A. M. *Molecular-Orbital Calculations on Transition-Metal Complexes, Charge-Transfer Spectra and Sequence of Metal and Ligand Orbitals*. International Journal of Quantum Chemistry, **6**, 859-&, (1972).
- Zerner, M. *Approximate Molecular-Orbital Method*. Journal of Chemical Physics, **62**, 2788-2799, (1975).
- Zerner, M. C. *Removal of Core Orbitals in Valence Orbital Only Calculations*. Molecular Physics, **23**, 963-+, (1972).
- Zerner, M. C. *Semiempirical Molecular Orbital Methods*. Reviews in Computational chemistry, **2**, 313, (1991).
- Zerner, M. C., Loew, G. H., Kirchner, R. F. e Muellerwesterhoff, U. T. *Intermediate Neglect of Differential-Overlap Technique for Spectroscopy of Transition-Metal Complexes - Ferrocene*. Journal of the American Chemical Society, **102**, 589-599, (1980).

B

APÊNDICE

Descrição Detalhada de Alguns Parâmetros de Fluorescência

B.1 Anisotropia de Fluorescência

Como colocado no Capítulo 2, Seção 2.2.2b, a anisotropia e a polarização são dadas por:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}, \quad (\text{B.1})$$

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (\text{B.2})$$

Nesse apêndice vamos analisar mais detalhadamente como essas expressões são deduzidas e quais as suas implicações.

Considerando uma luz parcialmente polarizada caminhando ao longo do eixo-x. Assumimos que são feitas as medidas de intensidade I_z e I_y com o detector e o polarizador posicionados no eixo-x. A polarização da luz é definida como a fração da luz que é linearmente polarizada, sendo:

$$P = \frac{p}{p + n} \quad (\text{B.3})$$

onde p é a intensidade da componente polarizada e n é a intensidade da componente natural. A intensidade da componente natural é dada por $n = I_z + I_y = 2I_y$. O restante é a componente polarizada, que é dada por $p = I_z - I_y$, como mostrado na Figura B.1.

Figura B.1: Polarização de um raio de luz. Adaptada de [Lakowicz, 2006].

A anisotropia r é definida como sendo a razão da intensidade da componente polarizada da luz pela intensidade total (I_T). Colocando esses valores para calcular r , temos:

$$r = \frac{I_z - I_y}{I_x + I_y + I_z} = \frac{I_z - I_y}{I_T} . \quad (\text{B.4})$$

Quando a excitação é polarizada ao longo do eixo-z, a radiação dipolar das sondas é simétrica ao redor do eixo-z. Por isso temos que $I_x = I_y$, onde $I_y = I_{\perp}$ e $I_x = I_{\parallel}$. Podemos resumir que a anisotropia é a razão do excesso de intensidade que é paralelo ao eixo-z em relação à intensidade total.

B.1a Teoria para Anisotropia

A teoria para a anisotropia de fluorescência pode ser deduzida considerando uma única molécula. Assumindo, por enquanto, que os momentos de transição para a absorção e para a emissão são paralelos. Isso é aproximadamente verdade para a sonda de membranas lipídicas DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno). Supondo que uma única molécula esteja orientada com um ângulo θ em relação ao eixo-z e Φ em relação ao eixo-y, observar na Figura B.2.

Figura B.2: Intensidades da emissão de um único fluoróforo num sistema de coordenadas. Adaptada de [Lakowicz, 2006].

No estado fundamental as moléculas de DPH estarão randomicamente orientadas se estiverem num solvente isotrópico. O objetivo é calcular a anisotropia que seria observada

para essa molécula orientada na ausência de difusão rotacional. As condições de dipolos paralelos, imobilidade e aleatoriedade do estado fundamental simplificam a dedução.

É conhecido que as emissões fluorescentes por fluoróforos se comportam como dipolos irradiando. A intensidade da luz irradiada de um dipolo é proporcional ao quadrado do seu vetor campo elétrico projetado no eixo de observação. A emissão também é polarizada ao longo do eixo do momento de transição. A intensidade observada através de um polarizador é proporcional ao quadrado da projeção campo elétrico do dipolo irradiante no eixo de transmissão do polarizador. Essas projeções, mostradas na Figura B.2, são dadas por:

$$I_{//}(\theta, \phi) = \cos^2 \theta , \quad (\text{B.5})$$

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2 \theta \cdot \sin^2 \phi . \quad (\text{B.6})$$

Numa experiência real, a solução terá muitas sondas com uma distribuição aleatória. A anisotropia é calculada fazendo uma média baseada na foto-seleção e em como as moléculas selecionadas contribuem para a medida da intensidade. Primeiramente, consideramos a excitação polarizada ao longo do eixo-z. Essa excitação deve excitar todas as moléculas que fazem ângulo Φ com o eixo-y com a mesma probabilidade. A população do estado excitado será simétrica em relação ao eixo-z. Qualquer população acessível experimentalmente terá valores de Φ entre 0 e 2π . Então usamos:

$$\langle \sin^2 \phi \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \sin^2 \phi d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2} . \quad (\text{B.7})$$

Colocando esse valor nas Eq. B.5 e B.6, temos:

$$I_{//}(\theta, \phi) = \cos^2 \theta , \quad (\text{B.8})$$

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \frac{1}{2} \sin^2 \theta . \quad (\text{B.9})$$

Agora assumimos que estamos observando um conjunto de fluoróforos que estão orientados em relação ao eixo-z com um ângulo θ dado por uma probabilidade $f(\theta)$. As medidas das intensidades fluorescentes para esse conjunto de moléculas são dadas por:

$$I_{//}(\theta) = \int_0^{\pi/2} f(\theta) \cdot \cos^2 \theta \cdot d\theta = k \langle \cos^2 \theta \rangle , \quad (\text{B.10})$$

$$I_{\perp}(\theta) = \int_0^{\pi/2} f(\theta) \cdot \sin^2 \theta \cdot d\theta = \frac{k}{2} \langle \sin^2 \theta \rangle , \quad (\text{B.11})$$

onde $f(\theta).d\theta$ é a probabilidade que o fluoróforo esteja orientado entre θ e $\theta + d\theta$ e k é uma constante instrumental. Usando esses valores na Eq. B.1 temos:

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} = \frac{k\langle \cos^2 \theta \rangle - \frac{k}{2}\langle \sin^2 \theta \rangle}{k\langle \cos^2 \theta \rangle + k\langle \sin^2 \theta \rangle}. \quad (\text{B.12})$$

Usando que $\sin^2 \theta = 1 - \cos^2 \theta$ na Eq. B.12, temos:

$$r = \frac{\langle \cos^2 \theta \rangle - \frac{1}{2} + \frac{\langle \cos^2 \theta \rangle}{2}}{1} = \frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2}, \quad (\text{B.13})$$

onde θ é o ângulo que o dipolo emissor faz com o eixo-z.

Como não é possível obter uma população do estado excitado perfeitamente orientada com a direção da radiação de excitação incidente em soluções homogêneas, a anisotropia é sempre menor que 1,0. A total perda de anisotropia ocorre em $\theta = 54,7^\circ$, isso não significa que cada fluoróforo está orientado com esse ângulo ou tenha rodado através do mesmo. Isso apenas significa que o valor médio do $\cos^2 \theta$ é $1/3$, onde θ é a diferença angular entre momento de excitação e o de emissão. Na dedução da Eq. B.13 foi assumido que esse dipolo são colineares, mas é preciso uma expressão um pouco mais complexa quando esses dipolos não estão posicionados dessa maneira. Para praticamente todos os fluoróforos é preciso deduzir essa expressão mais complexa, pois raramente os dipolos de emissão e excitação são colineares.

B.1b Porque a intensidade total é igual a $I_{//} + 2I_{\perp}$?

Essa relação é resultado de propriedades de transmissão dos polarizadores, em particular, a dependência da intensidade com $\cos^2 \alpha$, onde α é o ângulo entre o momento de transição e a direção de transmissão do polarizador. Considere um grupo de fluoróforos, cada um emitindo uma intensidade I_i . A intensidade total é dada por;

$$I_T = \sum_{i=1}^n I_i. \quad (\text{B.14})$$

Quando a intensidade é observada através de um polarizador (I_P) orientado ao longo de um eixo P, o seu valor é dado por:

$$I_P = \sum_{i=1}^n I_i \cos^2 \alpha_{Pi}, \quad (\text{B.15})$$

onde α_{pi} é o ângulo entre a direção de emissão do i -éssimo dipolo e o eixo de transmissão do polarizador. Podendo ser escolhido entre os três eixos cartesianos:

$$\begin{aligned} I_x &= \sum_{i=1}^n I_i \cos^2 \alpha_{xi} \\ I_y &= \sum_{i=1}^n I_i \cos^2 \alpha_{yi} , \\ I_z &= \sum_{i=1}^n I_i \cos^2 \alpha_{zi} \end{aligned} \quad (\text{B.16})$$

somando as equações mostradas na Eq. B.16, temos:

$$I_x + I_y + I_z = \sum_{i=1}^n I_i (\cos^2 \alpha_{xi} + \cos^2 \alpha_{yi} + \cos^2 \alpha_{zi}). \quad (\text{B.17})$$

Usando que $(\cos^2 \alpha_{xi} + \cos^2 \alpha_{yi} + \cos^2 \alpha_{zi}) = 1$, temos novamente a Eq. B.14, isso nos leva a concluir que :

$$I_T = I_x + I_y + I_z . \quad (\text{B.18})$$

Para excitação verticalmente polarizada, temos $I_x = I_y = I_{\perp}$ e $I_z = I_{\parallel}$ colocando na Eq. B.18, chegamos que:

$$I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp} . \quad (\text{B.19})$$

B.1c Foto-seleção na excitação do fluoróforo

Quando uma amostra é iluminada com uma luz polarizada, as moléculas com seu momento de transição de absorção paralelo ao vetor campo elétrico da luz incidente tem maior probabilidade de absorverem essa radiação. O dipolo elétrico de um fluoróforo não precisa estar precisamente alinhado com o eixo-z para absorver a luz polarizada nesse eixo. A probabilidade de absorção é proporcional ao $\cos^2 \theta$, onde θ é o ângulo entre o dipolo de absorção e o eixo-z, como dito anteriormente.

Por isso a excitação com luz polarizada resulta numa população de fluoróforos excitados que está simetricamente distribuída ao redor do eixo-z. Esse fenômeno é chamado de foto-seleção. A população excitada é simétrica ao redor do eixo-z e a maioria dos fluoróforos que são excitados estão alinhados próximos ao eixo-z e apenas alguns poucos têm seus momentos de transição orientados no plano xy .

Para uma distribuição aleatória no estado fundamental (que deve existir numa solução desorganizada), o número de moléculas entre θ e $\theta + d\theta$ é proporcional a $\sin\theta d\theta$. Essa

quantidade é proporcional a área da superfície de uma esfera que esteja entre θ e $\theta + d\theta$. A distribuição das moléculas excitadas pela luz polarizada verticalmente é dada por:

$$f(\theta)d\theta = \cos^2 \theta \cdot \sin \theta \cdot d\theta. \quad (\text{B.20})$$

A função $f(\theta)$ determina a foto-seleção máxima que pode ser obtida com a excitação de um fóton numa solução isotrópica. Populações mais altamente orientadas podem ser obtidas através de excitação com mais de um fóton.

Figura B.3: Distribuição do estado excitado para fluoróforos imóveis com $r_0 = 0,4$. Adaptada de [Lakowicz, 2006]

Como a anisotropia é uma função de $\langle \cos^2 \theta \rangle$, se calcularmos esse valor teremos o valor da anisotropia. Para absorção colinear e emissão dipolar, o valor máximo de $\langle \cos^2 \theta \rangle$ é dado por:

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \frac{\int_0^{\pi/2} \cos^2 \theta \cdot f(\theta) \cdot d\theta}{\int_0^{\pi/2} f(\theta) \cdot d\theta}. \quad (\text{B.21})$$

Se colocarmos a Eq. B.20 na Eq. B.21, temos:

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \frac{\int_0^{\pi/2} \cos^4 \theta \cdot \sin \theta \cdot d\theta}{\int_0^{\pi/2} \cos^2 \theta \cdot \sin \theta \cdot d\theta} = \frac{1/5}{1/3} = \frac{3}{5}. \quad (\text{B.22})$$

Colocando esse valor na equação B.13, temos:

$$r_0 = \frac{3 \cdot \left(\frac{3}{5}\right) - 1}{2} \Rightarrow r_0 = 0,4. \quad (\text{B.23})$$

Esse valor é observado quando os dipolos de absorção são colineares e quando não há nenhum processo que leva a despolarização. Nessas condições, a população no estado excitado está orientada preferencialmente ao longo do eixo-z e o valor de $I_{\perp}$ é $\frac{1}{3}$ do valor de $I_{\parallel}$ ($I_{\parallel} = 3I_{\perp}$). Se as medidas de anisotropia para uma amostra randomicamente orientada são maiores que 0,4, podemos dizer que temos interferência do espalhamento de luz nessas medidas. Esse valor de 0,4 é uma consequência da probabilidade de absorção de luz depender de $\cos^2 \theta$. Os valores de anisotropia podem ser maiores que 0,4 para excitação com mais de um fóton.

B.1d Espectros de anisotropia de excitação

Poucos fluoróforos têm $r_0 = 0,4$. Para a maioria das sondas os valores são ainda menores que 0,4 e em geral o valor da anisotropia depende do comprimento de onda de excitação. Isso é explicado em termos dos momentos de transição estarem colocados com um ângulo β em relação uns aos outros. O posicionamento dos dipolos de absorção e emissão com um ângulo β entre eles leva a uma perda de anisotropia. O valor observado para a anisotropia numa solução diluída e cristalina é um produto da perda de anisotropia pela fotoseleção $\left(\frac{2}{5}\right)$ e devido ao posicionamento angular entre os dipolos:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right), \quad (\text{B.24})$$

onde r_0 é usado para a anisotropia medida na ausência de outros processos despolarizadores como difusão rotacional e transferência de energia. Para algumas moléculas β é próximo de 0, fazendo com que r_0 seja muito próximo de 0,4. É interessante notar que quando $r_0 = 0$, temos um valor de $\beta = 54,7^\circ$ e quando o valor de β fica maior que esse valor a anisotropia passa a ser negativa até quando $\beta = 90^\circ$ e r_0 passa a ter o seu valor máximo negativo, -0,2. Podemos notar que os valores para a anisotropia devem sempre estar dentro do intervalo $-0,2 < r_0 < 0,4$ para uma solução isotrópica com excitação de um fóton.

Medidas de r_0 necessitam de condições especiais para evitar efeitos que pode levar a despolarização da luz. Para evitar difusão rotacional, as sondas são observadas em solventes que formem uma estrutura mais rígida a baixas temperaturas, com o objetivo de imobilizar o

fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. As soluções devem ser opticamente diluídas para evitar despolarização da luz devido à reabsorção e emissão da radiação ou devido à transferência de energia. As medidas de r_0 fornecem o valor do ângulo entre os dipolos de absorção e emissão. Já que a orientação do dipolo de absorção muda para cada banda de absorção, o ângulo β varia com o comprimento de onda de excitação.

As mudanças na anisotropia fundamental (r_0) com o comprimento de onda de excitação podem ser entendidas como uma rotação no momento de transição de absorção. No entanto, uma explicação mais precisa é a mudança nas contribuições das duas ou mais transições eletrônicas, cada uma com um valor diferente de β . Mudando o comprimento de onda de excitação, as frações de luz absorvidas por cada transição também mudam.

Espectro de anisotropia é um gráfico da anisotropia em função do comprimento de onda de excitação. Geralmente, a anisotropia é independente do comprimento de onda de emissão. Essa independência é esperada porque a emissão quase sempre acontece do menor estado do singlete. Se a emissão acontece de mais de um estado e se estes mostrarem diferentes espectros de emissão, então a anisotropia pode ser dependente do comprimento de onda de emissão.

Tipicamente, os maiores valores de r_0 são observados para as bandas de comprimento de onda de absorção mais longos. Isso acontece porque o estado singlete de menor energia é normalmente responsável pela fluorescência observada e esse estado é também responsável pela banda de absorção de maior comprimento de onda (regra de Kasha [Lakowicz, 2006]). Sabendo que a absorção e a emissão envolvem a mesma transição eletrônica e tem momentos quase colineares, valores maiores de β (r_0 menores) são obtidos quando ocorre a excitação para estados eletrônicos maiores, que geralmente não são responsável pela emissão fluorescente, pois os fluoróforos relaxam rapidamente para o estado singlete de menor energia por todos esses motivo o espectro de anisotropia de excitação revela o ângulo entre os momentos de transição de absorção e de emissão. No entanto, as direções desses momentos com relação à molécula não são mostradas.

B.1e Medida de anisotropia

Existem dois métodos de medidas comumente usados sendo eles: o método do formato L (onde apenas um canal de emissão é utilizado) e o método do formato T (onde as componentes paralela e perpendicular são medidas simultaneamente através de canais

separados). A explicação dada abaixo para esses métodos é para medidas realizadas com fluorescência estática, mas a com resolução temporal é muito parecida.

O método *L* ou canal único é o método mais usado, pois a maioria dos fluorímetros tem somente um canal de emissão. Assumindo que a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente e a emissão é observada através de um monocromador. As intensidades necessárias para o cálculo da anisotropia são todas medidas pelo mesmo canal, como está mostrado na Figura B.4.

O monocromador normalmente terá a eficiência de transmissão diferente para luz polarizada vertical e horizontalmente. Como consequência, a rotação do polarizador de emissão muda as medidas de I mesmo que a amostra emita luz não polarizada. Com isso, as intensidades medidas não são os valores desejados de $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$.

Colocando S_V e S_H como a sensibilidade do canal de emissão para as componentes polarizadas vertical e horizontalmente, respectivamente, temos:

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel}, \quad (\text{B.25})$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp}, \quad (\text{B.26})$$

onde k é um fator de proporcionalidade que leva em conta o rendimento quântico da sonda fluorescente e outros fatores instrumentais separando apenas a sensibilidade dependente da polarização. Dividindo a Eq. B.25 pela Eq. B.26 temos:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{\parallel}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}, \quad (\text{B.27})$$

onde é preciso determinar o valor do fator G , que é definido:

$$G = \frac{S_V}{S_H}. \quad (\text{B.28})$$

Figura B.4: Esquema para medidas de anisotropia de fluorescência pelo método L, onde MC significa monocromador. As formas na direita indicam as distribuições do estado excitado. Adaptada de [Lakowicz, 2006]

O fator G é facilmente medido usando excitação horizontalmente polarizada. Com esse tipo de excitação, a distribuição do estado excitado é rodada e fica ao longo do eixo de observação. Quando isso é feito, ambas as componentes vertical e horizontal são iguais e proporcionais à $I_{\perp}$. Com isso, temos:

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} = G \quad (\text{B.29})$$

Sabendo o fator G podemos facilmente calcular a razão $I_{\parallel}/I_{\perp}$ dada por:

$$\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = \frac{I_{VV} I_{HH}}{I_{VH} I_{HV}} = \frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{1}{G} \quad (\text{B.30})$$

Reorganizando a Eq. B.1 e usando a Eq. B.30, temos:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{(I_{\parallel}/I_{\perp}) - 1}{(I_{\parallel}/I_{\perp}) + 2} = \frac{\left(\frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{1}{G}\right) - 1}{\left(\frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{1}{G}\right) + 2} \Rightarrow r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (\text{B.31})$$

No método T ou de dois canais, as medidas de intensidade paralela e perpendicular são feitas simultaneamente usando dois sistemas de detecção separados como está mostrado na Figura B.5.

Figura B.5: Esquema para medidas de anisotropia de fluorescência pelo método T. Adaptada de [Lakowicz, 2006]

Os polarizadores de emissão não são mudados, então medidas da sensibilidade relativa para cada polarizador não são necessárias. Porém, é preciso medir a sensibilidade relativa dos dois sistemas de detecção, isso é feito usando a excitação horizontalmente polarizada. As medidas são realizadas da seguinte maneira. O polarizador de excitação é colocado primeiramente na vertical e é medida a razão entre os sinais paralelo e perpendicular, chamada de R_V . Essa razão é dada por:

$$R_V = \frac{G_{||} I_{||}}{G_{\perp} I_{\perp}}, \quad (\text{B.32})$$

onde $G_{||}$ e $G_{\perp}$ são os ganhos dos canais paralelo e perpendicular, respectivamente. A segunda medida é feita colocando o polarizador de excitação na posição horizontal, nesse caso ambos os canais de emissão observam $I_{\perp}$. Então a razão das intensidades é dada por:

$$R_H = \frac{G_{||}}{G_{\perp}}. \quad (\text{B.33})$$

A divisão da Eq. B.32 pela Eq. 33 fornece:

$$\frac{R_V}{R_H} = \frac{I_{||}}{I_{\perp}}, \quad (\text{B.34})$$

que pode ser usada para calcular a anisotropia dada pela Eq. B.31.

B.1f Causas para a Despolarização

As medidas de anisotropia podem ser mais baixas que o valor real por muitas razões, incluindo o espalhamento de luz, reabsorção e falta de alinhamento dos polarizadores. Apesar desses fatores serem problemas experimentais não triviais, eles somente dependem das condições ópticas do experimento e não fornecem informações das propriedades moleculares da amostra.

Amostras biológicas, como suspensões aquosas de membrana, são freqüentemente turvas, essa turbidez resulta num espalhamento de fótons incidentes e emitidos. Cada espalhamento pode diminuir a anisotropia do fóton espalhado em 0.7 do seu valor original e se espera que a anisotropia observada decresça linearmente com a densidade óptica devido a turbidez.

B.1g Efeitos da Difusão Rotacional na Anisotropia de Fluorescência

A difusão rotacional dos fluoróforos é uma das causas dominantes na despolarização fluorescente. Esse modo de despolarização é descrito num caso simples para rotores esféricos pela equação de Perrin:

$$\frac{r}{r_0} = 1 + \frac{\tau}{\theta} = 1 + 6D\tau, \quad (\text{B.35})$$

onde τ é o tempo de vida fluorescente, θ é o tempo de correlação rotacional e D é o coeficiente de difusão rotacional. Se $\theta \gg \tau$, então a medida de anisotropia (r) é igual a anisotropia fundamental (r_0). Se o oposto acontecer, ou seja, $\theta \ll \tau$, teremos a medida de anisotropia igual a zero.

A equação de Perrin foi deduzida de princípios baseados em passos de difusão [Weber, 1953; Weber, 1966]. A dedução mostrada abaixo está baseada no fato que depois de um pulso δ de excitação, o tempo de decaimento da anisotropia para uma molécula esférica é uma única exponencial:

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} = r_0 e^{-6Dt}, \quad (\text{B.36})$$

onde $\theta = \frac{\eta V}{RT}$, sendo η a viscosidade, T a temperatura, R a constante universal dos gases e V o volume.

A anisotropia estática pode ser calculada através de uma média no decaimento da anisotropia $r(t)$ sobre a intensidade de decaimento, dada por:

$$r = \frac{\int_0^{\infty} I(t)r(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt} \quad (\text{B.37})$$

Se colocarmos a Eq. B.36 na Eq. B.37:

$$r = \frac{\int_0^{\infty} I_0 e^{-t/\tau} r_0 e^{-t/\theta} dt}{\int_0^{\infty} I_0 e^{-t/\tau} dt} = \frac{r_0 \int_0^{\infty} e^{-t/\tau} e^{-t/\theta} dt}{\int_0^{\infty} e^{-t/\tau} dt} = \frac{r_0 \int_0^{\infty} e^{-t\left(\frac{\theta+\tau}{\theta\tau}\right)} dt}{\int_0^{\infty} e^{-t/\tau} dt} = \frac{r_0 \left(-\frac{\theta+\tau}{\theta\tau} \right) e^{-t\left(\frac{\theta+\tau}{\theta\tau}\right)} \Big|_0^{\infty}}{-\tau e^{-t/\tau} \Big|_0^{\infty}}. \quad (\text{B.38})$$

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta}$$

B.2 Contagem de um Único Fóton por Correlação Temporal

Em experimentos de decaimento fluorescente, a luz sendo analisada é um pulso que começa intenso e depois rapidamente decai em intensidade, como mostrado na figura 1. O ponto no eixo x onde o tempo é igual a zero indica o momento no qual a amostra foi bombardeada com o pulso de luz que excitou a amostra e começou a fluorescência. A escala de intensidade do eixo y é realmente o número de fótons contados em cada intervalo de tempo do eixo x .

Conceitualmente o processo é muito direto e ao final de um experimento o dado coletado é uma curva de contagens versus tempo como a mostrada na Figura B.6. Mas devido a escala de tempo envolvida (a escala toda do eixo x é usualmente da ordem de centenas de nanosegundos, com cada intervalo representando um nanosegundo ou menos), simplesmente contar e guardar os dados não é possível. A eletrônica do sistema não pode operar dessa maneira.

Figura B.6: Exemplo de um decaimento fluorescente (também colocada na Seção 2.2.3).

Como colocado na Seção 2.2.3, o ponto no eixo x onde o tempo é igual a zero indica o momento no qual a amostra foi bombardeada com o pulso de luz que excitou a amostra e começou a fluorescência. A escala de intensidade do eixo y é realmente o número de fótons contados em cada intervalo de tempo do eixo x . Conceitualmente o processo é muito direto e ao final de um experimento o dado coletado é uma curva de contagens versus tempo como a mostrada Figura B.6. Mas devido à escala de tempo envolvida (a escala toda do eixo x é usualmente da ordem de centenas de nanosegundos, com cada intervalo representando um nanosegundo ou menos), simplesmente contar e guardar os dados não é possível. A eletrônica do sistema não pode operar dessa maneira.

Para resolver esse problema foi criada a contagem de um único fóton por correlação temporal, em inglês, *Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)*. Nesta Seção discutiremos alguns detalhes dessa técnica.

B.2a As bases do Sistema TCSPC

O diagrama em blocos da Figura B.7 traduz a teoria sobre como esse sistema de aquisição de dados funciona. Através desse diagrama é possível evidenciar as funções de cada

componente nesse sistema e também as interações entre os mesmos. A seguir uma explicação detalhada de cada item do diagrama.

a. **Fonte de Luz:** A fonte de luz fornece a energia de excitação necessária para fazer a amostra fluorescer, sendo usualmente um laser ou uma lâmpada pulsada. Dependendo da exata natureza da fonte, esta mandará pulsos de luz monocromática para a amostra com taxas variando de alguns KHz até alguns MHz. Toda vez que a fonte de luz envia um pulso de excitação para a amostra, também envia um sinal de “Start” para um equipamento chamado Conversor de Tempo para Amplitude (*Time to Amplitude Converter, TCA*). Esse equipamento é que mede a diferença de tempo entre esse pulso de excitação inicial e o fóton emitido pela amostra.

Figura B.7: As bases de um sistema TCSPC.

b. **Amostra:** essa é a amostra sendo analisada. Ela é excitada pelo pulso de excitação, e ao relaxar para seu estado fundamental emite a fluorescência estudada.

c. **Filtro:** a fluorescência emitida pela amostra é primeiramente filtrada antes de ser analisada para eliminar comprimentos de ondas não desejados para o estudo. O filtro pode ser tão simples como vidros coloridos ou tão complexos como monocromadores.

d. **Detector:** depois de ser filtrada, a luz emitida pela amostra passa pelo detector, que usualmente é um Tubo Fotomultiplicador (PMT). O detector tem uma entrada muito estreita para assegurar que somente um único fóton de luz possa entrar e ser detectado.

A PMT irá amplificar o sinal gerado pelo fóton, adicionar esse sinal ao ruído eletrônico inerente de toda PMT e envia um pulso resultante do sinal mais ruído para o Discriminador de parada.

e. Discriminador de Parada: este é um elemento chave em qualquer sistema de *TCSPC*, ele faz com que a contagem de um único fóton seja essencialmente insensível ao ruído e a problemas de deslocamentos que estão presentes no método analógico de análise da luz. Um discriminador, por sua natureza, é desenvolvido para diferenciar entre os níveis de sinais elétricos. Isto é, se um sinal de entrada no discriminador está abaixo de um nível mínimo especificado, o sinal é completamente ignorado. Somente um sinal de entrada maior que esse nível mínimo é reconhecido, fazendo com que o discriminador produza um pulso de saída que significa que um sinal real foi detectado pelo mesmo. Ajustando esse nível mínimo para ser maior que o ruído da PMT, mas menor que o sinal mais o ruído, é possível eliminar os efeitos dos ruídos da PMT e de deslocamentos nos experimentos.

f. Conversor de Tempo para Amplitude (*TAC, Time Amplitude Convertor*): esse equipamento pode ser visto como um cronômetro muito preciso, começando a contar com o sinal de *start* vindo da fonte de luz e parando com o Discriminador de Parada envia um sinal. Quando recebe um sinal para parar, a *TAC* gera um pulso de saída analógico, cuja amplitude representa precisamente o tempo entre o sinal inicial e o sinal de parada (por isso o nome de conversor de tempo para amplitude). Então para esse fóton que foi detectado, é possível ter uma representação acurada do quanto tempo se passou para esse fóton ser emitido após a excitação da amostra.

g. Conversor de Analógico para Digital (*ADC, Analog to Digital Converter*): o *ADC* mede a amplitude do pulso produzido pelo *TAC* para determinar em qual intervalo de tempo no eixo *x* da curva de decaimento esse fóton em particular deve ser marcado. Ele envia o número desse intervalo para o Analisador de Pulso Multicanal como um número digital de canal.

h. Analisador de Pulso Multicanal (*MCA, Multichannel Pulse Height Analyzer*): depois de receber o número do canal, que na verdade é apenas um número de endereço da memória, o *MCA* adiciona uma unidade ao conteúdo da célula de memória para gravar o fato de que um fóton foi observado naquele intervalo de tempo específico.

Esse processo, que leva somente alguns microssegundos do começo ao fim, é então repetido por milhares de vezes até que a natureza randômica desses eventos leva a obtenção de um histograma como mostrado na Figura B.8.

Figura B.8: Decaimento fluorescente típico medido por esse método (linha preta) e o pulso do laser utilizado (linha vermelha).

B.2b Procedimento de Análise de Decaimentos Fluorescentes

A análise das curvas de decaimento, ou seja, retirar propriedades físicas dos dados medidos na amostra, é um aspecto crucial da técnica de *TCSPC*. Nesse tipo de análise se assume uma teoria *á priori* para se definir a verdadeira função da curva de decaimento e depois a sua validade é testada.

Na prática, a análise das curvas de decaimentos envolve:

- a. Remover distorções introduzidas pela duração finita do pulso de excitação (linha vermelha na Figura B.8) e pela resposta do sistema de detecção.
- b. Fazer uma avaliação dos parâmetros.
- c. Testar se o modelo adotado é apropriado aos dados experimentais.

Os passos *a* e *b* são realizados simultaneamente usando a técnica de deconvolução, que é baseada na integral de convolução:

$$F(t) = \int_0^t I(t-t')D(t')dt' \quad (\text{B.39})$$

Essa equação relaciona a lei de decaimento assumida, $D(t')$, a emissão de fluorescência medida experimentalmente, $F(t)$ e a função de resposta do equipamento $I(t)$,

algumas vezes chamada de “perfil da lâmpada”, que é a resposta do equipamento no limite em que $t \rightarrow 0$.

A função de resposta do equipamento precisa ser conhecida para ser usada na análise dos decaimentos fluorescentes. Essa função é normalmente medida através da substituição da amostra por uma solução espalhadora e colocando o monocromador de emissão no comprimento de onda de excitação.

A validade da análise por convolução requer que tanto $F(t)$ quanto $I(t)$ tenham sido medidos sob as mesmas condições experimentais.

Para muitos sistemas o decaimento fluorescente pode ser representado por uma soma de exponenciais, isto é,

$$D(t) = \sum_i B_i e^{-t/\tau_i} \quad (\text{B.40})$$

A lei de decaimento, $D(t)$, é usualmente chamada de função de resposta imediata porque ela representa a emissão que seria produzida por uma resposta do equipamento infinitamente curta ou por uma função delta de excitação.

O método de comparar a função ajustada aos dados experimentais medidos é o Método dos Mínimos Quadrados. A quantidade de acertos entre um dado e a função ajustada é medido pela estatística χ^2 definida da seguinte maneira:

$$\chi^2 = \sum_t \left[\frac{Y(t) - F(t)}{\sigma(t)} \right]^2, \quad (\text{B.41})$$

onde $Y(t)$ é o decaimento fluorescente, $F(t)$ é a função ajustada e $\sigma(t)$ é a incerteza estatística do ponto $Y(t)$, isto é:

$$\chi^2 = \sum_t \left[\frac{\text{desvio real}}{\text{desvio esperado}} \right]^2. \quad (\text{B.42})$$

O objetivo do método é obter o melhor ajuste, achando os melhores parâmetros que levam ao valor de χ^2 menor o possível. Se a função ajustada representa os dados adequadamente, então os desvios reais serão iguais aos desvios esperados e a razão de cada definição do χ^2 será igual a unidade. Então $\chi^2 = N$, o número de dados medidos.

Na prática é usual levar em conta o número de parâmetros a serem ajustados, ν , e então $\chi^2 = N - \nu$ para um bom ajuste. A normalização do valor de χ^2 pelos graus de liberdade ($N - \nu$) leva a:

$$\chi^2 = \frac{\chi^2}{N - \nu} \approx 1, \quad (\text{B.43})$$

para um bom ajuste. É bom notar que o desvio esperado é uma quantidade estatística com uma média e uma distribuição e que por isso χ^2 também será um valor estatístico com uma função de distribuição também estatística.

Para os dados de contagem de fótons, o valor do desvio esperado pode ser determinado através dos dados, usando uma distribuição de Poisson, levando a:

$$\sigma(t) = \sqrt{Y(t)}. \quad (\text{B.44})$$

Os resíduos, $R(t)$, são a diferença entre a função ajustada e os dados medidos, normalizada pela incerteza nos dados. Então:

$$R(t) = \frac{Y(t) - F(t)}{\sigma(t)}, \quad (\text{B.45})$$

levando a:

$$\chi^2 = \sum_t R(t)^2. \quad (\text{B.46})$$

Os resíduos são uma maneira muito importante de avaliar o quão bom é um ajuste, pois ele fornece:

- a. Uma relação direta entre χ^2 e $R(t)$;
- b. Desvios estatisticamente significativos para os resíduos são expressos em termos de desvios associados com o ruído dos dados.
- c. Determinação visual de uma posição errada de ajuste.

A função de autocorrelação é um teste adicional para a função ajustada e verifica também se existe correlação nos dados medidos. Esse teste é definido como:

$$C(\Delta T) = \lim_{T \rightarrow 0} \int_0^T R(t) R(t - \Delta t) dt \quad (\text{B.47})$$

Por definição $C(0) = 1$, isto é, cada resíduo é perfeitamente correlacionado com ele mesmo e para um bom ajuste a função de autocorrelação deve ser randomicamente distribuída em torno do 0.

B.3 Referências

- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Publishers, (2006).
 Weber, G. *Rotational Brownian Motion and Polarization of the Fluorescence of Solutions*. *Advances in Protein Chemistry*, **8**, 415-459, (1953).

Weber, G. *Polarization of the fluorescence of solutions*. In: D. M. Hercules (Ed.). Fluorescence and Phosphorescence Analysis. New York: John Wiley & Sons, (1966).

C

APÊNDICE

Descrição da Análise dos Dados

C.1 Análise dos Espectros de Absorção

C.1a Análise dos Espectros de Absorção

Os espectros de absorção para o Laurdan e Prodan nos diferentes solventes e bicamada foram analisados da seguinte maneira:

- Mediamos o espectro do solvente puro, sem nenhuma sonda, para obtermos a curva do solvente com a cubeta de quartzo (linha vermelha, Figura C.1A).
- Mediamos o espectro da sonda com solvente na mesma cubeta de quartzo (linha preta, Figura C.1A).
- Subtraímos o espectro do solvente puro do espectro da sonda mais solvente e obtínhamos apenas o espectro da sonda naquele solvente (linha preta, Figura C.1B).
- Quando o espectro não era zero em comprimentos de onda sem a influência da sonda, nesse caso comprimentos de onda maiores que 450 nm, uma constante era subtraída para levar o espectro a zero. O valor usado foi o do espectro em 500 nm (linha azul, Figura C.1B). Com isso obtínhamos o espectro final colocado na Figura C.1C.

Figura C.1: Demonstração da análise do espectro de absorção para o Prodan em ciclohexano. A – Espectros medidos para o solvente puro (linha vermelha) e para o Prodan em solvente (linha preta). B – Espectro do Prodan em ciclohexano já subtraindo o solvente puro (linha vermelha) e a constante que foi utilizada para levar o espectro para zero (linha azul). C – Espectro final.

Para os espectros medidos em bicamadas a análise foi um pouco mais delicada, pois a influência do espectro medido somente em bicamada é maior, pois as bicamadas espalham mais luz do que o solvente puro. Um exemplo dessa análise para um espectro medido em bicamada está colocado na Figura C.2.

Figura C.2: Demonstração da análise do espectro de absorção para o Prodan em DLPC. A – Espectros medidos para a bicamada pura (linha vermelha) e para o Prodan na bicamada (linha preta). B – Espectro do Prodan em DLPC já subtraindo a bicamada pura (linha vermelha) e a constante que foi utilizada para levar o espectro para zero (linha azul). C – Espectro final.

C.1b Decomposição dos Espectros de Emissão em Gaussianas

Para realizar a decomposição dos espectros de emissão em gaussianas, primeiro é preciso transformá-los de comprimento de onda para energia, ou número de onda, que chamaremos de energia. Essa transformação é necessária, pois os níveis de energia quânticos são quantizados em energia e a decomposição realizada em energia fornece a população de cada estado excitado das sondas.

Comprimento de onda pode ser facilmente transformado para número de onda (cm^{-1}) simplesmente fazendo o inverso. Porém quando os espectros são medidos, eles são medidos em intervalos de comprimentos de onda, chamados de *bandpass* e não em um comprimento de onda específico. O *bandpass* é a resolução do monocromador para um determinado intervalo de comprimento de onda e ele não é constante em número de onda, ou energia,

quando o espectro é medido com resolução constante em comprimento de onda, como é comum na maioria dos monocromadores. Por exemplo, considere um *bandpass* constante $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$, onde λ_1 e λ_2 são comprimentos de onda em cada lado do máximo de transmissão (Figura C.3). Em 300 nm, um *bandpass* ($\Delta\lambda$) de 2 nm é equivalente a 222 cm^{-1} . Em 600 nm, o mesmo *bandpass* é equivalente a uma resolução de 55 cm^{-1} . Conforme o comprimento de onda é aumentado, o *bandpass* (em cm^{-1}) diminui com o quadrado do comprimento de onda:

$$\Delta\nu = \nu_2 - \nu_1 = \frac{1}{\lambda_2} - \frac{1}{\lambda_1} = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_2 \lambda_1} \cong \frac{\Delta\lambda}{\lambda^2}. \quad (\text{C.1})$$

Portanto, se o espectro é medido com intensidade por comprimento de onda $I(\lambda, \lambda + \Delta\lambda)/\Delta\lambda$ e $I(\nu, \nu + \Delta\nu)$, então para converter o espectro para a escala de número de onda, é preciso que cada intensidade seja multiplicada por λ^2 :

$$I(\nu) = I(\lambda)\lambda^2 \quad (\text{C.2})$$

Figura C.3: Exemplo de um *bandpass* em comprimento de onda.

Depois de transformar os espectros de emissão de comprimento de onda para número de onda (energia), na maioria dos casos foi necessário subtrair uma linha de base para levar o espectro a zero (Figura C.4A e B). Os espectros não começam e terminam em zero como deveriam, devido à influência do pico de espalhamento da luz incidente que está em 340 nm. Com o espectro começando e terminando em zero, realizamos o ajuste das gaussianas utilizando o programa *Origin 8.0* (Figura C.4C).

Figura C.4: Exemplo do ajustes das gaussianas em um espectro de emissão do Prodan em bicamada de DLPC a 10 °C.

C.1c Análise dos Decaimentos Temporais

Os decaimentos temporais da fluorescência foram analisados utilizando a chamada análise global. Nessa análise o mesmo tempo de vida é ajustado para decaimentos medidos em diferentes comprimentos de onda de emissão. Essa análise foi realizada com o programa *GEM*, fornecido pela *Edinburgh Instruments*. A seguir colocaremos uma descrição passo a passo de como realizar essa análise, com esse programa:

- Iniciar o programa de aquisição de dados, *GEM*.
- Dentro a aba *Analysis*, entrar em *Level2 Analysis*.
- Aparecerão duas abas, *Analysis* e *Plot*. Clicar em *Analysis*. Selecionar *Global*.

A seguinte janela aparecerá:

Figura C.5: Janela inicial para a realização da análise global.

d. Clicar no campo *Response*, uma janela aparecerá para selecionar o arquivo que contem a resposta do equipamento, ou seja, o pulso do laser. Selecione o arquivo onde foi salva essa medida e clique *Ok*. O nome do arquivo deve aparecer no campo *Response*.

e. Clicar em *Add Decay(s)*, novamente a janela para selecionar arquivos aparecerá. Selecionar o arquivo com o decaimento temporal medido e clicar *Ok*. Realizar esse passo até colocar todos os decaimentos desejados. (O programa só permite um máximo de 16 decaimentos).

f. Clicar em *Fit Range*. Essa grandeza determina o intervalo onde o ajuste será realizado, no eixo x , ou seja, no eixo do tempo. Ela é dada em canais e o seu valor máximo dependerá da quantidade de canais selecionada durante as medidas. No caso mostrado aqui número de canais varia de 1 a 4095, que equivalente a 50 ns, dando uma resolução de 0.0122 ns por canal. O valor desse intervalo depende das medidas realizadas, mas ele deve eliminar possíveis espalhamentos de luz que aparecem no início do decaimento e também o ruído que pode aparecer no final do decaimento (Figura C.6). Nesse exemplo vamos utilizar, de 200 a 3000 canais.

Figura C.6: Exemplo do Fit Range. A esquerda temos o decaimento com todos os canais (1 a 4095) e a direita temos a parte do decaimento selecionado pelo Fit Range (de 200 a 3000 canais)

g. Depois de selecionar o *Fit Range*, clicar em $\tau 1$ e colocar o valor inicial para o ajuste. Essa grandeza pode ser fixada durante o ajuste se a opção *F* estiver selecionada (quadrado preto com letra branca) ou ela pode ser conectada entre todos os decaimentos, com a opção *Link* selecionada. Se o decaimento for monoexponencial, apenas $\tau 1$ deve ser inicializado, se forem duas exponenciais, $\tau 1$ e $\tau 2$ devem ser inicializados e assim sucessivamente. Nesse exemplo, vamos utilizar decaimentos com duas exponenciais e por isso colocamos valores para $\tau 1$ e $\tau 2$ e conectamos (*Link*) para que esses tempos de vida sejam ajustados com o mesmo valor em todos os decaimentos (Figura C.7).

h. Selecionar a opção *Shift term*, com *Yes*. Isso permitirá um deslocamento da resposta do equipamento se o seu máximo não corresponder ao máximo do decaimento temporal medido (Figura C.7).

i. Clicar em *Fit*. A janela colocada na Figura C.8 aparecerá enquanto o ajuste está sendo realizado. Quando o ajuste for finalizado, a janela mostrada na Figura C.8 desaparecerá e aparecerá a tela colocada na Figura C.9.

Figura C.7: Janela inicial para a realização da análise global, com os parâmetros selecionados para iniciar o ajuste.

Figura C.8: Programa realizando o ajuste e mostrando o valor do χ^2 Global.

Figura C.9: Resultado após o ajuste através da análise global.

Na Figura C.9, temos o resultado do ajuste para o decaimento 1 (DPLAU10.G00), clicando nos outros decaimentos os valores para cada um deles aparecerá na tela. Os valores de τ_1 e τ_2 aparecem no topo da tela assim como o seu desvio, a letra L aparece ao lado desses valores para indicar que eles foram conectados durante o ajuste e por isso têm o mesmo valor para todos os decaimentos. Os valores B_1 e B_2 são os fatores pré-exponenciais (0.016 e 0.023, respectivamente). Logo após esses valores estão mostrados os valores das porcentagens de contribuição de cada tempo de vida para intensidade total nesse comprimento de onda (16.10 e 83.90, respectivamente) e logo em seguida estão colocados os desvios de B_1 e B_2 . Esses dados estão salvo junto com o arquivo do decaimento, chamado de .G**, mas a melhor opção é anotar esses valores.

A qualidade do ajuste é verificada através do valor de *Local Chisq* e *Global Chisq* que devem ser próximos da unidade. Também é importante observar os resíduos obtidos para cada ajuste:

- Selecionar o decaimento desejado na janela *Fitted Files*.
- Clicar em *File Plot*.
- Na janela seguinte, clicar em *To Screen*.
- O decaimento, o ajuste e o resíduo apareceram na tela e o resíduo poderá ser analisado (Figura C.10).

Figura C.10: Gráficos do decaimento (vermelho), ajuste (linha verde) e resíduos (pontos verdes) obtidos após a análise global.

D

APÊNDICE

Arquivos de Entrada Utilizados nos Cálculos Quânticos e Simulações Computacionais

D.1 Arquivos de Entrada para os Cálculos Quânticos Prodan

D.1a Arquivo de Entrada: Otimização de Geometria do Prodan com o Gaussian03

%Chk=prodabl

#B3LYP/6-31G* OPT

Prodan B3LYP otimizacao da geometria a partir da geometria de raio-x

0 1

H	0.	0.	0.
C	1.084	0.	0.
C	1.80734	1.15759	0.
C	1.18279	2.5157	0.02181
O	1.87914	3.50647	0.02249
C	-0.31387	2.62819	0.04042
H	-0.71767	2.10721	-0.82016
H	-0.75037	2.05279	0.83397
C	-0.83665	4.0472	0.1604
H	-1.92985	3.97914	0.27207
H	-0.45248	4.67948	-0.65497
H	-0.40407	4.53407	1.04812
C	3.21428	1.08139	0.
H	3.822	1.97886	0.01622
C	3.85092	-0.12561	-0.0327
H	4.93306	-0.16646	-0.08136
C	3.12583	-1.33238	-0.05274
C	3.76259	-2.59816	-0.06793
H	4.84006	-2.5676	-0.18275
C	3.0467	-3.76262	-0.05282
C	1.63198	-3.68891	0.00927
H	0.9952	-4.56603	0.02486
C	0.98721	-2.47789	0.01862
H	-0.09523	-2.42179	0.03367
C	1.70847	-1.26555	-0.01205
N	3.67146	-5.00037	-0.09029
C	2.94327	-6.21906	0.07268
H	3.62651	-7.07666	0.17219
H	2.14817	-6.20808	0.83419
H	2.34742	-6.56402	-0.78649
C	5.1079	-5.08065	-0.12052
H	5.42265	-6.10752	-0.36275
H	5.55103	-4.54612	0.73395
H	5.56993	-4.52733	-0.95273

D.1b Arquivo de Entrada: Cálculo de Freqüências após a Otimização do Prodan com o Gaussian03

#B3LYP/6-31G* Freq

Prodan B3LYP otimizacao da geometria

0 1

H	-0.009650	0.013758	0.050865
C	1.076369	-0.006635	0.017744
C	1.807089	1.171340	0.015828
C	1.176176	2.523822	0.057457
O	1.867423	3.534645	0.054914
C	-0.348294	2.630864	0.103645
H	-0.760720	2.104699	-0.768825
H	-0.710111	2.074129	0.979572
C	-0.842990	4.075805	0.143289
H	-1.937425	4.105980	0.175982

H	-0.506255	4.629468	-0.737964
H	-0.454473	4.598895	1.021889
C	3.230111	1.095558	-0.027327
H	3.783784	2.028581	-0.027706
C	3.874084	-0.114014	-0.067079
H	4.960587	-0.154636	-0.099868
C	3.143291	-1.339146	-0.067440
C	3.783443	-2.597109	-0.104994
H	4.866887	-2.608444	-0.128998
C	3.057674	-3.791979	-0.108857
C	1.627064	-3.705360	-0.055306
H	1.030395	-4.609422	-0.045030
C	0.990494	-2.490877	-0.016844
H	-0.096130	-2.457818	0.022361
C	1.713211	-1.268690	-0.022847
N	3.681123	-5.026801	-0.168993
C	2.913741	-6.246537	0.024653
H	3.583884	-7.103933	-0.058142
H	2.425238	-6.289816	1.010238
H	2.139552	-6.359452	-0.744305
C	5.130593	-5.093724	-0.103129
H	5.447664	-6.133951	-0.196118
H	5.528917	-4.693632	0.842517
H	5.586973	-4.530290	-0.926511

D.1c Arquivo de Entrada: Cálculo das Cargas Atômicas do Prodan em vácuo com o Gaussian03

#MP2/aug-cc-pVDZ Pop=ChelpG Density=Current

Prodan MP2

0 1			
H	-0.009650	0.013758	0.050865
C	1.076369	-0.006635	0.017744
C	1.807089	1.171340	0.015828
C	1.176176	2.523822	0.057457
O	1.867423	3.534645	0.054914
C	-0.348294	2.630864	0.103645
H	-0.760720	2.104699	-0.768825
H	-0.710111	2.074129	0.979572
C	-0.842990	4.075805	0.143289
H	-1.937425	4.105980	0.175982
H	-0.506255	4.629468	-0.737964
H	-0.454473	4.598895	1.021889
C	3.230111	1.095558	-0.027327
H	3.783784	2.028581	-0.027706
C	3.874084	-0.114014	-0.067079
H	4.960587	-0.154636	-0.099868
C	3.143291	-1.339146	-0.067440
C	3.783443	-2.597109	-0.104994
H	4.866887	-2.608444	-0.128998
C	3.057674	-3.791979	-0.108857
C	1.627064	-3.705360	-0.055306
H	1.030395	-4.609422	-0.045030
C	0.990494	-2.490877	-0.016844
H	-0.096130	-2.457818	0.022361
C	1.713211	-1.268690	-0.022847
N	3.681123	-5.026801	-0.168993
C	2.913741	-6.246537	0.024653
H	3.583884	-7.103933	-0.058142
H	2.425238	-6.289816	1.010238
H	2.139552	-6.359452	-0.744305
C	5.130593	-5.093724	-0.103129
H	5.447664	-6.133951	-0.196118

H 5.528917 -4.693632 0.842517
H 5.586973 -4.530290 -0.926511

D.1d Arquivo de Entrada: Cálculo das Transições Eletrônicas do Prodan em vácuo com o ZINDO

\$TITLEI

prodan

\$END

\$CONTRL

DYNAL(1) = 0 17 17 0 0 1801 86
ONAME = form

IPRINT = 0

DIPOLE = 1

SCFTYP = RHF RUNTYP = CI ENTYP = COORD UNITS = ANG

INTTYP = 1 IAPX = 3 NAT = 34 SCFTOL = 0.00010

POLAR = 0 NEL = 88 MULT = 1

ISCRF = 0 ITMAX = 50

INTFA(1) = 1.0 1.267 0.585 1.0 1.0 1.0

\$END

\$DATAIN

-0.009650 0.013758 0.050865 1
1.076369 -0.006635 0.017744 6
1.807089 1.171340 0.015828 6
1.176176 2.523822 0.057457 6
1.867423 3.534645 0.054914 8
-0.348294 2.630864 0.103645 6
-0.760720 2.104699 -0.768825 1
-0.710111 2.074129 0.979572 1
-0.842990 4.075805 0.143289 6
-1.937425 4.105980 0.175982 1
-0.506255 4.629468 -0.737964 1
-0.454473 4.598895 1.021889 1
3.230111 1.095558 -0.027327 6
3.783784 2.028581 -0.027706 1
3.874084 -0.114014 -0.067079 6
4.960587 -0.154636 -0.099868 1
3.143291 -1.339146 -0.067440 6
3.783443 -2.597109 -0.104994 6
4.866887 -2.608444 -0.128998 1
3.057674 -3.791979 -0.108857 6
1.627064 -3.705360 -0.055306 6
1.030395 -4.609422 -0.045030 1
0.990494 -2.490877 -0.016844 6
-0.096130 -2.457818 0.022361 1
1.713211 -1.268690 -0.022847 6
3.681123 -5.026801 -0.168993 7
2.913741 -6.246537 0.024653 6
3.583884 -7.103933 -0.058142 1
2.425238 -6.289816 1.010238 1
2.139552 -6.359452 -0.744305 1
5.130593 -5.093724 -0.103129 6
5.447664 -6.133951 -0.196118 1
5.528917 -4.693632 0.842517 1
5.586973 -4.530290 -0.926511 1

\$END

\$CHNPU

2 1 50 1 0 0 0 1 1 2 50

```
-60000.00 0.000000
0
0001 44 44
0021 2 44 45 85
$END
```

D.2 Arquivos de Entrada para os Cálculos Quânticos: Laurdan

D.2a Arquivo de Entrada: Otimização de Geometria do Laurdan

```
%NProcShared=4
%Chk=laurdanblcis
#B3LYP/6-31G* OPT
```

Laurdan B3LYP otimizacao da geometria

```
0 1
H 1.7175 1.5650 -0.0257
C 2.6296 0.9747 -0.0148
C 2.5180 -0.4079 0.0000
C 1.1482 -1.0060 0.0002
O 0.9936 -2.2211 0.0002
C -0.0609 -0.0719 0.0002
H 0.0110 0.5923 0.8745
H 0.0109 0.5923 -0.8741
C -1.3999 -0.8120 0.0003
H -1.4430 -1.4742 -0.8732
H -1.4430 -1.4742 0.8738
C -2.6070 0.1338 0.0003
C 3.7101 -1.1881 0.0144
H 3.6475 -2.2718 0.0261
C 4.9479 -0.5909 0.0136
H 5.8476 -1.2019 0.0247
C 5.0834 0.8271 -0.0015
C 6.3442 1.4636 -0.0026
H 7.2271 0.8349 0.0085
C 6.4622 2.8566 -0.0174
C 5.2549 3.6326 -0.0319
H 5.3092 4.7145 -0.0438
C 4.0237 3.0297 -0.0311
H 3.1255 3.6425 -0.0423
C 3.8856 1.6153 -0.0160
N 7.6933 3.4843 -0.0183
C 8.9048 2.6852 -0.0053
H 9.7736 3.3453 -0.0081
H 8.9710 2.0317 -0.8871
H 8.9633 2.0495 0.8899
H 8.8401 5.2222 -0.0331
C 7.7876 4.9344 -0.0358
H 7.3136 5.3895 0.8452
H 7.3239 5.3678 -0.9332
H -2.5571 0.7950 0.8788
H -2.5571 0.7950 -0.8782
C -3.9517 -0.6049 0.0003
H -4.0011 -1.2657 -0.8778
H -4.0011 -1.2656 0.8784
C -5.1679 0.3300 0.0002
H -5.1188 0.9908 0.8787
H -5.1188 0.9907 -0.8783
C -6.5104 -0.4128 0.0002
H -6.5588 -1.0738 -0.8780
H -6.5589 -1.0737 0.8785
C -7.7291 0.5190 0.0001
H -7.6813 1.1798 0.8785
```

```

H -7.6811 1.1798 -0.8784
C -9.0703 -0.2262 0.0000
H -9.1178 -0.8872 -0.8783
H -9.1179 -0.8871 0.8784
C -10.2903 0.7037 -0.0001
H -10.2442 1.3649 0.8783
H -10.2440 1.3648 -0.8786
C -11.6311 -0.0420 -0.0002
H -11.6776 -0.7022 -0.8781
H -11.6778 -0.7021 0.8778
C -12.8441 0.8939 -0.0004
H -13.7850 0.3317 -0.0004
H -12.8437 1.5428 -0.8850
H -12.8439 1.5429 0.8841

```

D.2b Arquivo de Entrada: Cálculo de Freqüências após a Otimização do Laurdan com o Gaussian03

```

%NProcShared=4
%Chk=laurdanblcis
#B3LYP/6-31G* Freq

```

Laurdan B3LYP otimizacao da geometria

```

0 1
H 2.268335 -0.740304 -0.073342
C 3.017716 0.046320 -0.048721
C 2.642297 1.380341 -0.020355
C 1.217523 1.828038 -0.017411
O 0.939916 3.020372 0.017875
C 0.110188 0.775384 -0.063360
H 0.230766 0.187492 -0.985767
H 0.265901 0.062054 0.758829
C -1.298121 1.369416 0.008891
H -1.400176 1.937264 0.942231
H -1.420999 2.102483 -0.797468
C -2.397567 0.303908 -0.077891
C 3.659645 2.378678 0.010577
H 3.345353 3.416871 0.032117
C 4.987328 2.037013 0.013469
H 5.751558 2.810702 0.036925
C 5.397446 0.671016 -0.013871
C 6.758071 0.293675 -0.004540
H 7.498525 1.084391 0.029786
C 7.149411 -1.048117 -0.034222
C 6.118548 -2.044943 -0.056194
H 6.382150 -3.095605 -0.066822
C 4.792304 -1.694374 -0.064246
H 4.033301 -2.473439 -0.081683
C 4.379292 -0.336070 -0.045158
N 8.482994 -1.421302 -0.049609
C 9.506627 -0.401166 0.096125
H 10.491301 -0.865855 0.020171
H 9.445186 0.124436 1.062133
H 9.428527 0.348013 -0.701370
H 9.944016 -2.898952 0.083758
C 8.856636 -2.815509 0.126479
H 8.447582 -3.443735 -0.674213
H 8.520557 -3.227999 1.090295
H -2.301698 -0.245005 -1.027070
H -2.251727 -0.442358 0.717960
C -3.814245 0.883020 0.030320
H -3.913796 1.417773 0.986430
H -3.958017 1.639359 -0.755360

```

```

C -4.918894 -0.176057 -0.076247
H -4.828440 -0.698869 -1.040202
H -4.764081 -0.941887 0.698625
C -6.335448 0.397819 0.057750
H -6.427685 0.912819 1.025580
H -6.488948 1.169647 -0.711133
C -7.439680 -0.660675 -0.059709
H -7.352448 -1.169482 -1.031368
H -7.280814 -1.437276 0.703431
C -8.856239 -0.090097 0.087590
H -8.944392 0.414932 1.061114
H -9.014421 0.689370 -0.672684
C -9.960219 -1.148016 -0.035117
H -9.874563 -1.651666 -1.009739
H -9.801610 -1.929209 0.723556
C -11.376955 -0.579049 0.115928
H -11.463120 -0.076588 1.089975
H -11.536289 0.200859 -0.642368
C -12.472808 -1.642592 -0.007914
H -13.471373 -1.204664 0.103985
H -12.361308 -2.417925 0.760266
H -12.434567 -2.139285 -0.985368

```

D.2c Arquivo de Entrada: Cálculo das Cargas Atômicas do Laurdan em vácuo com o Gaussian03

```

%NProcShared=4
%Chk=laurdanmp2cc
#MP2/cc-pVDZ Pop=ChelpG Density=Current SCF=(MaxCycles=1000)

```

Laurdan B3LYP cis calculo carga

```

0 1
H 2.268335 -0.740304 -0.073342
C 3.017716 0.046320 -0.048721
C 2.642297 1.380341 -0.020355
C 1.217523 1.828038 -0.017411
O 0.939916 3.020372 0.017875
C 0.110188 0.775384 -0.063360
H 0.230766 0.187492 -0.985767
H 0.265901 0.062054 0.758829
C -1.298121 1.369416 0.008891
H -1.400176 1.937264 0.942231
H -1.420999 2.102483 -0.797468
C -2.397567 0.303908 -0.077891
C 3.659645 2.378678 0.010577
H 3.345353 3.416871 0.032117
C 4.987328 2.037013 0.013469
H 5.751558 2.810702 0.036925
C 5.397446 0.671016 -0.013871
C 6.758071 0.293675 -0.004540
H 7.498525 1.084391 0.029786
C 7.149411 -1.048117 -0.034222
C 6.118548 -2.044943 -0.056194
H 6.382150 -3.095605 -0.066822
C 4.792304 -1.694374 -0.064246
H 4.033301 -2.473439 -0.081683
C 4.379292 -0.336070 -0.045158
N 8.482994 -1.421302 -0.049609
C 9.506627 -0.401166 0.096125
H 10.491301 -0.865855 0.020171
H 9.445186 0.124436 1.062133
H 9.428527 0.348013 -0.701370
H 9.944016 -2.898952 0.083758

```



```

C   8.856636 -2.815509  0.126479
H   8.447582 -3.443735 -0.674213
H   8.520557 -3.227999  1.090295
H  -2.301698 -0.245005 -1.027070
H  -2.251727 -0.442358  0.717960
C  -3.814245  0.883020  0.030320
H  -3.913796  1.417773  0.986430
H  -3.958017  1.639359 -0.755360
C  -4.918894 -0.176057 -0.076247
H  -4.828440 -0.698869 -1.040202
H  -4.764081 -0.941887  0.698625
C  -6.335448  0.397819  0.057750
H  -6.427685  0.912819  1.025580
H  -6.488948  1.169647 -0.711133
C  -7.439680 -0.660675 -0.059709
H  -7.352448 -1.169482 -1.031368
H  -7.280814 -1.437276  0.703431
C  -8.856239 -0.090097  0.087590
H  -8.944392  0.414932  1.061114
H  -9.014421  0.689370 -0.672684
C  -9.960219 -1.148016 -0.035117
H  -9.874563 -1.651666 -1.009739
H  -9.801610 -1.929209  0.723556
C -11.376955 -0.579049  0.115928
H -11.463120 -0.076588  1.089975
H -11.536289  0.200859 -0.642368
C -12.472808 -1.642592 -0.007914
H -13.471373 -1.204664  0.103985
H -12.361308 -2.417925  0.760266
H -12.434567 -2.139285 -0.985368

```

D.2d Arquivo de Entrada: Cálculo das Transições Eletrônicas do Laurdan em vácuo com o ZINDO

```

$TITLEI

prodan

$END

$CONTRL

  DYNAL(1)=  0 35 35  0  0 1801 140
  ONAME = form

  IPRINT = 0
  DIPOLE = 1
  SCFTYP = RHF  RUNTYP = CI  ENTTYP = COORD  UNITS = ANGS
  INTTYP = 1   IAPX = 3  NAT = 61  SCFTOL= 0.00010
  POLAR = 0   NEL = 142  MULT = 1
  ISCRF = 0   ITMAX = 50

  INTFA(1)= 1.0 1.267 0.585 1.0 1.0 1.0

$END

$DATAIN
2.268335 -0.740304 -0.073342 1
3.017716  0.046320 -0.048721 6
2.642297  1.380341 -0.020355 6
1.217523  1.828038 -0.017411 6
0.939916  3.020372  0.017875 8
0.110188  0.775384 -0.063360 6
0.230766  0.187492 -0.985767 1
0.265901  0.062054  0.758829 1

```

```

-1.298121  1.369416  0.008891  6
-1.400176  1.937264  0.942231  1
-1.420999  2.102483 -0.797468  1
-2.397567  0.303908 -0.077891  6
 3.659645  2.378678  0.010577  6
 3.345353  3.416871  0.032117  1
 4.987328  2.037013  0.013469  6
 5.751558  2.810702  0.036925  1
 5.397446  0.671016 -0.013871  6
 6.758071  0.293675 -0.004540  6
 7.498525  1.084391  0.029786  1
 7.149411 -1.048117 -0.034222  6
 6.118548 -2.044943 -0.056194  6
 6.382150 -3.095605 -0.066822  1
 4.792304 -1.694374 -0.064246  6
 4.033301 -2.473439 -0.081683  1
 4.379292 -0.336070 -0.045158  6
 8.482994 -1.421302 -0.049609  7
 9.506627 -0.401166  0.096125  6
10.491301 -0.865855  0.020171  1
 9.445186  0.124436  1.062133  1
 9.428527  0.348013 -0.701370  1
 9.944016 -2.898952  0.083758  1
 8.856636 -2.815509  0.126479  6
 8.447582 -3.443735 -0.674213  1
 8.520557 -3.227999  1.090295  1
-2.301698 -0.245005 -1.027070  1
-2.251727 -0.442358  0.717960  1
-3.814245  0.883020  0.030320  6
-3.913796  1.417773  0.986430  1
-3.958017  1.639359 -0.755360  1
-4.918894 -0.176057 -0.076247  6
-4.828440 -0.698869 -1.040202  1
-4.764081 -0.941887  0.698625  1
-6.335448  0.397819  0.057750  6
-6.427685  0.912819  1.025580  1
-6.488948  1.169647 -0.711133  1
-7.439680 -0.660675 -0.059709  6
-7.352448 -1.169482 -1.031368  1
-7.280814 -1.437276  0.703431  1
-8.856239 -0.090097  0.087590  6
-8.944392  0.414932  1.061114  1
-9.014421  0.689370 -0.672684  1
-9.960219 -1.148016 -0.035117  6
-9.874563 -1.651666 -1.009739  1
-9.801610 -1.929209  0.723556  1
-11.376955 -0.579049  0.115928  6
-11.463120 -0.076588  1.089975  1
-11.536289  0.200859 -0.642368  1
-12.472808 -1.642592 -0.007914  6
-13.471373 -1.204664  0.103985  1
-12.361308 -2.417925  0.760266  1
-12.434567 -2.139285 -0.985368  1
$END
$CIINPU
 2  1 50  1  0  0  0  1  1  2 50
-60000.00 0.000000
 0
0001 71 71
0021 30 71 72 112
$END

```

D.3 Arquivos de Entrada: Simulações Computacionais com MC, programa DICE.

D.3a Prodan em Água

1)*.txt

```
*
2
34 prodan B3LYP (Carga HF/6-31G*)
1 1 -0.009650 0.013758 0.050865 0.164823 0.030 2.420
2 6 1.076369 -0.006635 0.017744 -0.220622 0.070 3.550
2 6 1.807089 1.171340 0.015828 -0.157239 0.070 3.550
3 6 1.176176 2.523822 0.057457 0.600799 0.076 3.550
4 8 1.867423 3.534645 0.054914 -0.761039 0.170 3.070
3 6 -0.348294 2.630864 0.103645 0.162147 0.066 3.500
5 1 -0.760720 2.104699 -0.768825 -0.011380 0.030 2.500
5 1 -0.710111 2.074129 0.979572 -0.009550 0.030 2.500
3 6 -0.842990 4.075805 0.143289 -0.138296 0.066 3.500
5 1 -1.937425 4.105980 0.175982 0.049995 0.030 2.500
5 1 -0.506255 4.629468 -0.737964 0.018193 0.030 2.500
5 1 -0.454473 4.598895 1.021889 0.030497 0.030 2.500
2 6 3.230111 1.095558 -0.027327 0.019432 0.070 3.550
1 1 3.783784 2.028581 -0.027706 0.097257 0.030 2.420
2 6 3.874084 -0.114014 -0.067079 -0.356469 0.070 3.550
1 1 4.960587 -0.154636 -0.099868 0.162586 0.030 2.420
2 6 3.143291 -1.339146 -0.067440 0.322538 0.070 3.550
2 6 3.783443 -2.597109 -0.104994 -0.608443 0.070 3.550
1 1 4.866887 -2.608444 -0.128998 0.245370 0.030 2.420
2 6 3.057674 -3.791979 -0.108857 0.429947 0.070 3.550
2 6 1.627064 -3.705360 -0.055306 -0.274150 0.070 3.550
1 1 1.030395 -4.609422 -0.045030 0.171439 0.030 2.420
2 6 0.990494 -2.490877 -0.016844 -0.209243 0.070 3.550
1 1 -0.096130 -2.457818 0.022361 0.168243 0.030 2.420
2 6 1.713211 -1.268690 -0.022847 0.104837 0.070 3.550
6 7 3.681123 -5.026801 -0.168993 -0.290762 0.170 3.250
7 6 2.913741 -6.246537 0.024653 0.034052 0.066 3.500
8 1 3.583884 -7.103933 -0.058142 0.071857 0.030 2.500
8 1 2.425238 -6.289816 1.010238 0.026152 0.030 2.500
8 1 2.139552 -6.359452 -0.744305 0.012355 0.030 2.500
7 6 5.130593 -5.093724 -0.103129 0.068814 0.066 3.500
8 1 5.447664 -6.133951 -0.196118 0.064607 0.030 2.500
8 1 5.528917 -4.693632 0.842517 -0.004360 0.030 2.500
8 1 5.586973 -4.530290 -0.926511 0.015610 0.030 2.500
3 SPC SPC/E (JPC,91,6269 (1987))
1 8 0.0000 0.0000 0.0000 -0.8476 0.1550 3.1650
2 1 0.5774 0.8165 0.0000 0.4238 0.0000 0.0000
2 1 0.5774 -0.8165 0.0000 0.4238 0.0000 0.0000
```

D.3b Prodan em Acetonitrila

1)*.txt

```
*
2
34 prodan B3LYP (Carga polarizadas #MP2/aug-cc-pVDZ) solvente acetonitrila
1 1 -0.009650 0.013758 0.050865 0.176897 0.030 2.420
2 6 1.076369 -0.006635 0.017744 -0.269160 0.070 3.550
2 6 1.807089 1.171340 0.015828 -0.089184 0.070 3.550
3 6 1.176176 2.523822 0.057457 0.474190 0.076 3.550
4 8 1.867423 3.534645 0.054914 -0.590224 0.170 3.070
3 6 -0.348294 2.630864 0.103645 0.191226 0.066 3.500
5 1 -0.760720 2.104699 -0.768825 -0.023333 0.030 2.500
5 1 -0.710111 2.074129 0.979572 -0.023583 0.030 2.500
```

3	6	-0.842990	4.075805	0.143289	-0.160032	0.066	3.500
5	1	-1.937425	4.105980	0.175982	0.039067	0.030	2.500
5	1	-0.506255	4.629468	-0.737964	0.032650	0.030	2.500
5	1	-0.454473	4.598895	1.021889	0.030868	0.030	2.500
2	6	3.230111	1.095558	-0.027327	-0.010320	0.070	3.550
1	1	3.783784	2.028581	-0.027706	0.099700	0.030	2.420
2	6	3.874084	-0.114014	-0.067079	-0.340236	0.070	3.550
1	1	4.960587	-0.154636	-0.099868	0.149843	0.030	2.420
2	6	3.143291	-1.339146	-0.067440	0.302642	0.070	3.550
2	6	3.783443	-2.597109	-0.104994	-0.582878	0.070	3.550
1	1	4.866887	-2.608444	-0.128998	0.240780	0.030	2.420
2	6	3.057674	-3.791979	-0.108857	0.426337	0.070	3.550
2	6	1.627064	-3.705360	-0.055306	-0.286714	0.070	3.550
1	1	1.030395	-4.609422	-0.045030	0.174090	0.030	2.420
2	6	0.990494	-2.490877	-0.016844	-0.214675	0.070	3.550
1	1	-0.096130	-2.457818	0.022361	0.164214	0.030	2.420
2	6	1.713211	-1.268690	-0.022847	0.118391	0.070	3.550
6	7	3.681123	-5.026801	-0.168993	-0.328083	0.170	3.250
7	6	2.913741	-6.246537	0.024653	0.053833	0.066	3.500
8	1	3.583884	-7.103933	-0.058142	0.065982	0.030	2.500
8	1	2.425238	-6.289816	1.010238	0.020546	0.030	2.500
8	1	2.139552	-6.359452	-0.744305	0.010680	0.030	2.500
7	6	5.130593	-5.093724	-0.103129	0.096143	0.066	3.500
8	1	5.447664	-6.133951	-0.196118	0.056587	0.030	2.500
8	1	5.528917	-4.693632	0.842517	0.000602	0.030	2.500
8	1	5.586973	-4.530290	-0.926511	-0.006842	0.030	2.500
6 (acetonitrile madden model Bohm, McDonen, Mol. Phys. 1983, 49, 347.)							
1	6	-1.364478	-1.245037	-0.813752	0.488	0.0998	3.4
2	7	-0.445246	-0.926603	-0.163741	-0.514	0.0998	3.3
3	6	-2.511552	-1.642399	-1.624877	-0.577	0.0998	3.0
4	1	-2.403100	-1.250547	-2.632974	0.201	0.0200	2.2
4	1	-2.573568	-2.726742	-1.668730	0.201	0.0200	2.2
4	1	-3.425855	-1.250548	-1.186617	0.201	0.0200	2.2

D.3c Prodan em Diclorometano

1)*.txt

*

2

34 prodan B3LYP (Carga HF/6-31G*) solvente diclorometano

1	1	-0.009650	0.013758	0.050865	0.160851	0.030	2.420
2	6	1.076369	-0.006635	0.017744	-0.257072	0.070	3.550
2	6	1.807089	1.171340	0.015828	-0.092666	0.070	3.550
3	6	1.176176	2.523822	0.057457	0.494849	0.076	3.550
4	8	1.867423	3.534645	0.054914	-0.603678	0.170	3.070
3	6	-0.348294	2.630864	0.103645	0.182786	0.066	3.500
5	1	-0.760720	2.104699	-0.768825	-0.024033	0.030	2.500
5	1	-0.710111	2.074129	0.979572	-0.025295	0.030	2.500
3	6	-0.842990	4.075805	0.143289	-0.149474	0.066	3.500
5	1	-1.937425	4.105980	0.175982	0.035872	0.030	2.500
5	1	-0.506255	4.629468	-0.737964	0.033034	0.030	2.500
5	1	-0.454473	4.598895	1.021889	0.029164	0.030	2.500
2	6	3.230111	1.095558	-0.027327	0.000420	0.070	3.550
1	1	3.783784	2.028581	-0.027706	0.102255	0.030	2.420
2	6	3.874084	-0.114014	-0.067079	-0.340104	0.070	3.550
1	1	4.960587	-0.154636	-0.099868	0.146965	0.030	2.420
2	6	3.143291	-1.339146	-0.067440	0.296897	0.070	3.550
2	6	3.783443	-2.597109	-0.104994	-0.565646	0.070	3.550
1	1	4.866887	-2.608444	-0.128998	0.229420	0.030	2.420
2	6	3.057674	-3.791979	-0.108857	0.414840	0.070	3.550
2	6	1.627064	-3.705360	-0.055306	-0.272713	0.070	3.550
1	1	1.030395	-4.609422	-0.045030	0.163164	0.030	2.420
2	6	0.990494	-2.490877	-0.016844	-0.206070	0.070	3.550
1	1	-0.096130	-2.457818	0.022361	0.156259	0.030	2.420

```

2 6 1.713211 -1.268690 -0.022847 0.116459 0.070 3.550
6 7 3.681123 -5.026801 -0.168993 -0.307041 0.170 3.250
7 6 2.913741 -6.246537 0.024653 0.055900 0.066 3.500
8 1 3.583884 -7.103933 -0.058142 0.060350 0.030 2.500
8 1 2.425238 -6.289816 1.010238 0.019050 0.030 2.500
8 1 2.139552 -6.359452 -0.744305 0.004897 0.030 2.500
7 6 5.130593 -5.093724 -0.103129 0.089501 0.066 3.500
8 1 5.447664 -6.133951 -0.196118 0.054225 0.030 2.500
8 1 5.528917 -4.693632 0.842517 0.007674 0.030 2.500
8 1 5.586973 -4.530290 -0.926511 -0.011041 0.030 2.500
5
1 6 12.389501 -10.715666 0.000229 -0.053601 0.080 3.800
2 17 13.862818 -9.731098 0.259592 -0.132333 0.300 3.470
2 17 10.914971 -9.733156 -0.259814 -0.132313 0.300 3.470
3 1 12.545963 -11.327150 -0.885244 0.159124 0.000 0.000
3 1 12.233847 -11.326730 0.886138 0.159124 0.000 0.000
Send

```

D.3c Prodan em Ciclohexano

1)*.txt

```

*
2
34 prodan B3LYP (Carga HF/6-31G*) solvente ciclohexano
1 1 -0.009650 0.013758 0.050865 0.150875 0.030 2.420
2 6 1.076369 -0.006635 0.017744 -0.271668 0.070 3.550
2 6 1.807089 1.171340 0.015828 -0.064949 0.070 3.550
3 6 1.176176 2.523822 0.057457 0.455988 0.076 3.550
4 8 1.867423 3.534645 0.054914 -0.536857 0.170 3.070
3 6 -0.348294 2.630864 0.103645 0.188558 0.066 3.500
5 1 -0.760720 2.104699 -0.768825 -0.035026 0.030 2.500
5 1 -0.710111 2.074129 0.979572 -0.035943 0.030 2.500
3 6 -0.842990 4.075805 0.143289 -0.160231 0.066 3.500
5 1 -1.937425 4.105980 0.175982 0.025710 0.030 2.500
5 1 -0.506255 4.629468 -0.737964 0.041422 0.030 2.500
5 1 -0.454473 4.598895 1.021889 0.040708 0.030 2.500
2 6 3.230111 1.095558 -0.027327 -0.008496 0.070 3.550
1 1 3.783784 2.028581 -0.027706 0.108967 0.030 2.420
2 6 3.874084 -0.114014 -0.067079 -0.321855 0.070 3.550
1 1 4.960587 -0.154636 -0.099868 0.138974 0.030 2.420
2 6 3.143291 -1.339146 -0.067440 0.294283 0.070 3.550
2 6 3.783443 -2.597109 -0.104994 -0.539359 0.070 3.550
1 1 4.866887 -2.608444 -0.128998 0.219875 0.030 2.420
2 6 3.057674 -3.791979 -0.108857 0.394969 0.070 3.550
2 6 1.627064 -3.705360 -0.055306 -0.268571 0.070 3.550
1 1 1.030395 -4.609422 -0.045030 0.152964 0.030 2.420
2 6 0.990494 -2.490877 -0.016844 -0.203615 0.070 3.550
1 1 -0.096130 -2.457818 0.022361 0.145632 0.030 2.420
2 6 1.713211 -1.268690 -0.022847 0.126932 0.070 3.550
6 7 3.681123 -5.026801 -0.168993 -0.283715 0.170 3.250
7 6 2.913741 -6.246537 0.024653 0.045684 0.066 3.500
8 1 3.583884 -7.103933 -0.058142 0.054769 0.030 2.500
8 1 2.425238 -6.289816 1.010238 0.014594 0.030 2.500
8 1 2.139552 -6.359452 -0.744305 0.006812 0.030 2.500
7 6 5.130593 -5.093724 -0.103129 0.068946 0.066 3.500
8 1 5.447664 -6.133951 -0.196118 0.050783 0.030 2.500
8 1 5.528917 -4.693632 0.842517 0.004734 0.030 2.500
8 1 5.586973 -4.530290 -0.926511 -0.001895 0.030 2.500
18 Tese Kaline (xyz) e Jacs (1996) 118 11225 para os outros parametros
1 6 0.7650 0.0000 1.2685 -0.120 0.066 3.500
1 6 -0.7650 0.0000 1.2685 -0.120 0.066 3.500
1 6 -1.3381 -0.6352 0.0000 -0.120 0.066 3.500
1 6 -0.7650 0.0000 -1.2685 -0.120 0.066 3.500
1 6 0.7650 0.0000 -1.2685 -0.120 0.066 3.500

```

1	6	1.3381	0.6352	0.0000	-0.120	0.066	3.500
2	1	1.1127	-1.0291	1.3296	0.060	0.030	2.500
2	1	1.1127	0.5675	2.1291	0.060	0.030	2.500
2	1	-1.1127	-0.5675	2.1291	0.060	0.030	2.500
2	1	-1.1127	1.0291	1.3296	0.060	0.030	2.500
2	1	-1.0918	-1.6949	0.0000	0.060	0.030	2.500
2	1	-2.4175	-0.4987	0.0000	0.060	0.030	2.500
2	1	-1.1127	1.0291	-1.3296	0.060	0.030	2.500
2	1	-1.1127	-0.5675	-2.1291	0.060	0.030	2.500
2	1	1.1127	-1.0291	-1.3296	0.060	0.030	2.500
2	1	1.1127	0.5675	-2.1291	0.060	0.030	2.500
2	1	1.0918	1.6949	0.0000	0.060	0.030	2.500
2	1	2.4175	0.4987	0.0000	0.060	0.030	2.500

D.a Arquivos de Entrada: Simulações Computacionais com MD, programa

Tinker.

D.3a Prodan em Água

1)*.key

```
# Output Control
VERBOSE
```

```
# Force Field Selection
PARAMETERS none
```

```
CHARGETERM
VDWTERM
ANGLETERM
BONDTERM
TORSIONTERM
```

```
# Van Der Waals Functional Form
EPSILONRULE GEOMETRIC
RADIUSRULE GEOMETRIC
RADIUSIZE DIAMETER
RADIUSTYPE SIGMA
VDWTYPE LENNARD-JONES
VDW-14-SCALE 2.0 #OPLSAA
CHG-14-SCALE 2.0 #OPLSAA
TORSIONUNIT 0.5 #OPLSAA
```

```
# Electrostatics Functional Form
DIELECTRIC 1.0
```

```
# Dynamics
INTEGRATE VERLET
TAU-TEMPERATURE 0.1
THERMOSTAT BERENDSEN
```

```
# Random Number
RANDOMSEED 12345789
```

```
# Constraint And Restraint
#RATTLE
```

```
# Molecula 1 - natom = 34
ATOM 1 HA "H1 mol1" 1 1.008 1
ATOM 2 CA "C2 mol1" 6 12.000 3
ATOM 3 CA "C3 mol1" 6 12.000 3
ATOM 4 C "C4 mol1" 6 12.000 3
ATOM 5 O "O5 mol1" 8 15.999 1
ATOM 6 CT "C6 mol1" 6 12.000 4
```

ATOM	7	HC	"H7 mol1"	1	1.008	1
ATOM	8	HC	"H8 mol1"	1	1.008	1
ATOM	9	CT	"C9 mol1"	6	12.000	4
ATOM	10	HC	"H10 mol1"	1	1.008	1
ATOM	11	HC	"H11 mol1"	1	1.008	1
ATOM	12	HC	"H12 mol1"	1	1.008	1
ATOM	13	CA	"C13 mol1"	6	12.000	3
ATOM	14	HA	"H14 mol1"	1	1.008	1
ATOM	15	CA	"C15 mol1"	6	12.000	3
ATOM	16	HA	"H16 mol1"	1	1.008	1
ATOM	17	CA	"C17 mol1"	6	12.000	3
ATOM	18	CA	"C18 mol1"	6	12.000	3
ATOM	19	HA	"H19 mol1"	1	1.008	1
ATOM	20	CA	"C20 mol1"	6	12.000	3
ATOM	21	CA	"C21 mol1"	6	12.000	3
ATOM	22	HA	"H22 mol1"	1	1.008	1
ATOM	23	CA	"C23 mol1"	6	12.000	3
ATOM	24	HA	"H24 mol1"	1	1.008	1
ATOM	25	CA	"C25 mol1"	6	12.000	3
ATOM	26	NT	"N26 mol1"	7	14.007	3
ATOM	27	CT	"C27 mol1"	6	12.000	4
ATOM	28	HC	"H28 mol1"	1	1.008	1
ATOM	29	HC	"H29 mol1"	1	1.008	1
ATOM	30	HC	"H30 mol1"	1	1.008	1
ATOM	31	CT	"C31 mol1"	6	12.000	4
ATOM	32	HC	"H32 mol1"	1	1.008	1
ATOM	33	HC	"H33 mol1"	1	1.008	1
ATOM	34	HC	"H34 mol1"	1	1.008	1

#tiradas do gaussian mp2 depois da polarizacao#

CHARGE	1	0.164747
CHARGE	2	-0.218074
CHARGE	3	-0.156721
CHARGE	4	0.608913
CHARGE	5	-0.758924
CHARGE	6	0.169131
CHARGE	7	-0.021176
CHARGE	8	-0.004908
CHARGE	9	-0.145982
CHARGE	10	0.044511
CHARGE	11	0.027014
CHARGE	12	0.030560
CHARGE	13	0.025228
CHARGE	14	0.091559
CHARGE	15	-0.361936
CHARGE	16	0.162070
CHARGE	17	0.311463
CHARGE	18	-0.596102
CHARGE	19	0.247810
CHARGE	20	0.428312
CHARGE	21	-0.283871
CHARGE	22	0.174285
CHARGE	23	-0.213300
CHARGE	24	0.168912
CHARGE	25	0.100478
CHARGE	26	-0.302650
CHARGE	27	0.045009
CHARGE	28	0.071841
CHARGE	29	0.025214
CHARGE	30	0.011958
CHARGE	31	0.083492
CHARGE	32	0.063907
CHARGE	33	0.009699
CHARGE	34	-0.002469

#####

```

##                                     ##
## Van der Waals Parameters          ##
##                                     ##
#####
#usado o do oplsaal, sao os mesmos usados no dice#
VDW   1   2.420  0.030
VDW   2   3.550  0.070
VDW   3   3.550  0.070
VDW   4   3.550  0.076
VDW   5   3.070  0.170
VDW   6   3.500  0.066
VDW   7   2.500  0.030
VDW   8   2.500  0.030
VDW   9   3.500  0.066
VDW  10   2.500  0.030
VDW  11   2.500  0.030
VDW  12   2.500  0.030
VDW  13   3.550  0.070
VDW  14   2.420  0.030
VDW  15   3.550  0.070
VDW  16   2.420  0.030
VDW  17   3.550  0.070
VDW  18   3.550  0.070
VDW  19   2.420  0.030
VDW  20   3.550  0.070
VDW  21   3.550  0.070
VDW  22   2.420  0.030
VDW  23   3.550  0.070
VDW  24   2.420  0.030
VDW  25   3.550  0.070
VDW  26   3.250  0.170
VDW  27   3.500  0.066
VDW  28   2.500  0.030
VDW  29   2.500  0.030
VDW  30   2.500  0.030
VDW  31   3.500  0.066
VDW  32   2.500  0.030
VDW  33   2.500  0.030
VDW  34   2.500  0.030

#####
##                                     ##
## Bond Stretching Parameters        ##
##                                     ##
#####
#cada constate de forza tem a sua descricao, a distancia da ligacao foi usada da saida do gaussian pos-otimizacao#
BOND   1   2   367.00  1.0867      #usei do oplsaal.prm 5 6#
BOND   2   3   469.00  1.3862      #usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND   2  25   469.00  1.4142      #usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND   3   4   317.00  1.4930      #usei do oplsaal.prm 1 5, mas deveria ser 5 21#
BOND   3  13   469.00  1.4257      #usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND   4   5   570.00  1.2246      #usei do oplsaal.prm 21 22#
BOND   4   6   317.00  1.5289      #usei do oplsaal.prm 1 21#
BOND   6   7   340.00  1.0992      #usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND   6   8   340.00  1.0991      #usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND   6   9   268.00  1.5278      #usei do oplsaal.prm 1 1#
BOND   9  10   340.00  1.0953      #usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND   9  11   340.00  1.0939      #usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND   9    12   340.00  1.0939      #usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND  13    14   367.00  1.0849      #usei do oplsaal.prm 5 6#
BOND  13    15   469.00  1.3709      #usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND  15    16   367.00  1.0878      #usei do oplsaal.prm 5 6#
BOND  15    17   469.00  1.4265      #usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND  17    18   469.00  1.4325      #usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND  17    25   469.00  1.4120      #usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND  18    19   367.00  1.0838      #usei do oplsaal.prm 5 6#
BOND  18    20   469.00  1.3980      #usei do oplsaal.prm 5 5#

```


BOND	20	21	469.00	1.4342	#usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND	20	26	337.00	1.3846	#usei do oplsaal.prm 1 32#
BOND	21	22	367.00	1.0833	#usei do oplsaal.prm 5 6#
BOND	21	23	469.00	1.3717	#usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND	23	24	367.00	1.0878	#usei do oplsaal.prm 5 6#
BOND	23	25	469.00	1.4199	#usei do oplsaal.prm 5 5#
BOND	26	27	337.00	1.4540	#usei do oplsaal.prm 1 32#
BOND	26	31	337.00	1.4525	#usei do oplsaal.prm 1 32#
BOND	27	28	340.00	1.0914	#usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND	27	29	340.00	1.1009	#usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND	27	30	340.00	1.0970	#usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND	31	32	340.00	1.0914	#usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND	31	33	340.00	1.1014	#usei do oplsaal.prm 1 2#
BOND	31	34	340.00	1.0971	#usei do oplsaal.prm 1 2#

```
#####
##                                     ##
##   Angle bending Parameters         ##
##                                     ##
#####
```

#as constantes que não tinham equivalência direta, estão descritas. Os ângulos foram usados da saída do gaussian pos-otimizacao#

ANGLE	1	2	3	35.00	117.88	
ANGLE	1	2	25	35.00	120.72	
ANGLE	2	25	17	63.00	122.60	
ANGLE	2	25	23	63.00	123.16	
ANGLE	2	3	4	70.00	118.75	# (opls : 5-5-1) #
ANGLE	2	3	13	63.00	119.62	
ANGLE	3	13	14	35.00	117.62	
ANGLE	3	13	15	63.00	121.10	
ANGLE	3	4	5	80.00	120.60	# (opls : 1-21-22) #
ANGLE	3	4	6	63.00	119.05	# (opls : 1-1-5) #
ANGLE	3	2	25	63.00	121.39	
ANGLE	4	3	13	70.00	108.45	# (opls : 5-5-1) #
ANGLE	4	6	7	37.50	108.47	# (opls : 1-1-2) #
ANGLE	4	6	8	37.50	112.94	# (opls : 1-1-2) #
ANGLE	4	6	9	58.35	118.08	# (opls : 1-1-1) #
ANGLE	5	4	6	80.00	120.33	# (opls : 1-21-22) #
ANGLE	6	9	10	37.50	110.98	
ANGLE	6	9	11	37.50	110.98	
ANGLE	6	9	12	37.50	110.50	
ANGLE	7	6	8	33.00	110.59	
ANGLE	7	6	9	37.50	105.46	
ANGLE	8	6	9	37.50	110.59	
ANGLE	10	9	11	33.00	108.52	
ANGLE	10	9	12	33.00	108.52	
ANGLE	11	9	12	33.00	107.19	
ANGLE	13	15	16	35.00	121.13	
ANGLE	13	15	17	63.00	120.20	
ANGLE	14	13	15	35.00	121.26	
ANGLE	15	17	18	63.00	117.97	
ANGLE	15	17	25	63.00	122.20	
ANGLE	16	15	17	35.00	118.65	
ANGLE	17	18	19	35.00	121.74	
ANGLE	17	18	20	63.00	117.77	
ANGLE	17	25	23	63.00	117.58	
ANGLE	18	17	25	63.00	117.78	
ANGLE	18	20	21	63.00	121.91	
ANGLE	18	20	26	80.00	119.81	#(opls : 1 1 23/ C-C-N)#
ANGLE	19	18	20	35.00	120.66	
ANGLE	20	21	22	35.00	119.95	
ANGLE	20	21	23	63.00	121.15	
ANGLE	20	26	27	50.00	120.31	#(opls : 1 23 1/ C-N-CH3)#
ANGLE	20	26	31	50.00	119.23	#(opls : 1 23 1/ C-N-CH3)#

```

ANGLE 21      20      26      80.00      119.43 #(opls : 1 1 23/ C-C-N)#
ANGLE 21      23      24      35.00      121.71
ANGLE 21      23      25      63.00      120.30
ANGLE 22      21      23      35.00      118.88
ANGLE 24      23      25      35.00      118.84
ANGLE 26      27      28      35.00      112.73 #(opls : 2 1 23/ H-C-N)#
ANGLE 26      27      29      35.00      111.43 #(opls : 2 1 23/ H-C-N)#
ANGLE 26      27      30      35.00      109.26 #(opls : 2 1 23/ H-C-N)#
ANGLE 26      31      32      35.00      112.52 #(opls : 2 1 23/ H-C-N)#
ANGLE 26      31      33      35.00      110.94 #(opls : 2 1 23/ H-C-N)#
ANGLE 26      31      34      35.00      108.95 #(opls : 2 1 23/ H-C-N)#
ANGLE 27      26      31      50.00      118.81 #(opls : 1 23 1/ C-N-C)#
ANGLE 28      27      29      33.00      107.41
ANGLE 28      27      30      33.00      108.02
ANGLE 29      27      30      33.00      108.08
ANGLE 32      31      33      33.00      107.73
ANGLE 32      31      34      33.00      108.31
ANGLE 33      31      34      33.00      107.90

```

```

#####
##                                     ##
## Improper Torsional Parameters      ##
##                                     ##
#####

```

```

IMPTORS 1 2 25 3 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 2 25 17 23 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 4 3 2 13 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 14 13 3 15 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 15 17 18 25 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 16 15 13 17 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 19 18 17 20 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 22 21 20 23 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 23 25 17 2 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3
IMPTORS 26 20 21 18 0.0 0.0 1 2.200 180.0 2 0.0 0.0 3

```

```

#####
##                                     ##
## Torsional Parameters              ##
##                                     ##
#####

```

```

TORSION 1 2 3 4 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 1 2 3 13 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 1 2 25 17 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 1 2 25 23 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 2 3 4 5 1.141 0.0 1 10.331 180.0 2 0.0 0.0 3 #ajustado#
TORSION 2 3 4 6 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 1 1 5#
TORSION 2 3 13 14 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 2 3 13 15 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 3 2 25 17 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 3 2 25 23 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 3 4 6 7 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.366 0.0 3 #usei do polsaal.prm 1 1 1 2#
TORSION 3 4 6 8 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.366 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 1 1 2#
TORSION 3 4 6 9 1.740 0.0 1 -0.157 180.0 2 0.279 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 1 1 1
TORSION 3 13 15 17 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 3 13 15 16 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 4 3 13 14 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 5 5 6#
TORSION 4 3 13 15 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 5 5 5#
TORSION 4 6 9 10 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.366 0.0 3 #usei do polsaal.prm 1 1 1 2#
TORSION 4 6 9 11 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.366 0.0 3 #usei do polsaal.prm 1 1 1 2#
TORSION 4 6 9 12 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.366 0.0 3 #usei do polsaal.prm 1 1 1 2#
TORSION 5 4 6 7 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 21 22#
TORSION 5 4 6 8 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 21 22#
TORSION 5 4 6 9 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 1 21 22#

```

```

TORSION 7 6 9 10 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.318 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 1 2#
TORSION 7 6 9 11 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.318 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 1 2#
TORSION 7 6 9 12 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.318 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 1 2#
TORSION 8 6 9 10 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.318 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 1 2#
TORSION 8 6 9 11 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.318 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 1 2#
TORSION 8 6 9 12 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.318 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 2 1 1 2#
TORSION 13 3 4 5 1.141 0.0 1 10.331 180.0 2 0.0 0.0 3 #ajustado#
TORSION 13 3 4 6 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 1 5 5#
TORSION 13 15 17 18 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 13 15 17 25 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 14 13 15 16 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 6 5 5 6#
TORSION 14 13 15 17 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 15 17 18 19 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 15 17 18 20 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 15 17 25 2 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 15 17 25 23 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 16 15 17 18 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 16 15 17 25 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 17 18 20 21 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 17 18 20 26 2.392 0.0 1 -0.674 180.0 2 0.550 0.0 3 #usei do opsl.txt 033 CT-CT-CT-NT
amine all-atom#
TORSION 18 17 25 2 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 18 20 26 27 1.473 0.0 1 17.406 180.0 2 1.293 0.0 3 #ajustado#
TORSION 18 17 25 23 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 18 20 21 22 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 18 20 21 23 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 18 20 26 31 1.473 0.0 1 17.406 180.0 2 1.293 0.0 3 #ajustado#
TORSION 19 18 20 21 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 19 18 20 26 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 064 N-C-C-H
amide opsl.pdf#
TORSION 20 21 23 25 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 20 21 23 24 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 20 26 27 28 -0.954 0.0 1 3.861 180.0 2 -10.395 0.0 3 #ajustado#
TORSION 20 26 27 29 -0.954 0.0 1 3.861 180.0 2 -10.395 0.0 3 #ajustado#
TORSION 20 26 27 30 -0.954 0.0 1 3.861 180.0 2 -10.395 0.0 3 #ajustado#
TORSION 20 26 31 32 -0.954 0.0 1 3.861 180.0 2 -10.395 0.0 3 #ajustado#
TORSION 20 26 31 33 -0.954 0.0 1 3.861 180.0 2 -10.395 0.0 3 #ajustado#
TORSION 20 26 31 34 -0.954 0.0 1 3.861 180.0 2 -10.395 0.0 3 #ajustado#
TORSION 21 20 26 27 1.473 0.0 1 17.406 180.0 2 1.293 0.0 3 #ajustado#
TORSION 21 20 26 31 1.473 0.0 1 17.406 180.0 2 1.293 0.0 3 #ajustado#
TORSION 21 23 25 2 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 21 23 25 17 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 22 21 23 24 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 6 5 5 6#
TORSION 22 21 23 25 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 24 23 25 17 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 24 23 25 2 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 25 17 18 19 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 6#
TORSION 25 17 18 20 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 25 2 3 4 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 1 5 5 5#
TORSION 25 2 3 13 0.0 0.0 1 7.250 180.0 2 0.0 0.0 3 #usei do oplsaal.prm 5 5 5 5#
TORSION 26 20 21 22 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 064 N-C-C-H
amide opsl.pdf#
TORSION 26 20 21 23 2.392 0.0 1 -0.674 180.0 2 0.550 0.0 3 #usei do opsl.txt 033 CT-CT-CT-NT
amine all-atom#
TORSION 27 26 31 32 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 048 CT-N-CT-H
tert. amide#
TORSION 27 26 31 33 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 048 CT-N-CT-H
tert. amide#
TORSION 27 26 31 34 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 048 CT-N-CT-H
tert. amide#
TORSION 31 26 27 28 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 048 CT-N-CT-H
tert. amide#
TORSION 31 26 27 29 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 048 CT-N-CT-H
tert. amide#
TORSION 31 26 27 30 0.0 0.0 1 0.0 180.0 2 0.464 0.0 3 #usei do opsl.txt 048 CT-N-CT-H
tert. amide#

```

#water SPC/E, only change the charges from SPC#

```

ATOM 106 O "O106 mol2" 8 15.999 107 107
ATOM 107 H "H107 mol2" 1 1.008 106
ATOM 107 H "H107 mol2" 1 1.008 106
CHARGE 106 -0.847600
CHARGE 107 0.423800
CHARGE 107 0.423800
VDW 106 3.165555296 0.155406042
VDW 107 0.000 0.000
VDW 107 0.000 0.000
BOND 106 107 527.2 1.0000
BOND 106 107 527.2 1.0000
ANGLE 107 106 107 57.95 109.4665
# Crystal Lattice And Periodic Boundary
A-AXIS 30.427000
B-AXIS 36.427100
C-AXIS 26.427000

```

I).xyz*

```

3034
1 HA -0.67251 2.31634 0.37498 1 2
2 CA -0.33396 1.31694 0.63476 2 1 3 25
3 CA -0.09809 0.97021 1.95598 3 2 4 13
4 C -0.28516 1.91740 3.09477 4 3 5 6
5 O -0.06376 1.56087 4.24513 5 4
6 CT -0.75830 3.34215 2.80535 6 4 7 8 9
7 HC -0.05064 3.80846 2.10552 7 6
8 HC -1.71345 3.28872 2.26416 8 6
9 CT -0.90274 4.18971 4.06806 9 6 10 11 12
10 HC -1.24312 5.19981 3.81560 10 9
11 HC 0.05027 4.26692 4.59948 11 9
12 HC -1.62321 3.74304 4.75946 12 9
13 CA 0.34414 -0.35300 2.24931 13 3 14 15
14 HA 0.52280 -0.60476 3.28939 14 13
15 CA 0.53641 -1.27302 1.25134 15 13 16 17
16 HA 0.87435 -2.27859 1.49188 16 15
17 CA 0.30164 -0.93873 -0.11543 17 15 18 25
18 CA 0.48961 -1.86923 -1.16063 18 17 19 20
19 HA 0.81892 -2.86621 -0.89189 19 18
20 CA 0.26033 -1.53028 -2.49737 20 18 21 26
21 CA -0.19382 -0.19977 -2.78121 21 20 22 23
22 HA -0.39339 0.09706 -3.80369 22 21
23 CA -0.38264 0.71511 -1.77672 23 21 24 25
24 HA -0.72692 1.71697 -2.02388 24 23
25 CA -0.14409 0.38914 -0.41552 25 2 17 23
26 NT 0.46575 -2.43291 -3.52690 26 20 27 31
27 CT 0.03474 -2.11488 -4.87860 27 26 28 29 30
28 HC 0.28383 -2.94978 -5.53597 28 27
29 HC -1.04951 -1.93785 -4.94880 29 27
30 HC 0.55038 -1.22728 -5.26538 30 27
31 CT 0.81114 -3.80702 -3.20736 31 26 32 33 34
32 HC 0.96593 -4.36414 -4.13302 32 31
33 HC 0.02639 -4.31485 -2.62485 33 31
34 HC 1.74278 -3.85306 -2.62977 34 31
35 O 2.93064 1.80022 -0.61181 106 36 37
36 H 2.36350 2.51204 -0.19730 107 35
37 H 2.56460 1.56460 -1.51215 107 35
38 O -2.66828 -2.12948 1.16730 106 39 40
39 H -1.82006 -1.59995 1.15349 107 38
40 H -2.52262 -2.97891 1.67453 107 38
41 O 0.97809 3.65991 -0.59534 106 42 43
42 H 0.77657 3.44041 -1.54997 107 41
43 H 0.20454 4.15206 -0.19609 107 41
44 O -3.22257 -1.05092 -2.15817 106 45 46
45 H -3.43124 -2.01493 -1.99320 107 44
46 H -2.25097 -0.88643 -1.98818 107 44
47 O 3.91281 0.89423 1.73186 106 48 49
48 H 3.76121 1.67045 2.34388 107 47

```

49	H	3.40613	1.03636	0.88153	107	47
50	O	3.40191	-2.97258	-0.29840	106	51 52
51	H	2.68173	-2.28381	-0.21481	107	50
52	H	3.80016	-2.92884	-1.21469	107	50
53	O	-4.50763	1.11073	0.07155	106	54 55
54	H	-4.02796	0.36052	-0.38362	107	53
55	H	-4.62027	0.89448	1.04137	107	53
56	O	2.88026	1.61458	-3.44134	106	57 58
57	H	2.47058	1.07856	-4.17952	107	56
58	H	2.34228	2.44457	-3.29401	107	56
59	O	0.69991	3.25497	-3.38704	106	60 61
60	H	0.19784	2.82276	-4.13616	107	59
61	H	0.49978	4.23466	-3.37326	107	59
62	O	-2.73097	-1.29140	4.19840	106	63 64
63	H	-2.43494	-0.46418	4.67595	107	62
64	H	-1.95419	-1.91262	4.09513	107	62
65	O	-3.71104	3.51181	-1.06330	106	66 67
66	H	-4.04721	2.69192	-0.59983	107	65
67	H	-3.03500	3.96816	-0.48473	107	65
68	O	-1.67464	4.99532	0.04259	106	69 70
69	H	-1.45980	5.14116	-0.92314	107	68
70	H	-1.45669	5.82222	0.56106	107	68

...

A ssim sucessivamente até completar todas as moléculas de água.

E

APÊNDICE

Lista de Artigos Publicados e Trabalhos Apresentados em Congressos

E.1 Trabalhos Publicados (Anexados)

1. Vequi-Suplicy, Cíntia C., Riske, Karin A., Knorr, Roland L., Dimova, Rumiana
Vesicles with charged domains. Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes. v.1798, p.1338 - 1347, 2010.
2. Lúcio, Aline D., Vequi-Suplicy, Cíntia C., Fernandez, Roberto M., Lamy, M. Teresa
Laurdan Spectrum Decomposition as a Tool for the Analysis of Surface Bilayer Structure and Polarity: a Study with DMPG, Peptides and Cholesterol. Journal of Fluorescence. v.20, p.473 - 482, 2009.
3. Riske, Karin A., Barroso, Rafael P., Vequi-Suplicy, C. C., Germano, Renato, Henriques, Vera B., Lamy, M. Teresa
Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes. v.1788, p.954 - 963, 2009.
4. Vequi-Suplicy, Cíntia C., Benatti, Carlos R., Lamy, M. Teresa
Laurdan in Fluid Bilayers: Position and Structural Sensitivity. Journal of Fluorescence. v.16, p.431 - 439, 2006.

E.2 Trabalhos Apresentados em Congressos

1. Vequi-Suplicy, Cíntia C., Lamy, M. Teresa, Coutinho, Kalline
Study of the Electronic Polarization of Prodan in Several Solvents Using the Sequential QM/MM Procedure
XXXIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. 2010. Águas de Lindóia.
2. Vequi-Suplicy, C. C., Coutinho, K., Lamy, M. T.
PRODAN aggregation in water: an experimental and molecular modelling study
XXXII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. 2009. Águas de Lindóia
3. Vequi-Suplicy, C. C., Coutinho, K., Lamy, M. T.
Estudo Teórico do Efeito de Solvente na Estrutura Eletrônica da Sonda Fluorescente PRODAN
XXXI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. 2008. Águas de Lindóia
4. Vequi-Suplicy, C. C., Coutinho, K., Lamy, M. T.
Membranes and Fluorescent Probes. Theoretical and Experimental Study
6th International Congress on Biological Physics. 2007. Montevideo
5. Vequi-Suplicy, C. C., Lamy, M. T., Coutinho, K.
Propriedades Estruturais e Eletrônicas de Prodan em vários Solventes: um estudo teórico e experimental
XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica. 2007. Poços de Caldas.
6. Vequi-Suplicy, C. C., Benatti, C.R., Lamy, M. T.
Laurdan in fluid bilayers: position and structural sensitivity
XXIX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. 2006. São Lourenço.
7. Vequi-Suplicy, C. C., Benatti, C.R., Lamy, M. T.
Laurdan as a fluorescent probe highly sensitive to membrane packing
Ninth International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF 9). 2005. Lisboa.

8. Vequi-Suplicy, C. C., Benatti, C.R., Lamy, M. T., Fernandez, R. M.
A study on Laurdan as a membrane phase sensitive fluorescent probe
2nd International Workshop on Spectroscopy for Biology. 2004. Rio de Janeiro.

E.2 Trabalhos Apresentados em Congressos em Colaboração

1. Riske, Karin A., Barroso, Rafael P., Vequi-Suplicy, Cíntia C., Germano, Renato, Henriques, Vera B., Lamy, M. Teresa
Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process
XXXII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. 2009. Águas de Lindóia.
2. Riske, Karin A., Barroso, Rafael P., Vequi-Suplicy, Cíntia C., Germano, Renato, Henriques, Vera B., Lamy, M. Teresa
Lipid Bilayer Pre-Transition as the Beginning of the Melting Process: a Periodic Melting
Biophysical Society 53rd Annual Meeting. 2009. Boston
3. Guidi, Henrique S., Enoki, Thais A., Fonseca, Raul V., Vequi-Suplicy, Cíntia C., Lamy, M. Teresa, Henriques, Vera B.
Probing interactions between lipid vesicles: experiment and theory
XXXII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. 2009. Águas de Lindóia

Vesicles with charged domains

Cíntia C. Vequi-Suplicy^a, Karin A. Riske^b, Roland L. Knorr^c, Rumiana Dimova^{c,*}

^a Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 66318 CEP 05315-970, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu, 862 CEP 04023-062 São Paulo, Brazil

^c Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Science Park Golm, 14424 Potsdam, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2009

Received in revised form 15 December 2009

Accepted 22 December 2009

Available online 4 January 2010

Keywords:

Giant vesicle

Confocal microscopy

Phase separation

Lipid raft

Membrane domain

Charged lipid

DOPG

Egg sphingomyelin

DOTAP

ABSTRACT

This work summarizes results obtained on membranes composed of the ternary mixture dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), egg sphingomyelin (eSM) and cholesterol (Chol). The membrane phase state as a function of composition is characterized from data collected with fluorescence microscopy on giant unilamellar vesicles. The results suggest that the presence of the charged DOPG significantly decreases the composition region of coexistence of liquid ordered and liquid disordered phases as compared to that in the ternary mixture of dioleoylphosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. The addition of calcium chloride to DOPG:eSM:Chol vesicles, and to a lesser extent the addition of sodium chloride, leads to the stabilization of the two-phase coexistence region, which is expressed in an increase in the miscibility temperature. On the other hand, addition of the chelating agent EDTA has the opposite effect, suggesting that impurities of divalent cations in preparations of giant vesicles contribute to the stabilization of charged domains. We also explore the behavior of these membranes in the presence of extruded unilamellar vesicles made of the positively charged lipid dioleoyltrimethylammoniumpropane (DOTAP). The latter can induce domain formation in DOPG:eSM:Chol vesicles with initial composition in the one-phase region.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last years, the outburst of studies on multicomponent model membranes has been gradually shaping our understanding about cell membranes. The emerging concept pictures them as heterogeneous patchworks of groups of lipids, cholesterol and integral proteins [1]. The role of lipids in membrane structure and organization has received increased attention. In particular, the so-called lipid rafts are thought to be involved in several biological processes, such as signaling, membrane traffic, fusion and fission, apoptosis, cytoskeleton organization and adhesion [2–5]. Lipid rafts are nanometer-scale membrane domains rich in saturated lipids, cholesterol and specific proteins [6]. Their existence and role in cell membranes are still controversial, due to difficulties in resolving them in vivo.

The lipid fraction in cell membranes includes a surprisingly wide spectrum of lipid species and the reason for this diversity is not at all clear [7,8]. To further add to the compositional complexity, the lipids are asymmetrically distributed between the two membrane leaflets. Yet, to understand the membrane behavior when certain sterols or lipids are added or removed, e.g. during lipid hydrolysis, it is useful to start with examining the phase diagrams of symmetric model membranes with simpler composition [9].

In model lipid systems like vesicles or supported bilayers, phase separation in three component membranes made of a high- and a low-melting temperature lipids and cholesterol, has been reported for different lipid species and sterols. Giant unilamellar vesicles (GUVs) as a model system [10,11] present a powerful tool for mapping compositional phase diagrams [12–15], characterizing physical properties like fluidity (diffusion coefficients) [16], domain line tension [17–19], locating tie lines and miscibility critical points [20,21].

Both the raft domains and their surrounding lipid environment are fluid [22]. Thus, of special interest in the phase diagrams of ternary lipid mixtures is the two-phase region of coexistence of a liquid ordered (L_o) or raft phase, rich in the high-melting temperature lipid (saturated), and liquid disordered (L_d) phase, rich in the low-melting temperature lipid (typically unsaturated). Fluorescence microscopy of giant unilamellar vesicles allows for direct visualization of phase separation in the micrometer scale, taking advantage of the preferential partitioning of certain fluorescent dyes into one of the phases [23].

In the plasma membrane, the typical lipid composition leading to immiscibility of liquid phases is found mainly in the external bilayer leaflet, rich in phosphatidylcholines (PCs) with unsaturated chains and sphingomyelins (SMs). Cholesterol (Chol) is found in similar amount in both leaflets because of its fast flip-flop rate. Thus, lipid rafts are believed to form in the external leaflet. Studies on the phase behavior and coupling (or registering) of rafts in asymmetric lipid bilayers [24] show that the formation of domains in one bilayer leaflet composed of the classical raft mixture PC:SM:Chol induces domain

* Corresponding author. Tel.: +49 331 567 9615; fax: +49 331 567 9612.
E-mail address: dimova@mpikg.mpg.de (R. Dimova).

formation on the other monolayer, rich in phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS). The latter is an anionic phospholipid found in the plasma membrane side facing the cytosol. Thus, formation of rafts on the external side of the cell membrane could be coupled to the formation of domains rich in the negatively charged lipid in the membrane leaflet facing the cytosol. Studies testing the ability of membranes containing charged lipids to form domains on their own are scarce [25] (note that earlier studies on binary mixtures containing charged lipids report domain formation induced by agents like polylysine and calcium ions [26,27]). Charged domains could influence the binding of oppositely charged proteins and ions present in the cytosol.

Here, we investigate the phase behavior of mixtures of the anionic phospholipid dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), egg sphingomyelin (eSM), and cholesterol. We used fluorescence microscopy to obtain an insight on the membrane phase state. To the best of our knowledge, this is the first report characterizing vesicles with charged PG-rich domains.

Our choice for the charged lipid is based on the fact that PCs and PGs bearing the same acyl chains show very similar thermal behavior,¹ e.g. almost identical temperatures of the main phase transition [30,31], which is not the case for PCs and PSs with identical acyl chains. Thus, we chose to replace the commonly used DOPC with its charged analog DOPG, because the effects of headgroup charges on the phase behavior of such mixtures could be recognized more easily. Furthermore, some studies reporting phase diagrams of membranes composed of ternary mixtures (see e.g. [15]) are based on vesicles prepared according to the method of Akashi et al. [32]. This method involves the use of PGs as an additional membrane component of up to 10–20 mol%. Such amounts of charged lipid were recently reported to have an effect on the domain morphology in vesicles made of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dilauroylphosphatidylcholine and DOPC [33]. Thus, the presence of the charged PG is expected to have a significant influence on the phase behavior of the composite PG:SM:Chol membranes.

We locate the region of two-phase L_d/L_o coexistence and study the stability of domains in this region with temperature and in the presence of ions. The addition of salt to DOPG membranes is known to decrease the lipid diffusion coefficient and the permeability to water [34]. These effects were interpreted as due to an increased lipid packing because of screening of the repulsion between the headgroup charges upon interaction with sodium and calcium ions [34]. Calcium ions bind to both neutral and negatively charged membranes [35] and at millimolar concentrations have condensation effect inducing area shrinkage of the membrane by several percents [35–38]. The interaction is strong and characterized by a 1:1 association constant of calcium ions with PG in the range $8.5\text{--}100\text{ M}^{-1}$ [39–41]. Our observations show that calcium ions can influence the stability of the fluid domains in DOPG:eSM:Chol vesicles.

Phosphatidylglycerols are found in membranes of prokaryotes and are widely used in studies on model membranes, particularly when interactions with positively charged molecules are investigated. In this way, one can mimic interactions of biologically relevant cationic macromolecules (e.g. peptides, protein domains, and hormones) with negatively charged membranes of microorganisms or cell membranes facing the cytosol. We exposed the negatively charged DOPG:eSM:Chol vesicles to positively charged liposomes made of dioleoyltrimethylammoniumpropane (DOTAP). DOTAP membranes have been studied most extensively for DNA delivery; see e.g. [42,43]. When present in membranes of saturated lipids like DPPC, DOTAP is known to significantly perturb the interfacial region of the membrane in addition to decreasing the melting temperature and broadening the phase transition [44,45]. Interestingly, when injected in the vicinity of homogeneous giant DOPG:eSM:Chol vesicles in the L_d phase, extruded DOTAP liposomes induce domain formation. The interaction

may involve membrane fusion since oppositely charged vesicles, containing either DOTAP and/or PG, are known to adhere and fuse [46–48].

2. Materials and methods

2.1. Materials

The lipids DOPG (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-[1'-*rac*-glycerol], sodium salt), egg sphingomyelin, cholesterol and DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, chloride salt) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and Sigma (Steinheim, Germany). The chemical structures of cholesterol, palmitoyl-SM (the major component of eSM), DOPG, and DOTAP are given in Fig. 1. The fluorescent label DiI_{C18} (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR) and perylene was purchased from Sigma. The chelating agent EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt dehydrate) was obtained from Sigma.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of giant DOPG:eSM:Chol unilamellar vesicles

Giant unilamellar vesicles (GUVs) were prepared by electroformation [49]. Briefly, ~12 μl of a 2 mg/ml lipid chloroform solution with the desired DOPG:eSM:Chol composition was spread on the surfaces of two conductive glasses coated with indium or fluor tin oxide. The lipid solution contained up to 0.5 mol% of the fluorescent dye DiI_{C18}, which is known to preferentially reside in the liquid disordered phase. Since DiI_{C18} is positively charged, its preference to the DOPG-rich domains could be enhanced. Occasionally, we also introduced 0.3 mol% perylene in the mixtures. Perylene is typically excluded from solid domains. The dye concentrations are given with respect to the total lipid content in the solutions. The glasses were kept under vacuum for about 2 h to remove all traces of organic solvent. Then, they were placed with their conductive sides facing each other and separated by a 2 mm thick Teflon frame. The chamber was filled with 0.2 M sucrose solution and placed inside an oven at 60 °C. The glass plates were connected to a function generator and an alternating current of 1 V with a 10 Hz frequency was applied for 2 h. After that, the chamber was removed from the oven and allowed to cool to room temperature.

Fig. 1. Chemical structures of the membrane components used: cholesterol, palmitoyl-SM—the major component of eSM, DOPG, and DOTAP.

¹ Note that this is not necessarily the case for short-tailed lipids especially at low ionic strength; see e.g. [28,29].

Generally, the GUVs were observed few hours after preparation or in the following day, because this allowed for a longer equilibration time and consequently more vesicles had completed the phase separation process. The vesicles were diluted with 0.2 M glucose solution, which created a sugar asymmetry between the interior and the exterior of the vesicles. The osmolarities of the sucrose and glucose solutions were measured with a cryoscopic osmometer Osmomat 030 (Gonotec, Germany) and carefully matched to avoid osmotic pressure effects. In some of the experiments 0.1–0.2 mM EDTA, 1–10 mM NaCl or 0.5 mM CaCl_2 were added either to both the sucrose and the glucose solutions or only to the glucose solution.

2.2.2. Preparation of large unilamellar vesicles

Films of DOTAP or DOPG:eSM:Chol mixture were prepared from chloroform solutions of the lipids in glass tubes. The DOTAP solutions used for preparation of vesicles for microscopy observations contained 1 mol% DiI $_{C18}$. The tubes were placed under vacuum for about 2 h. A solution of 0.2 M glucose was added to obtain lipid concentration of 1 mM and the samples were vortexed for 1 min. The vesicle dispersion was extruded many times (>10) through polycarbonate pores of 200 and 100 nm diameter size, consecutively, using a minixtruder from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), yielding large unilamellar vesicles (LUVs) of approximately 100 nm diameter as measured via dynamic light scattering.

2.2.3. Zeta-potential and dynamic light scattering measurements

Electrophoretic mobilities and size distribution of the extruded vesicles were determined at 21 °C with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) operating with a 4 mW HeNe laser (632.8 nm), a detector positioned at the scattering angle of 173° and a temperature-control jacket for the cuvette. Each sample was degassed for 8 min to remove air bubbles. The cuvette was sealed to avoid evaporation and left for 3 min for temperature equilibration. Three dynamic light scattering measurements consisting of up to 50 consecutive runs of duration of 10 s were performed for each sample. Dynamic correlation functions were fitted by a second-order cumulant method to obtain the size distributions. Note that the quantitative interpretation of the DLS data depends on the applied fitting model. Here, the measurements were used to detect general trends in the evolution of the vesicle size distribution. For the zeta-potential measurements, the samples with volume 0.75 ml were loaded in folded capillary zeta-potential cells with integral gold electrodes. Three measurements consisting of 100 runs with duration 10 s were performed for every sample. The mobility u was converted to zeta-potential, ζ , using the Helmholtz–Smoluchowski relation $\zeta = u\eta/\epsilon_0$, where η is the solution viscosity; ϵ , the dielectric constant of the solution and ϵ_0 , the permittivity of free space. The standard deviation is about ± 3 mV. The viscosity of the glucose solution was taken into account in the analyses of the data obtained with both techniques.

2.2.4. Optical microscopy observation

The GUV solution was placed in a home-built observation chamber with a temperature-control jacket connected to a water circulating bath (Lauda RE-106, Westbury, NY). Due to the differences in density and refractive index between the sucrose and glucose solutions, the vesicles were stabilized by gravity at the bottom of the chamber and had better contrast when observed with phase contrast microscopy. For the conventional microscopy images, the vesicles were observed with an inverted microscope (Zeiss Axiovert 200, Jena, Germany) equipped with a Plan Neo-Fluar 63 $\times$ Ph2 objective (NA 0.75). A set of filters with excitation at 540–552 nm and emission band of 575–640 nm (Zeiss filter set 20) and a mercury lamp HBO 100 W were used for observing vesicles labeled with DiI $_{C18}$. Image sequences were recorded with HSM digital camera (Zeiss, Jena, Germany) mounted on the microscope. The confocal images were taken on confocal microscope DM IRE2 (SP5

system, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany) equipped with a 40 $\times$ HCX Plan APO objective (NA 0.75). A laser source at 561 nm was used to excite DiI $_{C18}$, and the 458 nm line was used for the excitation of perylene. To reduce artifacts due to light-induced domain formation [50,51] illumination with lower intensity was used. If domain sizes in vesicles were observed to grow (not due to coalescence of domains), the data was discarded.

Injection of 1 mM DOTAP LUVs close to DOPG:eSM:Chol GUVs was done with a glass micropipette (diameter 10–20 μm) controlled by a micromanipulator MP-225 from Sutter Instruments (Novato, CA). The micropipettes were pulled with PC-10 Puller from Narishige (Tokio, Japan). The injection flux was controlled manually with a micrometer knob pressing a 10 μl Hamilton syringe (Sutter Instruments, Novato, CA).

3. Results and discussion

We first describe our microscopy observations to characterize the overall phase behavior of DOPG:eSM:Chol membranes with various compositions. Our main goal was to locate the region of coexistence of the liquid disordered and liquid ordered phases, L_d/L_o . Then, we consider the effect of salt concentration and presence of divalent ions on the thermal stability of the fluid domains. We close with observations on DOPG:eSM:Chol vesicles in whose proximity we inject oppositely charged small extruded liposomes.

3.1. Phase behavior of DOPG:eSM:Chol membranes

We study the ternary mixture of eSM, DOPG and cholesterol using GUVs observed with confocal and conventional fluorescence microscopy. The formation of micron-size domains following demixing can be visualized on the surface of GUVs with fluorescently labeled lipids. The fluorescence dyes are homogeneously distributed in single-phase membranes, but are preferentially excluded from the phase whose structure is more disrupted by their inclusion [13,52–54]. Typically, this is the more ordered phase. Fluid domains in a fluid environment can be recognized by their smooth boundaries. Their shapes are typically round, but this depends on the line tension of the domains. Since the fluorescent dye DiI $_{C18}$ is predominantly excluded from the L_o phase, these domains appear dark. Solid domains can be recognized by sharp or angular features. Both of the fluorescent dyes used here (DiI $_{C18}$ and perylene) are excluded from such domains. The domains observed on the surface of a vesicle could be clearly distinguished from small vesicles in the interior when adjusting the focus to be midway through the giant vesicle.

At high temperatures, the vesicles prepared from ternary mixtures are homogeneous and fluid, and in the L_d phase. At room temperature, eSM is in the gel or solid (S_o) phase, whereas DOPG is in the fluid state already above -18 °C [31]. Thus, vesicles at room temperature can display immiscibility of phases depending on the specific composition.

Before we consider the phase diagram of DOPG:eSM:Chol, let us note that this is a quasi-ternary mixture. Egg sphingomyelin is a natural SM mixture highly enriched in long-chain saturated fatty acids, particularly in 16:0 (83.9%), and contains only small amounts of unsaturated ones (2–3% of 24:1). It exhibits a high melting temperature around 39 °C [55] showing an unusually cooperative phase transition (in contrast to brain SM), which arises from the fact that it contains primarily even-chain saturated fatty acids. Thus, the major sharp peak in the eSM exotherm is mainly associated with the chain-melting phase transition of palmitoyl-SM [56].

To study the DOPG:eSM:Chol membrane phase behavior, around 40 different compositions were explored. The compositions yielding vesicles with domains were examined with at least 3 preparations. Isolated vesicles that were larger than 10 μm in diameter and exhibited little or no defects (like lipid lumps or membrane tubes) were chosen. A typical GUV preparation contained around 30% of such vesicles. In order to achieve a more homogenous phase behavior for

each mixture, the GUVs were left to equilibrate at room temperature for several hours after preparation and before observation.

Some regions of the phase diagram were not accessible, either because the electroformation method resulted in poor yield of GUVs, or because cholesterol did not fully incorporate in the membrane during the vesicle preparation at high mole fractions. The solubility limits of cholesterol in PC membranes was found to be 66 mol% [57] and in ethanolamine membranes 51 mol% [58]. Above these solubility limits, cholesterol precipitates as crystals of cholesterol monohydrate. Thus, we did not examine vesicle compositions with molar fraction of cholesterol in this region.

We first consider the sides of the Gibbs triangle of the DOPG:eSM:Chol membranes, i.e. the binary mixtures of eSM and Chol, DOPG and Chol, and DOPG and eSM.

Addition of cholesterol (up to about 10 mol%) is known to cause a slight decrease in the temperature of the transition peak of eSM followed by a modest increase at higher cholesterol concentrations [55]. At cholesterol fractions above about 30 mol%, the eSM:Chol membranes at room temperature are in the L_o state [59], while at cholesterol fractions between approximately 8 mol% and 20–30%, evidence for L_o/S_o coexistence in palmitoyl-SM:Chol membranes is provided from differential scanning calorimetry [60,61] and fluorescence quenching studies [62]. Thus, between these limits, we expected to find vesicles with coexisting S_o and L_o domains. However, we did not detect such coexistence region in our fluorescence microscopy observations on giant eSM:Chol vesicles, similarly to results obtained with palmitoyl-SM:Chol mixtures [63]. For the composition eSM:Chol 9:1 (molar ratios), the vesicles were homogeneously fluorescent, with facets typical for gel-like membranes, and exhibited no thermal shape fluctuations of the vesicles. The next examined mixtures 8:2, 7:3 and 6:4 appeared also homogenous but with detectable fluctuations, which is why we assume that they belong to the L_o phase. No domains were observed. A possible explanation could be that solid domains are not distinguished because they are smaller than 1 μm . This is consistent with NMR results showing small (<1 μm) domains in membranes with coexisting S_o/L_o phases [64].

Following our protocol for vesicle electroformation, vesicles prepared from the binary mixture DOPG:Chol were with very low yield for reporting representative results. However, the phase behavior of this binary mixture is not rich. The DOPG:Chol membranes are expected to be in L_d phase, which continuously changes to L_o phase with increasing the cholesterol fraction. This change mainly leads to an increase in the packing order as reflected by the lower permeability of the bilayers to water [65].

For vesicles made of DOPG and eSM, one expects a region of coexistence of fluid and gel phases. For the studied compositions, we observe that this immiscibility region is broader compared to that observed in other mixtures of low- and high-melting temperature lipids like eSM and palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine (POPC) or eSM and DOPC. Vesicles with composition DOPG:eSM in the broad range from 8:2 to 2:8 show domains, suggesting that DOPG and eSM mix poorly. Vesicles with composition DOPG:eSM 1:9 appeared with homogeneous fluorescence but rigid and with faceted shapes indicating that they are in the S_o phase.

To describe our observations on vesicles from the quasi-ternary DOPG:eSM:Chol mixture, we first consider the composition 1:1:1. At room temperature, vesicles made of the same fractional composition but of DOPC:eSM:Chol mixture, also known as the “canonical” raft mixture, exhibit liquid domains and the miscibility temperature of this mixture was reported to be 41–43 °C [14]. Replacing DOPC by DOPG has a significant consequence: At room temperature, vesicles prepared from this mixture are homogeneous and in the one-phase state. Phase separation was not observed even down to ~16 °C (lower temperatures could not be explored with our setup), showing that the presence of the charged lipids leads to depression of the miscibility temperature by more than 25 °C. We conclude that the repulsion among the charged headgroups in the DOPG-containing membranes hinders phase separation.

At about the same fraction of cholesterol (30 mol%) and arbitrary mole ratio between DOPG and eSM we still do not observe any domain formation in contrast to the phase behavior of DOPC:SM:Chol membranes [63]. Presumably, less cholesterol is needed to mix DOPG with eSM at room temperature as compared to DOPC with SM.

The results for all of the explored mixtures of DOPG:eSM:Chol at room temperature are summarized in Fig. 2. We classified the vesicles in four categories: i) homogeneous and with fluid membrane as visible from the thermal fluctuations, e.g. belonging to either L_o or L_d phase (solid red circles); ii) homogenous but without thermal fluctuations, i.e. gel-like (solid black squares); iii) with round fluid domains in fluid environment, i.e. representing the L_d/L_o coexistence region (red semi-filled circles); and iv) with non-round but angular or worm-like domains corresponding to either L_d/S_o or L_o/S_o or $L_d/L_o/S_o$ coexistence (black semi-filled squares). Note that our observations were done on vesicles prepared in sucrose and subsequently diluted in glucose. The phase behavior of the membranes in pure water or various buffers may differ slightly.

For the region of low cholesterol content (<20 mol%) and small fractions of eSM, we observe solid structures with hexagonal-like symmetry; see the vesicle snapshot for the 7:2:1 mixture in Fig. 2. Upon increasing the fraction of eSM, angular shapes and worm-like domains are detected; see the snapshots at the bottom in Fig. 2.

We attempted to locate the region of coexistence of L_o and L_d phases at room temperature. Compositions from this region are indicated with round semi-filled symbols in the graph in Fig. 2. Compared to the phase diagram of DOPC:SM:Chol [63,66,67], the size of the region of fluid phase immiscibility is significantly reduced when the zwitterionic lipid DOPC is replaced by the anionic lipid DOPG. The coexistence region is shifted towards the eSM corner of the triangle, i.e. to low DOPG and Chol content ($\leq 30\%$). Indeed, some vesicles in these preparations (less than about 20%) were homogeneous and showed no domains. This suggests that the L_d/L_o region is relatively narrow and the examined vesicle compositions are close to the miscibility line. The borders of the charged domains showed significant fluctuations, even when the temperature was decreased to 18 °C, suggesting that either these membrane compositions are close to the critical point, or the line tension of DOPG-rich domains in DOPG:eSM:Chol mixtures is lower than that of DOPC-rich domains in the DOPC:eSM:Chol mixtures [14,20]. At room temperature, only three of the examined compositions appeared to belong to the L_d/L_o region: 3:5:2, 2:6:2 and 1:7:2. The mixture 4:4:2 is in the one-phase region but demixes to L_d/L_o domains already at 22 °C, suggesting that it is close to the boundary of the L_d/L_o coexistence region.

Note that the presence of as little as 10 mol% of PG (as in the mixture 1:7:2) influences the phase state of the membrane. This result should be considered when working with vesicles prepared by the method of “gentle hydration” [32], which involves the use of PGs of up to 20 mol%. This method for example has been used to determine the phase diagram of DOPC:distearoylphosphatidylcholine:Chol [15].

We are aware of existing discrepancies between phase diagrams measured by different methods [68]. Moreover, applying only one technique to characterize the phase diagram of multicomponent membranes is a restricted approach. Locating the exact phase boundaries for membranes made of the ternary mixture DOPG:eSM:Chol is rather complex. When addressing this task with fluorescence microscopy only, one encounters the following difficulties: First, there is always a slight variation in composition between different vesicles in a batch. This can lead to a variation in the measured transition temperatures. Second, for a fixed temperature, compositions close to the miscibility boundary can exhibit both homogeneous vesicles and such with phase separated domains. For the electroformation method for one vesicle preparation, Veatch and Keller [69] have estimated a variation of ± 2 mol% cholesterol between individual vesicles. Judging from the area fraction of the domains in vesicles from one batch, our experience suggests that this spread may be even larger for certain compositions. For this reason, we

Fig. 2. Summary of microscopy observations on giant unilamellar vesicles made of DOPG:eSM:Chol at room temperature ($\sim 23^\circ\text{C}$). The snapshots show typical confocal microscopy images (either 3D projection of half of a selected vesicle or a 2D scan with an open pinhole) of giant vesicles for each composition as indicated in the upper left corners of the images. The fluorescent dye used, DiI $_{C18}$, partitions preferentially into the liquid disordered phase. The filled symbols in the graph correspond to homogenous vesicles without domains, the semi-filled symbols correspond to vesicles with domains. The circles correspond to vesicles, which appear to be fluid and if domains are present they are round. The region of L_d/L_0 phase coexistence is schematically indicated with the dashed line. The squares correspond to vesicles which appear to be solid (do not fluctuate and have facets) and if domains are present they are not round but have angular or worm-like shapes. All scale bars correspond to 10 μm .

varied the explored vesicle compositions in relatively large steps of 10 mol% of one of the components. We also examined large populations of vesicles. In addition, to circumvent possible influence of budding or curvature sorting on the membrane composition [70–73], we typically avoided using vesicles with inclusions and those externally connected to lipid lumps or clusters of smaller vesicles. Third, in composition regions where the domains are small, the domain shapes may be difficult to resolve and thus the conclusion about the observed phase may be subjective. Fourth, for areas in the phase diagram where the fraction of the fluid phase is very low, the fluorescent dye is concentrated in the small fluid domains and may influence the phase state of the lipids. Finally, we employed two fluorescent dyes (DiI $_{C18}$ is excluded from the L_0 and S_0 domains and perylene is typically excluded from the S_0 domains). However, this did not help significantly to determine the different domain types. The phase of the observed domain could be inferred only from its shape if optically resolved.

Because of the above considerations, we refrained from attempts to draw the exact boundaries in the phase diagram but set the modest goal to mainly locate a region of coexistence of the two fluid phases L_d and L_0 relevant for rafts in cell membranes. The presence of these phases in giant vesicles is typically evidenced by round domains.

We then studied the stability of the fluid domains in the L_d/L_0 region with temperature. Of the three studied compositions, the mixture 3:5:2 has the highest miscibility temperature. Fig. 3 shows the behavior of such a vesicle with raising temperature: the fluctuations in the domain shapes become stronger, and the domains melt at 28°C . This temperature is significantly lower as compared to that of the L_d/L_0 coexistence region of the classical mixture with DOPC, which is stable up to $\sim 41^\circ\text{C}$ [14]. The miscibility temperatures for the

mixtures 2:6:2 and 1:7:2 DOPG:eSM:Chol were around $23\text{--}25^\circ\text{C}$. Note that these temperatures lie well below the melting temperature of eSM (39°C). We remind that the miscibility temperatures here are detected with fluorescence microscopy, which cannot resolve domains with sizes below the optical resolution limit, if they are present.

3.2. Stability of domains in the L_d/L_0 region in the presence of different solutes

Lipids in different phases occupy different area. For example, the area of a lipid membrane increases upon melting. The melting temperatures of charged membranes are typically lower than those of neutral ones, since the charges on the headgroups repel each other, favoring the fluid state with larger area per lipid. Increasing the ionic strength screens the electrostatic interactions, thus playing a crucial role on the phase behavior of charged membranes. Furthermore, some ions can bind to the charged headgroups changing the bilayer material properties. The effect of ionic concentration on the stability of charged membrane domains is not straightforward to predict. The addition of salt is expected to screen possible repulsion between charged domains, thus allowing them to easily coarsen by coalescence. Moreover, high ionic strength and/or ion binding may have an effect on the lipid headgroups and packing in the bilayer presumably promoting the formation of domains rich in the charged lipid. In both cases, we expect that the phase separation process will be facilitated at higher ionic strengths, which should be associated with an increase in the miscibility temperature.

Fig. 3. A sequence of snapshots obtained with fluorescence microscopy on a GUV made of DOPG:eSM:Chol 3:5:2 showing the effect of temperature on domain stability. The vesicle was left to equilibrate for 5 min at each temperature. The scale bar corresponds to 10 μ m.

The influence of the salts NaCl and CaCl_2 on the stability of DOPG-rich domains was studied for two mixtures, 3:5:2 and 2:6:2, which show L_d/L_o phase coexistence at room temperature. The miscibility temperatures were used to characterize the stability of the domains. Because we are aware of the presence of impurities of divalent cations in aqueous solutions [74,75], we first tested the effect of adding the chelating agent EDTA. The latter complexes free multivalent cations and is not expected to interact with the membranes. The lipid concentration in GUV samples is typically in the micromolar range. Thus, the presence of impurities at similar concentrations can affect the phase behavior of membranes, particularly charged ones [74]. For example, calcium is known to induce phase separation in black lipid membranes composed of PC:PG mixtures [76] and to increase the main phase transition temperature of PG membranes [74,77].

The miscibility temperatures measured for vesicles in the L_d/L_o coexistence region in the presence of different additives are summarized in Table 1. The addition of 0.1 mM EDTA decreased the miscibility temperature of vesicles in the L_d/L_o coexistence region by $\sim 6^\circ\text{C}$ for the 3:5:2 mixture and by $\sim 3^\circ\text{C}$ for the 2:6:2 mixture. This result indicates that divalent cations present as impurities stabilize charged domains in GUVs with stronger effect on the mixture with the larger fraction of DOPG. Further increasing the EDTA concentration to 0.2 mM did not lead to additional decrease in the miscibility temperature, suggesting that the concentration of impurities is below that complexed by 0.1 mM EDTA.

When 0.5 mM CaCl_2 was added to the vesicles (in the absence of EDTA), the miscibility temperature of the 2:6:2 mixture increased considerably (by $\sim 5^\circ\text{C}$) compared to the no-additive case. This confirms our conclusion based on the experiments with EDTA that charged domains are stabilized by the presence of divalent ions. Little or no effect was detected in the 3:5:2 mixture, which exhibited the highest miscibility temperature in the L_d/L_o coexistence region when no calcium was added. Higher concentrations of CaCl_2 (1–5 mM) increased the vesicle tension (the membrane fluctuations were suppressed), induced vesicle aggregation and adhesion to the cover slip followed by vesicle rupture. Similar effects were observed on giant vesicles containing PS in the presence of calcium ions [35], while the adsorption of divalent cations to charged monolayers was shown to decrease the area per molecule [37] and increase the surface tension [78,79], consistent with our observations.

Table 1

Miscibility temperatures of GUVs in the L_d/L_o coexistence region in the absence and presence of different solutes. Data for two different membrane compositions are given. The vesicles were prepared in sucrose and diluted in glucose solution containing the specified amount of additives as indicated. The case where no EDTA or salt was added to the sugar solutions is referred to as “no additive”.

Solution	DOPG:eSM:Chol membranes	
	3:5:2	2:6:2
No additive	27–29 $^\circ\text{C}$	23–25 $^\circ\text{C}$
0.1–0.2 mM EDTA	21–22 $^\circ\text{C}$	21–22 $^\circ\text{C}$
0.5 mM CaCl_2	27–30 $^\circ\text{C}$	27–30 $^\circ\text{C}$
1–10 mM NaCl	27–30 $^\circ\text{C}$	23–26 $^\circ\text{C}$
1–10 mM NaCl + 0.1 mM EDTA	22–26 $^\circ\text{C}$	22–27 $^\circ\text{C}$

Addition of 1, 5 and 10 mM NaCl to vesicles in the absence of EDTA had little or no effect on the miscibility temperature. To avoid the influence of divalent ion impurities, the effect of NaCl was also examined in the presence of 0.1 mM EDTA. In the latter case, the addition of 1–10 mM NaCl induced a mild increase of the miscibility temperature of the domains as compared to the data obtained in the presence of EDTA only; see Table 1. Miscibility temperatures as high as those measured for the L_d/L_o region in DOPG:eSM:Chol mixtures [14] were not observed. This indicates that for the explored ionic strengths the charges in the membrane are only partially screened. Indeed, for other PG systems it has been shown that even 500 mM NaCl is insufficient to completely suppress the repulsion between adjacent bilayers [80]. Here we could not explore such high concentrations because already upon the addition of 10 mM NaCl a fraction of the vesicles ruptured. This suggests that monovalent ions might also induce tension on the membrane. When 50 mM NaCl was added, the majority of the vesicles adhered to the glass and ruptured.

Our experiments in the presence of different solutes were performed both on vesicles having the additives inside and outside and on vesicles where the solute was added only to the external solution. In the former case the vesicle yield was poorer. In both cases the vesicles behaved similarly indicating that the stabilization/melting of domains in the outer bilayer leaflet is coupled to domain formation/destabilization in the inner bilayer leaflet as shown for asymmetrical bilayer systems [24].

3.3. Interaction of DOPG:eSM:Chol GUVs with extruded cationic liposomes

Upon phase separation, vesicles with charged lipids acquire regions with higher surface charge density. In our case, these are the DOPG-rich domains. Negatively charged domains can act as recognition patches for positively charged molecules (e.g. positively charged peptides or protein domains) or particles. These positively charged molecules may adhere to the membrane or insert into the bilayer. In both cases, they are expected to change the phase behavior of multicomponent membranes. Here we studied the effect of injecting a dispersion of extruded large unilamellar vesicles (LUVs) made of the positively charged lipid DOTAP, in the vicinity of giant DOPG:eSM:Chol vesicles. We explored both homogeneous fluid GUVs and GUVs in the fluid two-phase L_d/L_o region.

We used a dispersion of 1 mM extruded DOTAP LUVs labeled with 1 mol% DiI_{C18}. The solution was injected with a glass pipette, which was held at a distance of about 50 μ m away from the selected vesicle. The size and surface charge of the DOTAP vesicles are discussed further.

We studied the effect of injecting extruded DOTAP liposomes in the vicinity of two-phase L_d/L_o GUVs with composition 3:5:2. To ensure the domain stability, we worked at lower temperature, namely 18 $^\circ\text{C}$. At this temperature DOTAP is fluid. It has a low melting temperature, similarly to DOPG because of the identical acyl chains, see Fig. 1.

We first used GUVs which were fluorescently labeled to be able to observe the area fraction and location of the DOPG-rich domains; see

Fig. 4. Sequences of snapshots showing the effect of injection of a LUV dispersion of 1 mM DOTAP vesicles labeled with 1 mol% DiIC₁₈ in the vicinity of two GUVs made of 3:5:2 DOPG:eSM:Chol: a vesicle labeled with DiIC₁₈ (a–d), and a vesicle, which is not labeled (e–h). The experiments were performed at 18 °C. The snapshots were taken a few seconds apart. The scale bars correspond to 10 μm. Before injection of DOTAP vesicles (a), the GUV labeled with DiIC₁₈ exhibited domains. The bright background seen right after the injection (b) was due to the flow of fluorescently labeled DOTAP LUVs reaching the giant vesicle. A few seconds after injection (c, d), the area fraction of the fluorescently labeled L_d domains in the GUV increased. In less than a minute, the vesicle adhered to the cover slip and ruptured. Before injection of DOTAP, the unlabeled GUV could be observed under phase contrast (e) but not with fluorescence microscopy (f). Several seconds after injection of DOTAP LUVs from the lower right side, domains were observed to form on the GUV (j). After that, the vesicle adhered to the glass and ruptured, spreading on the substrate (h).

Fig. 4a. After injection, the positively charged DOTAP vesicles induced an increase in the area fraction of the L_d DOPG-rich domains; see Fig. 4b–d. The fluctuations in the domain boundaries decreased, suggesting an increase in the line tension and stabilization of the domains. Several seconds after the injection, brighter spots could be observed on the vesicle surface (Fig. 4c and d), indicating local condensation or formation of small buds. After a few tens of seconds, the vesicles typically adhered to the glass surface and ruptured (here not shown; an example with another vesicle is given in Fig. 4h). This is due to the tendency of the positively charged DOTAP to strongly adhere to the negatively charged glass surfaces. The GUVs adhesion in the presence of DOTAP is similar to that observed in the presence of calcium. The adhesion and rupture of the DOPG:eSM:Chol GUVs is an indication that, in the presence of extruded DOTAP vesicles, the overall surface charge of the GUVs changes from negative to positive leading also to adhesion to the negatively charged glass. The change in the surface charge is supported by zeta-potential measurements described further. Because the GUVs were unstable and ruptured in the presence of extruded DOTAP vesicles, we could not study the

stability of the domains as a function of temperature. These experiments mainly demonstrate that DOTAP influences the phase state of the DOPG:eSM:Chol membranes.

We also explored the possibility to use fluorescent DOTAP vesicles as markers for the charged domains in a two-phase GUV, which was not labeled fluorescently. We expected that if DOTAP vesicles only adhere to the GUV, they would prefer the DOPG-rich domains and would fluorescently mark them. If the DOTAP vesicles fuse with the membrane of the GUV, complex behavior of the domains can be expected because of a change in the membrane composition. The images in Fig. 4e–h illustrate the results from these experiments. We first located a GUV under phase contrast (Fig. 4e). A few seconds after injecting the fluorescently labeled DOTAP vesicles, we observed fluorescence from domains on the GUV surface. It appeared that in this case, the continuous phase was L_d (fluorescent) surrounding smaller L_o domains (Fig. 4j), while in vesicles of this composition in the absence of DOTAP the continuous phase is typically L_o; see Fig. 4a. The domain repartitioning implies a change in the GUV membrane composition. Presumably this is due to fusion of DOTAP vesicles with the GUV. However, we did not detect an increase in the size of the inspected giant vesicles. Similarly to the vesicle described in Fig. 4a–d, this GUV also adhered to the glass surface and ruptured coating the substrate with a bilayer with a fluorescent pattern; see Fig. 4h. Adhesion affects the entropy of the membrane by dampening its thermal undulations and has been shown to induce phase segregation in adhesion zones between vesicles or vesicles and a substrate [81]. However, here the vesicles were observed to phase separate already before adhering to the glass surface.

We then explored the effect of injecting extruded DOTAP vesicles in the vicinity of labeled GUVs in the fluid one-phase region. Fig. 5 shows the result on a GUV with the composition 4:4:2. This membrane composition belongs to the one-phase region but is close to the miscibility boundary of the L_d/L_o region; see Fig. 2. After initiating the injection, we detect local domain formation at the vesicle side facing the injection pipette (lower right side). This side of the vesicle is exposed to higher concentration of DOTAP, which locally influences the phase state of the membrane via adsorption or fusion. The bright DOPG-rich L_d domain formed there presumably depletes the surrounding from DOPG, leading to the formation of relatively large L_o domains (Fig. 5, snapshots at 75–121 s). After a couple of minutes, the L_o domains decrease in size (Fig. 5, 148–176 s). Note that after the DOTAP injection is terminated, the local concentration of LUVs decreases due to diffusion.

The sequence of events shown in Figs. 4 and 5 is rather complex to provide a thorough explanation, as the membrane composition might be changing depending on the amount of DOTAP inserting into the bilayer via fusion. Furthermore, an equilibrium state is hardly ever reached, because the vesicles usually rupture after several seconds

Fig. 5. Sequence of snapshots presenting the effect of injecting dispersion of 1 mM DOTAP LUVs labeled with 1 mol% DiIC₁₈ in the vicinity of a GUV made of DOPG:eSM:Chol 4:4:2. The time after injection is indicated in the upper left corner of each snapshot. The arrow in the first snapshot shows the direction of injection. The scale bar corresponds to 10 μm.

due to adhesion to the cover slip. Suitably coating the glass walls of the working chamber might provide a solution to this problem. Control on the local concentration of DOTAP should also be pursued. However, the purpose of these experiments was to demonstrate that interaction with positively charged small vesicles changes the phase behavior of the ternary mixture DOPG:eSM:Chol. Using individual and better suited fluorescent labels on each of the membrane types might help for quantitative characterization of the interaction of the DOTAP vesicles with the GUVs and to clarify whether membrane adhesion or fusion is the main process involved. Efforts in this direction will be subject of future work.

To complement our microscopy observations on the interaction of the DOPG:eSM:Chol GUVs with the extruded DOTAP vesicles and to attempt to find out whether the interaction between them occurs mainly via adhesion or fusion, zeta-potential and dynamic light scattering (DLS) measurements were performed. Because both experimental techniques are limited to particles whose size is not larger than a couple of micrometers, we used extruded and not giant DOPG:eSM:Chol vesicles. Only the homogeneous 4:4:2 mixture was investigated. The DLS data showed that on the average the extruded DOTAP vesicles had a mean diameter around 105 nm and positive zeta-potential of +85 mV, while the DOPG:eSM:Chol vesicles were slightly larger with diameters around 130 nm and with negative zeta-potential with average value of -70 mV. A few minutes after mixing the two vesicles dispersion in 1:1 ratio, the size distribution in the measuring cell drastically changed giving rise to an additional population of particles with diameters around $0.5\ \mu\text{m}$ and much broader distribution in the following hours; see Fig. 6a. Immediately after mixing, only a single peak in the zeta-potential measurements was detected around +50 mV. In the next several hours it gradually shifted to +64 mV. Thus, upon mixing, the DOPG:eSM:Chol vesicles, which are initially negatively charged, change their surface charge to

positive. Indeed, the data indicates approximately proportional compensation of positive and negative charges considering the molar concentrations of DOTAP and DOPG, respectively. The DLS data shows that the vesicle sizes increase. This can be both due to aggregation induced by adhesion of the oppositely charged vesicles or due to their fusion. Visual inspection of the mixed vesicle dispersion after the measurements did not show increase in turbidity or precipitation. We investigated this dispersion with phase contrast microscopy and found a small fraction of giant vesicles with diameters of up to around $40\ \mu\text{m}$ a few hours after mixing the solutions; see Fig. 6b and c. No such vesicles were found in dispersions of extruded DOTAP or DOPG:eSM:Chol 4:4:2 vesicles when left to equilibrate for a few hours. The background texture in Fig. 6c shows that the majority of the vesicles are still sub-microscopic.

The presence of giant vesicles in the mixture suggests that the interaction between the two types of liposomes involves membrane fusion, although adhesion is likely to occur prior to fusion. We did not observe an increase in the size of the giant vesicles made of DOPG:eSM:Chol to which the extruded DOTAP vesicles were injected. A plausible explanation could be that the area change was too small to be detected or that DOTAP might have a condensation effect on DOPG:eSM:Chol membranes. Such condensation may lead to higher tension on the DOPG:eSM:Chol vesicles, which is known to facilitate fusion [82].

Upon fusion, the membrane of the resulting vesicles is a mixture of cationic, anionic and neutral lipids. Such mixtures have the propensity to form inverted nonlamellar phases when the mean surface charge approaches neutrality [83], and thus, are not expected to be stabilized as giant vesicles, which exemplify a system in the lamellar phase. However, we were not able to probe the stability of the DOPG:eSM:Chol vesicles after exposure to DOTAP dispersions, because the GUVs generally ruptured shortly after the DOTAP injection.

4. Conclusions

We explored the phase diagram of the quasi-ternary mixture DOPG:eSM:Chol complementing the available literature on domain formation in neutral model membranes. To the best of our knowledge, this is the first study on the stability of fluid charged domains in giant vesicles. We show that the composition range leading to formation of rafts is significantly reduced when one of the lipids is charged. Addition of salt increases the stability of the domains, whereas the chelating agent EDTA has the opposite effect. Thus, ions like calcium in the solution have a stabilizing effect on the domains. Intracellular release of calcium, known to occur after cell stimulation, might be influencing the local phase state of the membranes.

Charged domains, here DOPG-rich, can act as recognition sites on the membrane for selective interaction with positively charged molecules or particles. Here, we demonstrated this possibility using a dispersion of DOTAP vesicles. The complex phase behavior observed in our experiments needs further exploration.

Studying negatively charged domains in model membranes is imposed by the overwhelming need for understanding the basic biophysics of raft formation in the plasma membrane. Even though rafts are believed to form in the external leaflet of the plasma membrane, evidence for registering of rafts in asymmetric lipid bilayers has been recently provided [24], justifying the need for studying phase separation in membranes with charged lipids. Negative charges in the lipid headgroup significantly increase the complexity of the system involving the interplay between electrostatic interactions and hydrophobic effects, in addition to inter-domain elastic interactions [84]. The need of studying phase separation in charged membranes is further motivated by the possible involvement of charged rafts in regulating protein activity in the cytosol which may either be governed by or may regulate the phase separation in the external leaflet of the plasma membrane.

Fig. 6. DLS data from dispersions of extruded DOTAP and DOPG:eSM:Chol 4:4:2 vesicles and their mixture (a), and microscopy observations on these samples (b, c). The size distribution curves shift to larger diameters at a certain time after mixing as indicated in the graph (a). A snapshot of the dispersion of extruded vesicles made of DOTAP (b) shows the absence of particles resolvable with phase contrast microscopy; similar image is obtained from a dispersion of extruded vesicles made of DOPG:eSM:Chol 4:4:2. Snapshots recorded several hours after mixing of the two types of extruded vesicles show that giant vesicles with diameters of up to about $40\ \mu\text{m}$ can be found (c).

Intracellular membranes are negatively charged and are close to a critical point [8,85]. Thus, proteins may easily influence their phase state locally, facilitating processes like budding and vesicular trafficking. Our study is only a scratch on the surface of a bulk of still unexplored knowledge required for understanding the versatile mechanisms, which cell membranes employ to function.

Acknowledgments

We thank the editor of this issue for the invitation to submit this article. We also thank C. Remde and M. Staykova for the support on the zeta-potential and microscopy measurements. R.D. thanks R. Lipowsky and C. Marques for the stimulating discussions. C.C.V.-S. thanks M. T. Lamy for allowing this new experience with GUVs. R.D. acknowledges the support of the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft). K.A.R. and C.C.V.-S. acknowledge the support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). K.A.R. also acknowledges the financial support of INCT-FCx.

References

- [1] D.M. Engelman, Membranes are more mosaic than fluid, *Nature* 438 (2005) 578–580.
- [2] M. Eddin, The state of lipid rafts: from model membranes to cells, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32 (2003) 257–283.
- [3] D. Holowka, J.A. Gosse, A.T. Hammond, X.M. Han, P. Sengupta, N.L. Smith, A. Wagenknecht-Wiesner, M. Wu, R.M. Young, B. Baird, Lipid segregation and IgE receptor signaling: a decade of progress, *BBA-Mol. Cell Res.* 1746 (2005) 252–259.
- [4] J. Fullekrug, K. Simons, Lipid rafts and apical membrane traffic, *Gastroenteropancreatic Neuroendocr. Tumor Dis.: Mol. Cell Biol. Asp.* 1014 (2004) 164–169.
- [5] D. Meder, M.J. Moreno, P. Verkade, W.L.C. Vaz, K. Simons, Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 329–334.
- [6] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–572.
- [7] B.G. Gennis, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, New York, 1989.
- [8] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 112–124.
- [9] G.W. Feigenson, Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures, *BBA-Biomembranes* 1788 (2009) 47–52.
- [10] P.L. Luisi, P. Walde, *Giant Vesicles*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2000.
- [11] R. Dimova, S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K.A. Riske, R. Lipowsky, A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy, *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (2006) S1151–S1176.
- [12] C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, Lipid rafts reconstituted in model membranes, *Biophys. J.* 80 (2001) 1417–1428.
- [13] J. Koriach, P. Schwill, W.W. Webb, G.W. Feigenson, Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 8461–8466.
- [14] S.L. Veatch, S.L. Keller, Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol, *Biophys. J.* 85 (2003) 3074–3083.
- [15] J. Zhao, J. Wu, F.A. Heberle, T.T. Mills, P. Klawitter, G. Huang, G. Costanza, G.W. Feigenson, Phase studies of model biomembranes: complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol, *BBA-Biomembranes* 1768 (2007) 2764–2776.
- [16] N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, B. Poolman, P. Schwill, Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 28109–28115.
- [17] A.J. Garcia-Saez, S. Chiantia, P. Schwill, Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes, *J. Biol. Chem.* 282 (2007).
- [18] C. Esposito, A. Tian, S. Melamed, C. Johnson, S.Y. Tee, T. Baumgart, Flicker spectroscopy of thermal lipid bilayer domain boundary fluctuations, *Biophys. J.* 93 (2007) 3169–3181.
- [19] A.W. Tian, C. Johnson, W. Wang, T. Baumgart, Line tension at fluid membrane domain boundaries measured by micropipette aspiration, *Phys. Rev. Lett.* 98 (2007) 208102.
- [20] A.R. Honerkamp-Smith, S.L. Veatch, S.L. Keller, An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes, *BBA-Biomembranes* 1788 (2009) 53–63.
- [21] S.L. Veatch, K. Gawrisch, S.L. Keller, Closed-loop miscibility gap and quantitative tie-lines in ternary membranes containing diphytanoyl PC, *Biophys. J.* 90 (2006) 4428–4436.
- [22] A. Pralle, P. Keller, E.L. Florin, K. Simons, J.K.H. Horber, Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 997–1007.
- [23] T. Baumgart, G. Hunt, E.R. Farkas, W.W. Webb, G.W. Feigenson, Fluorescence probe partitioning between L- α /L-d phases in lipid membranes, *BBA-Biomembranes* 1768 (2007) 2182–2194.
- [24] V. Kiessling, C. Wan, L.K. Tamm, Domain coupling in asymmetric lipid bilayers, *BBA-Biomembranes* 1788 (2009) 64–71.
- [25] J. Ashcraft, S. Keller, Miscibility phase behavior of GUV membranes containing ternary mixtures of PS lipids, PC lipids, and cholesterol, *Biophys. J.* 96 (2009) 160a–161a.
- [26] H.J. Galla, E. Sackmann, Chemically induced lipid phase separation in model membranes containing charged lipids: a spin label study, *BBA-Biomembranes* 401 (1975) 509–529.
- [27] W. Hartmann, H.J. Galla, E. Sackmann, Direct evidence of charge-induced lipid domain structure in model membranes, *FEBS Lett.* 78 (1977) 169–172.
- [28] M.F. Schneider, D. Marsh, W. Jahn, B. Kloesgen, T. Heimburg, Network formation of lipid membranes: triggering structural transitions by chain melting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 14312–14317.
- [29] K.A. Riske, L.Q. Amaral, M.T. Lamy, Extensive bilayer perforation coupled with the phase transition region of an anionic phospholipid, *Langmuir* 25 (2009) 10083–10091.
- [30] A. Watts, K. Harlos, W. Maschke, D. Marsh, Control of structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration, *Biochim. Biophys. Acta* 510 (1978) 63–74.
- [31] E.J. Findlay, P.G. Barton, Phase behavior of synthetic phosphatidylglycerols and binary-mixtures with phosphatidylcholines in presence and absence of calcium-ions, *Biochemistry* 17 (1978) 2400–2405.
- [32] K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, K. Kinoshita, Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope, *Biophys. J.* 71 (1996) 3242–3250.
- [33] L. Li, J.X. Cheng, Coexisting stripe- and patch-shaped domains in giant unilamellar vesicles, *Biochemistry* 45 (2006) 11819–11826.
- [34] A. Filippov, G. Orädd, G. Lindblom, Effect of NaCl and CaCl₂ on the lateral diffusion of zwitterionic and anionic lipids in bilayers, *Chem. Phys. Lipids* 159 (2009) 81–87.
- [35] C.G. Sinn, M. Antonietti, R. Dimova, Binding of calcium to phosphatidylcholine-phosphatidylserine membranes, *Colloids Surf., A-Physicochem. Eng. Asp.* 282 (2006) 410–419.
- [36] D. Uhrkova, N. Kucerka, J. Teixeira, V. Gordeliy, P. Balgavy, Structural changes in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer promoted by Ca²⁺ ions: a small-angle neutron scattering study, *Chem. Phys. Lipids* 155 (2008) 80–89.
- [37] J. Mattai, H. Hauser, R.A. Demel, G.G. Shipley, Interactions of metal-ions with phosphatidylserine bilayer-membranes – effect of hydrocarbon chain unsaturation, *Biochemistry* 28 (1989) 2322–2330.
- [38] P.T. Vernier, M.J. Ziegler, R. Dimova, Calcium binding and head group dipole angle in phosphatidylserine-phosphatidylcholine bilayers, *Langmuir* 25 (2009) 1020–1027.
- [39] A. Lau, A. McLaughlin, S. McLaughlin, The adsorption of divalent-cations to phosphatidylglycerol bilayer-membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 645 (1981) 279–292.
- [40] J. Marra, J. Israelachvili, Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous-electrolyte solutions, *Biochemistry* 24 (1985) 4608–4618.
- [41] K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, K. Kinoshita, Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion, *Biophys. J.* 74 (1998) 2973–2982.
- [42] I. Koltover, T. Salditt, J.O. Radler, C.R. Safinya, An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery, *Science* 281 (1998) 78–81.
- [43] Y.H. Xu, F.C. Szoka, Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection, *Biochemistry* 35 (1996) 5616–5623.
- [44] R.B. Campbell, S.V. Balasubramanian, R.M. Straubinger, Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties, *BBA-Biomembranes* 1512 (2001) 27–39.
- [45] S. Cinielli, G. Onori, S. Zuzzi, F. Bordini, C. Cametti, S. Sennato, F. Bordini, C. Cametti, S. Sennato, M. Diociaiuti, Properties of mixed DOTAP-DPPC bilayer membranes as reported by differential scanning calorimetry and dynamic light scattering measurements, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 10032–10039.
- [46] L. Stammatatos, R. Leventis, M.J. Zuckermann, J.R. Silvius, Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid-vesicles and biological-membranes, *Biochemistry* 27 (1988) 3917–3925.
- [47] K. Anzai, M. Masumi, K. Kawasaki, Y. Kirino, Frequent fusion of liposomes to a positively charged planar bilayer without calcium-ions, *J. Biochem. (Tokyo)* 114 (1993) 487–491.
- [48] C.M. Franzin, P.M. Macdonald, Detection and quantification of asymmetric lipid vesicle fusion using deuterium NMR, *Biochemistry* 36 (1997) 2360–2370.
- [49] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss.* 81 (1986) 303–311.
- [50] A.G. Ayuyan, F.S. Cohen, Lipid peroxides promote large rafts: effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation, *Biophys. J.* 91 (2006) 2172–2183.
- [51] J. Zhao, J. Wu, H.L. Shao, F. Kong, N. Jain, G. Hunt, G. Feigenson, Phase studies of model biomembranes: macroscopic coexistence of L α plus L β , with light-induced coexistence of L α plus L α Phases, *BBA-Biomembranes* 1768 (2007) 2777–2786.
- [52] L.A. Bagatolli, E. Gratton, A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: a two-photon fluorescence microscopy study, *Biophys. J.* 79 (2000) 434–447.
- [53] S.L. Veatch, S.L. Keller, Organization in lipid membranes containing cholesterol, *Phys. Rev. Lett.* 89 (2002) 4.
- [54] T. Baumgart, S. Das, W.W. Webb, J.T. Jenkins, Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence, *Biophys. J.* 89 (2005) 1067–1080.
- [55] D.A. Mannock, T.J. McIntosh, X. Jiang, D.F. Covey, R.N. McElhaney, Effects of natural and enantiomeric cholesterol on the thermotropic phase behavior and structure of egg sphingomyelin bilayer membranes, *Biophys. J.* 84 (2003) 1038–1046.

- [56] B. Ramstedt, J.P. Slotte, Comparison of the biophysical properties of racemic and d-erythro-N-acyl sphingomyelins, *Biophys. J.* 77 (1999) 1498–1506.
- [57] J.Y. Huang, G.W. Feigenson, A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers, *Biophys. J.* 76 (1999) 2142–2157.
- [58] J.Y. Huang, J.T. Buboltz, G.W. Feigenson, Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers, *BBA-Biomembranes* 1417 (1999) 89–100.
- [59] A. Wisniewska, W.K. Subczynski, The liquid-ordered phase in sphingomyelin-cholesterol membranes as detected by the discrimination by oxygen transport (DOT) method, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 13 (2008) 430–451.
- [60] T.N. Estep, D.B. Mountcastle, Y. Barenholz, R.L. Biltonen, T.E. Thompson, Thermal-behavior of synthetic sphingomyelin-cholesterol dispersions, *Biochemistry* 18 (1979) 2112–2117.
- [61] P.R. Maulik, G.G. Shipley, N-palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biochemistry* 35 (1996) 8025–8034.
- [62] R.F.M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophys. J.* 85 (2003) 2406–2416.
- [63] S.L. Veatch, S.L. Keller, Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin, *Phys. Rev. Lett.* 94 (2005) 148101.
- [64] T.H. Huang, C.W.B. Lee, S.K. Dasgupta, A. Blume, R.G. Griffin, A C-13 and H-2 nuclear-magnetic-resonance study of phosphatidylcholine cholesterol interactions — characterization of liquid-gel phases, *Biochemistry* 32 (1993) 13277–13287.
- [65] M.M.A.E. Claessens, F.A.M. Leermakers, F.A. Hoekstra, M.A.C. Stuart, Osmotic shrinkage and reswelling of giant vesicles composed of dioleoylphosphatidylglycerol and cholesterol, *BBA-Biomembranes* 1778 (2008) 890–895.
- [66] S.L. Veatch, S.L. Keller, Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes, *BBA-Mol. Cell Res.* 1746 (2005) 172–185.
- [67] A. Filippov, G. Oradd, G. Lindblom, Sphingomyelin structure influences the lateral diffusion and raft formation in lipid bilayers, *Biophys. J.* 90 (2006) 2086–2092.
- [68] F.M. Goni, A. Alonso, L.A. Bagatolli, R.E. Brown, D. Marsh, M. Prieto, J.L. Thewalt, Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts, *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* 1781 (2008) 665–684.
- [69] S.L. Veatch, S.L. Keller, A closer look at the canonical ‘raft mixture’ in model membrane studies, *Biophys. J.* 84 (2003) 725–726.
- [70] R. Lipowsky, R. Dimova, Domains in membranes and vesicles, *J. Phys.: Condens. Matter* 15 (2003) S31–S45.
- [71] A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, B. Goud, Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules, *EMBO J.* 24 (2005) 1537–1545.
- [72] A. Tian, T. Baumgart, Sorting of lipids and proteins in membrane curvature gradients, *Biophys. J.* 96 (2009) 2676–2688.
- [73] B. Sorre, A. Callan-Jones, J.B. Manneville, P. Nassoy, J.F. Joanny, J. Prost, B. Goud, P. Bassereau, Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 5622–5626.
- [74] K.A. Riske, H.G. Dobereiner, M.T. Lamy-Freund, Comment on “Gel–fluid transition in dilute versus concentrated DMPG aqueous dispersions”, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 5391–5392.
- [75] K.A. Riske, R.L. Knorr, R. Dimova, Bursting of charged multicomponent vesicles subjected to electric pulses, *Soft Matter* 5 (2009) 1983–1986.
- [76] S. Mittler-Neher, W. Knoll, Ca²⁺-induced lateral phase-separation in black lipid-membranes and its coupling to the ion translocation by gramicidin, *Biochim. Biophys. Acta* 1152 (1993) 259–269.
- [77] J.M. Boggs, G. Rangaraj, Investigation of the metastable phase-behavior of phosphatidylglycerol with divalent-cations by calorimetry and manganese ion binding measurements, *Biochemistry* 22 (1983) 5425–5435.
- [78] S. Ohki, A mechanism of divalent ion-induced phosphatidylserine membrane-fusion, *Biochim. Biophys. Acta* 689 (1982) 1–11.
- [79] S. Ohki, H. Ohshima, Divalent cation-induced phosphatidic-acid membrane-fusion — effect of ion binding and membrane-surface tension, *Biochim. Biophys. Acta* 812 (1985) 147–154.
- [80] R.M. Fernandez, K.A. Riske, L.Q. Amaral, R. Itri, M.T. Lamy, Influence of salt on the structure of DMPG studied by SAXS and optical microscopy, *BBA-Biomembranes* 1778 (2008) 907–916.
- [81] V.D. Gordon, M. Deserno, C.M.J. Andrew, S.U. Egelhaaf, W.C.K. Poon, Adhesion promotes phase separation in mixed-lipid membranes, *Epl* 84 (2008).
- [82] J.C. Shillcock, R. Lipowsky, Tension-induced fusion of bilayer membranes and vesicles, *Nat. Mater.* 4 (2005) 225–228.
- [83] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: calorimetric and P-31-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids, *Biophys. J.* 79 (2000) 1455–1464.
- [84] T.S. Ursell, W.S. Klug, R. Phillips, Morphology and interaction between lipid domains, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 13301–13306.
- [85] D. Lingwood, J. Ries, P. Schwille, K. Simons, Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10005–10010.

Laurdan Spectrum Decomposition as a Tool for the Analysis of Surface Bilayer Structure and Polarity: a Study with DMPG, Peptides and Cholesterol

Aline D. Lúcio · Cíntia C. Vequi-Suplicy ·
Roberto M. Fernandez · M. Teresa Lamy

Received: 14 July 2009 / Accepted: 3 November 2009 / Published online: 17 November 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract The highly hydrophobic fluorophore Laurdan (6-dodecanoyl-2-(dimethylaminonaphthalene)) has been widely used as a fluorescent probe to monitor lipid membranes. Actually, it monitors the structure and polarity of the bilayer surface, where its fluorescent moiety is supposed to reside. The present paper discusses the high sensitivity of Laurdan fluorescence through the decomposition of its emission spectrum into two Gaussian bands, which correspond to emissions from two different excited states, one more solvent relaxed than the other. It will be shown that the analysis of the area fraction of each band is more sensitive to bilayer structural changes than the largely used parameter called Generalized Polarization, possibly because the latter does not completely separate the fluorescence emission from the two different excited states of Laurdan. Moreover, it will be shown that this decomposition should be done with the spectrum as a function of energy, and not wavelength. Due to the presence of the two emission bands in Laurdan spectrum, fluorescence anisotropy should be measured around 480 nm, to be able to monitor the fluorescence emission from one excited state only, the solvent relaxed state. Laurdan will be used to

monitor the complex structure of the anionic phospholipid DMPG (dimyristoyl phosphatidylglycerol) at different ionic strengths, and the alterations caused on gel and fluid membranes due to the interaction of cationic peptides and cholesterol. Analyzing both the emission spectrum decomposition and anisotropy it was possible to distinguish between effects on the packing and on the hydration of the lipid membrane surface. It could be clearly detected that a more potent analog of the melanotropic hormone α -MSH (Ac-Ser¹-Tyr²-Ser³-Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂) was more effective in rigidifying the bilayer surface of fluid membranes than the hormone, though the hormone significantly decreases the bilayer surface hydration.

Keywords Laurdan · Fluorescence · Spectrum decomposition · Fluorescence anisotropy · DMPG · Melanocortin peptides · α -MSH · [Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH · Cholesterol

Introduction

Since designed by Weber and Farris (1979) [1], Prodan (6-propionyl-2-(dimethylaminonaphthalene)) and its more hydrophobic derivative, Laurdan (6-dodecanoyl-2-(dimethylaminonaphthalene)), have been extensively used due to their high sensitive to solvent polarity. When incorporated into lipid bilayers, their fluorescence emission spectrum is clearly composed of two bands, which have been attributed to emission from two different excited states: a solvent-non-relaxed, and a solvent-relaxed state [2, 3].

Considering the gel-fluid thermal transition of lipid bilayers, the short-wavelength band (solvent-non-relaxed) is predominantly present when Laurdan is incorporated into

A. D. Lúcio · C. C. Vequi-Suplicy (✉) · R. M. Fernandez ·
M. T. Lamy
Instituto de Física, Universidade de São Paulo,
CP 66318, CEP 05314-970 São Paulo, SP, Brazil
e-mail: cintia@if.usp.br

A. D. Lúcio
Departamento de Exatas, Universidade Federal de Lavras,
CP 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brazil

R. M. Fernandez
Depto. de Física e Biofísica, Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista,
CP 510, CEP 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

a lipid gel phase, as compared to the predominance of the longer wavelength band (solvent-relaxed) when the probe is in fluid bilayers [4]. Taking that into consideration, together with the high sensitivity of Prodan or Laurdan to solvent polarity, these two bands have been mostly attributed to the fluorophore incorporated in the less hydrated lipid gel phase and in the more hydrated fluid phase [3]. However, it has been shown that Laurdan fluorescence in lipid bilayers is extremely sensitive to the bilayer packing, even in a pure lipid fluid phase, and that even in a lipid gel phase the two bands are almost equally present [5]. Hence, the emission spectrum of these fluorophores seems to be a reporter of both the presence of water molecules and the mobility of these molecules at the bilayer surface, where the naphthalene moiety is supposed to reside [4–6].

In the present work Laurdan was used to monitor the structure of the anionic phospholipid DMPG (dimyristoyl phosphatidylglycerol). At high ionic strength (1 mM DMPG in 500 mM NaCl), DMPG presents a sharp gel-fluid thermal transition around 23 °C. However, at low ionic strength, DMPG presents a rather peculiar thermal behavior, displaying a large gel-fluid transition region, with several calorimetric peaks, between the beginning ($T_m^{on} \sim 17$ °C) and the end ($T_m^{off} \sim 35$ °C) of the melting process (see, for instance [7, 8]). Although the lipid structure of this transition region is not well understood, some of its characteristics are known, like low turbidity, high viscosity and high electric conductivity [9–11]. Moreover, electron spin resonance (ESR) of spin labels intercalated into the lipid phase evidenced the presence of two structurally different domains: rigid and highly hydrophobic gel domains coexisting with rather fluid and hydrated domains, possibly high curvature regions [7]. The ESR data mentioned above, together with SAXS data [12] and the study of giant vesicles by optical microscopy [13] suggest that DMPG bilayers are perforated along the transition region, explaining the coexistence of gel bilayers patches with micelle like structures, the latter would be along the rim of the pores. This proposal is in accord with the formation of pores in most lipid bilayers, but over a very short interval of temperature, at the gel-fluid transition [14, 15].

Considering that Laurdan fluorescence has been used for detecting phases coexistence in lipid membranes, through the analysis of a parameter called Generalized Polarization [2, 3], this probe seemed appropriate for detecting the possible presence of the two phases over the gel-fluid transition region of DMPG at low ionic strength.

Moreover, the present paper discusses the sensitivity of Laurdan fluorescence to the interaction of DMPG with two cationic peptides: the melanocortin hormone α -MSH (Ac-Ser¹-Tyr²-Ser³-Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂) and the biologically more potent analog [Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH (NDP-MSH) [16–18]. Apart from acting as skin darkening regulator in most vertebrates,

α -MSH is involved in many physiological and neurological processes [19–21]. The hormone and its derivatives are known to interact with receptors at the membrane surface [22], but their biological activity can be modulated by the interaction with membrane lipid domains. Both α -MSH and NDP-MSH were found to interact with DMPG bilayers at low ionic strength, at the highly charged bilayer surface. It was found that the peptide-lipid interaction is primarily electrostatic, but leads to a partial peptide penetration into the lipid bilayers [23–26]. The peptide penetration into the bilayer core was monitored by spin labels intercalated into the bilayer, and by the peptide Trp⁹ fluorescence. It was found that Trp⁹ in the more potent analog, NDP-MSH, is in a somewhat deeper position inside the DMPG bilayer [27]. In the present paper Laurdan fluorescence was used to compare the structural changes produced by these two peptides, α -MSH and NDP-MSH, at the bilayer surface of DMPG membranes in the gel and fluid phases. The data is compared with those yielded by spin labels intercalated into the hydrophobic core of the membrane [27]. As done before [27], results obtained with cholesterol, which is totally inserted into the bilayer, are shown for comparison.

It will be shown here that the analysis of the decomposition into two bands of the Laurdan emission spectrum is more sensitive to bilayer structural changes than the Generalized Polarization parameter. Moreover, it will be shown that the two bands decomposition needs to be done with the spectrum as a function of energy, and not wavelength.

Materials and methods

Materials

DMPG (1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-(1-glycerol)) was purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, USA). Laurdan (2-dimethylamino-6-laur-oilnaftaleno) was from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). α -MSH (Ac-Ser¹-Tyr²-Ser³-Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂), [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH, cholesterol, Hepes (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) and EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Milli-Q Plus water (Millipore), pH~6, was used for buffer preparation.

Sample preparation

A lipid film was formed from a solution of DMPG and Laurdan (0.1 mol% relative to lipid concentration) in chloroform. When used, cholesterol was added to the chloroform solution (30 mol% relative to lipid concentra-

tion). Chloroform was evaporated under a stream of N_2 , and the sample left under reduced pressure for a minimum of 2 h, to remove all traces of organic solvent. Vesicles were prepared by the addition of the 10 mM Hepes solution with 1 mM EDTA, pH 7.4, to a final lipid concentration of 1 mM (low ionic strength samples). After hydration, the sample was vortexed for ~2 min, and extruded 10 times through polycarbonate filters (100 nm pore) at a temperature above the lipid phase transition, to yield large unilamellar vesicles. For the high salt concentration samples (high ionic strength samples), 500 mM NaCl was added to the buffer solution, before lipid hydration. Peptides, when used, were also added to the buffer before lipid film hydration, at 10 or 20 mol% relative to lipid concentration.

Fluorescence measurements

Samples were placed in quartz cuvettes with 2 mm optical pathway. The excitation and emission spectra were measured with a Fluorolog 3 Jobin YvonSPEX, model FL3-11, equipped with a xenon lamp, with 1.5 nm wide bandpass. The excitation spectra were corrected with a quantum counter (Rhodamine B in 3 mg/mL ethylene glycol). The temperature was controlled with a thermal bath model Julabo HP 25, and was measured by a digital thermometer in the sample. The emission spectra were obtained with the excitation wavelength at 340 nm. The steady-state anisotropy, r , is given by

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

where I_{VV} and I_{VH} are the intensities with the excitation polarizer on vertical position, and the emission polarizer at vertical and horizontal position, respectively, and G represents the ratio of the sensitivity of the system for vertically and horizontally polarized light [28]. The anisotropy measurements were done using the same equipment with automated polarizers in front of the excitation and emission light. The excitation wavelength was 340 nm and the emission was measured at 430 nm and 480 nm.

The presence of tryptophan (Trp), a fluorescent residue of α -MSH and NDP- α -MSH, did not alter the Laurdan emission spectra profile (Trp has maximal excitation at 296 nm [27]). Emission spectra were decomposed into two Gaussian bands, using the software *Origin 6.1*. When necessary, the fluorescence spectrum was transformed from wavelength to energy, and the intensity multiplied by λ^2 taking into account that the spectrum is recorded with constant wavelength resolution, not energy [28].

The Generalized Polarization (GP_{exc}) was calculated by [2, 3]:

$$GP_{exc} = \frac{(I_{440} - I_{490})}{(I_{440} + I_{490})}$$

where I_{440} and I_{490} are the fluorescence emission intensities at 440 and 490 nm, respectively. When indicated (Fig. 3), GP_{exc} was calculated as a function of the excitation wavelength, by directly subtracting the two excitation spectra obtained with the emission wavelength at 440 nm and at 490 nm.

Results and discussion

Laurdan in DMPG bilayers at low and high ionic strength

Figure 1 shows typical fluorescence emission spectra of Laurdan in 1 mM DMPG dispersion at low ionic strength (see Material and methods), at different temperatures. As observed for Laurdan incorporated in other lipids, its emission spectra is extremely sensitive to temperature, changing from a spectrum centered around 430 nm, in the lipid gel phase, to a wide band centered around 480 nm when the lipid is in the fluid phase [2, 3, 5]. (The present paper will not focus on the lipid pre-transition, centered around 11 °C for DMPG [7]. Hence, the lipid gel and ripple phases, present at temperatures below the lipid gel-fluid main transition, will be generally called “gel phase”).

The temperature dependence of the fluorescent spectra of Laurdan incorporated in DMPG at low and high ionic strength (see “Materials and methods”) was analyzed as it

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of Laurdan in DMPG bilayers at low ionic strength, at different temperatures (°C). λ_{exc} =340 nm

usually is, using the GP_{exc} [2, 3], (see “Materials and methods”). Figure 2 shows that this parameter is unable of detecting the known large difference between the temperature transition profile of the two DMPG dispersions, at low and high salt (see, for instance, [7, 8]). Moreover, considering that $GP_{exc}(\lambda_{exc})$ has been largely used for the discussion of phases coexistence in lipid dispersions [2, 3], and the proposed coexistence of domains with different packing structures over a large interval of temperature (17–35 °C) for DMPG at low ionic strength [7, 8], GP_{exc} values were calculated for all temperatures, as a function of the excitation wavelength (see “Materials and methods”). Figure 3 shows the dependence of GP_{exc} with λ_{exc} , for DMPG at low salt. Three different samples were analyzed, and the results were rather reproducible. It can be clearly seen that GP_{exc} does not vary with λ_{exc} up to around 25 °C. At and above 30 °C, GP_{exc} decreases with λ_{exc} . Taking into account the usual analysis of GP_{exc} [2, 3], the bilayer would be in the gel phase up to around 25 °C (no GP_{exc} variation with λ_{exc}), and in the fluid state above that temperature (a decrease of GP_{exc} with λ_{exc}). However, this analysis is not in accord with DSC, ESR, and other techniques [9, 13, 29, 30], as mentioned above.

Hence, as the GP_{exc} analysis did not seem to be sensitive to the complex structure of DMPG bilayers, we decided to analyze the Laurdan fluorescent spectrum through the decomposition of the spectrum into two bands, as discussed before [5]. This has the advantage over the GP_{exc} calculation of clearly separate the fluorescence emission of the two different excited states of Laurdan. Different

Fig. 2 Excitation GP as a function of the temperature for Laurdan in DMPG bilayers at low ($\square$) and high ($\circ$) ionic strength. The data are mean values of two different samples, and the uncertainties are the standard deviations, not shown if they are smaller than the symbols. $\lambda_{exc}=340$ nm

Fig. 3 Excitation GP as a function of the excitation wavelength, for Laurdan in DMPG at low ionic strength. The full lines from *top* to *bottom* correspond to temperatures 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, and 60 °C, respectively. The dashed lines are lines of constant GP_{exc} , drawn just for helping the visualization of GP_{exc} variation with λ_{exc} .

from the previous work [5], we would like to discuss here the importance of making the analysis with the spectrum as a function of energy, and not wavelength. Figures 4a and b show the spectrum decomposition into Gaussian bands as a function of energy and wavelength, respectively. It can be clearly seen that the relative percentage of the bands are different in the two cases: for the lower energy band we have 80 % for the decomposition in energy and 90 % for the decomposition in wavelength. Hence, in the present paper all the decompositions were performed with the emission spectra in energy, as, theoretically, this is the correct way of decomposing a spectrum into different emission bands. From now on, the bands will be named shorter and longer wavelength bands, as they are known in the literature, corresponding to the bands with higher and lower energy, respectively, in the spectra decomposition.

The spectra for all temperatures could be well decomposed into two Gaussians, ($\chi^2 \sim 1.00$). Figure 5a shows the variation of the longer wavelength area fraction with temperature, for DMPG at low and high ionic strength. The centers of the two Gaussian lines were found to vary from 438 to 430 nm (2.84 to 2.89 eV) and 463 to 493 nm (2.68 to 2.52 eV) for the shorter and longer wavelength bands, respectively, as the temperature increases from 10 to 60 °C, for all samples studied here. As observed before [5], the fraction of the longer wavelength band is higher in the lipid fluid phase as compared with the gel phase (Fig. 5a).

Fig. 4 A typical decomposition of Laurdan emission spectrum into two Gaussian lines, in energy and in wavelength, for 1 mM DMPG vesicles at 45 °C. λ_{exc} =340 nm

This longer wavelength band has been attributed to the fluorescence emission from a more relaxed Laurdan excited state, which would be favored by a looser and/or more hydrated micro-environment [4, 5]. However, it is important to have in mind that even in the rigid lipid gel phase, the contribution of this band for Laurdan spectrum in DMPG is around 0.5–0.6 (Fig. 5a), showing that half of the emission energy comes from the so called relaxed excited state. Similar result was obtained with DPPG [5]. (The presence of more than one Laurdan excited state in lipid gel phase was found before [31] and confirmed by us (Vequi-Suplicy et al., unpublished results))

In contrast to the GP_{exc} analysis, here there is a clear difference in the relative areas of the two Laurdan fluorescent bands over the lipid transition region for the

Fig. 5 **a** Temperature variation of the area fraction of the Laurdan emission component at lower energy (longer wavelength, ~480 nm), for DMPG at low ($\square$) and high ($\circ$) ionic strength (see “Material and methods”). **b** Laurdan fluorescence anisotropy at 430 nm (*open symbols*) and 480 nm (*full symbols*), for DMPG at low ($\blacksquare$ and $\square$) and high ($\bullet$ and $\circ$) ionic strength. The data are mean values of at least three different samples, and the uncertainties are the standard deviations, not shown if they are smaller than the symbols. λ_{exc} =340 nm

two systems studied, namely DMPG at low and high ionic strength. Hence, even at a bilayer shallow position where Laurdan is considered to reside [5], the fluorophore detects the anomalous gel-fluid transition region of DMPG at low salt.

For the high ionic strength DMPG sample, there is a sharp increase on the fraction of the longer wavelength band between 20–25 °C (Fig. 5a), following the lipid gel-fluid transition temperature (T_m ~23 °C). However, though difficult to explain, there is a small but significant decrease

on the fraction of the longer wavelength band from 25 to 30 °C. The result obtained with DMPG at low salt is rather interesting, as the fraction of the Laurdan longer wavelength band slightly decreases up to 20 °C, increasing from 25 °C upwards. This is curious, because DSC indicates that the gel-fluid transition of low ionic strength DMPG starts around 17 °C going up to 35 °C [7–9, 29]. Moreover, ESR of spin labels indicates the coexistence of phases with different packing along this transition region (17–35 °C) [7], one of them being rather loose and hydrated. Hence, the difference observed with Laurdan in low and high ionic strength DMPG dispersions (Fig. 5a) indicates that Laurdan fluorescence is sensitive to the anomalous gel-fluid transition region present at low ionic strength DMPG, but the interpretation of the data is rather complex, and requires a better understanding of the origin of the two emitting states of Laurdan.

In the lipid fluid phase (35 to 60 °C), the Laurdan fluorescence is very similar for both systems, with DMPG at low and high salt presenting similar spectra decomposition (Fig. 5a). The similarity between these two systems, concerning the lipid bilayer structure and polarity in the fluid phase, was also observed with spin labels intercalated into the bilayers [27]. It is interesting to note that, for DMPG fluid phase, the contribution of the longer wavelength band increases with temperature, at least up to 60 °C, as measured here. At 60 °C, the fraction of the shorter wavelength band is still 0.15 of the total Laurdan fluorescent spectrum (Fig. 5a), although this band has been frequently attributed to the gel phase only [2, 3].

Considering that the Gaussian lines were somehow centered around 430 nm (2.84 eV) and 480 nm (2.54 eV) for all temperatures, the fluorescence anisotropy of Laurdan was measured at those two wavelengths (Fig. 5b). Like Laurdan in DPPG [5], the measured fluorescence anisotropy at the two wavelengths are rather similar for DMPG gel phase, but for the fluid phase the Laurdan anisotropy is much higher at 430 than at 480 nm. It is important to have in mind that the measured anisotropy at 480 nm is almost completely due to the longer wavelength emission band, as the contribution of this band at 480 nm was found to be around (95±5) %, for all temperatures studied. At 430 nm, the anisotropy is mostly due to the shorter wavelength band, (70±5) %, but not entirely. As discussed before [5], the much higher anisotropy observed for the shorter wavelength band (at 430 nm) for Laurdan in the lipid fluid phase could possibly be related to the shorter lifetime of the excited state associated to this emission, but needs further investigation.

As expected, the Laurdan fluorescence anisotropy decreases as a function of temperature, monitoring the lipid gel-fluid transition, consistent with a looser fluid bilayer surface. Laurdan anisotropy also indicates a sharper gel-

fluid transition for DMPG at high ionic strength as compared to DMPG at low salt, as found with other techniques [7–9, 29].

Lets focus on the Laurdan anisotropy at 480 nm (Fig. 5b), which is mostly due to the longer wavelength band, and compare its temperature dependence with that of the fraction area of this band (Fig. 5a). Similar to the results obtained with the Laurdan emission band decomposition, for the fluid phase of DMPG (35 to 60 °C), Laurdan fluorescence anisotropy is rather similar when incorporated in high and low ionic DMPG bilayers, confirming the similar bilayer packing and hydration for the two DMPG systems. However, considering the saturating effect on Laurdan anisotropy as temperature increases (Fig. 5b), and the steep increase on the relative area of the longer wavelength band (Fig. 5a), it seems that the packing of DMPG bilayer surface does not change much for temperatures above 45 °C, whereas the bilayer hydration keeps increasing (Fig. 5a).

At low temperatures, from 10 to 20 °C, Laurdan fluorescence anisotropy presents a small decrease with temperature (Fig. 5b), for both high and low ionic DMPG samples, indicating an small increase in average bilayer fluidity with temperature (the data are rather reliable, as the values are mean values of three different samples, and the standard deviations are not shown because they are smaller than the symbols). These results should be compared with those obtained with Laurdan spectrum decomposition (Fig. 5a), which indicated a decrease on the fraction of the longer wavelength band from 10 to 20 °C (low ionic strength DMPG) or 10 to 15 °C (high ionic strength DMPG). Hence, it is clear that the two parameters (Figs 5a and b) give complementary information about the lipid bilayer surface: as the decrease in fluorescence anisotropy indicates that Laurdan is monitoring, in average, a less packed bilayer surface as temperature increases from 10 to 20 °C, the decrease on the fraction of Laurdan longer wavelength band seems to be solely related to a decrease on bilayer surface hydration.

Though a rationalization about possible structures of DMPG aggregates at low ionic strength is out of the scope of the present work (see, for instance, [11, 13]), the data presented here will have to be taken into account for further discussions about this peculiar lipid system. Due to the complexity of the system, results obtained with Laurdan fluorescence emission need to be compared with data from other techniques (Lamy et al., in preparation)

Laurdan in DMPG bilayers in the presence of cationic peptides and cholesterol

In this section we will apply the methodology presented above on the discussion of the modifications on Laurdan

fluorescence spectrum due to the interaction of two cationic melanotropic peptides, α -MSH and the more potent analogue, NDP- α -MSH, with low ionic strength DMPG bilayers. DMPG has to be used at low salt concentration otherwise the cationic peptide–anionic lipid interaction is not observed [23, 25]. It was found that the peptides reside at the bilayer surface, but partially penetrate the membrane [23–27]. Results obtained with cholesterol, which is totally incorporated into the bilayer, are shown for comparison. The information yielded by Laurdan fluorescence will be compared with the results obtained with spin labels inside the DMPG bilayer (at the bilayer core and at the 5th C-atom position [27]), regarding α -MSH and cholesterol interaction with DMPG bilayers.

Figure 6 shows that the Laurdan emission spectra is sensitive to the interaction of DMPG with α -MSH (20 mol %), NDP- α -MSH (20 mol %), and cholesterol (30 mol %), at different temperatures. As analyzed for pure DMPG samples, the spectra as a function of energy could be well decomposed into two Gaussian lines, at all temperatures ($\chi^2 \sim 1.00$). The temperature dependence of the fraction of the longer wavelength emission band for Laurdan incorporated in pure DMPG bilayer, and in DMPG bilayers in the presence of α -MSH, NDP- α -MSH, and cholesterol are shown in Fig. 7a. As expected from the changes on the shape of the Laurdan emission spectra (Fig. 6), the spectrum decomposition is dependent on the presence of the cationic peptides and cholesterol. The results related to the Laurdan fluorescence band decomposition will be discussed together with Laurdan emission anisotropy at 480 nm (Fig. 7b), which corresponds to the anisotropy of the longer wavelength emission band, as discussed before.

Considering the complexity of the gel–fluid transition region of DMPG (17 to 35 °C), and the present controversy about the structure of the bilayer along this temperature range [11, 13], alterations on the Laurdan fluorescence emission caused by the interacting molecules on DMPG bilayers over this temperature interval will not be discussed here, but will be the subject of future studies, together with other spectroscopic techniques. In the present paper, we focus on the alterations caused by the cationic peptides, and cholesterol, on the Laurdan spectra when the probe is incorporated in the gel (10–15 °C) and fluid (40–60 °C) phases of DMPG bilayers.

Focusing on the fluid phase of DMPG bilayers (at and above 40 °C), the increase on the fluorescence anisotropy of Laurdan in DMPG bilayers with NDP- α -MSH and cholesterol indicates an increase on the bilayer packing/order at the bilayer surface, monitored by Laurdan. Clearly, cholesterol is much more effective in increasing the bilayer surface packing than the peptides (higher anisotropy). Different from NDP- α -MSH, the hormone α -MSH does not change the DMPG membrane packing at the bilayer

Fig. 6 Typical fluorescence emission spectra of Laurdan in low ionic strength DMPG (—), and in the presence of 20 mol% of α -MSH (---), 20 mol% of NDP- α -MSH (···) and 30 mol% of cholesterol (-·-·-), at 10, 25 and 50 °C. $\lambda_{\text{exc}}=340$ nm

Fig. 7 **a** Temperature variation of the area fraction of the Laurdan emission component at lower energy (longer wavelength, ~ 480 nm), for DMPG at low ionic strength ($\blacksquare$), and in the presence of 20 mol% of α -MSH (Δ), 20 mol% of NDP- α -MSH ($\circ$) and 30 mol% of cholesterol (ψ). **b** Laurdan fluorescence anisotropy measured at $\lambda_{em} = 480$ nm (same symbols as in (a)). The data are mean values of at least three different samples, and the uncertainties are the standard deviations, not shown if they are smaller than the symbols. $\lambda_{exc} = 340$ nm

surface. But spin labels localized at the 5th C-atom and at the bilayer core indicated that both cholesterol and α -MSH increase the packing of fluid DMPG hydrocarbon chains [27].

The Laurdan anisotropy results discussed above (at and above 40 °C) for DMPG membranes with and without peptides and cholesterol can be compared with the calculated area of the longer wavelength Laurdan emission band in the same conditions (Fig. 7a). Clearly, the two peptides and cholesterol decrease the fraction of the longer wavelength band, with cholesterol yielding a stronger effect. Considering that this longer wavelength emission band has been associated with Laurdan in a looser and/or

more hydrated environment, it can be said that cholesterol clearly increases the packing of the DMPG bilayer surface and/or decreases the bilayer hydration (increases Laurdan fluorescence anisotropy and decreases the fraction of the longer wavelength band). Though not inside the membrane, but at the bilayer surface, NDP- α -MSH also increases the packing of the bilayer (increases the Laurdan fluorescence anisotropy), and decreases the fraction of the Laurdan longer wavelength band emission (Fig. 7a). Considering that α -MSH does not change the Laurdan emission anisotropy (Fig. 7b), but significantly decreases the Laurdan longer wavelength band emission (Fig. 7a), it can be concluded that the presence of the hormone at the DMPG bilayer surface decreases the hydration of Laurdan without much changing the bilayer surface packing. Interestingly, this is an effect quite different from that observed with spin labels at the 5th carbon atom position, or at the bilayer core: the hormone was found to increase the bilayer packing and increase the bilayer hydration at the micro-environment monitored by the labels [27]. Hence, it seems that the presence of α -MSH at the bilayer surface of DMPG pushes the water molecules from the bilayer surface to the bilayer core.

On DMPG gel phase, at 10 and 15 °C, it is interesting to see that the known fluidizing effect of cholesterol (for instance, see [32]) can be well detected through the decrease of the Laurdan emission anisotropy (Fig. 7b). However, the percentage of the longer wavelength Laurdan emission band is not changed with the presence of cholesterol, indicating a similar water environment for Laurdan (Fig. 7a). Considering the decrease on Laurdan fluorescence anisotropy, the two peptides, the hormone α -MSH and its more potent analogue NDP- α -MSH, similarly disturb the structure of the membrane gel phase, increasing the bilayer surface fluidity (Fig. 7b). Interestingly, the peptides are more effective in decreasing the gel bilayer surface packing than cholesterol. Similar to cholesterol, the presence of α -MSH does not alter the Laurdan spectrum decomposition (Fig. 7a). Hence, though the hormone decreases the DMPG gel phase packing it does not seem to alter the bilayer surface water distribution. Only with NDP- α -MSH at 15 °C, the effect of increasing the fraction of the longer wavelength emission band (related to the more relaxed Laurdan excited state) is observed.

Conclusions

In the present paper we discuss the decomposition of the Laurdan fluorescent spectrum into two Gaussian bands, and we show that this decomposition should be done with the spectrum as a function of energy, and not wavelength. This methodology has the advantage over the calculation of the

Excitation Generalized Polarization, GP_{exc} , by clearly separating the fluorescence emission of the two different excited states of Laurdan. We present here an example with DMPG at low and high ionic strength, where this methodology was found to be better for detecting alterations on bilayer structure and/or polarity than the calculation of GP_{exc} : even at a bilayer shallow position, Laurdan can detect the anomalous gel-fluid transition region of DMPG at low salt. Though the interpretation of the data is rather complex, it could be clearly seen that Laurdan anisotropy and Laurdan spectra decomposition give complementary information.

The presence of the two emission bands in Laurdan spectrum should also be considered in the calculation of the fluorescence anisotropy. At 480 nm the fluorescence anisotropy measures the anisotropy of the fluorescence emission from the more relaxed excited state only, but at 430 nm the fluorescence anisotropy measures the anisotropy of the emission from the two excited states. It is important to have in mind that the origin of the two emission bands of Laurdan and Prodan, when incorporated into lipid bilayers, is still not well understood. They can be related to two different excited states of the molecule in a certain microenvironment, but they could also be related to different populations of the fluorophore, positioned at two different regions of the membrane [33–35], which would differently favor the more relaxed or the less relaxed excited state.

In a fluid bilayer (DMPG above 40 °C), Laurdan fluorescence, through the analysis of both the spectrum decomposition and anisotropy, could detect that the hormone α -MSH does not alter the bilayer surface packing, but significantly decreases the surface hydration. Comparatively, the more potent analog NDP- α -MSH was found to increase the surface packing and, possibly, also decrease the surface hydration. The surface rigidifying effect of NDP- α -MSH could be related to its somewhat more rigid structure as compared to that of the hormone [36, 37]. The presence of the two peptides at the bilayer surface clearly decreases the packing of the highly ordered gel bilayer surface (DMPG at 10–15 °C, Fig. 7b). However, the expected increase on the fraction of the longer wavelength band, which is associated to an emission from a more relaxed excited state, is not observed for all temperatures. The above information may be important for future melanotropin analogs design. However, a better understanding of the origin of the two populations present in Laurdan emission spectra is still necessary, and would strongly contribute to disentangle the effect of the two peptides on the lipid bilayer surface.

Acknowledgements This work was supported by USP, FAPESP and CNPq. Fellowships for A. D. L. (CNPq), C.C.V.S. (FAPESP) and M.T. L. (CNPq, research) are acknowledged.

References

- Weber G, Farris FJ (1979) Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene. *Biochemistry* 18(14):3075–3078
- Parasassi T, De Stasio G, D'ubaldo A, Gratton E (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys J* 57(6):1179–1186
- Parasassi T, De Stasio G, Ravagnan G, Rusch RM, Gratton E (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J* 60(1):179–189
- Bagatolli LA, Gratton E, Fidelio GD (1998) Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence. *Biophys J* 75(1):331–341
- De Vequi-Suplicy CC, Benatti CR, Lamy MT (2006) Laurdan in fluid bilayers: position and structural sensitivity. *J Fluoresc* 16(3):431–439
- Harris FM, Best KB, Bell JD (2002) Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta* 1565(1):123–128
- Lamy-Freund MT, Riske KA (2003) The peculiar thermostructural behavior of the anionic lipid DMPG. *Chem Phys Lipids* 122(1–2):19–32
- Epand RM, Hui SW (1986) Effect of electrostatic repulsion on the morphology and thermotropic transitions of anionic phospholipids. *FEBS Lett* 209(2):257–260
- Heimburg T, Biltonen RL (1994) Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome-C. *Biochemistry* 33(32):9477–9488
- Riske KA, Politi MJ, Reed WF, Lamyfreund MT (1997) Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions. *Chem Phys Lipids* 89(1):31–44
- Schneider MF, Marsh D, Jahn W, Kloesgen B, Heimburg T (1999) Network formation of lipid membranes: triggering structural transitions by chain melting. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(25):14312–14317
- Riske KA, Amaral LQ, Dobereiner HG, Lamy MT (2004) Mesoscopic structure in the chain-melting regime of anionic phospholipid vesicles: DMPG. *Biophys J* 86(6):3722–3733
- Riske KA, Amaral LQ, Lamy MT (2009) Extensive bilayer perforation coupled with the phase transition region of an anionic phospholipid. *Langmuir* 25(17):10083–10091
- Nagle JF, Scott HL Jr (1978) Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers. Theory of membrane permeability. *Biochim Biophys Acta* 513(2):236–243
- Antonov VF, Petrov VV, Molnar AA, Predvoditelev DA, Ivanov AS (1980) Appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer-membranes at the phase-transition temperature. *Nature* 283(5747):585–586
- Castrucci AM, Hadley ME, Sawyer TK, Wilkes BC, Al-Obeidi F, Staples DJ, De Vaux AE, Dym O, Hintz MF, Riehm JP, Al E (1989) Alpha-melanotropin: the minimal active sequence in the lizard skin bioassay. *Gen Comp Endocrinol* 73(1):157–163
- Hadley ME, Sharma SD, Hraby VJ, Levine N, Dorr RT (1993) Melanotropic peptides for therapeutic and cosmetic tanning of the skin. *Ann N Y Acad Sci* 680:424–439
- Hadley ME, Hraby VJ, Jiang J, Sharma SD, Fink JL, Haskell-Luevano C, Bentley DL, Al-Obeidi F, Sawyer TK (1996) Melanocortin receptors: identification and characterization by melanotropic peptide agonists and antagonists. *Pigment Cell Res* 9(5):213–234
- Oprica M, Forslin Aronsson A, Post C, Eriksson C, Ahlenius S, Popescu LM, Schultzberg M (2002) Effects of alpha-MSH on

- kainic acid induced changes in core temperature in rats. *Peptides* 23(1):143–149
20. Zhong Y, Bellamkonda RV (2005) Controlled release of anti-inflammatory agent alpha-MSH from neural implants. *J Control Release* 106(3):309–318
 21. Humphreys MH (2007) Cardiovascular and renal actions of melanocyte-stimulating hormone peptides. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16(1):32–38
 22. Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 51:287–317 discussion 318
 23. Ito AS, Castrucci AM, Hruby VJ, Hadley ME, Krajcarski DT, Szabo AG (1993) Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry* 32(45):12264–12272
 24. Macedo ZS, Furquim TA, Ito AS (1996) Estimation of average depth of penetration of melanotropins in dimyristoylphosphatidylglycerol vesicles. *Biophys Chem* 59(1–2):193–202
 25. Biaggi MH, Pinheiro TJ, Watts A, Lamy-Freund MT (1996) Spin label and 2H-NMR studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers. *Eur Biophys J* 24(4):251–259
 26. Biaggi MH, Riske KA, Lamy-Freund MT (1997) Melanotropic peptides-lipid bilayer interaction. Comparison of the hormone alpha-MSH to a biologically more potent analog. *Biophys Chem* 67(1–3):139–149
 27. Fernandez RM, Vieira RFF, Nakaie CR, Ito AS, Lamy MT (2005) Peptide-lipid interaction monitored by spin labeled biologically active melanocortin peptides. *Peptides* 26(10):1825–1834
 28. Lakowicz JR (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum, New York
 29. Salonen IS, Eklund KK, Virtanen JA, Kinnunen PK (1989) Comparison of the effects of NaCl on the thermotropic behaviour of sn-1' and sn-3' stereoisomers of 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 982(2):205–215
 30. Alakoskela JM, Kinnunen PK (2007) Thermal phase behavior of DMPG: the exclusion of continuous network and dense aggregates. *Langmuir* 23(8):4203–4213
 31. Rowe BA, Neal SL (2006) Photokinetic analysis of PRODAN and LAURDAN in large unilamellar vesicles from multivariate frequency-domain fluorescence. *J Phys Chem B* 110(30):15021–15028
 32. Huang TH, Lee CWB, Dasgupta SK, Blume A, Griffin RG (1993) A C-13 and H-2 nuclear-magnetic-resonance study of phosphatidylcholine cholesterol interactions—characterization of liquid-gel phases. *Biochemistry* 32(48):13277–13287
 33. Sachl R, Stepanek M, Prochazka K, Humpolickova J, Hof M (2008) Fluorescence study of the solvation of fluorescent probes prodan and laurdan in poly(epsilon-caprolactone)-block-poly(ethylene oxide) vesicles in aqueous solutions with tetrahydrofuran. *Langmuir* 24(1):288–295
 34. Jurkiewicz P, Olzynska A, Langner M, Hof M (2006) Headgroup hydration and mobility of DOTAP/DOPC bilayers: a fluorescence solvent relaxation study. *Langmuir* 22(21):8741–8749
 35. Klymchenko AS, Duportail G, Demchenko AP, Mely Y (2004) Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers. *Biophys J* 86(5):2929–2941
 36. Prabhu NV, Perkyns JS, Pettitt BM, Hruby VJ (1999) Structure and dynamics of alpha-MSH using DRISM integral equation theory and stochastic dynamics. *Biopolymers* 50(3):255–272
 37. Ito AS, Souza ES, Barbosa SR, Nakaie CR (2001) Fluorescence study of conformational properties of melanotropins labeled with aminobenzoic acid. *Biophys J* 81(2):1180–1189

Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process

Karin A. Riske^{1,*}, Rafael P. Barroso, Cíntia C. Vequi-Suplicy, Renato Germano, Vera B. Henriques, M. Teresa Lamy

Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 66318, CEP 05315-970 São Paulo-SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2008

Received in revised form 3 December 2008

Accepted 19 January 2009

Available online 27 January 2009

Keywords:

Ripple phase

DSC

ESR

Laurdan fluorescence

Statistical model

Monte Carlo simulations

ABSTRACT

We investigate the bilayer pre-transition exhibited by some lipids at temperatures below their main phase transition, and which is generally associated to the formation of periodic ripples in the membrane. Experimentally we focus on the anionic lipid dipalmytoylphosphatidylglycerol (DPPG) at different ionic strengths, and on the neutral lipid dipalmytoylphosphatidylcholine (DPPC). From the analysis of differential scanning calorimetry traces of the two lipids we find that both pre- and main transitions are part of the same melting process. Electron spin resonance of spin labels and excitation generalized polarization of Laurdan reveal the coexistence of gel and fluid domains at temperatures between the pre- and main transitions of both lipids, reinforcing the first finding. Also, the melting process of DPPG at low ionic strength is found to be less cooperative than that of DPPC. From the theoretical side, we introduce a statistical model in which a next-nearest-neighbor competing interaction is added to the usual two-state model. For the first time, modulated phases (ordered and disordered lipids periodically aligned) emerge between the gel and fluid phases as a natural consequence of the competition between lipid–lipid interactions.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The spontaneous self-assembly of lipids into bilayers renders biological membranes their basic lamellar structure. Thus, physico-chemical properties of pure lipid systems have been thoroughly investigated, in order to better understand the structure and features of natural membranes. Special attention has been given to lipid phase transitions, the most well-studied being the gel–fluid transition. This main transition is associated with gauche isomerizations of the acyl chains, which brings the bilayer from an ordered gel to a disordered fluid state. Lipids in biological membranes are mainly in a fluid state, which facilitates lateral mobility and conformational changes of membrane proteins. However, the existence of more ordered domains, such as the so-called rafts, has called the attention to the different membrane packings that might exist in specific regions and could have a biological role [1,2]. Furthermore, some organisms adjust their lipid membrane composition according to the ambient temperature such that their membrane is right above the end of the melting process [3]. Thus, characterization of lipid phases other than the fluid is also biologically relevant.

Some lipids undergo another phase transition below the main one, the so-called pre-transition, in which a flat membrane in the gel phase transforms into a periodically undulated bilayer [4,5]. Although this phase, named ripple phase or P_{β} , has been systematically studied, a complete understating of its origin and molecular details is still lacking. Most studies have been performed on phosphatidylcholines (PCs), a major constituent of mammalian cells, which readily form multilamellae with definite interlayer distance when dispersed in water (for a review see [6]). PCs have a fairly bulky headgroup, creating a size mismatch with its acyl chains, especially below the main phase transition. This is believed to be the reason why the acyl chains are tilted in the gel phase of PCs [6,7]. It has been proposed that the driving force for the ripple formation is also coupled to this size mismatch, with headgroup hydration playing an import role [8,9]. It is not yet established whether the chains remain tilted in the ripple phase [10]. Electron density profiles obtained from small angle X-rays scattering (SAXS) of PCs in the ripple phase show an asymmetric undulation pattern resembling a saw-tooth with wavelength of 120–160 Å, depending on chain length [5,10–12]. Studies of the ripple phase are normally done on multilamellar systems. Some works propose the existence of surface ripples even in unilamellar vesicles [13,14], although the pre-transition is less cooperative in that case [15]. For multilamellar systems, the rippling of the membrane surface is thought to be coupled to interlamellar distance, thus coherently constructing a lattice that can easily be detected with diffraction techniques. On the other hand, the undulations of single bilayers add incoherently, thus making their detection more difficult [13].

* Corresponding author. Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu, 862 7° andar, CEP 04023-062 São Paulo-SP, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4530; fax +55 11 5571 5780

E-mail address: kar@biofis.epm.br (K.A. Riske).

¹ Present address: Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu, 862 7° andar CEP 04023-062, São Paulo-SP, Brazil.

Generally, it is assumed that the lipids in the ripple phase are mainly in an all-*trans* configuration, as in the gel phase [11]. However, many studies point to the existence of fluid regions coupled with the geometry of the ripples. Sun et al. [10] could model their SAXS data better assuming that the ripples were composed of a long saw-tooth arm, with characteristics of a gel bilayer, and a short arm, thinner and less densely packed, more compatible with a fluid bilayer. Changes of bilayer packing along the undulations were also obtained from molecular [16] and dissipative particle dynamics [17] simulations. Experimental evidence of gel-fluid coexistence in the ripple phase was reported from NMR [18], ESR [19] and SAXS/WAXS [20,21] data. Startlingly, even though so many authors have been stressing for decades the existence of fluid lipids coupled to the ripple geometry, this has not yet become an established knowledge.

Apart from PCs, the pre-transition has been detected also for deprotonated phosphatidylglycerols (PGs) [22–24], although no comprehensive study has been performed with PGs yet. The pre-transition has not been systematically observed for other lipids [8]. The bilayer structure of PCs and charged PGs at 100 mM salt of the same acyl chain was shown to be quite similar [22]. Despite the PG headgroup being considerably smaller than the PC headgroup, its charged character could account for an area per headgroup of the same magnitude. However, this is only true at high ionic strength. At low ionic strength, short chain PGs show peculiar properties and thermal behavior [24–29].

Theoretical studies (see [30] for a general review) in terms of simple statistical models have followed mainly two approaches for explaining the ripple phase: (i) *periodic elastic* deformations, mainly due to competition between curvature and tilting of lipids in the *gel* state [9,31–34], although Carlson and Sethna [9] suggested a posteriori that fluid lipids could reside in the packing defects induced by the bilayer corrugation, or (ii) *periodic melting* of the chains, which, due to curvature, might imply periodic mechanical undulations [30]. Heimburg [30] was the first to explicitly couple ripple formation with (periodic) chain melting, and to compare experimental DSC data for the pre- and main transitions to results from model simulation. The first group of models [31–34] yield ripple periods dependent on the relation between curvature and tilting parameters, but do not include melting, whereas Heimburg's model [30] requires *ad hoc* introduction of modulation period.

The purpose of this work is to broaden the experimental and theoretical knowledge on the pre-transition and to further explore the idea of the existence of fluid regions coupled to the ripple phase. Experimentally, we compare dispersions of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) with its charged analog, dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG). Because of the net negative charge of DPPG, different concentrations of salt are used. So far, only high ionic strength conditions (at least 100 mM salt) were investigated. Three experimental techniques

are used: differential scanning calorimetry (DSC), electron spin resonance (ESR) of a phospholipid labeled at the end of the hydrocarbon chain (16-PCSL), and the fluorescence of the hydrophobic probe Laurdan, which is also located within lipid bilayers. ESR has been extensively used to monitor the viscosity and polarity of the micro-environment where the nitroxide is localized (see, for example, [35,36]). With the fluorophore Laurdan, the focus is the study of the excitation generalized polarization (GP_{ex}) [37], which has been extensively used to detect the coexistence of phases in lipid bilayers [37–39]. We introduce an alternative statistical model, inspired on spin models, which presents modulated phases as an *outcome* of the competing interaction. The main phase transition of lipids is generally well-described using a two-state model [40–43], where interactions between nearest-neighbors give rise to a first order transition between gel (ordered) and fluid (disordered) phases. Based on packing mismatch between heads and tails, we put forward a generalization of this two-state model, where an additional interaction, which favors next-nearest-neighbor pairs in different states, competes with the usual interaction, which prefers adjacent lipids in the same state. The competing interaction yields periodicity. The experimental and simulation results are discussed in terms of the pre-transition being coupled to a periodic lipid melting, associated to the whole acyl chain melting process.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The sodium salt of the phospholipid DPPG (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)]), DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine) and the spin label 16-PCSL (1-palmitoyl-2-(5-, 14- or 16-doxyl stearoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocoline) were purchased from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). Laurdan (2-dimethylamino-6-lauroyl-naphthalene) is from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). The buffer system used was 10 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) adjusted with NaOH to pH 7.4. Mille-Q Plus water (Millipore) was used throughout.

2.2. Lipid dispersion preparation

A lipid film was formed from a lipid chloroform solution, dried under a stream of N_2 and left under reduced pressure for about 2 h, to remove all traces of the organic solvent. Vesicles were prepared by addition of 10 mM Hepes pH 7.4 with the desired salt concentration, followed by vigorous vortexing above T_m . For the ESR measurements 0.2 mol% 16-PCSL and for the fluorescence measurements 0.1 mol% Laurdan was added to the chloroform lipid solution. At this lipid/spin

Fig. 1. (a) Raw DSC data of 10 mM DPPC and of a buffer-buffer scan. The insert shows a magnification of the data. Scanrate was 10 °C/h (heating). (b) Magnification of the data after subtraction of the buffer–buffer scan and normalization due to the lipid concentration. The line below shows a baseline created manually. (c) Final curve, which is a result of the subtraction of the baseline shown in b).

label ratio no spin exchange linewidth broadening occurred. For the fluorescence measurements, the lipid dispersion was extruded through polycarbonate filters with pores of 100 nm to yield large unilamellar vesicles [44], in order to decrease sample turbidity.

2.3. Differential scanning calorimetry

The calorimetric data were carried out in a Microcalorimeter Microcal VP-DSC at a scan rate of 10 °C/h (heating). The thermal profile obtained for DPPC and DPPG at high ionic strength were independent of the scan rate, below 30 °C/h. On the other hand, the profile of DPPG at low ionic strength (with and without 2 mM NaCl) changed slightly with all the scan rates tested (down to 5 °C/h), but within the range of variation found for a series of consecutive scans with the same rate. Fig. 1 shows the sequence of data treatment performed on a typical scan. Data analysis was done using the Microcal Origin software with the additional device for DSC data analysis provided by Microcal: the buffer–buffer scan (shown in Fig. 1a) was subtracted from the raw data, and the resultant curve was then normalized for the lipid concentration (Fig. 1b). Afterwards a baseline was manually created (Fig. 1b) and subtracted, yielding the excess heat capacity ΔC_p (Fig. 1c). The results shown in Fig. 2 are the final results of the same data treatment done on all curves.

2.4. ESR spectroscopy

ESR measurements at X-band (9.4 GHz frequency) were performed with a Bruker EMX spectrometer. Magnetic field modulation amplitude of 1 G and a microwave power of 5 mW were used. The temperature was controlled with a Bruker BVT-2000 variable temperature controller, and monitored with a Fluke 51 K/J thermometer. The ESR spectra of 0.2 mol% 16-PCSL incorporated in DPPC and DPPG were repeated at least twice with samples prepared at different times and the different experiments were compatible. The ESR spectra shown in Figs. 3 and 4 are the best of these experiments. Spectral subtractions were done using the WINEPR software (Bruker).

2.5. Fluorescence spectroscopy

The samples were placed in a quartz cuvette, with an optical path of 2 mm. Spectra were measured with a Fluorolog 3 Jobin YvonSPEX, model FL3-11, equipped with a xenon lamp using a 1.5 nm wide bandpass. The excitation spectra were corrected with a quantum counter (Rhodamine B in 3 mg/mL ethylene glycol). Temperature was controlled with a thermal bath Julabo HP 25 and was directly measured in the sample with a digital thermocouple. Excitation spectra were obtained with the emission wavelengths (λ_{em}) at 440 and 490 nm. From these spectra, the excitation generalized polarization (GP_{ex}) as a function of the excitation wavelength (λ_{ex}) was calculated for each temperature according to [37,45]:

$$GP_{ex}(\lambda_{ex}) = \frac{(I_{440} - I_{490})}{(I_{440} + I_{490})} \quad (1)$$

where I_{440} and I_{490} are the fluorescence intensities at 440 and 490 nm, respectively, at a fixed value of λ_{ex} . Lipid concentration was 1 mM, to reduce light scattering interferences on the fluorescence measurements. DSC thermal profiles of 1 and 10 mM DPPG and DPPC were found to be very similar. To better analyze the dependence of GP_{ex} with λ_{ex} , linear fittings were performed, $GP_{ex} = \alpha \lambda_{ex} + b$, and the slopes α plotted.

3. Results and discussions

3.1. Differential scanning calorimetry

Lipid phase transitions are accompanied by peaks in the heat capacity profile, and can thus be detected with differential scanning

Fig. 2. (a) Excess heat capacities (ΔC_p) of 10 mM DPPG in 10 mM Hepes pH 7.4 without and with 2 and 100 mM NaCl, and 10 mM DPPC in 10 mM Hepes pH 7.4. The DPPG in Hepes curve was multiplied by 5. Scans were shifted for clarity. The light curves above each line (below T_m) are 5 $\times$ magnifications of the correspondent curve below. Scanrate was 10 °C/h (heating). (b) Fraction of fluid lipids calculated as the integral of the ΔC_p curves and normalized by the total enthalpy change ΔH for DPPG in Hepes (light line), +2 mM NaCl (dots), +100 mM NaCl (dashes) and DPPC in Hepes (bold line). Each curve is an average over at least two scans of different samples. The estimated error is around 10% for DPPC and DPPG at high ionic strength and 30% for DPPG at low ionic strength, due to differences among samples. (c) Detail of the pre-transition region of part b).

calorimetry (DSC), which measures the heat capacity at constant pressure as a function of temperature. The lipid main phase transition, also called gel–fluid phase transition, generally gives rise to a very intense and sharp peak of heat capacity. On the other hand, the pre-transition is usually detected as a much less intense and broader peak at lower temperatures. Fig. 2a shows excess heat capacity (ΔC_p) profiles obtained for DPPG, at different concentrations of salt, and for DPPC. PGs and PCs with the same acyl chains are known to exhibit

similar thermal behavior [22]. However, this applies to deprotonated PG in a certain ionic strength range, because of the charge character of its headgroup. Accordingly, dispersions of DPPG in the presence of 100 mM NaCl display a heat capacity profile similar to that of DPPC, as can be seen in Fig. 2a. The very sharp and intense peaks at $T_m = 41^\circ\text{C}$ (DPPC) and 40°C (DPPG in 100 mM NaCl) correspond to the main transition. The broader and less intense peaks at $T_p = 33.5^\circ\text{C}$ (DPPC) and 30.8°C (DPPG in 100 mM NaCl) are related to the pre-transition. For both DPPC and DPPG at high ionic strength, the whole ΔC_p profile was quite reproducible among different samples, with only minor shifts in T_m and/or T_p .

At lower concentration of salt (2 mM NaCl), the main transition of DPPG becomes somewhat broader and the transition temperature shows a minor shift to $T_m = 39.7^\circ\text{C}$. An increase in T_m with the concentration of salt is expected to happen for charged lipids, due to stabilization of the gel phase as a result of headgroup charge screening [46]. The pre-transition is also present for DPPG in 2 mM NaCl, although its ΔC_p profile is more complex; see Fig. 2a. A maximum in ΔC_p is detected around $T_p \sim 35^\circ\text{C}$, but the peak is broad and asymmetric. Furthermore, a very broad peak appears at lower temperatures (starting around 20°C), which might be already connected to the pre-transition. Comparison of thermograms obtained with different preparations (data not shown) shows that the position and profile of the pre-transition peak is sample-dependent, its maximum lying around $32\text{--}35^\circ\text{C}$. The location of additional lower temperature broad peaks also depends on preparation. On the other hand, the intense T_m peak is very reproducible among different preparations. The thermogram obtained for DPPG in the absence of salt (in Hepes buffer) is even more complex, as even the main transition peak is no longer a single event. The T_m peak splits into two (39.3 and 40.1°C) and the overall width is larger, as compared to the higher ionic strength condition (note that ΔC_p is multiplied by five). The exact position and proportion of these two peaks differed to some extent among different samples. This behavior seems to be reminiscent of the complex melting regime of shorter chain PGs, for which an intermediate phase appears between the gel and fluid phases (for a review see [26]). However, the investigation of this possibility is beyond the purpose of the present work. The pre-transition behaves in quite the same way as with 2 mM NaCl: the peak maximum and profile depends on the preparation, its maximum being around $32\text{--}35^\circ\text{C}$, and lower temperature events start already around 20°C . Here we have interpreted the broad thermal events starting around 20°C as the beginning of the pre-transition event, for reasons that will become clearer with the analysis of the fluorescence data, in a following section.

The integral of the excess heat capacity gives the excess enthalpy change ΔH associated with the transition. The literature values for the enthalpy changes of the pre and the main transition for DPPC and DPPG are around $\Delta H_p = 1$ kcal/mol and $\Delta H_m = 8$ kcal/mol, respectively [15,47]. Our data with DPPC and DPPG agree well with these values. However, the excess heat capacity does not reach the baseline between T_p and T_m , being thus difficult to separate both transition events. As mentioned in the introduction, some researchers claim that the melting process starts already at T_p , and thus both ΔH_p and ΔH_m are parts of one and the same process, namely the melting of the acyl chains [18,21,30]. Our data clearly suggest the same phenomenon, since even for DPPC dispersions ΔC_p does not level off and continually increases between T_p and T_m (see the magnified curves in Fig. 2a). Following this idea, we can estimate the fraction of fluid lipids as a function of temperature by integrating the excess heat capacity profile and normalizing it by the total enthalpy change, as was first introduced by Hinz and Sturtevant [47], followed by Heimburg [15]. We have calculated this fraction for different samples of DPPC and DPPG in the different concentrations of salt studied, and the average curves for each condition are shown in Fig. 2b. The pre-transition region is shown in detail in Fig. 2c.

The details of the temperature dependence of the fluid fraction of the various conditions studied here are different and sample dependence was observed for DPPG at low ionic strength. However, a general trend can be extracted from our DSC data analysis. A first melting event happens coupled to T_p , with associated melting of 5–15% of the lipids, depending on the condition. This event is much cooperative for DPPG at high ionic strength and DPPC and is separated in sequential broad peaks for DPPG at low ionic strength. Between T_p and T_m the fluid population reaches 20% for all conditions. The main transition itself is related to the strong cooperative melting of the remaining 80%. It is interesting to call the attention to this limiting value of 20%, also seen in the data of Heimburg [15]. This might indicate a (geometrical) limiting value for fluid lipids embedded in gel domains.

The pre-transition, and thus the ripple phase, has been generally assumed to be a characteristic of multilamellar structures. However, the fact that the DSC traces of DPPG in 100 mM NaCl and of DPPC are very similar shows that the pre-transition is present also in non-correlated bilayers, as discussed now. From SAXS data [48], DPPG forms unilamellar or uncorrelated lamellae up to 100 mM NaCl. Observation of dispersions of 10 mM DPPG in 100 mM NaCl under an optical microscope revealed the presence of few giant multilamellar vesicles (sizes $\sim 20\ \mu\text{m}$) coexisting with a leading submicroscopic vesicle population (results not shown). Thus, DPPG in 100 mM NaCl is mostly assembled into submicroscopic vesicles, which might be unilamellar or made of uncorrelated lamellae. Very similar SAXS and optical microscopy results were obtained with DMPG (dimirystoylphosphatidylglycerol) [49].

Fig. 3. ESR spectra of 0.2 mol% 16-PCSL incorporated in 10 mM DPPC in 10 mM Hepes pH 7.4 and in 10 mM DPPG in 10 mM Hepes pH 7.4 without and with 2 and 100 mM NaCl at 20°C (below T_p), 35°C and 37°C (between T_p and T_m) and 50°C (above T_m). The spectra were shifted for clarity.

Conversely, only highly dense giant multilamellar vesicles were seen in dispersions of DMPC [49] and DPPC (not shown). We thus conclude that the presence of dominant multilamellar structures is not a pre-requisite for the development of a cooperative pre-transition, since the DSC scans of DPPC and DPPG at high ionic strength are very similar. Thus, the emergence of a ripple phase seems to be dictated by interactions among lipids within a single bilayer. Multilamellae, however, are essential to build up coherence among ripples in different bilayers so that they can be easily detected by diffraction techniques [13].

3.2. Electron spin resonance

Electron spin resonance (ESR) of spin labels incorporated in lipid bilayers is a traditional technique to study membrane packing and viscosity [35,36], because it gives information on the mobility, order and polarity of the probe microenvironment. In this work we used a PC lipid labeled with a nitroxide group at the 16th carbon (16-PCSL), thus at the bilayer center. We chose such position because of its high sensitivity to changes in mobility which takes place at the main transition [27]. Probes closer to the headgroup region are partly immobilized even in the fluid phase, because of the reduced degrees of freedom for that position. On the other hand, probes located at the end of the acyl chain experience much more freedom of movement, and changes along the melting process can be better evaluated. Additionally, this probe has proven to be especially adequate for our purpose in previous studies on dispersions of low ionic strength DMPC, which show an extended melting regime. ESR spectra of 16-PCSL were the only ones that could resolve the presence of two distinct populations [27]. If the probe senses two different microenvironments, its spectrum will be a sum of the two populations if the exchange rate between these different locations is slow in the relevant time scale, set by the microwave frequency (nanoseconds). Moreover, in order to detect these two populations in the composite spectrum, differences in their spectral characteristics are necessary. If the exchange rate between the two populations is fast, their differences will be averaged out.

Fig. 3 shows ESR spectra of 0.2 mol% 16-PCSL incorporated in DPPG and DPPC, in the same conditions as studied with DSC, at four different temperatures: 20 °C (below T_p), 35 and 37 °C (between T_p and T_m) and 50 °C (above T_m). In the fluid phase (50 °C) the spectra obtained with DPPC and DPPG with and without salt are all quite similar, with the high degree of motional averaging expected to happen in a fluid phase, inferred from the sharp linewidths and the relatively symmetric heights. On the other hand, the spectra in the gel phase (20 °C) obtained for DPPG and DPPC show a large extent of spectral anisotropy, characteristic of the low mobility and high order of this phase.

The spectra at 35 and 37 °C (Fig. 3), thus between T_p and T_m , are those we focus in the present work. If we carefully look at the high field line (first line from the right side), we observe that a second peak is present, being more pronounced in DPPC. In DPPG samples it is only a shoulder, and a second peak can also be identified in the low field line (first line from the left side). Yet, this is a reasonable indication of the presence of two populations, a small amount of a more mobile population, together with a predominant gel phase. It is thus tempting to propose that this corresponds to a small fluid population, consistent with the DSC results.

To test the consistency of this hypothesis, we performed spectra subtractions. Spectra obtained in the fluid phase (40 or 42 °C, depending on the condition) were subtracted from spectra at temperatures between T_p and T_m . The percentage of the fluid signal subtracted was varied until the resulting spectrum looked like a one-component signal. Variations on the bilayer packing with temperature in a phase are expected to happen, so the ESR spectrum of a fluid component at 35–37 °C might not be exactly the same as at 40–42 °C. Moreover, lipids located in small fluid regions might experience a slightly different microviscosity than when placed in a complete fluid bilayer. The same reasoning discussed for the fluid phase applies for lipids in the gel phase.

Despite not being able to perform successful subtractions with all spectra between T_p and T_m , the features of these spectra suggested the presence of a small percentage of a more mobile component.

Fig. 4. Examples of 16-PCSL ESR spectra subtraction for DPPG at different salt concentrations and DPPC. For each condition, a certain percentage of a spectrum obtained in the fluid phase (marked with 40 or 42 °C) was subtracted from those obtained in the ripple phase (top spectra at the given temperature). The resultant spectra are shown below (indicated by "sub"). The percentage of each component (2nd and 3rd spectra from the top) in the composite spectra (top spectra) is given in the component spectra. The spectra shown at the bottom are experimental spectra obtained at 30 °C, where most of the lipids are in the gel phase.

Examples of reasonable subtractions are shown in Fig. 4. The spectra obtained from the subtractions were similar to spectra at 30 °C for each system (shown for comparison below each subtraction in Fig. 4). As compared to spectra obtained at 20 °C, thus really in the gel phase (see Fig. 3), spectra at 30 °C indicate a somewhat more mobile environment. In fact, for DPPG at all ionic strengths studied, the bilayer is already experiencing the beginning of the melting process at 30 °C (see Fig. 2). From the double integral of the spectrum we can infer the percentage of each population. The fluid component subtracted accounts for 6–9% of the composite spectrum. From the DSC data we have estimated a fluid population around 10–15% at 35–37 °C (Fig. 2c). The subtraction could only be successfully performed when small amounts of the fluid component were present. This is an indication that the microenvironment sensed by the probe in the fluid regions between T_p and T_m is somewhat different than in a complete fluid phase. From the DSC data, lipid melting can start at temperatures as low as 20 °C for DPPG at low ionic strength. The ESR spectra, however, would not be sensitive to the presence of less than ~5% fluid fraction. Evidences for the existence of a fluid fraction could only be detected above 30 °C.

3.3. Laurdan fluorescence

The fluorescent probe Laurdan has been widely used to study the gel–fluid transition of lipid bilayers, because it is strongly sensitive to the environment where it resides [39,45,50–52]. Laurdan emission spectra can be decomposed into two bands, with their relative percentages being highly dependent on bilayer packing [52]. The excitation generalized polarization, GP_{ex} , measures a normalized intensity ratio between the two emission bands centered around 440 and 490 nm (see Eq. 1 in Material and methods). It has been shown that GP_{ex} is constant for all excitation wavelengths (λ_{ex}) when Laurdan is incorporated in the gel phase, and steadily decreases with λ_{ex} when the bilayer is in the fluid phase. When coexistence of gel and fluid domains is present, GP_{ex} has been shown to linearly increase with λ_{ex} [37,45]. To further test the possible gel–fluid coexistence between the pre- and main transitions, Laurdan was incorporated in DPPC and DPPG in Hepes buffer (the lowest ionic strength condition used in the other experiments), and GP_{ex} was calculated from the probe excitation spectrum.

Fig. 5a shows GP_{ex} as a function of λ_{ex} for DPPC at four different temperatures: below T_p (20 °C), between T_p and T_m (35 °C), at $\sim T_m$ (41 °C), and above T_m (50 °C). Visual inspection of the curves shows that the slopes at 20 and 35 °C are close to zero, at 41 °C the slope is positive and at 50 °C it is negative. However, this does not provide an accurate evaluation of the slopes, although it is the conventional way used in the literature to characterize lipid phases with this probe [38,50,53,54]. To better quantify the slopes of the curves, linear fits were made on the dependence of GP_{ex} on λ_{ex} for DPPC and DPPG at all temperatures. As far as we know, this is the first time these slopes are quantitatively analyzed. The angular coefficients α obtained are plotted as a function of temperature in Fig. 5b. The results shown are averaged values obtained from three different experiments. The quantitative analysis of the GP_{ex} slopes reveals the dependence of the Laurdan emission spectrum on λ_{ex} with a much better accuracy. Clear and reproducible profiles of α as a function of temperature were obtained for DPPG and DPPC. The careful quantitative analysis of the slopes below T_m reveals that at low temperatures (below ~30 °C for DPPC and ~20 °C for DPPG) α is actually slightly negative, but is roughly independent of temperature (see dashed lines in Fig. 5b). Thus, the gel phase can be characterized by constant slopes, though slightly negative [55]. Between the gel and fluid phases, the slope α increased in two steps. For DPPC, a first small increase happened at 32 °C, coupled to T_p , followed by a steady increase up to 37 °C, after which a large increase in α was observed at T_m . For DPPG at low ionic strength, α first steadily increased between 20 °C and

Fig. 5. (a) GP_{ex} as function of the excitation wavelength (λ_{ex}) obtained from the excitation spectra of 0.1 mol% of Laurdan incorporated in 1 mM of DPPC in Hepes buffer, for different temperatures. (b) Temperature dependence of the slope α ($GP_{ex} = \alpha \lambda_{ex} + b$) obtained from linear fits of Laurdan GP_{ex} as a function of λ_{ex} in the region between 370 and 390 nm, where clear linear behavior was observed, for DPPG (○) and DPPC (■). The results are the average of three experiments.

37 °C, and then also showed a pronounced increase at T_m , when positive values were reached. In the fluid phase (above 42 °C), the linear fits yielded clear negative slopes. Therefore, it is possible to conclude that when α starts to increase from the roughly constant gel phase value, the bilayer is no longer in a homogeneous phase, but contains fluid domains. For DPPC, fluid domains appears in a defined step at $T_p = 32$ °C, whereas for DPPG at low ionic strength, it slowly starts to be perceptible around 20 °C. Laurdan fluorescence was also obtained for DPPG in 2 and 100 mM NaCl, the former resembling DPPG in pure Hepes, whereas the latter showed a similar profile to that observed with DPPC (not shown).

In summary, the dependence of α with temperature extracted from the analysis of the Laurdan spectra parallels that of the fluid fraction obtained from the DSC scans of both DPPC and DPPG (see Fig. 2c). Similar to ESR results, Laurdan fluorescence also indicates gel–fluid coexistence coupled to the ripple phase.

Before proceeding to the statistical model, we would like to make a short summary of the experimental section. The excess heat capacity profile of DPPG at all ionic strengths studied and DPPC (Fig. 2) show that T_p and T_m cannot be completely separated, suggesting that both transitions are related to the same physical phenomenon, namely the acyl chain melting, as proposed earlier [30]. Following this idea, we have estimated that 20% of the lipids melt along the ripple phase, starting with a cooperative event at T_p (Fig. 2c). From ESR spectra subtraction and Laurdan fluorescence (Figs. 3–5) we have confirmed that indeed fluid domains are present in the ripple phase for both lipids. On the other hand, comparing the results obtained for DPPG at different ionic strengths, we conclude that the thermal behavior of DPPG is similar to that of the well-studied DPPC only at high ionic strength (100 mM NaCl). At low ionic strength (0 and 2 mM NaCl), DPPG also displays a pre-transition, but it is less defined/cooperative, sample-dependent, and generally starts at a lower temperature.

3.4. Statistical model

The main phase transition has been adequately described by a very simple two-state (gel/fluid) model [31,40–43]. Heimburg [30] was the first to couple the ripple phase to full acyl chain melting. Based on phenomenological arguments, additional interactions between lipids in the two states were considered and a period for the melting “defects” was explicitly included. This new model could simulate two peaks in the excess heat capacity profile. The first smaller peak was associated to the pre-transition and to periodically ordered melting. A second big peak followed at higher temperature, and led to complete melting.

Modulated (periodic) phases have been extensively studied for magnetic spin systems [56–60]. The simpler ferromagnetic phase is described by an analogous two-state model which favors spin alignment. Those studies have led to the discovery that periodic sequences of particles in states of opposite alignment may arise from the addition of a very simple competing interaction with no *ad hoc* periodicity. Modulation comes out as a result from model calculations, but could hardly be predicted a priori, and no qualitative argument which could lead to the prediction of this result exists. Competition between nearest neighbor and next-nearest neighbor interactions along some chosen axis generated modulations of different periods, depending on the competition parameter.

Competing interactions between lipids may also arise from their geometry and hydrophobicity. One of the mechanisms believed to be behind the appearance of the ripple phase is the packing mismatch between a large (hydrated) headgroup and its acyl chains [8,9,61]. Head–tail mismatch may yield a competition, through hydrophobic interactions, between gel and fluid chain states. Consider a row of lipids, as shown in the cartoon of Fig. 6a. Because of head–tail mismatch, a lipid after few gel lipids would be preferentially driven into a fluid state, in order to maintain the integrity of the membrane. This feature can be represented as a favorable interaction between nearest-neighbor lipids in the gel state along with an additional favorable interaction between next-nearest lipids in opposite states.

Note that the packing requirement on head–chain mismatch is satisfied if the line represented in the cartoon is repeated a number of times, giving origin to strips of lipids in the fluid state in the bilayer plane. Thus a competing interaction would be one-dimensional. In analogy to the spin systems, the balance between these two interactions may be expected to create periodic arrays of gel and fluid lipids, under certain conditions.

The presence of fluid lipids embedded in a gel environment would induce kinks on the bilayer surface plane, giving rise to bilayer rippling. The packing frustration within the bilayer discussed here is similar to the picture proposed by Carlson and Sethna [9]. In that paper, however, interactions are treated in terms of elastic energies for tilting of lipids in the gel state. Only a *posteriori*, defects of the gel structure are interpreted in terms of fluid states.

Inspired by the spin models and by this geometric mismatch described above, we propose to analyze the behavior of the two-state (gel/fluid) model with an additional competing interaction, without

imposing a specific period. The effective configurational enthalpy may be written in terms of lipid state variables η_i , which may take values 1 (gel, with degeneracy D_g), or 0 (fluid, with degeneracy D_f). Using this representation for lipid states, and interactions given in Fig. 6b, we may write an effective enthalpy as

$$H_{\text{eff}} = -\varepsilon \sum_{nn} \eta_i \eta_j + \varepsilon K \sum_{nnn} \eta_i \eta_j - \varepsilon R \sum \eta_i \quad (2)$$

where the first summation in Eq. 2 is over nearest-neighbor (*nn*) pairs, the second over next-nearest-neighbor (*nnn*) pairs along an arbitrary direction and the third one is over lattice sites. Note that the first term favors spatial separation of lipids in the gel from lipids in the fluid state (for $\varepsilon > 0$), whereas the second term favors mixing of lipids in the gel and fluid states, if $K > 0$. The linear term, R , dependent on the effective pressure, and on the interaction parameters, favors a pure gel ground state for $R > 0$. The additional competition term may favor special sequences of states along some given direction of the lattice, as is the case for spin models. The direction chosen for the competing interaction is arbitrary and would be defined by some initial nucleation condition.

We have undertaken Monte Carlo [62,63] simulations of the system on a triangular lattice, in the pressure ensemble [64]. Randomly selected lipids are tested for a change of state, according to the Metropolis algorithm, with degeneracy of the gel state accounted for, in order to generate equilibrium Boltzmann distributions at each temperature. We have run our simulations for different lattice sizes L^2 and a few sets of parameters for fluid lipid degeneracy and competition, respectively $D = D_f/D_g$ and K . Different sequences of calorimetric peaks are found depending on the parameter set chosen. If more than one peak is present, the peaks correspond to the emergence of different modulated phases, followed by complete melting. Also, for different parameter sets the modulated phases display different periods, in accordance with what is known for spin systems [56–60]. On a first exploration of the three-parameter space (D, K, R) we searched for the conditions under which a single modulated phase appeared between the ordered and disordered phases. Data displayed below correspond to a specific set which fulfils such condition. Parameters D and R were taken near the values adopted in studies of the two-state model (in the absence of competition, i.e. $K = 0$) and fittings to experiments [e.g. [40]].

Fig. 7 illustrates our results obtained with $K = 1.2$, $D = 10^4$, $R = 2$ and $L = 10$ for which we have done extensive numerical experiments. Each simulation point corresponds to averages from runs of 10^5 Monte Carlo steps. In Fig. 7a we show the model specific heat as a function of the reduced temperature (kT/ε), for which two peaks are seen, together with the fraction of lipids in the fluid phase. The first peak is related to partial melting of the chains (around 60%), whereas the second peak is associated to complete disordering of the chains.

The three model parameters, degeneracy D , competition interaction K and effective pressure R , have different effects on the specific heat profiles. As the degeneracy D is increased, the transitions become sharper, as would be expected. The competition parameter K , if sufficiently large, introduces modulated phases between the gel and fluid phases. The modulation period is dependent on the magnitude of R , as well as on the other model parameters. At low effective pressures R , various transitions, and thus different modulated phases, are present. As R is increased, however, the gel phase is favored, and the modulated phases are gradually suppressed, and at sufficiently high pressure, only the main transition remains. For the same reason, peaks are moved to higher temperatures as pressure increases. Our numerical studies also included variations in the linear lattice size L ($L = 20, 30, 40$ and 80). The results obtained varying the temperature were essentially the same for the same set of parameters, but small bumps appeared in the specific heat peaks for larger lattice sizes.

The presence of modulation was checked by inspection of the correlation function, $g(n)$, for lipids in the gel state. The correlation

Fig. 6. (a) Row of lipids with head–tail packing mismatch. (b) Intermolecular energies considered in the model. Left: attractive nearest-neighbor (*nn*) interactions between a pair of lipids in the gel state. Right: next-nearest-neighbors (*nnn*) interaction along an arbitrarily chosen coordinate axis of the plane.

Fig. 7. (a) Specific heat (C_p) obtained from the Monte Carlo simulation (solid line) and fluid fraction (dashed line) as a function of the reduced temperature. The points show the temperatures for which the correlation function $g(n)$ was calculated. (b) Correlation function $g(n)$ as a function of the lattice site calculated for four different reduced temperatures: 0.35 (■), 0.40 (○), 0.45 (▲) and 0.50 (▽), shown with the same symbols in a). Parameters used in the Monte Carlo simulations: $K = 1.2$, $D = 10^4$, $R = 2$ and $L = 10$.

function measures the probability of finding a lipid in the gel state at a site position n from a lipid taken as reference. Fig. 7b illustrates the behavior of $g(n)$ measured for temperatures above and below the transition to the modulated phase. Typical configurations are shown in Fig. 8.

The lower temperature peak in specific heat data may thus be associated to partial melting of the chains, as seen from data for fraction of lipids in the fluid state (Fig. 7a). Moreover, data for spatial correlations (Fig. 7b) show that this partial melting is accompanied by the emergence of modulation. Note that the modulation $\sim 3 / 2.5$ (gel/fluid) arises naturally from the microscopic model which includes no parameter for the modulation.

Comparison of the simulation results (Fig. 7) with those from DSC experiments (Fig. 2) show that agreement is, in this first study, only qualitative: we can simulate the emergence of two distinct peaks coupled to periodic and global melting of the lipids. However, the quantitative agreement is still very poor. The DSC results indicate that the pre-transition accounts for the melting of only 20% of the lipids, whereas model simulations present 60% melting; the DSC pre-transition peak is clearly smaller and broader than the main one, in opposition to the model specific heat; the distance in temperature between the two peaks

obtained from the model is also too large. In its current state the model parameters do not have immediate physical meaning. Thus we could not yet reproduce important features of the experimental profile with our model. Further exploration of parameter space and modulation is under study and shall be the subject of a future work.

4. Concluding remarks

In this work we combine experiments and Monte Carlo simulations to broaden the knowledge on the bilayer pre-transition. Experimentally, we have investigated the melting process of DPPG at different concentrations of salt and of DPPC using differential scanning calorimetry, electron spin resonance and fluorescence spectroscopy. Our main experimental finding is that in both lipid systems clear indications of up to 20% fluid population were detected between the pre- and the main transitions, in the so-called ripple phase. Thus, our results clearly support the idea that the pre-transition is part of the full acyl chain melting process, as proposed before [30].

Another important result is that at low ionic strength, the pre-transition of the charged lipid DPPG becomes less cooperative, probably indicating a less defined ripple period. We can speculate that headgroup electrostatic repulsion adds an extra interaction that alters the delicate geometrical balance between heads and chains.

We can try to rationalize the data obtained previously with ours. From SAXS data [10,12], typically ~ 40 lipids build up one ripple period of ~ 140 Å. If we assume that 10–15% of the lipids melt at T_p , as our DSC data suggest (see Fig. 2c), this implies ~ 4 – 6 lipids/ripple. These would be enough to stabilize the bilayer kinks. Thus the pre-transition would cooperatively bring the system from a flat to a rippled bilayer, with the fluid lipids geometrically located at the kinks. However, the fluid fraction increases between T_p and T_m reaching 20% (~ 8 lipids/ripple) just below T_m (Fig. 2c). These melted lipids would be preferentially accommodated in the short arm, as suggested by Sun et al. [10], who showed that this is thinner and less dense than the longer one. Thus a long gel arm seems to coexist with an almost fluid short one just below T_m . Further melting of lipids initiates the cooperative transition of the whole system.

We have introduced here a statistical model to further evaluate the interplay between pre-transition and chain melting. Our model combines ideas from the usual two-state model, which describes the gel–fluid transition as a single event [e.g. [40]], and from magnetic spin models, where modulated phases were observed [e.g. [56]]. Based on head–chain packing mismatch, a competition between nearest and next-nearest neighbor interactions among lipids was considered. For a certain set of model parameters, this new model could simulate two calorimetric peaks associated with the melting process. More important, the appearance of gel and fluid lipids in a periodic fashion is a natural consequence of the competition between lipid–lipid interactions. In its current state, the model could qualitatively predict the main experimental observations. A more quantitative description of the melting process using this model is in progress.

The statistical model discussed here does not require multilamellar structures to build up ripples, and is based on packing mismatch on

Fig. 8. Configurations obtained with Monte Carlo simulation at different reduced temperatures (marked on top; see temperatures in Fig. 7) of gel (white) and fluid (black) lipids. Parameters used in the simulations: $K = 1.2$, $D = 10^4$, $R = 2$ and $L = 40$.

one monolayer. Indeed, as already mentioned, indication of ripples was observed also in unilamellar vesicles [13]. Our experimental data also suggest that a cooperative pre-transition, and ripple formation, can occur on non-correlated bilayers.

The new ideas introduced here may apply to other lipid systems which also have an extended acyl chain melting region. One example is the anionic phospholipid DMPG, for which the gel–fluid transition region extends over more than 10 °C at low ionic strength [26], accompanied by a structural correlation peak around 40 nm [28], which may be related to the emergence of a new type of modulated phase. Generally, the idea of including competition between nearest and next-nearest-neighbor interactions among lipids is new, and might apply to other biologically relevant problems.

Acknowledgements

We are grateful to Tiago Ribeiro de Oliveira for helping in some measurements and to Mario Tamashiro for helpful discussions on the statistical model. The financial supports of FAPESP, CNPq, CAPES and DFG are acknowledged.

References

- [1] D.A. Brown, E. London, Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17221–17224.
- [2] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–572.
- [3] T. Heimburg, A.D. Jackson, On soliton propagation on biomembranes and nerves, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 9790–9795.
- [4] M.J. Janiak, D.M. Small, G.G. Shipley, Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin, *Biochemistry* 15 (1976) 4575–4580.
- [5] D.C. Wack, W.W. Webb, Synchrotron X-ray study of the modulated lamellar phase $P_{\beta'}$ in the lecithin–water system, *Phys. Rev. A* 40 (1989) 2712–2730.
- [6] J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle, Structure of lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 159–195.
- [7] T.J. McIntosh, Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing model, *Biophys. J.* 29 (1980) 237–246.
- [8] G. Cevc, Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition and rippled lamellae, *Biochim. Biophys. Acta* 1062 (1991) 59–69.
- [9] J.M. Carlson, J.P. Sethna, Theory of the ripple phase in hydrated phospholipid bilayers, *Phys. Rev. A* 36 (1987) 3359–3374.
- [10] W.-J. Sun, S. Tristram-Nagle, R.M. Suter, J.F. Nagle, Structure of the ripple phase in lecithin bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 7008–7012.
- [11] K. Sengupta, V.A. Raghunathan, J. Katsaras, Structure of the ripple phase of phospholipid multibilayers, *Phys. Rev. E* 68 (2003) 031710.
- [12] G. Pabst, H. Amenitsch, D.P. Kharakoz, P. Laggner, M. Rappolt, Structure and fluctuations of phosphatidylcholines in the vicinity of the main phase transition, *Phys. Rev. E* 70 (2004) 021908.
- [13] P.C. Mason, B.D. Gaulin, R.M. Epand, G.D. Wignall, J.S. Lin, Small angle neutron scattering and calorimetric studies of large unilamellar vesicles of the phospholipids phosphatidylcholine, *Phys. Rev. E* 59 (1999) 3361–3367.
- [14] R.A. Parente, B.R. Lentz, Phase behavior of large unilamellar vesicles composed of synthetic phospholipids, *Biochemistry* 23 (1986) 2353–2362.
- [15] T. Heimburg, Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta* 1415 (1998) 147–162.
- [16] A.H. De Vries, S. Yefimov, A.E. Mark, S.J. Marrink, Molecular structure of the lecithin ripple phase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2005) 5392–5396.
- [17] M. Kraneburg, C. Laforge, B. Smit, Mesoscopic simulations of phase transitions in lipid bilayers, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 4531–4534.
- [18] R.J. Wittebort, C.F. Schmidt, R.G. Griffin, Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance of the lecithin gel to liquid–crystalline phase transition, *Biochemistry* 20 (1981) 4223–4228.
- [19] D. Marsh, Molecular motions in phospholipid bilayers in the gel phase: long axis rotation, *Biochemistry* 19 (1980) 1632–1637.
- [20] B.A. Cunningham, A.-D. Brown, D.H. Wolfe, W.P. Williams, A. Brain, Ripple phase formation in phosphatidylcholine: effect of acyl chain relative length, position, and unsaturation, *Phys. Rev. E* 58 (1998) 3662–3672.
- [21] M. Rappolt, G. Pabst, G. Rapp, M. Kriechbaum, H. Amenitsch, C. Krenn, S. Bernstorff, P. Laggner, New evidence for gel–liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines, *Eur. Biophys. J.* 29 (2000) 125–133.
- [22] A. Watts, K. Harlos, W. Maschke, D. Marsh, Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration, *Biochim. Biophys. Acta* 510 (1978) 63–74.
- [23] A. Watts, K. Harlos, D. Marsh, Charge-induced tilt in ordered-phase phosphatidylglycerol bilayers evidence from X-ray diffraction, *Biochim. Biophys. Acta* 645 (1981) 91–96.
- [24] M.F. Schneider, D. Marsh, W. Jahn, B. Kloege, T. Heimburg, Network formation of lipid membranes: triggering structural transitions by chain melting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14312–14317.
- [25] I.S. Salonen, K.K. Eklund, J.A. Virtanen, P.K.J. Kinnunen, Comparison of the effects of NaCl on the thermotropic behaviour of sn-1' and sn-3' stereoisomers of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol, *Biochim. Biophys. Acta* 982 (1989) 205–215.
- [26] M.T. Lamy-Freund, K.A. Riske, The peculiar thermo-structural behavior of the anionic lipid DMPG, *Chem. Phys. Lipids* 122 (2003) 19–32.
- [27] K.A. Riske, R.M. Fernandez, O.R. Nascimento, B.L. Bales, M.T. Lamy-Freund, DMPG gel–fluid thermal transition monitored by a phospholipid spin labeled at the acyl chain end, *Chem. Phys. Lipids* 124 (2003) 69–80.
- [28] K.A. Riske, L.Q. Amaral, H.-G. Döbereiner, M.T. Lamy, Mesoscopic structure in the chain-melting regime of anionic phospholipid vesicles: DMPG, *Biophys. J.* 86 (2004) 3722–3733.
- [29] J.-M.I. Alakoskela, P.K.J. Kinnunen, Thermal phase behavior of DMPG: the exclusion of continuous network and dense aggregates, *Langmuir* 23 (2007) 4203–4213.
- [30] T. Heimburg, A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with chain-melting transition, *Biophys. J.* 78 (2000) 1154–1165.
- [31] S. Doniach, A thermodynamic model for the monoclinic (ripple) phase of hydrated phospholipid bilayers, *J. Chem. Phys.* 70 (1978) 4587–4596.
- [32] M. Marder, H.L. Frisch, J.S. Langer, H.M. McConnell, Theory of the intermediate rippled phase of phospholipid bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (1984) 6559–6561.
- [33] W.S. McCullough, H.L. Scott, Statistical–mechanical theory of the ripple phase of lipid bilayers, *Phys. Rev. Lett.* 65 (1990) 931–934.
- [34] T.C. Lubensky, F.C. MacKintosh, Theory of “Ripple” phases of lipid bilayers, *Phys. Rev. Lett.* 71 (1993) 1565–1568.
- [35] S. Schreiber, C.F. Polnaszek, I.C.P. Smith, Spin labels in membranes. Problems in practice, *Biochim. Biophys. Acta* 515 (1978) 375–436.
- [36] D. Marsh, Experimental methods in spin-label spectral analysis, in: L.J. Berliner, J. Reuben (Eds.), *Spin Labeling. Theory and Applications*, vol. 8, Plenum Press, New York, 1989, pp. 255–303.
- [37] T. Parasassi, G. Stasio, G. Ravagnan, R.M. Ruschand, E. Gratton, Quantization of lipids phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence, *Biophys. J.* 60 (1991) 179–189.
- [38] T. Parasassi, E. Gratton, W.M. Yu, P. Wilson, M. Levi, Two-photon fluorescence microscopy of Laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes, *Biophys. J.* 72 (1997) 2413–2429.
- [39] L.A. Bagatolli, E. Gratton, G.D. Fidelio, Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence, *Biophys. J.* 75 (1998) 331–341.
- [40] O.G. Mouritsen, A. Boothroyd, R. Harris, N. Jan, T. Loofman, L. MacDonald, D.A. Pink, Computer simulation of the main gel–fluid phase transition of lipid bilayers, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 2027–2041.
- [41] I.P. Sugár, R.L. Biltonen, N. Mitchard, Monte Carlo simulations of membranes: phase transition of small unilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles, *Meth. Enzymol.* 240 (1994) 569–593.
- [42] I.P. Sugár, T.E. Thompson, R.L. Biltonen, Monte Carlo simulation of two-component bilayers: DMPC/DSPC mixtures, *Biophys. J.* 76 (1999) 2099–2110.
- [43] R. Jerala, P.F.F. Almeida, R.L. Biltonen, Simulation of the gel–fluid transition in a membrane composed of lipids with two connected acyl chains: application of a dimer-move step, *Biophys. J.* 71 (1996) 609–615.
- [44] M.J. Hope, R. Nayar, L.D. Mayer, P.R. Cullis, Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques, in: G. Gregoriadis (Ed.), 2nd ed., *Liposome technology*, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 124–139.
- [45] L.A. Bagatolli, T. Parasassi, G.D. Fidelio, E. Gratton, A model for the interaction of 6-Lauryl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: implications for spectral properties, *Photochemistry and Photobiology* 70 (1999) 557–564.
- [46] G. Cevc, A. Watts, D. Marsh, Non-electrostatic contribution to the titration of the ordered–fluid phase transition of phosphatidylglycerol bilayers, *FEBS Letters* 120 (1980) 267–270.
- [47] H.-J. Hinz, J.M. Sturtevant, Calorimetric studies of dilute aqueous suspensions of lipids formed from synthetic α - α -lecithins, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 6071–6075.
- [48] G. Degovics, A. Latal, K. Lohner, X-ray studies on aqueous dispersions of dipalmitoyl phosphatidylglycerol in the presence of salt, *J. Appl. Cryst.* 33 (2000) 544–547.
- [49] R.M. Fernandez, K.A. Riske, L.Q. Amaral, R. Itri, M.T. Lamy, Influence of salt on the structure of DMPG studied by SAXS and optical microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 907–916.
- [50] D. Zubiri, A. Domecq, D.L. Bernik, Phase behavior of phosphatidylglycerol bilayers as a function of buffer composition: fluorescence studies using Laurdan probe, *Coll. Surf. B: Biointer.* 13 (1999) 13–28.
- [51] S. Vanounou, D. Pines, E. Pines, A.H. Parola, I. Fishov, Coexistence of domains with distinct order and polarity in fluid bacterial membranes, *Photochem. Photobiol.* 76 (2002) 1–11.
- [52] C.C. De Vequi-Suplicy, C.R. Benatti, M.T. Lamy, Laurdan in fluid bilayers: position and structural sensitivity, *J. Fluorescence* 16 (2006) 431–439.
- [53] S. Palleschi, L. Silvestroni, Laurdan fluorescence spectroscopy reveals a single liquid–crystalline lipid phase and lack of thermotropic phase transitions in the plasma membrane of living human sperm, *Biochim. Biophys. Acta* 1279 (1996) 197–202.
- [54] R.B. Campbell, S.V. Balasubramanian, R.M. Straubinger, Phospholipid–cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties, *Biochim. Biophys. Acta* 1512 (2001) 27–39.
- [55] The invariance of Laurdan GP_{ex} with λ_{ex} when incorporated in the gel phase of lipids has been justified considering the presence of the probe in a homogeneous

- membrane. However, the discussion about the negative values obtained for Laurdan in pure fluid phases are still not clear [37]. We would like to explain the non-zero slopes presented here (Fig. 5b) for lipids in pure gel phase (or fluid phase), which were calculated through a rather accurate methodology, calling attention to the two absorption and emission bands seen in Laurdan spectra [37] in pure phases, which could be attributed to Laurdan in different conformations, absorbing and emitting at different wavelengths (the center of the bands). Hence, it is quite understandable that GP_{ex} would vary with λ_{ex} , as the relative excitation of the bands would be dependent on the excitation wavelength: the ratio GP_{ex} would be dependent on λ_{ex} . This discussion is out of the scope of the present work, and will be focused elsewhere (de Vequi-Suplicy, Lamy, Coutinho, in preparation).
- [56] W. Selke, The ANNNI model — theoretical analysis and experimental application, *Phys. Rep.* 170 (1988) 213–264.
- [57] N. Bhattacharyya, S. Dasgupta, Statistical mechanics of the 1D ferromagnetic ANNNI chain under an external field: revisited, *J. Phys. A: Math. Gen.* 24 (1991) 3927–3934.
- [58] M.H.R. Tragtenberg, C.S.O. Yokoi, Field behavior of an Ising model with competing interactions on the Bethe lattice, *Phys. Rev. E* 52 (1995) 2187–2197.
- [59] A. Sato, F. Matsubara, Equilibrium properties of an axial next-nearest-neighbor Ising model in two dimensions, *Phys. Rev. B* 60 (1999) 10316–10324.
- [60] R.A. Dos Anjos, J.R. Viana, J.R. de Sousa, J.A. Plascak, Three-dimensional Ising model with nearest- and next-nearest-neighbor interactions, *Phys. Rev. E* 76 (2007) 022103.
- [61] S. Kirchner, G. Cevc, On the origin of the thermal $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ pretransition in the lamellar phospholipid membranes, *Europhys. Lett.* 28 (1994) 31–36.
- [62] M.E.J. Newman, G.T. Barkema, *Monte Carlo Methods in Statistical Physics*, Clarendon Press, Gloucestershire, 1999.
- [63] D.P. Landau, K. Binder, *A Guide to Monte Carlo Simulations in Statistical Physics*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2005.
- [64] H.B. Callen, *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics*, 2nd ed. John Wiley & Sons Inc., Singapore, 1985.

Laurdan in Fluid Bilayers: Position and Structural Sensitivity

Cíntia C. De Vequi-Suplicy,¹ Carlos R. Benatti,¹ and M. Teresa Lamy^{1,2}

Received November 1, 2005; accepted December 23, 2005
Published online: May 9, 2006

Laurdan (2-dimethylamino-6-lauroylnaphthalene) is a hydrophobic fluorescent probe widely used in lipid systems. This probe was shown to be highly sensitive to lipid phases, and this sensitivity related to the probe microenvironment polarity and viscosity. In the present study, Laurdan was incorporated in 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DPPG), which has a phase transition around 41°C, and DLPC (1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), which is in the fluid phase at all temperatures studied. The temperature dependence of Laurdan fluorescent emission was analyzed via the decomposition into two gaussian bands, a short- and a long-wavelength band, corresponding to a non-relaxed and a water-relaxed excited state, respectively. As expected, Laurdan fluorescence is highly sensitive to DPPG gel–fluid transition. However, it is shown that Laurdan fluorescence, in DLPC, is also dependent on the temperature, though the bilayer phase does not change. This is in contrast to the rather similar fluorescent emission obtained for the analogous hydrophilic probe, Prodan (2-dimethylamino-6-propionynaphthalene), when free in aqueous solution, over the same range of temperature. Therefore, Laurdan fluorescence seems to be highly dependent on the lipid bilayer packing, even for fluid membranes. This is supported by Laurdan fluorescence anisotropy and spin labels incorporated at different positions in the fluid lipid bilayer of DLPC. The latter were used both as structural probes for bilayer packing, and as Laurdan fluorescence quenchers. The results confirm the high sensitivity of Laurdan fluorescence emission to membrane packing, and indicate a rather shallow position for Laurdan in the membrane.

KEY WORDS: Laurdan; fluorescence; lipid bilayers; fluid phase; bilayer packing; polarity; bilayer position.

INTRODUCTION

Prodan (2-dimethylamino-6-propionynaphthalene) and its derivatives were introduced as solvent-sensitive probes by Weber and Farris [1]. They were designed with a donor and an acceptor group substituted opposite to a naphthalene ring, allowing the appearance of a large electric dipole, when excited, taking into consideration that the sensitivity of the fluorescent probe to the polarity of the environment is related to the magnitude of the excited state dipole moment. Among Prodan derivatives, Laurdan (2-dimethylamino-6-lauroylnaphthalene) has

been widely used as a membrane probe, since it anchors in the bilayer due to its 12-carbon aliphatic tail, with the fluorescent moiety localized close to the bilayer surface (Fig. 1).

Laurdan fluorescence has been extensively used to characterize the gel–fluid phase transition in phospholipid membranes, and to identify phase coexistence in a large number of artificial and natural membranes [2–6]. In view of the great sensitivity of Laurdan to environment polarity [7–11], its fluorescent properties in membranes have been largely discussed in terms of the presence of water molecules at the different bilayer phases, at the fluorophore location, and their interaction with the excited state dipole. It is also known that the rate of solvent relaxation depends on the temperature and viscosity of the solvent [12]. Namely, when the molecular dynamics of solvent dipoles occur on the time scale of the probe

¹ Instituto de Física, Universidade de S. Paulo, CP 66318, CEP 05315-970, Sao Paulo, SP Brazil.

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: mtlamy@if.usp.br

Fig. 1. Molecular structures: (a) DLPC, (b) Tempo-PCSL, (c) 5-PCSL, (d) 12-PCSL, (e) Laurdan.

fluorescence lifetime, a reorientation of solvent dipoles around the probe excited state may occur.

The presence of three different emitting populations has been proposed for Laurdan [13]. One related to the radiative deexcitation of a “locally excited” (LE) state, only present in apolar oils and frozen polar solvents (ethanol at -190°C). Due to a fast excited state reaction, attributed to an intramolecular rearrangement of the probe, in most solvents, or at a bilayer surface, two major excited states would be present, giving rise to two fluorescent bands, corresponding to the fluorescence of the solvent-relaxed

and the solvent-non-relaxed charge transfer states (CTr and CT), respectively. Hence, both intramolecular and solvent relaxation processes would be responsible for the large Stokes shift displayed by this probe in polar solvents.

In lipid membranes, the maximum of the Laurdan emission fluorescent band displays a red shift of about 50 nm, when the bilayer goes from the gel to the fluid phase, as temperature increases [7]. This shift has been analyzed using a two excited state model, with the predominance of a short-wavelength band for the gel phase,

as compared to a long-wavelength emission for the fluid phase, related to radiative emissions from a non-relaxed and a solvent relaxed excited states, respectively.

The present work focus on Laurdan fluorescent properties in the fluid phase of 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DLPC), as compared to 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DPPG), the latter presenting a gel–fluid transition around 41°C [14]. The emission spectra are analyzed as a composition of two gaussian bands, related to the emission of the two excited state populations, allowing a very precise evaluation of the relative presence of each population. Fluorescence anisotropy and spin labels are used to structurally characterize the site where the fluorescence moiety of Laurdan is localized.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DLPC, DPPG, and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) were purchased from Avanti Polar Lipids Inc. (Birmingham, AL). The fluorescent probes Laurdan (2-dimethylamino-6-lauroylnaphthalene) and Prodan (2-dimethylamino-6-propionynaphthalene) are from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). The buffer Hepes (4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) and EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) were purchased from Sigma Chemical Co. Milli-Q Plus water (Millipore) pH ~ 6 was used for buffer preparation. The spin labels, Tempo-PCSL (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho(TEMPO)choline), 1-palmitoyl-2-stearoyl(5-DOXYL)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (5-PCSL), and 1-palmitoyl-2-stearoyl(12-DOXYL)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (12-PCSL) were purchased from Avanti Polar Lipids Inc. (Birmingham, AL).

Sample Preparation

For the steady-state fluorescent measurements, solutions of Laurdan and DLPC or DPPG in chloroform were prepared, to a final lipid concentration of 1 mM and Laurdan concentration of 1 μ M. For ESR measurements, stock solutions of spin labels were prepared with DLPC and DOPC in chloroform to a final lipid concentrations of 10 mM and spin label concentration of 0.06 mM. With Prodan, a concentration of 1.13 μ M was used in buffer. For the quenching measurements, a concentration of 0.05 mM of the quencher (5 mol% of the lipid concentration) was added to the lipid/Laurdan solution in chloroform. For all the samples, chloroform was evapo-

rated under a stream of pure N₂ and the lipid/probe film was dried under low pressure for 2 h. The lipid/probe dry films were hydrated with 10 mM Hepes with 1 mM EDTA, pH 7.4, above the lipid phase transition temperature. The spectra were always measured immediately after sample preparation.

Fluorescence Measurement

Samples were placed in quartz cuvettes with optical pathways of 2 mm. The fluorescence emission and anisotropy were measured with a Fluorolog 3 Jobin YvonSPEX, model FL3-11, equipped with a xenon lamp, using 1.5 nm slits. The temperature was controlled with a thermal bath model Julabo HP 25, and was directly measured in the sample by a digital thermometer. The emission spectra were obtained with the excitation wavelength at 340 nm. The emission spectra of Laurdan were separated into two gaussian bands using the software *Origin 6.1*.

ESR Measurement

ESR measurements were performed with a Bruker EMX spectrometer. Field modulation amplitude of 1.0 G and microwave power of 10.13 mW were used. The temperature was controlled to about 0.2°C with a Bruker BVT-2000 variable temperature device. The temperature was monitored with a Fluke 51 K/J thermometer with the probe placed just above the cavity. The magnetic field was measured with a Bruker ER 035 NMR Gaussmeter, and, when necessary, the *WINEPR* software (Bruker) was used.

For the highly anisotropic spectra yielded by 5-PCSL, the order parameter and the isotropic hyperfine splitting (a_0) were calculated from the expressions [15, 16].

$$S_{\text{eff}} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a_{0c}}{a_0}, \quad a_0 = \frac{A_{//} + 2A_{\perp}}{3},$$

$$a_{0c} = \frac{A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}}{3}$$

$$A_{//} \approx A_{\text{max}}, \quad A_{\perp} = A_{\text{min}}$$

$$+1.4 \left(1 - \frac{A_{\text{max}} - A_{\text{min}}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \right)$$

where A_{max} and A_{min} are the maximum and inner hyperfine splitting, respectively, directly measured in the ESR spectrum (see Fig. 7), and $A_{xx} = 5.9$ G, $A_{yy} = 5.4$ G, and $A_{zz} = 32.9$ G are the principal values of the hyperfine tensor for doxylpropane [17].

RESULTS AND DISCUSSION

Laurdan Fluorescence

Laurdan fluorescent emission spectra, at different temperatures, in DPPG and DLPC, are shown in Fig. 2a and b, respectively. A shift in the emission spectra for temperatures higher than 40°C can be clearly seen in Fig. 2a, in accord with the gel–fluid phase transition of DPPG, which is about 41°C. As expected, Laurdan in a gel bilayer emits around 440 nm, whereas in a fluid membrane the emission maximum shifts to 490 nm. As mentioned, this red shift has been attributed to an increase in the number/mobility of water molecules around Laurdan in the fluid phase, as compared to the gel phase, therefore increasing the probe/solvent dipolar relaxation [7].

However, a not so drastic but similar shift on the Laurdan emission band can be observed when the fluorophore is incorporated in DLPC bilayer (Fig. 2b), though the membrane is in the fluid state at the whole range of temperatures studied.

Fig. 2. Fluorescence emission spectra of Laurdan in (a) DPPG and (b) DLPC at different temperatures.

Fig. 3. Decomposition of the fluorescence emission spectra of Laurdan in (a) DPPG and (b) DLPC, in buffer, at 30°C: full line (—) is the experimental spectrum; dot (...) and dash-dot lines (— · —) are the short-wavelength and long-wavelength gaussian bands, respectively; dash line (—) is the sum of the two gaussians.

The Laurdan fluorescent emission spectra, at all temperatures studied, in both DPPG and DLPC, can be well analyzed as a composition of two gaussian lines, centered around 430 and 480 nm, as shown in Fig. 3a and b. Therefore, confirming that the fluorescence decay is mainly due to transitions from two different excited energy levels only. The fraction of the areas of the two gaussians used in the fittings is shown in Fig. 4, for Laurdan in the two lipid bilayers, as a function of temperature. The analysis of the spectra through the decomposition into two bands allows a clear evaluation of the percentage of each emitting population. Hence, for that purpose, it is a better analysis than the generalized polarization [7], GP, which measures a normalized intensity relationship $((I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490}))$. GP does not completely separate the

Fig. 4. Temperature variation of the fraction of the areas of the two gaussian components that give the best fit of the Laurdan fluorescence spectra in (○, ●) DPPG and (■, □) DLPC. Open and full symbols used for long- and short-wavelength bands, respectively. The data are mean values of three different samples, and the uncertainties are the standard deviations, not shown if they are smaller than the size of the symbols.

contributions of the two excited states. Though the fluorescence emission at 490 nm is almost only due to the relaxed excited state, at 440 nm both bands are present (see Fig. 3).

The DPPG gel–fluid transition can be very well monitored by the relative area of the two bands: there is a sharp drop on the short-wavelength band area, naturally parallel to a sharp increase on the long-wavelength band. Surprisingly, the two bands are nearly equally present in DPPG gel phase, their relative areas presenting almost no dependence on temperature, showing that even in the gel phase half of the emission energy comes from the relaxed excited state.

When inserted in a fluid bilayer, either in DPPG or DLPC, Laurdan fluorescent decay is mainly due to the long-wavelength transition, therefore to the relaxed excited state (Fig. 4). It is important to point out that for the fluid phase of DLPC, from 10 to 40°C, there is a significant increase in the population emitting from the relaxed excited state. Above 40°C, almost all the Laurdan fluorescent emission is due to the low energy excited state only.

For both lipids, the center of the gaussians for the best fittings presented a small variation with temperature. As temperature increases, from 10 to 70°C, the position of the short-wavelength band presents a continuous blue shift, whereas the position of the long-wavelength peak shifts to the red side (Table I). This is an interesting experimental result, needing more investigation. Though a theoretical approach is out of the scope of the present

Table I. Peak Positions of the Two Gaussian Curves, and Errors (χ^2), Found for the Best Fittings of Laurdan Fluorescence Spectra in DPPG and DLPC, at Various Temperatures

T (°C)	Short-wavelength peak (nm)		Long-wavelength peak (nm)		χ^2	
	DPPG	DLPC	DPPG	DLPC	DPPG	DLPC
10	437.4	435.4	462.8	473.4	0.996	0.995
13	437.5	435.4	463.2	475.2	0.996	0.994
16	437.6	434.8	463.2	475.2	0.996	0.995
19	437.6	434.8	463.6	478.3	0.996	0.996
22	438.7	433.7	466.2	477.5	0.996	0.996
25	438.6	432.8	466.6	478.3	0.996	0.997
28	437.8	432.6	465.3	480.1	0.996	0.998
31	437.9	430.8	466.3	479.8	0.996	0.998
34	438.9	430.3	469.5	482.2	0.962	0.999
37	438.1	428.8	469.3	481.2	0.995	0.999
40	435.7	427.8	477.9	482.0	0.995	0.999
43	430.6	426.7	481.2	482.5	0.997	0.999
46	429.0	425.4	482.5	483.0	0.998	0.999
49	427.8	424.8	483.7	483.2	0.999	0.999
52	426.9	423.3	484.3	483.8	0.999	0.998
55	426.2	422.7	485.1	483.9	0.999	0.998
58	425.3	421.4	485.6	484.3	0.999	0.998
61	424.6	420.0	486.0	484.5	0.999	0.998
64	423.9	418.9	486.3	484.8	0.999	0.998
67	423.2	417.3	486.4	485.9	0.999	0.998
70	422.5	416.2	486.5	484.6	0.999	0.998

Note. The wavelength data are mean-values of three different samples, with less than 0.5% deviations.

work, one could speculate that the shift to longer wavelengths, as temperature increases, hence a decrease in the average emission energy, is due to the predominance of transitions from more relaxed excited sub-states due to the molecule and/or solvent movement. The blue shift detected for the so-called non-relaxed charge transfer excited state, as temperature increases, needs a more complex rationalization.

Interestingly, the difference in the population of the two Laurdan excited states in fluid DLPC does not seem to be related to the temperature variation only, as the fluorescent emission of the analogous hydrophilic probe Prodan in water solution is insensitive to temperature variation, from 10 to 50°C (Fig. 5). Hence, the balance between the two Laurdan excited populations is dependent on the packing of the fluid DLPC bilayer, which is sensitive to the temperature. And the packing of the membrane defines the rigidity of the water molecules at the bilayer surface, around the fluorophore.

To analyze the bilayer packing at the Laurdan position, Laurdan fluorescence anisotropy was measured (Fig. 6). As expected, Laurdan anisotropy can well monitor the DPPG phase transition, as shown in Fig. 6a.

Fig. 5. Emission spectra of 1.13 μM Prodan in buffer solution, at 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, and 50°C.

Curiously, the fluorescence anisotropy measured at the short- and long-wavelength positions yielded rather different values, mainly for the fluid phases of DPPG and DLPC. The anisotropy measured at the long-wavelength position, 480 nm, is much lower than that measured at the short-wavelength position, 430 nm. That could possibly be due to a shorter lifetime for the non-relaxed excited state [18], allowing a shorter time for the excited fluorophore rotational diffusion, resulting in a higher anisotropy value. Alternatively, one could think about the coexistence of two different average positions for the Laurdan fluorophore in the bilayer: one at the water/lipid interface, rather mobile, mainly decaying at 480 nm; and the other one less mobile, inside the bilayer, hence less water relaxed, decaying at a shorter wavelength, 430 nm. Time-resolved fluorescence would be important for that discussion.

In the gel phase of DPPG, the Laurdan anisotropy is nearly temperature independent, indicating that the bilayer packing does not change from 10 to 38°C. That can be correlated to the invariance in the equilibrium of the two excited populations over the same range of temperature (Fig. 4).

In the fluid phase of DLPC (Fig. 6b), the temperature variation of the Laurdan anisotropy clearly indicates that the bilayer microenvironment where the fluorophore is inserted is becoming looser as the temperature increases. That is certainly related to the increase in the relaxed excited state population with temperature (Fig. 4). Above 40°C, the bilayer packing keeps getting looser, as indicated by the decrease in Laurdan fluorescence anisotropy, but the probe/solvent dipolar relaxation process is complete, as the equilibrium between the two

Fig. 6. Laurdan fluorescence anisotropy in (a) DPPG and (b) DLPC, at two different emission wavelengths, 430 and 480 nm, corresponding to the short (full symbols) and long (open symbols) wavelength bands. The data are mean values of three different samples. All the calculated standard deviations were found to be smaller than the size of the symbols.

emitting populations is temperature independent (Fig. 4). However, the Laurdan fluorescence spectrum is rather different from that of Prodan in aqueous medium (Fig. 5), possibly indicating that the number and/or dynamics of water molecules surrounding Laurdan at the bilayer surface are different from those in bulk water.

Spin Labels as Structural Probes

Spin labels have been extensively used to monitor the viscosity and polarity of microenvironments in lipid membranes [see, for instance, 19–22]. In order to further analyze the dependence of the packing and polarity of DLPC bilayers with temperature, two different spin labels were used close to the membrane surface, where

Fig. 7. ESR spectra of Tempo-PCSL in DLPC at (a) 10°C and (b) 60°C, and 5-PCSL in DLPC at (c) 10°C and at (d) 60°C.

the fluorescent moiety of Laurdan is supposed to reside [8]: Tempo-PCSL and 5-PCSL (Fig. 1), which monitor, respectively, the membrane interface and the bilayer position close to the fifth acyl carbon atom. To get a better insight into the variation of the packing of fluid bilayers with temperature, the same spin labels were also incorporated in the fluid bilayer of DOPC, which has the same polar headgroup as DLPC, but two chains with 18 carbon atoms with one unsaturation each, being in the fluid phase for temperatures above zero.

The spectra of Tempo-PCSL and 5-PCSL incorporated in the bilayers, at 10 and 60°C, are rather different

Fig. 8. Temperature dependence of the (a) central line line width (ΔH_0) measured on the ESR spectra of Tempo-PCSL and (b) effective order parameter (S_{eff}) of 5-PCSL in (■) DLPC and (□) DOPC.

(Fig. 7), evidencing the variation in the bilayer packing with temperature, and the great structural sensitivity of spin labels. Moreover, the much more anisotropic spectra of 5-PCSL, as compared to those of Tempo-PCSL, evidences the greater packing and order around the fifth chain carbon atom, as compared to the bilayer surface [17].

For the Tempo-PCSL the best experimental parameter to be used over the whole range of temperature, sensitive to bilayer packing, is the central line width (ΔH_0 shown in Fig. 8). Interestingly, the two fluid bilayers, DLPC and DOPC, show very similar mobility at the bilayer interface (Fig. 8a). Around the fifth carbon atom, 5-PCSL also indicates that the two lipids present very similar packing. The parameter used to analyze the 5-PCSL spectra was the effective order parameter, S_{eff} (see Materials and methods section), which contains

Fig. 9. Temperature dependence of the isotropic hyperfine splitting a_0 , measured on the ESR spectra of 5-PCSL in (■) DLPC and (□) DOPC.

contributions from both order and rate of motion, although the principal contribution to S_{eff} is the amplitude of segmental motion of the acyl chains [23]. Hence, though both DLPC and DOPC are in the fluid phase at all temperatures studied, the packing of the bilayer surface varies considerably with temperature. These results with spin labels are in accordance with those yielded by Laurdan fluorescence anisotropy (Fig. 6).

Considering that the variation on the Laurdan fluorescent emission spectra has been also discussed based on the variation of the number of water molecules around the fluorophore, the ESR spectra of the spin labels incorporated in the bilayers were analyzed for possible nitroxide microenvironment polarity changes. It has been shown that the magnitude of the nitrogen isotropic hyperfine splitting (a_0 , one-third of the trace of the hyperfine tensor) depends on several factors, which increases the unpaired electron spin density at the nitrogen nucleus, [24]. For labels inside a lipid bilayer, there are strong indications that an increase in a_0 is mainly related to the increase in the amount of nitroxide–water hydrogen bonding. Therefore, the presence of water in the bilayer can be estimated from the magnitude of the isotropic nitrogen hyperfine splitting. The nitrogen isotropic hyperfine splitting a_0 can be relatively well determined in ESR spectra typical of probes displaying high order and fast movement, where the A_{max} and A_{min} values can be precisely measured (see Materials and methods section) like those of 5-PCSL (Fig. 7d). Figure 9 shows that the polarity around the fifth carbon atom is nearly invariant with temperature, for the two lipids in the fluid phase. Though this is interesting for bilayers structural characterization, it is not conclusive

for discussing Laurdan sensitivity to water molecules, as will be shown in the next section. Unfortunately, the ESR spectra of Tempo-PCSL do not allow an obvious measurement of the isotropic hyperfine splitting.

Spin Labels as Laurdan Fluorescence Quenchers

For a better understanding of the Laurdan position in fluid bilayers, spin labels with the paramagnetic center bound at different acyl carbon atoms (Tempo-PCSL, 5-, and 12-PCSL) were used as quenchers of the Laurdan fluorescence in DLPC bilayers, at different temperatures (Fig. 1). Figure 10 shows, comparatively, the fluorescence emission of Laurdan incorporated in DLPC bilayer, in the absence and in the presence of the quenchers. Interestingly, the Laurdan fluorescence suppression by nitroxides at the 5th and 12th carbon atoms is rather similar. That is possibly due to the mobility of the hydrocarbon chain in a 12-carbon atoms bilayer as DLPC, making the N–O group at both positions almost equally accessible to the fluorophore. However, Tempo-PCSL is clearly more effective in suppressing Laurdan fluorescence, indicating that the fluorophore is localized at the bilayer surface, closer to the position where the paramagnetic moiety of Tempo-PCSL resides. Also interesting is the observation that Tempo-PCSL clearly quenches the emission of the more relaxed (long wavelength) state preferentially. Again, that could be related to a longer lifetime for the Laurdan water-relaxed excited state, but, for further discussion, a comprehensive study of Laurdan fluorescence suppression, with static and time-resolved fluorescence would be necessary.

Fig. 10. Fluorescence emission spectra of Laurdan (—) in pure DLPC, and in DLPC with the quenchers (···) Tempo-PCSL, (---) 5-PCSL, and (— · —) 12-PCSL at 30°C.

CONCLUSIONS

Laurdan fluorescence, both in DPPG and DLPC, can be well decomposed into two gaussian bands. This decomposition allows a clear evaluation of the balance between the two emitting populations: a non-relaxed and a water-relaxed. In fluid DLPC bilayers, the equilibrium between the two excited states is dependent on the bilayer surface packing, up to 40°C. For higher temperatures, though the bilayer surface structure keeps changing, as monitored by Laurdan fluorescence anisotropy, and spin labels, Laurdan fluorescence emission spectrum is insensitive to the changes. The sensitivity of Laurdan fluorescence to the increase in fluidity of DLPC bilayers, from 0 to 40°C, is possibly related to the increase in the mobility of the water molecules at the membrane surface. The faster movement of the molecules would facilitate their equilibrium around the Laurdan excited state dipole, increasing the population of the relaxed long-wavelength excited state. The great difference in the Laurdan fluorescence spectra when incorporated in gel and fluid membranes could be mainly due to the mobility of the water molecules around the fluorophore, and not to the amount of water molecules at the bilayer surface.

Laurdan fluorescence quenching by nitroxides strongly indicates that the fluorescence moiety of Laurdan is localized at the lipid bilayer surface closer to the position where the N–O group of Tempo-PCSL resides, as compared to the position of the fifth carbon atom, where the 5-PCSL paramagnetic group is localized.

Interestingly, for Laurdan in DPPG in the gel phase, half of its radiative deexcitation originates from the relaxed excited state. That indicates that even in this lipid packed phase, at the bilayer position where Laurdan resides, there is a considerable probability of water rearrangement around the excited state dipole.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by USP, FAPESP and CNPq. Fellowships for C.C.V.S. (FAPESP), C.R.B. (FAPESP) and M.T.L. (CNPq) are acknowledged.

REFERENCES

1. G. Weber and F. J. Farris (1979). Synthesis and spectral properties of hydrophobic fluorescent probe: 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **18**, 3075–3078.
2. L. A. Bagatolli, E. Gratton, and G. D. Fidelio (1998). Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence. *Biophys. J.* **75**, 331–341.
3. D. Zubiri, A. Domecq and D. L. Bernik (1999). Phase behavior of phosphatidylglycerol bilayers as a function of buffer composition: Fluorescence studies using Laurdan probe, *Coll. Surf. B Biointer.* **13**, 13–28.
4. L. A. Bagatolli, T. Parasassi, G. D. Fidelio, and E. Gratton (1999). A model for the interaction of 6-Lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: Implications for spectral properties, *Photochem. Photobiol.* **70**(4), 4.
5. L. A. Bagatolli and E. Gratton (1999). Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles, *Biophys. J.* **77**, 2090–2101.
6. S. Vanounou, D. Pines, E. Pines, A. H. Parola and I. Fishov (2002). Coexistence of domains with distinct order and polarity in fluid bacterial membranes, *Photochem. Photobiol.* **76**(1), 1–11.
7. T. Parasassi, G. Stasio, G. Ravagnan, R. M. Rusch, and E. Gratton (1991). Quantization of lipids phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence, *Biophys. J.* **60**, 179–189.
8. T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, and E. Gratton (1998). LAURDAN and PRODAN as polarity-sensitive fluorescent membrane probes, *J. Fluorescence* **8**, 365–373.
9. R. M. Epand and R. Kraayenhof (1999). Fluorescent probes used to monitor membranes interfacial polarity, *Chem. Phys. Lipids* **101**, 57–64.
10. R. B. Campbell, S. V. Balsubramanian, and R. M. Straubinger (2001). Phospholipid–cationic lipid interactions: Influences on membrane and vesicles properties, *Biochim. Biophys. Acta* **1512**, 27–39.
11. T. Söderlund, J. M. I. Alakoskela, A. L. Pakkanen, and P. K. J. Kinnunen (2003). Comparison of the effects of surface tension and osmotic pressure on the interfacial hydration of a fluid phospholipid bilayer, *Biophys. J.* **85**, 2333–2341.
12. J. R. Lakowicz (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Press, New York, pp. 185–289.
13. M. Viard, J. Gallay, M. Vincent, O. Meyer, B. Robert and M. Paternostre (1997). Laurdan solvatochromism: Solvent dielectric relaxation and intramolecular excited-state reaction, *Biophys. J.* **73**, 2221–2234.
14. D. Marsh (1990) *CRC Handbook of Lipids Bilayers*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 219.
15. O. H. Griffith and P. C. Jost (1976) Lipids spin labels in biological membranes. In: L. J. Berliner (Ed.), *Spin Labelling. Theory and Applications*. Academic Press, New York, p. 453.
16. B. J. Gaffney (1976) Practical considerations for the calculations of order parameters for fatty acid or phospholipid spin labels in membranes. In: L. J. Berliner (Ed.), *Spin Labelling. Theory and Applications*. Academic Press, New York, p. 567.
17. W. L. Hubbell, and H. M. McConnell (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 314–326.
18. M. Viard, J. Gallay, M. Vincent and M. Paternostre (2001). Origin of Laurdan sensitivity to the vesicle-to micelle transition of phospholipids–octylglucoside system: A time-resolved fluorescent study, *Biophys. J.* **80**, 347–359.
19. D. Marsh (1981). Electron spin resonance: Spin labels. In: E. Grell (Ed.), *Membrane Spectroscopy*. Springer, Berlin, pp. 51–142.
20. C. R. Benatti, E. Feitosa, R. M. Fernandez and M. T. Lamy-Freund (2001). Structural and thermal characterization of dioctadecyltrimethylammonium bromide dispersions by spin labels, *Chem. Phys. Lipids* **111**, 93–104.
21. C. R. Benatti, J. M. Ruyschaert, and M. T. Lamy (2004). Structural characterization of diC₁₄-amidine, a pH sensitive lipid used for transfection, *Chem. Phys. Lipids* **131**, 197–204.
22. R. M. Fernandez and M. T. Lamy-Freund (2000). Correlation between the effects of a cationic peptide on the hydration and fluidity of anionic lipid bilayers: A comparative study with sodium ions and cholesterol, *Biophys. Chem.* **87**, 87–102.
23. H. Schindler and J. Seelig (1973). EPR-spectra of spin labels in lipid bilayers, *J. Chem. Phys.* **59**(4), 4.
24. O. H. Griffith, P. J. Dehlinger and S. P. Van (1974). Shape of hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (evidence for water penetration in biological membranes), *J. Membrane Biol.* **15**, 159–192.