RANYLSON MARCELLO LEAL SAVEDRA

**ESTUDO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E ELETRÔNICAS
DE RETINAIS E DE RETINAIS LIGADOS À LISINA VIA BASE DE
SCHIFF PROTONADA**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de Mestre
em Ciências (Físico-Química).

Orientador: Prof. Dr. Milan Trsic

São Carlos
2008

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 18/08/2008

Ranylson Marcello Leal Savedra

*Dedico este trabalho aos meus pais
Raimundo e Nazide e à minha
querida esposa Melissa.*

AGRADECIMENTOS

Nesta seção aproveito para expressar a minha gratidão a todos, que de forma direta ou indireta, participaram na execução deste projeto.

- Ao Prof. Dr. Milan Trsic pela confiança, orientação e ensinamentos que possibilitou a conclusão deste projeto;
- À minha amada esposa Melissa, pela sua atuação efetiva em meu aprendizado acadêmico e principalmente por dar-me o privilégio da sua companhia diária;
- Aos meus pais Raimundo e Nazide Savedra, por todos os ensinamentos e bons momentos que me concederam;
- A Sra. Maria de Fátima e ao Sr. Waldir, pelo incondicional apoio durante esse período;
- Aos meus irmãos, que foram fundamentais em minha formação;
- Aos meus amigos e companheiros diários, cujas opiniões e sugestões nos momentos decisivos foram essenciais, destaco especialmente: Elton Sitta, Hyrla, Roberto, Bernanete (Bê), Edson, Ana Cláudia, Elias Paulo, André, Wagner, Maíra, Saulo, Nathan, Márcio e Nazareno Silva;
- Aos professores, alunos e funcionários da Química Estrutural do IQSC;
- Ao Ângelo Dói pelas inúmeras consultas técnicas sobre informática;
- À funcionária Bernadete da biblioteca do IQSC;
- Ao CNPq pela bolsa concedida;
- À FAPESP pelo auxílio financeiro que possibilitou a aquisição do servidor utilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação das estruturas cristalográficas das proteínas (a) bacteriorrodopsina e (b) rodopsina, extraídas do banco de dados de proteínas (PDB) com os códigos 1C3W e 1U19, respectivamente, segundo os protocolos descritos nas referências 8 e 9.	11
FIGURA 2: Formação da base de Schiff protonada entre o 11- <i>cis</i> -retinal e a lisina-296 da apoproteína opsin.	13
FIGURA 3: Estrutura molecular do retinal em sua conformação <i>todo-trans</i> . Em azul está destacada a cadeia poliênica da molécula.	16
FIGURA 4: Fotociclo da BR simplificado. Os intermediários estão representados pelas letras maiúsculas de K a O. Os números subscritos dos intermediários representam o $\lambda_{\text{máx}}$ dos diferentes estados da BR e os valores entre as etapas denotam o tempo de vida de cada evento.	18
FIGURA 5: Esquema simplificado do processo de transporte de prótons do ciclo da bacteriorrodopsina.	19
FIGURA 6: Mecanismos de fotoisomerização (a) envolvendo dois estados eletrônicos e (b) envolvendo três estados, extraído da referência 43.	20
FIGURA 7: Representação estrutural do <i>todo-E-trans</i> -retinal (A), dos retinais análogos com anéis cumarínicos (B e C) e dos análogos com anéis policíclicos aromáticos (D e E). A numeração indicada será a adotada para as discussões dos resultados.	22
FIGURA 8: Fluxograma com as principais etapas dos cálculos utilizando o método de HFR.	25
FIGURA 9: Fluxograma com as principais etapas dos cálculos utilizando o método da DFT.	28
FIGURA 10: Esquema de partição do sistema em uma metodologia de QM/MM	31
FIGURA 11: (a) espectro de absorção teórico do retinal e dos retinais com substituintes cumarínicos e em (b) os espectros do retinal e dos retinais com substituintes poliaromáticos condensados. Todos calculados com o método ZINDO/S-CI a partir das geometrias obtidas com B3LYP/6-31G(d,p).	47

FIGURA 12: Gráficos de Ramachandran apresentando os ângulos Ψ e ϕ dos aminoácidos da proteína BR, obtidas com os métodos (a) HF/6-31G(d,p):UFF e (b) B3LYP/6-31G(d,p):UFF.	49
FIGURA 13: RMSD das posições dos átomos de C, N e O dos modelos calculados em relação ao experimental [8]. Em vermelho os resultados referentes ao método HF/6-31g(d,p):UFF e em preto os calculados com B3LYP/6-31g(d,p):UFF.	50
FIGURA 14: Sobreposição das estruturas da BR obtidas respectivamente por difração de raios-X [8] (estrutura azul), pelo método HF/6-31G(d,p):UFF (verde) e com B3LYP/ 6-31G(d,p):UFF (vermelha).	52
FIGURA 15: Representações das estruturas secundárias da BR: (a) obtidas por difração de raios-X; e as calculadas com (b) B3LYP/6-31G(d,p):UFF e (c) HF/6-31G(d,p):UFF. As regiões com baixa resolução estão destacadas em vermelho nas estruturas teóricas.	53
FIGURA 16: Gráficos de Ramachandran das proteínas com substituintes cumarínicos (a) B e (b) C e os policíclicos (c) D e (d) E, segundo a ordem apresentada na Figura 7. Todas as estruturas foram calculadas combinando-se os métodos B3LYP/6-31G(d,p):UFF. A região destacada refere-se aos aminoácidos com maiores desvios em relação a BR.	54
FIGURA 17: Representação dos monômeros das proteínas com os retinais sintéticos, com substiuintes cumarínicos (a) e (b) e com substituintes poliaromáticos (c) e (d). Todas as estruturas foram obtidas com o método B3LYP/6-31G(d,p):UFF. Em destaque os aminoácidos que apresentaram maiores desvios do gráfico de Ramachandran.	55
FIGURA 18: Planos da cadeia poliênica observados na estrutura dos retinais ligados à BR.	57
FIGURA 19: Diagrama de energia potencial da rotação do ângulo diedro existente entre os carbonos C12C13C14C15 no modelo apresentado na Figura 18. Esses dados foram calculados com HF/6-31G(d,p). A energia térmica à T = 298,15 K está indicada com pela linha azul.	58
FIGURA 20: Energias de excitação das transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$ em função do ângulo diedral do cromóforo da BR, calculadas com o método ZINDO/S-CI.	62

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: RMSD para os comprimentos e ângulos de ligações entre carbonos do todo- <i>trans</i> -retinal em relação aos dados cristalográficos.	38
TABELA 2: Ângulo formado entre os planos da cadeia poliênica e o ciclo ligado a ela.	39
TABELA 3: Mapas de cargas derivadas do potencial eletrostático dos retinais estudados calculados com os métodos HF e DFT.....	40
TABELA 4: Representação dos orbitais moleculares de fronteira, calculados com o nível de teoria HF/6-31G(d,p)	42
TABELA 5: Energia dos orbitais de fronteira e da diferença entre estes (E_g), calculadas com os métodos HF e DFT associados à base 6-31G(d,p) para as moléculas estudadas.	43
TABELA 6: Comprimentos de onda de excitações eletrônicas experimentais e teóricas calculadas com ZINDO/S-CI para o retinal e seus derivados.	45
TABELA 7: Comprimento de onda de excitações eletrônicas experimentais e teóricas calculadas com os métodos TDDFT e TDHF para o retinal e seus derivados.	46
TABELA 8: RMSD dos átomos de C, N, O e S das estruturas teóricas da BR em relação à estrutura cristalográfica.	51
TABELA 9: Ângulos entre os planos $\alpha\beta$ e $\beta\delta$, indicados na Figura 18.....	57
TABELA 10: Comprimentos de onda teóricos e experimentais das proteínas. Os resultados teóricos foram calculados com ZINDO/S-CI na região QM do modelo da BR.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfato

BR – Bacteriorrodopsina

CI – Interação de configurações (*Configuration Interaction*)

DFT – Teoria do funcional da densidade (*Density Functional Theory*)

E_g – Diferença de energia entre os orbitais LUMO e HOMO (“gap” de energia)

HF – Método de Hartree-Fock-Roothaan

HOMO – Orbital molecular de maior energia completamente preenchido (*Highest Orbital Molecular Occupied*)

INDO – *Intermediate Neglect of Differential Overlap Method*

LUMO – Primeiro orbital molecular desocupado (*Lowest Orbital Molecular Unoccupied*)

MM – Mecânica molecular

RD – Rodopsina

RMSD – Desvio da raiz quadrada da média quadrática (*Root Mean Square Deviation*)

TDDFT – *Time-Dependent Density Functional Theory*

TDHF – *Time-Dependent Hartree-Fock method*

UFF – Campo de força universal (*Universal Force Field*)

UV – Ultravioleta

ZINDO/S – *Zerner’s Intermediate Neglect of Differential Overlap*

$\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda da excitação eletrônica de maior absorvidade molar

RESUMO

As transições eletrônicas que apresenta as energias mais baixas no retinal e em quatro retinais sintéticos foram analisadas em dois diferentes ambientes: no vácuo e ligados à proteína bacterioopsina por uma base de Schiff protonada, utilizando diversos métodos de química teórica. Os resultados aqui apresentados fornecem indicativos de que três estados eletrônicos estão envolvidos na formação da primeira banda de absorção dos aldeídos, enquanto que, no caso dos compostos ligados à proteína apenas dois estados estariam envolvidos. As análises discutidas neste trabalho também sugerem uma possível explicação para o envolvimento de dois estados eletrônicos excitados no processo de fotoisomerização do retinal ligado à bacterioopsina.

ABSTRACT

Low-lying electronic transitions of retinal and of four synthetic retinals were analyzed in two different environments: in *vacuum* and linked to bacterioopsin through a protonated Schiff base, employing several methods of theoretical chemistry. The results here reported suggest that the first absorption band of the aldehydes involves three electronic states, while for the case of protein linked compounds, two states would be embraced. Our discussions also provided a possible explanation about the involvement of two electronic excited states in the photoisomerization process of retinal linked to bacterioopsin.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1. <i>Introdução</i>	<i>10</i>
1.1. <i>Retinal.....</i>	<i>15</i>
1.1.1. Características espectroscópicas do todo- <i>trans</i> -retinal.....	16
1.2. <i>Bacteriorrodopsina.....</i>	<i>17</i>
1.2.1. Fotociclo da bacteriorrodopsina	17
1.2.2. A fotoisomerização do retinal e o evento primário	20
1.3. <i>Objetivos.....</i>	<i>22</i>
CAPÍTULO 2	23
2. <i>Métodos Utilizados.....</i>	<i>23</i>
2.1. <i>Método de Hartree-Fock-Roothaan (HF)</i>	<i>24</i>
2.2. <i>Teoria do funcional da densidade (DFT).....</i>	<i>25</i>
2.3. <i>Métodos propagadores (TDHF e TDDFT)</i>	<i>29</i>
2.4. <i>Método semi-empírico ZINDO/S-CI.....</i>	<i>29</i>
2.5. <i>Método Híbrido – ONIOM</i>	<i>31</i>
2.6. <i>Campo de Força Universal – UFF</i>	<i>32</i>
2.7. <i>Estratégias Computacionais.....</i>	<i>33</i>
2.7.1. Propriedades Eletrônicas e estruturais dos retinais.....	33
2.7.2. Características estruturais dos retinais.....	33
2.7.3. Espectro de excitação dos retinais	34
2.8. <i>Propriedades dos cromóforos da BR</i>	<i>34</i>
2.8.1. Descrição do modelo da proteína	34
2.8.2. Estrutura das BRs	35
2.8.3. Transições eletrônicas.....	35
2.9. <i>Pacotes computacionais utilizados.....</i>	<i>36</i>

CAPÍTULO 3	37
3. <i>Resultados e Discussões</i>	37
3.1. <i>Estruturas dos retinais</i>	37
3.2. <i>Características estruturais das moléculas</i>	38
3.3. <i>Análise de orbitais dos retinais</i>	41
3.4. <i>Espectros de excitação eletrônica</i>	44
3.5. <i>Propriedades das Proteínas</i>	48
3.6. <i>Validação das estruturas das Proteínas.....</i>	48
3.7. <i>Estrutura dos Grupos Prostéticos</i>	56
3.8. <i>Excitações eletrônicas dos cromóforos</i>	59
3.9. <i>Estados eletrônicos do retinal</i>	61
CAPÍTULO 4.....	63
4. <i>Conclusões.....</i>	63
<i>Referências Bibliográficas</i>	65

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A radiação emitida pelo Sol é constituída por uma extensa faixa de comprimento de ondas eletromagnéticas que ao penetrar na atmosfera terrestre, fornece toda a iluminação e o aquecimento necessário para manter a vida no planeta sendo, por isso, considerada a fonte de energia mais importante para a Terra. A maioria dos organismos conhecidos faz o uso desse poderoso recurso energético, utilizando-o em complexos e eficientes eventos biológicos como no caso da fotossíntese de seres *autótrofos*, que se vale da energia luminosa natural para sintetizar a ATP, adenosina trifosfato, e o sistema visual dos vertebrados e dos artrópodes que se adaptaram ao meio ambiente, empregando a região do visível do espectro eletromagnético para interpretar estímulos externos [1, 2]. Processos como estes são possíveis apenas em células especializadas que produzem ou possuem proteínas com grande habilidade em absorver essa energia e posteriormente transformá-la em energia química. Embora essas proteínas não sejam as mais comuns, várias de suas famílias são observadas em bactérias, vegetais e seres produtores em geral. Dentro desta classe encontram-se as rodopsinas, as quais se destacam por desempenharem função vital na fotossíntese de alguns microrganismos procariontes e na percepção visual de vertebrados, moluscos e artrópodes [1, 3-7], portanto possuem importância singular no processo evolutivo de vários filos dos reinos animal e *archae*.

As rodopsinas mais estudadas são: a rodopsina (RD), cujas propriedades são indispensáveis no evento primário do processo de transdução visual dos vertebrados; e a bacteriorrodopsina (BR), que atua na fotossíntese e na manutenção do pH do meio intracelular

das membranas das halobactérias. Apesar de exercerem diferentes funções biológicas em organismos distintos, a análise morfológica de suas estruturas revela significantes semelhanças entre as mesmas. Geralmente, elas são classificadas como proteínas conjugadas e o seu grupo prostético é o retinal, um aldeído derivado do β -caroteno que se liga ao grupo lateral de uma lisina específica por meio de uma base de Schiff protonada, que está circundado por sete α -hélices de sua apoproteína. A principal diferença entre estas duas proteínas refere-se aos seus estados ativos, onde o cromóforo encontra-se na conformação 11-*cis* na RD enquanto que na BR ele se apresenta na conformação *todo-trans*. As estruturas cristalográficas da BR e da RD, obtidas por Luecke *et al* [8] e Palczewski *et al* [9], respectivamente, estão representadas na Figura 1.

FIGURA 1: Representação das estruturas cristalográficas das proteínas (a) bacteriorrodopsina e (b) rodopsina, extraídas do banco de dados de proteínas (PDB) com os códigos 1C3W e 1U19, respectivamente, segundo os protocolos descritos nas referências 8 e 9.

A interação da luz do sol com essas proteínas fornece energia suficiente para isomerizar o retinal da configuração 11-*cis* para a *todo-trans* na RD; e de *todo-trans* para a

13-*cis* na BR. Essa ação sobre o grupo prostético, pelo agente externo, é a etapa que inicia os ciclos bioquímicos dessas moléculas, sem a qual não exerceriam as suas funções biológicas. Um fato intrigante a respeito desses sistemas é compreender o motivo que levou esses seres vivos a utilizarem diferentes isômeros do retinal para executar propriedades moleculares similares. Provavelmente este fator esteja associado à evolução independentes desses organismos, já que as *archaeobacterias* são muito primitivas em relação aos mamíferos [7, 10]. Além disso, ao analisar o balanço energético dessas transformações, constata-se que a modificação de *cis* para *trans*, em seres superiores, necessita de menor energia de ativação para isomerizar e também armazena maior energia durante o evento molecular para iniciar o seu ciclo, quando comparada com a transformação molecular das halobactérias [11-13]. Graças à simplicidade celular desses procariotas foi possível compreender sobre a dinâmica molecular envolvida na fotoisomerização do retinal, cujas informações são freqüentemente utilizadas em modelos para interpretar este fenômeno em sistemas mais complexos, como a fotoquímica da visão dos vertebrados.

A compreensão dos mecanismos moleculares e os ciclos fotoquímicos dessas proteínas são temas de pesquisas recorrentes, não somente pelos motivos previamente apresentados, mas principalmente pelas habilidades fotocrômicas dessas moléculas, isto é, a capacidade do sistema em absorver luz e induzi-lo a uma mudança de coloração reversível. Proteínas com essa propriedade são raramente observadas na natureza, o que incitou o interesse de pesquisadores em estudá-las para aplicações com finalidades tecnológicas, especialmente após a descoberta da BR nas membranas das halobactérias *Halobacterium salinarum*, que apresenta potencial para ser utilizada no desenvolvimento de dispositivos eletrônicos e fotônicos [4, 14-16], tais como, cartões de memórias de armazenamento tridimensionais e a retina sintética. Desde então, numerosos esforços são destinados a elucidar

as propriedades eletrônicas destas moléculas como, por exemplo, o mecanismo de interação com a luz que resulta na conversão em energia química ou em sinais fisiológicos.

O fisiologista Frans Boll foi o pioneiro a descrever o efeito fotocromico das retinas em 1877, conferindo-lhe a atribuição de descobridor da RD [17, 18]. Meio século depois Wald provou que a rodopsina é o produto da apoproteína opsina com o aldeído retinal e este, por sua vez, liga-se covalentemente à lisina – 296 através de uma base de Schiff protonada, conforme esquematizado na Figura 2 [19-21]. Com auxilio de diversos colaboradores, Wald desenvolveu trabalhos que foram fundamentais para indicar que a isomerização do cromóforo da RD é resultante da sua interação com a luz visível. Estas pesquisas outorgaram-lhe a laureação com o prêmio Nobel de medicina, juntamente com Ragnar Granit e Haldan Keffer Hartline, em 1967, por suas contribuições concernentes à fisiologia e a química da visão.

FIGURA 2: Formação da base de Schiff protonada entre o 11-*cis*-retinal e a lisina-296 da apoproteína opsina.

Mais de um século após a divulgação do trabalho de Boll, grandes avanços foram alcançados nesse tema, dentre os quais podem ser destacados: a compreensão de várias etapas dos ciclos bioquímicos destas proteínas [1, 6]; a determinação cristalográfica de alta resolução de suas estruturas [9, 22] e indicativos relevantes sobre os efeitos de sua interação com a luz [3, 6]. Atualmente, os trabalhos científicos sobre o assunto se destinam aos estudos da evolução da visão [3, 23, 24], de proteínas mutantes associadas a doenças [3, 24], em estratégias de aplicações de membranas fotocromicas como dispositivos eletrônicos, no

desenvolvimento da retina sintética [4, 14-16] e inferir acerca do mecanismo molecular da fotoisomerização do retinal. Este último propósito é particularmente desafiador devido a sua complexidade e suas perspectivas de aplicações, e encontra-se próximo aos limites físicos de detecção dos equipamentos, que necessita de laboriosos procedimentos de extração e purificação das proteínas para medidas mais precisas [25].

Diante das dificuldades mencionadas é natural buscar alternativas para poder avaliar esses sistemas satisfatoriamente. Comumente o retinal é analisado em ensaios experimentais com diferentes solventes e pHs, ou empregando métodos teóricos de química quântica e dinâmica molecular. Entretanto, sabe-se que a eficiência máxima da fotoisomerização do retinal em solução é de aproximadamente 14% e não é específica como nas proteínas purificadas, onde a eficiência do processo pode superar 65% [26]. As abordagens teóricas para esse sistema são relativamente complexas, uma vez que envolvem graus de liberdade eletrônicos que exigem a utilização de aproximações baseadas na mecânica quântica, e requerem considerável esforço computacional para sua execução, o que leva a utilização modelos simplificados baseados na proteína ou somente no cromóforo para investigar suas propriedades estruturais e eletrônicas.

Em 1968 Trsic estudou a cadeia poliênica do cromóforo retinal utilizando o método teórico de Hückel, quando propôs que um único fóton poderia excitar um bastonete anulando a resposta de milhares de moléculas de rodopsina presentes na célula [27]. Recentemente, Pinto analisou a molécula do retinal e um modelo protonado do retinal ligado à cadeia lateral de uma lisina via base de Schiff no estado fundamental e no primeiro estado excitado, empregando métodos semi-empíricos de química quântica. Esse trabalho propôs uma explicação para a interrupção da corrente escura após a absorção de luz pelos bastonetes na retina [28, 29]. Outras interessantes abordagens teóricas estão relacionadas com a cinética da

isomerização do cromóforo através da superfície de energia potencial de diferentes níveis de energia eletrônica utilizando ondas planas [30-32].

A pesquisa desenvolvida durante este projeto de mestrado foi destinada a estimar as excitações de alguns retinais na configuração *todo-trans* no estado fundamental e também verificar quais as implicações na estrutura da cadeia poliênica desta molécula devido a substituição do anel β -ionona por grupos fluoróforos em dois ambientes distintos, no vácuo e ligado à bacterioopsina, utilizando métodos teóricos. Para a melhor compreensão das proposições deste trabalho, esta dissertação foi estruturada da seguinte forma: no decorrer deste capítulo serão detalhados os aspectos considerados mais relevantes para o estudo da excitação do retinal e da BR, a motivação e os objetivos. No Capítulo 2 os métodos teóricos são brevemente apresentados e, em seguida, são descritas detalhadamente as estratégias de aplicações dos métodos utilizados. Os resultados são interpretados e discutidos no Capítulo 3 e as conclusões gerais são apresentadas no Capítulo 4.

1.1. RETINAL

O retinal, uma molécula derivada do β -caroteno, está envolvida em importantes processos biológicos como, por exemplo, na regulação, proliferação e diferenciação celular no período embrionário dos animais superiores e também exerce papel essencial na química da visão [24, 33]. A explicação para tanta diversidade em suas funções biológicas está na existência de múltiplos receptores específicos para os metabólitos da vitamina A em organismos vivos [33]. A Figura 3 apresenta a estrutura dessa molécula enfatizando suas ligações insaturadas.

FIGURA 3: Estrutura molecular do retinal em sua conformação *todo-trans*. Em azul está destacada a cadeia poliênica da molécula.

1.1.1. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DO TODO-*TRANS*-RETINAL

Nas últimas décadas, diversas pesquisas concentraram-se na investigação das propriedades fotoquímicas do *todo-trans*-retinal, por serem essenciais para o ciclo bioquímico da visão e da fotossíntese das halobactérias. Os estados eletrônicos de mais baixa energia são especialmente investigados para o melhor entendimento dos processos cinéticos da fotoisomerização. Medidas de fluorescência realizadas para o *todo-trans*-retinal indicam a existência de três estados eletrônicos de baixa energia, sendo que o primeiro é decorrente da transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$, enquanto que as outras duas são do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ [34-37]. Contudo, a ordem das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ainda é assunto de controvérsias [35, 38]. Experimentalmente foi constatado que essa molécula apresenta comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) em torno de 381 nm [39].

A possibilidade de desenvolver dispositivos de alta tecnologia a partir de membranas de bactérias também incentivou alguns pesquisadores a elaborar rotas sintéticas para produzir novos retinais. Ivanova e colaboradores propuseram um procedimento no qual o anel β -iononona do retinal é substituído por grupos fluorescentes como policiclos de anéis aromáticos condensados e anéis cumarínicos [39], segundo seus resultados, a incorporação

desses co-fatores artificiais pela BR é satisfatória e, dessa forma, viabilizam aplicações com finalidades tecnológicas. Essas alterações estruturais são particularmente interessantes, pois possibilitam uma variedade de proteínas análogas com capacidade de exercer a mesma função que a encontrada na natureza. Obviamente, essas mudanças ocasionam interações diferenciadas entre a apoproteína e os retinais análogos quando comparadas à BR, possibilitando a obtenção de melhores resultados para determinadas aplicações [14, 15].

1.2. BACTERIORRODOPSINA

A BR é uma proteína com massa molecular aproximada de 26 KD, encontrada na membrana púrpura da *Halobacterium salinarum*. Esses microrganismos são arqueobactérias halófilas, “que gostam de sal”, que desenvolveram um eficiente mecanismo para armazenar energia. Em ambientes onde há presença de O₂ elas oxidam moléculas energéticas, lipídios e glicídios, para gerar ATP. Quando o O₂ torna-se escasso elas se adaptam para um modo fotossintético e produzem grandes quantidades de BR, Figura 1 (a), que são proteínas integrantes de sua membrana [2]. Nesta proteína, o todo-*trans*-retinal se liga covalentemente à lisina – 216 formando uma base de Schiff, similarmente à reação que ocorre com a RD, Figura 2. Nessas condições a proteína está apta a exercer suas propriedades fotocrômicas.

1.2.1. FOTOCICLO DA BACTERIORRODOPSINA

A função da BR é de bombear prótons do meio citoplasmático da membrana para o meio extracelular. Esse processo envolve elevada energia livre de ativação, pois transportar prótons através da membrana significa transferir cargas de um ambiente apolar, citoplasma,

para outro polar aquoso, o meio extracelular. Para tal finalidade, esta proteína utiliza a energia da isomerização do retinal, induzida pela luz gerando um gradiente eletroquímico que bombeia os prótons através da membrana plasmática para posterior uso na síntese da ATP.

O fotociclo da BR envolve várias etapas intermediárias caracterizadas pelo $\lambda_{\text{máx}}$ das distintas conformações do retinal. As principais etapas deste ciclo estão indicadas na Figura 4. Resumidamente, o ciclo é explicado da seguinte maneira: após a absorção do fóton no estado inicial a BR₅₇₀ é convertida por processos fotoquímicos ao estado J₆₂₅, não apresentado na figura. Esse evento possui tempo de vida em torno de 0,5 ps e corresponde ao processo de excitação. O processo J $\rightarrow$ K é a fotoisomerização do retinal que leva a estrutura da conformação *todo-trans* para a *13-cis*, cujo tempo de vida é da ordem de 4 ps.

FIGURA 4: Fotociclo da BR simplificado. Os intermediários estão representados pelas letras maiúsculas de K a O. Os números subscritos dos intermediários representam o $\lambda_{\text{máx}}$ dos diferentes estados da BR e os valores entre as etapas denotam o tempo de vida de cada evento.

As etapas posteriores são responsáveis pelo transporte de prótons do meio citoplasmático para o meio extracelular sendo que o mecanismo molecular mais provável foi proposto por Henderson e colaboradores [40], com interpretações eletrostáticas, esquematizada na Figura 5. Nesse modelo, após a formação da base de Schiff entre o retinal e a lisina-216 os oxigênios de dois aspartatos (Asp-85 e Asp-212) servem como opositores para

o nitrogênio com a carga positiva da base de Schiff protonada. Nessa condição o retinal bloqueia o fluxo de prótons através da membrana. Após a conversão do *todo-trans* para o *13-cis*, a base de Schiff move-se cerca de 2 Å, favorecendo a transferência do próton da base de Schiff para o Asp-85. Essa mudança de carga induz a arginina-82 a transferir seu próton para o meio externo da proteína. No intermediário M_{412} ocorre uma mudança conformacional na proteína, afastando o nitrogênio do Asp-85. Ao relaxar a proteína, o N da base de Schiff se inverte e captura um próton do Asp-96 (etapa $M_{412} \rightarrow N_{550}$), que por sua vez adquire um próton do citossol e provoca a modificação da proteína juntamente com a isomerização do cromóforo (etapa $N_{550} \rightarrow O_{640}$) reiniciando o ciclo da BR. Esse processo é bastante eficiente e, em condições extremas, cada molécula de BR é capaz de transportar até 100 prótons por segundos [2, 6].

FIGURA 5: Esquema simplificado do processo de transporte de prótons do ciclo da bacteriorrodopsina.

1.2.2. A FOTOISOMERIZAÇÃO DO RETINAL E O EVENTO PRIMÁRIO

O ciclo aparentemente simples da BR consegue explicar, em detalhes, várias das suas etapas intermediárias. No entanto, não oferece justificativa para o evento primário da isomerização do retinal na etapa $BR_{570} \rightarrow K_{590}$. Diferentemente das outras etapas onde os processos são de natureza eletrostática ou térmica, esse é um problema de natureza eletrônica. Com técnicas espectroscópicas temporalmente resolvidas, alguns trabalhos de fotofísica dinâmica elaboraram modelos para explicar o mecanismo de fotoisomerização do retinal. Em 1988, dois grupos independentes sugeriram um modelo abrangendo dois estados eletrônicos para entender o processo primário na BR [41, 42]. Em suas conclusões eles sugeriram que a fotoexcitação da BR pode acessar uma região repulsiva da energia potencial do estado excitado, que provoca um movimento torsional ultra-rápido, entre 100 e 200 fs, em torno do mínimo dessa superfície de energia potencial ao longo da coordenada da reação, Figura 6 (a).

FIGURA 6: Mecanismos de fotoisomerização (a) envolvendo dois estados eletrônicos e (b) envolvendo três estados, extraído da referência 43.

Atualmente há evidências teóricas e experimentais indicando que neste processo estão envolvidos três estados eletrônicos, onde a dinâmica do processo sugere que a superfície de energia potencial na região ativa de Frank-Condon do primeiro estado eletrônico excitado é relativamente plana e não repulsiva, Figura 6 (b). Sugerindo que a estrutura da proteína em torno do retinal não deve dirigir a reação para a conformação 13-*cis*, ou seja, a principal fonte de energia da isomerização é intrínseca do grupo prostético [43, 44].

1.3. OBJETIVOS

Conforme discutido anteriormente, os estados eletrônicos de baixa energia são essenciais para o processo de isomerização do retinal que resulta na efetivação de importantes eventos biológicos. Isso motivou a investigação das transições eletrônicas dos retinais apresentados na Figura 7. Foi investigado também, o comportamento eletrônico dessas moléculas ligadas à proteína bacterioopsina. Para assim, estimar algumas de suas propriedades ópticas e estruturais, para tratar o fenômeno da fotoisomerização do retinal utilizando métodos de estrutura eletrônica.

FIGURA 7: Representação estrutural do todo-*E*-retinal (A), dos retinais análogos com anéis cumarínicos (B e C) e dos análogos com anéis policíclicos aromáticos (D e E). A numeração indicada será a adotada para as discussões dos resultados.

Capítulo 2

2. MÉTODOS UTILIZADOS

A maioria dos estudos teóricos tem como principal objetivo relacionar fenômenos físicos ou químicos com propriedades atômicas e moleculares. A forma ideal de alcançar esse propósito seria obter a função onda do sistema de interesse. Em princípio, a resolução exata da equação de Schrödinger seria o mais indicado para essa finalidade. Porém, isso é factível apenas para o átomo de hidrogênio e sistemas hidrogenoídes, devido a complexidade no tratamento das repulsões intereletrônicas [45]. Entretanto, na maioria dos casos, devido a aproximação de Born-Oppenheimer, a solução da sua forma independente do tempo fornece resultados satisfatórios, Eq. (1).

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad \text{Eq. (1)}$$

A obtenção da função de onda para sistemas polieletrônicos somente é possível através de aproximações, as quais tentam encontrar soluções para a equação de Schrödinger e com isso caracterizar adequadamente o sistema tratado, dentro das possibilidades matemáticas e computacionais disponíveis, o que requer bom senso e pacotes computacionais confiáveis.

Em análises de estrutura eletrônica o tamanho do sistema é sempre um fator limitante. Por isso, em moléculas com número de átomos da ordem de 10^2 muitas vezes é necessário utilizar métodos clássicos para descrever os movimentos nucleares e algumas interações de longo alcance. No entanto, para tratar os processos eletrônicos é indispensável o uso de métodos fundamentados na mecânica quântica.

No decorrer desta seção os métodos utilizados nesta pesquisa são sucintamente descritos, enfatizando que não houve a intenção em aprofundar as discussões sobre a teoria, mas apenas destacar alguns aspectos a respeito de suas principais diferenças.

2.1. MÉTODO DE HARTREE-FOCK-ROOTHAAN (HF)

Dentre os métodos de estrutura eletrônica, o de Hartree-Fock (HF) é um dos mais populares por apresentar boas soluções para o problema de muitos elétrons, e também por ser ponto de partida para outros métodos. Em sua formulação é admitida a aproximação de Born-Oppenheimer e desprezados os efeitos relativísticos. Desta forma resolve-se a equação de Schrödinger eletrônica [45]. Após a introdução do conceito de conjuntos de funções base, proposto independentemente por Clemens C. J. Roothaan e George G. Hall, este tratamento matemático tornou o cálculo de moléculas mais atrativo. Assim, os orbitais moleculares de HF podem ser obtidos como combinações lineares de funções de base atômicas, Eq. (2). Este é um processo iterativo, onde são usados: os determinantes de Slater, para construir funções de onda anti-simétricas; o operador de energia de Fock ($\hat{F}$) e o princípio variacional. Com isso a energia total do sistema ($\mathcal{E}_i$) é minimizada de acordo com os limites de convergência impostos, com o intuito de calcular os coeficientes de expansão (c_{ik}) e por fim obter as requeridas propriedades do sistema [45-47].

$$\hat{F} \sum_k^n c_{ik} \chi_k = \mathcal{E}_i \sum_k^n c_{ik} \chi_k \quad \text{Eq. (2)}$$

Na Eq. (2), χ_i são as n funções de base monoelétrônicas usadas na expansão, as quais são conhecidas.

As principais deficiências do método de HF referem-se a imprecisão associada à expansão em um conjunto de funções de base finito e, principalmente, aos efeitos de correlação eletrônica. Para corrigir o problema de correlação eletrônica, foram elaborados os métodos pós-Hartree-Fock para melhor descrever as interações entre muitos corpos. Dentre estes estão inclusos: o método de interação de configurações (CI), a teoria da perturbação de muitos corpos de Møller-Plesset (MBPT – *Many Body Perturbation Theory*), *Coupled Cluster* (CC), o método do campo auto-consistente multiconfiguracional (MCSCF – *Multi-Configuration Self-Consistent Field* ou CASSCF – *Complete Active Space Self-Consistent Field*) e outros. Entretanto, a utilização destes métodos necessita de elevado esforço computacional sendo, portanto empregados em sistemas relativamente pequenos.

Esquemáticamente, os principais passos seguidos nos cálculos executados com o método HF estão sintetizados no fluxograma apresentado na Figura 8.

FIGURA 8: Fluxograma com as principais etapas dos cálculos utilizando o método de HFR.

2.2. TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE (DFT)

Em problemas químicos e físicos que exigem o tratamento de correlação eletrônica, frequentemente são usados os métodos derivados da teoria do funcional da densidade (DFT – *Density Functional Theory*). O tempo computacional requerido para efetuar os cálculos com a

DFT geralmente é menor do que o dos pós-Hartree-Fock, sendo um de seus principais atrativos.

Diferentemente do HF, que determina a função de onda (Ψ) para depois obter as propriedades, a DFT obtêm informações sobre um dado sistema a partir de sua densidade eletrônica, $\rho(\vec{r})$, equações 3 e 4.

$$\begin{aligned} E &= E[\rho(\vec{r})] \\ E[\rho(\vec{r})]_{\min} &= E_0 = E[\rho_0(\vec{r})] \end{aligned} \quad \text{Eq. (3)}$$

onde:

$$\begin{aligned} E[\rho_0(\vec{r})] &= T[\rho_0(\vec{r})] + E_{Ne}[\rho_0(\vec{r})] + E_{ee}[\rho_0(\vec{r})] = \\ &= T[\rho_0(\vec{r})] + \int \rho_0(\vec{r}) V_{Ne} d\vec{r} + E_{ee}[\rho_0(\vec{r})] \end{aligned} \quad \text{Eq. (4)}$$

Na Eq. (4), T é o termo atribuído à energia cinética, E_{Ne} é relativo a energia potencial de atração núcleo-elétron, E_{ee} é a energia potencial de repulsão elétron-elétron, enquanto que V_{Ne} refere-se ao potencial de atração entre o núcleo e os elétrons, denominado de potencial externo.

A essência deste método reside na consideração de que a densidade eletrônica do estado fundamental de um sistema pode ser calculada como a densidade de um sistema de partículas independentes que se movem sob ação de um potencial externo. Uma vez que este potencial efetivo (V_{ext}) é calculado, a energia do estado fundamental pode ser obtida variacionalmente pela minimização do funcional de energia. Para isso, seleciona-se uma função de onda inicial ou tentativa ($\tilde{\Psi}$), Eq. (5), para gerar o operador hamiltoniano associado à mesma [48-51].

$$\begin{aligned} \langle \tilde{\Psi} | \hat{H} | \tilde{\Psi} \rangle &= T[\tilde{\rho}_0(\vec{r})] + V_{ee}[\tilde{\rho}_0(\vec{r})] + \int \tilde{\rho}_0(\vec{r}) V_{ext} d\vec{r} = \\ &= E[\tilde{\rho}_0(\vec{r})] \geq E_0[\rho_0(\vec{r})] = \langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle \end{aligned} \quad \text{Eq. (5)}$$

Kohn e Sham relacionaram um sistema de referência fictício e densidade $\rho_s(\vec{r})$, no qual os seus n elétrons não interagem entre si, com um sistema real. Admitindo que ambos os sistemas possuíssem densidades iguais obtiveram a Eq. (6) [51].

$$\rho_s(\vec{r}) = \sum_i^n \sum_s |\varphi(\vec{r}, s)|^2 = \rho_0(\vec{r}) \quad \text{Eq. (6)}$$

Os orbitais de Kohn-Sham são determinados utilizando-se o teorema variacional na DFT, Eq. (7), minimizando a energia (ε_i) e aplicando o operador de Kohn-Sham (h_i^{KS}).

$$h_i^{KS} \varphi_i(\vec{r}) = \varepsilon_i \varphi_i(\vec{r})$$

$$\left[-\frac{\nabla^2}{2} + V_{KS}[\rho(\vec{r})] \right] \varphi_i(\vec{r}) = \varepsilon_i \varphi_i(\vec{r}) \quad \text{Eq. (7)}$$

Em contraste com o método de HF, onde as funções monoelétrônicas são usadas para minimizar diretamente a energia, os orbitais calculados com a DFT aproximada são utilizados para obtenção da melhor densidade eletrônica do sistema. Portanto, os autovalores das energias da DFT não possuem significado físico e não há um teorema equivalente ao de Koopmans na teoria de Kohn-Sham que relacione as energias dos orbitais com as energias de ionização [51, 52]. Contudo, o autovalor do orbital ocupado de maior energia ($\varepsilon_{máx}$) relaciona-se com a energia de ionização, se for utilizado o potencial de correlação e troca exato (V_{xc}), e este por sua vez, está associado ao funcional de correlação e troca (E_{xc}), conforme apresentado na Eq. (8) [51-53], onde os subscritos c e x significam correlação e troca provenientes dos termos escritos na língua inglesa.

$$V_{xc} \equiv \frac{\delta E_{xc}[\rho(\vec{r})]}{\delta[\rho(\vec{r})]} \quad \text{Eq. (8)}$$

Na prática, a qualidade da aproximação do funcional da densidade depende principalmente da escolha do funcional de correlação e troca (E_{xc}), para a descrição das propriedades do sistema em questão, que podem ser do tipo LDA, GGA, híbridos e outras. Considerando-se que todas as metodologias ou códigos da DFT tentam resolver a Eq. (7), então para encontrar o potencial de Kohn-Sham, V_{KS} , faz-se o uso da Eq. (9):

$$V_{KS}[\rho(\vec{r})] = V_{ext}(\vec{r}) + V_{Hartree}[\rho(\vec{r})] + V_{xc}[\rho(\vec{r})] \quad \text{Eq. (9)}$$

Assim, resumidamente, os cálculos realizados com os métodos da DFT seguem os passos mostrados na Figura 9.

FIGURA 9: Fluxograma com as principais etapas dos cálculos utilizando o método da DFT.

Nesta pesquisa utilizou-se o funcional híbrido B3LYP que, de modo geral, apresenta resultados satisfatórios para sistemas químicos. Este funcional apresenta em suas formulações o termo de energia de troca (E_x) de Hartree-Fock combinado com o termo de energia de correlação e troca (E_{xc}) da DFT. A expressão referente a este funcional está descrita na

Eq. (10), onde os três termos a , b e c são parâmetros empíricos inseridos com a finalidade de ajustar as contribuições dos termos do HF e da DFT [48-50, 52].

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1-a)E_x^{LSDA} + aE_x^{HF} + bE_x^B + cE_c^{LYP} + (1-c)E_c^{LSDA} \quad \text{Eq. (10)}$$

2.3. MÉTODOS PROPAGADORES (TDHF E TDDFT)

Os métodos TDHF e TDDFT, acrônimos dos termos em inglês *Time-dependent Hartree-Fock* (Hartree-Fock dependente do tempo) e *Time-dependent density functional theory* (teoria do funcional da densidade dependente do tempo), são métodos de primeiros princípios que podem ser empregados no tratamento de sistemas complexos para estimar propriedades ópticas não-lineares e energias de excitação. Estes métodos consistem de aproximações do potencial do campo médio para o estudo de interações dinâmicas de sistemas de muitos corpos, e utiliza a função de Green para medir a correlação de uma dada variável com o tempo [49, 54-56].

2.4. MÉTODO SEMI-EMPÍRICO ZINDO/S-CI

A utilização de métodos semi-empíricos se justifica quando existe a dificuldade em estudar moléculas constituídas por um número de átomos relativamente grande aliada à necessidade de compreender o comportamento das propriedades concernentes a elas. Nesses métodos, além das constantes universais são incluídas em sua formulação parâmetros empíricos com a intenção de diminuir o tempo computacional, mas sem tornar seus resultados discrepantes em relação aos resultados experimentais e a métodos mais precisos como os *ab initio* (HF, DFT, TDHF e TDDFT).

Neste trabalho foi utilizado o método ZINDO/S-CI (*Zerner's Intermediate Neglect of Differential Overlap/Spectroscopic-Configuration Interaction*) como alternativa para a obtenção das transições eletrônicas das moléculas e suas caracterizações, devido ao elevado custo computacional exigido pelos métodos TDHF e TDDFT. Além disso, este método se destaca por prever e reproduzir satisfatoriamente resultados experimentais de espectroscopia de absorção eletrônica [28, 29, 57, 58]. Este método foi parametrizado com parâmetros espectroscópicos por Zerner e Ridley e inclui o tratamento de interação de configurações aproximado, CI truncado, com o propósito de introduzir o efeito de correlação eletrônica [28, 29, 59, 60]. No procedimento de CI completo, Eq. (11), a função de onda inicial ou tentativa é escrita como uma combinação linear de determinantes de Slater, Eq. (12), referentes as possíveis configurações dos estados excitados e do fundamental, onde os coeficientes são determinados mediante o processo variacional de minimização da energia eletrônica de acordo com os limites impostos no cálculo [46, 48, 49].

$$\Psi_{CI-Completo} = c_o \left| \psi_{HF} \right\rangle + \sum c_n \left| \psi_{S,D,T,\dots} \right\rangle \quad \text{Eq. (11)}$$

$$\Psi_{HF} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{pmatrix} \chi_1(x_1) & \chi_2(x_1) & \dots & \chi_N(x_1) \\ \chi_1(x_2) & \chi_2(x_2) & \dots & \chi_N(x_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(x_N) & \chi_2(x_N) & \dots & \chi_N(x_N) \end{pmatrix} \quad \text{Eq. (12)}$$

2.5. MÉTODO HÍBRIDO – ONIOM

O método ONIOM (*our own N-layered integrated molecular orbital + molecular mechanics*) é uma metodologia híbrida que foi desenvolvida por Morokuma e colaboradores que permite usar simultaneamente até três métodos com níveis de teoria diferentes em partes distintas de uma molécula ou sistema [50, 61, 62]. Métodos como este visam diminuir o erro, ao introduzir os efeitos da vizinhança, em processos eletrônicos que ocorrem apenas em ambientes químicos como solventes e proteínas. Vale ressaltar que as simulações clássicas conseguem reproduzir apenas fenômenos onde os graus de liberdade eletrônicos podem ser ignorados. Portanto em processos que envolvem reações químicas ou transições eletrônicas os potenciais clássicos não conseguem descrevê-los.

O princípio básico destes métodos considera o sítio responsável pelo processo eletrônico como uma pequena região em relação ao sistema completo. Sendo assim, a estratégia consiste em aplicar aproximações da mecânica quântica (QM) para investigar os efeitos eletrônicos, enquanto a vizinhança é tratada com métodos fundamentados na mecânica clássica conhecidos como métodos de mecânica molecular (MM), veja a Figura 10. Devido a essa freqüente abordagem, esses métodos são genericamente conhecidos como QM/MM.

FIGURA 10: Esquema de partição do sistema em uma metodologia de QM/MM

Em sua aplicação tradicional, o tratamento quântico e o clássico são executados simultaneamente, na qual o hamiltoniano efetivo do sistema completo é dado pela Eq. (13).

$$H_{eff} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM}, \quad \text{Eq. (13)}$$

onde, H_{QM} , H_{MM} e $H_{QM/MM}$ são respectivamente os hamiltonianos quântico, clássico e o que rege as interações entre os dois ambientes.

Neste trabalho foram utilizadas duas abordagens para avaliar as interações entre os níveis de teoria. Para calcular a estrutura das proteínas foi utilizado o acoplamento eletrostático, ao passo que para as excitações do cromóforo aplicou-se o acoplamento mecânico. No primeiro caso, o potencial gerado pelas cargas parciais da região clássica é introduzido no hamiltoniano quântico, enquanto que no segundo a carga é tratada classicamente, ou seja, as cargas parciais são atribuídas aos átomos da região quântica que interagem com as da região clássica.

2.6. CAMPO DE FORÇA UNIVERSAL – UFF

A mecânica molecular é uma excelente aproximação que permite tratar os movimentos dos núcleos e dos elétrons separadamente. Métodos como estes utilizam campos de força empíricos em suas formulações, isto é, um conjunto de funções potenciais que mapeiam a dependência da energia com os movimentos nucleares.

O campo de força UFF (*Universal Force Field*) foi escolhido neste trabalho por apresentar um conjunto de raios de ligações atômicas dependentes da hibridização, de ângulos de hibridização, parâmetros de Wan der Walls e barreiras de inversão e torsionais. Este campo de força está parametrizado para os átomos de C, N, H, O, S e uma série de átomos pesados inorgânicos com diferentes cargas efetivas [63].

2.7. ESTRATÉGIAS COMPUTACIONAIS

Os sub-tópicos desta seção descrevem os procedimentos efetuados para a obtenção das geometrias e energias das excitações das moléculas. Todos os procedimentos empregados neste trabalho são amplamente utilizados para o estudo de estrutura eletrônica de sistemas moleculares orgânicos, e capazes de fornecer resultados comprovadamente satisfatórios [49, 52, 58, 64].

2.7.1. PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E ESTRUTURAIS DOS RETINAIS

O estudo das transições eletrônicas das moléculas faz parte do escopo das investigações desta dissertação. Por isso, todos os procedimentos prévios foram direcionados para esse objetivo. A primeira etapa deste trabalho consistiu em analisar as propriedades estruturais e eletrônicas dos aldeídos ilustrados na Figura 7 e confrontar os resultados teóricos com os experimentais [39, 65].

2.7.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS RETINAIS

Para a obtenção de energias de excitação confiáveis são necessárias boas representações estruturais das moléculas, o que motivou a escolha dos métodos *ab initio* HF e DFT para calcular as estruturas do retinais e suas propriedades.

Nos cálculos executados com o método HF aplicou-se a análise hierárquica de funções de bases, usando os conjuntos de funções de bases de Pople 3-21G, 6-31G e 6-31G(d,p) [45, 66]. Com a DFT foi selecionado o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de função de base 6-31G(d,p).

As geometrias geradas com o HF/6-31(d,p) foram posteriormente comparadas com as obtidas com a metodologia B3LYP/6-31(d,p) e com os resultados cristalográficos [65]. Adicionalmente foram analisadas as possíveis alterações da estrutura das moléculas sintéticas em relação ao retinal, decorrentes da substituição do ciclo β -ionona por anéis policíclicos condensados e cumarínicos e, por fim, foram estudados os orbitais de fronteira dessas moléculas.

2.7.3. ESPECTRO DE EXCITAÇÃO DOS RETINAIS

A partir das conformações moleculares calculadas previamente, foram estimados os espectros de excitação para investigar os estados eletrônicos envolvidos na primeira banda de absorção deste retinais. Todos os espectros foram obtidos com os métodos semi-empíricos ZINDO/S-CI e os *ab initio* TDHF e TDDFT com a base 6-31G(d,p), com excitações simples.

Como espaços ativos foram utilizados dez orbitais ocupados e dez virtuais nos métodos TDHF e TDDFT, enquanto no método semi-empírico empregou-se trinta orbitais ocupados e trinta virtuais. Em ambos os casos foram calculadas trinta transições eletrônicas do tipo singlete.

2.8. PROPRIEDADES DOS CROMÓFOROS DA BR

2.8.1. DESCRIÇÃO DO MODELO DA PROTEÍNA

Para alcançar o propósito deste trabalho, foi necessário obter a estrutura da proteína ligada a cada um dos retinais apresentados. A estratégia consistiu em usar a estrutura cristalográfica da proteína BR, obtida por Luecke *et al* [22] de resolução 1,55 Å como coordenadas iniciais para os átomos de C, O, N e S da estrutura protéica. Para compor o

modelo foram inseridos os átomos de hidrogênios na proteína e os cromóforos, exceto na proteína nativa, e os resíduos de lipídio removidos. Nesse modelo, foram adotadas as cargas padrões dos aminoácidos em solução de pH 7,0 [2], exceto na Asp96, Asp115 e Glu204, devido às evidências experimentais que sugerem que nesta proteína esses aminoácidos são neutros [67, 68]. Em suma, o modelo utilizado é constituído de 222 aminoácidos, 23 moléculas de água e o cromóforo, apresentando o sistema com carga total + 3 ua.

2.8.2. ESTRUTURA DAS BRs

Pelos motivos apresentados no Capítulo 2, foi necessário dividir as proteínas em duas regiões: uma com QM, constituída do retinal ligado à cadeia lateral da Lys-216; e outra MM, para descrever o comportamento dos demais átomos da proteína. A Figura 10 apresenta todos os átomos da região QM para a molécula do *todo-trans*-retinal aplicado neste trabalho, onde a carga é +1, o mesmo modelo foi aplicado aos demais cromóforos.

Na região QM foram aplicados o HF e o funcional híbrido B3LYP combinados com a base 6-31G(d,p), para verificar a dependência da geometria do cromóforo com a correlação eletrônica.

2.8.3. TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS

O método semi-empírico ZINDO/S-CI foi aplicado na região QM as estruturas estabilizadas das proteínas para fornecer as possíveis transições eletrônicas dos cromóforos. O acoplamento mecânico no tratamento das cargas foi utilizado devido às limitações do pacote computacional GAUSSIAN03 [69]. O espaço ativo adotado foi de 10 orbitais ocupados e 10

virtuais para calcular cinquenta excitações simples do tipo singlete para cada uma das estruturas.

2.9. PACOTES COMPUTACIONAIS UTILIZADOS

Os principais pacotes computacionais utilizados nesta pesquisa estão citados abaixo:

- GAUSSIAN 03 – revisão B04 [69];
- VMD - versão: 1.8.6 [70];
- Pymol - versão: 0.97 [71].

Capítulo 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. ESTRUTURAS DOS RETINAIS

Para que as análises teóricas sejam plausivelmente realistas, é imprescindível fazer uso de modelos estruturais que descrevam o mais satisfatoriamente possível o sistema real e, com isso, propor mecanismos que possam ocorrer nestes sistemas e compreender suas implicações. Isso somente é possível com as informações obtidas acerca da distribuição eletrônica e conformacional provenientes dos cálculos.

A estrutura do todo-*trans*-retinal foi previamente calculada com vários métodos de química quântica. A análise comparativa entre esses resultados e o procedente de dados cristalográficos, medidos por Hamanaka *et al* [65], sumariadas pelos cálculos da raiz quadrada da média quadrática (RMSD – *root mean square deviation*), Tabela 1, mostraram que os métodos semi-empíricos são capazes de fornecer resultados equivalentes aos obtidos com os *ab initio* para os ângulos e comprimentos de ligação. Portanto, para o caso do retinal, esses métodos teóricos foram capazes de estimar estas propriedades estruturais de forma similar ao observado em ambiente experimental e com significativa confiabilidade.

TABELA 1: RMSD para os comprimentos e ângulos de ligações entre carbonos do todo-*trans*-retinal em relação aos dados cristalográficos.

Método/ base	Ângulo de ligação (grau)	Comprimento de ligação (Å)
HF/6-31G(d,p)	2,1	0,021
B3LYP/6-31G(d,p)	2,1	0,025
AM1	2,1	0,025
PM3	2,3	0,025

3.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS MOLÉCULAS

Neste trabalho, grande parte das discussões referentes às estruturas das moléculas restringiu-se a cadeia poliênica, com o intuito de facilitar as análises e também por ser a região responsável pela interação com a radiação eletromagnética e onde ocorrem os processos fotoquímicos.

Ao analisar o sistema de ligações- π da estrutura do retinal, Figura 7 (A), calculada tanto com o método HF como com DFT, observa-se dois planos. Um dos planos é compreendido pela ligação π do ciclo β -ionona, enquanto que o outro plano é formado pelas ligações da cadeia poliênica. A ressonância dos elétrons- π fornece uma razoável rigidez estrutural na cadeia conjugada e a ocorrência destes dois planos é provavelmente devido às repulsões intramoleculares existentes entre os hidrogênios do anel e os da cadeia poliênica. Comportamento similar a este foi observado por Pinto [57], ao analisar a superfície de energia potencial de dímeros derivados do fluoreno, onde propôs que os efeitos eletrostáticos poderiam explicar a não-planaridade dessas moléculas no estado fundamental.

Embora os retinais sintéticos apresentem um grupo aromático ligados diretamente à cadeia poliênica, eles apresentaram resultados estruturais similares ao do *todo-trans*-retinal, ou seja, as estruturas também apresentaram dois planos: um contendo o anel e o outro a cadeia insaturada. No entanto, para as moléculas com substituintes cumarínicos, Figura 7 (B) e (C), verificou-se que as estruturas são completamente planas, segundo os resultados calculados com o funcional B3LYP. A Tabela 2 sintetiza esses resultados. Nesta tabela observa-se ainda que a DFT gera ângulos menores do que os obtidos com o HF. Assim, considerando que ligações π -conjugadas são mais estáveis em conformações planares, pode-se dizer que os resultados obtidos com a DFT são mais coerentes. Porém, é importante ressaltar que recentemente alguns trabalhos mostraram que o funcional híbrido B3LYP não fornece resultados estruturais satisfatórios para sistemas π -conjugados, pois, geralmente, ele superestima os efeitos de conjugação eletrônica [57, 72-74].

TABELA 2: Ângulo formado entre os planos da cadeia poliênica e o ciclo ligado a ela.

Molécula	HF/6-31G(d,p)	B3LYP/6-31G(d,p)
	ϕ_1 (grau)	ϕ_1 (grau)
Retinal (A)	64,2	46,1
B	19,1	0,0
C	18,6	0,0
D	44,3	29,9
E	49,1	34,2

Os mapas de cargas derivadas do potencial eletrostático estão expostos na Tabela 3. A análise desses resultados mostra que, conforme o esperado, as maiores densidades de carga positiva estão sobre os hidrogênios, enquanto que os oxigênios retêm a maior densidade

negativa. Além disso, pode ser observado que a inclusão dos oxigênios nos anéis ocasiona concentração da densidade eletrônica sobre estes heteroátomos e sua ausência faz com que a distribuição se torne mais dispersa ao longo da cadeia poliênica e mais intensa sobre os anéis aromáticos.

TABELA 3: Mapas de cargas derivadas do potencial eletrostático dos retinais estudados calculados com os métodos HF e DFT.

Molécula	HF/6-31G(d,p)	B3LYP/6-31G(d,p)	Escala ($\times 10^2$)
(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

A partir dos resultados apresentados da Tabela 2, verifica-se ainda que as moléculas (A) e (E) apresentam os maiores desvios da planaridade. Esses resultados fornecem

indicativos de que as cargas podem, de fato, induzir efeitos intramoleculares repulsivos nos retinais, desfavorecendo as conformações planares.

3.3. ANÁLISE DE ORBITAIS DOS RETINAIS

Os elétrons de valência são importantes para determinar os processos eletrônicos de baixa energia, por isso foram analisados os orbitais de fronteira das estruturas. Essas representações descrevem qualitativamente a região onde elétrons mais externos das moléculas estão distribuídos.

Como esperado, os orbitais de fronteira da molécula *todo-trans*-retinal localizam-se predominantemente na sua cadeia poliênica em função da alta densidade de elétrons- π desta região. A introdução de grupos com alta densidade de elétrons- π contribuiu para a formação de orbitais ligantes nos anéis diretamente ligados à cadeia conjugada no orbital HOMO dos compostos. Os orbitais virtuais de fronteira (LUMO) indicam que as características do retinal original são preservadas nos análogos, mesmo com introdução dos substituintes aromáticos, como pode ser constatado na Tabela 4. Deste modo, segundo a teoria do orbital molecular, é provável que as moléculas análogas ao retinal apresentem propriedades químicas e físicas similares as do retinal natural e, com isso, possam realizar funções equivalentes às que este desempenha com o processo de absorção de luz.

TABELA 4: Representação dos orbitais moleculares de fronteira, calculados com o nível de teoria HF/6-31G(d,p)

Molécula	HOMO	LUMO
(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

Orbitais moleculares são importantes propriedades determinadas por teóricos e experimentais para compreender o comportamento eletrônico de moléculas [75, 76]. Os resultados das superfícies dos orbitais referentes à DFT, embora não tenham sido apresentados, são similares aos obtidos com o HF, mas convém comentar que os orbitais de Kohn-Sham (KS) são considerados inapropriados para esse tipo de análise, pois os autovalores de funcionais não-exatos não possuem significado físico [51, 52].

As energias dos orbitais de fronteira de todos os compostos estudados estão dispostas na Tabela 5. As energias do orbital HOMO calculadas com o método HF podem ser escritas

de forma crescente da seguinte maneira: $C < A < B < D < E$. Porém, com a DFT foi observado que a ordem crescente desta propriedade é dada por $C < B < A = D < E$. De modo geral, com ambos os métodos notou-se que a substituição do anel do retinal por grupos cumarínios ocasiona a diminuição do potencial de ionização, segundo o teorema de Koopmans. Em relação à diferença de energia entre os orbitais de fronteira, E_g , apesar de os métodos HF e DFT terem gerado valores substancialmente diferentes em magnitude, pode ser observado que ambos apresentaram qualitativamente a mesma tendência. Esses resultados mostram que essas modificações químicas potencializam as transições verticais, diminuindo a energia entre os orbitais preenchidos de maior energia e desocupados de menor energia.

TABELA 5: Energia dos orbitais de fronteira e da diferença entre estes (E_g), calculadas com os métodos HF e DFT associados à base 6-31G(d,p) para as moléculas estudadas.

Molécula	HOMO (eV)		LUMO (eV)		E_g (eV)	
	HF	DFT	HF	DFT	HF	DFT
A	-7,592	-5,333	1,605	-2,286	9,197	3,048
B	-7,565	-5,551	1,225	-2,585	8,789	2,966
C	-7,619	-5,633	1,007	-2,776	8,626	2,857
D	-7,347	-5,333	1,415	-2,449	8,762	2,884
E	-7,265	-5,306	1,415	-2,422	8,680	2,884

3.4. ESPECTROS DE EXCITAÇÃO ELETRÔNICA

Na introdução deste trabalho foi mencionado que o *todo-trans*-retinal apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ de 381nm. Evidências experimentais indicam a existência de três estados excitados singletes referentes à primeira banda de absorção desta molécula, sendo o primeiro proveniente de uma transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e outros dois oriundos de transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Entretanto, não há consenso quanto à energia desses dois últimos estados. Sendo assim, foram investigadas as transições eletrônicas de mais baixa energia da primeira banda de absorção do espectro de excitação das moléculas utilizando os métodos TDHF, TDDFT e ZINDO/S-CI, como descrito no Capítulo 2.

De acordo com a teoria clássica da interação da luz com as moléculas, a força do oscilador f depende da absortividade molar ε , como escrito na Eq. (14). Consequentemente, com esta relação é possível associar as medidas de UV experimentais com as transições teóricas.

$$f = 4,3 \cdot 10^{-9} \int_{\bar{\nu}_1}^{\bar{\nu}_2} \varepsilon d\bar{\nu} \quad \text{Eq. (14)}$$

Os diferentes métodos empregados para estimar os espectros dos retinais apresentaram resultados qualitativamente similares, onde foi constatado que os métodos *ab initio* inverteram a transição $n\pi^*$ do *todo-trans*-retinal em relação aos observados experimentalmente, conforme apresentado nas Tabelas 6 e 7.

TABELA 6: Comprimentos de onda de excitações eletrônicas experimentais e teóricas calculadas com ZINDO/S-CI para o retinal e seus derivados.

Molécula	$\lambda_{\text{max}}^{\text{a}}$ (nm)	S_n^{b}	HF		DFT	
			λ (nm)	f^{c}	λ (nm)	f^{c}
A	381	$S_1(n,\pi^*)$	378	0,00	383	0,00
		$S_2(\pi,\pi^*)$	316	1,00	358	1,00
		$S_3(\pi,\pi^*)$	257	0,04	274	0,08
B	391	$S_1(n,\pi^*)$	379	0,00	385	0,00
		$S_2(\pi,\pi^*)$	335	1,00	374	1,00
		$S_3(\pi,\pi^*)$	319	0,01	335	0,02
C	401	$S_1(n,\pi^*)$	379	0,00	385	0,00
		$S_2(\pi,\pi^*)$	342	1,00	382	1,00
		$S_3(\pi,\pi^*)$	308	0,06	322	0,03
D	398	$S_1(n,\pi^*)$	379	0,00	385	0,00
		$S_2(\pi,\pi^*)$	331	1,00	378	1,00
		$S_3(\pi,\pi^*)$	312	0,08	326	0,06
E	399	$S_1(n,\pi^*)$	378	0,00	383	0,00
		$S_2(\pi,\pi^*)$	333	1,00	381	1,00
		$S_3(\pi,\pi^*)$	331	0,43	349	0,01

^a $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos em metanol [39].

^b S_n , onde n é a ordem de menor energia do estado singlete.

^c Força do oscilador normalizada.

TABELA 7: Comprimento de onda de excitações eletrônicas experimentais e teóricas calculadas com os métodos TDDFT e TDHF para o retinal e seus derivados.

Molécula	λ_{max}^a (nm)	S_n^b	TDHF//HF/6-31G(d,p)		TDDFT//B3LYP/6-31G(d,p)	
			λ (nm)	f^c	λ (nm)	f^c
A	381	$S_1(\pi, \pi^*)$	273	1,00	410	1,00
		$S_2(n, \pi^*)$	270	0,00	407	0,00
		$S_3(\pi, \pi^*)$	200	0,07	321	0,50
B	391	$S_1(n, \pi^*)$	287	1,00	415	0,00
		$S_2(\pi, \pi^*)$	271	0,00	414	1,00
		$S_3(\pi, \pi^*)$	247	0,20	395	0,00
C	401	$S_1(\pi, \pi^*)$	298	1,00	431	1,00
		$S_2(n, \pi^*)$	271	0,00	420	0,00
		$S_3(\pi, \pi^*)$	245	0,07	369	0,01
D	398	$S_1(\pi, \pi^*)$	286	1,00	439	1,00
		$S_2(n, \pi^*)$	270	0,00	411	0,00
		$S_3(\pi, \pi^*)$	248	0,12	360	0,42
E	399	$S_1(\pi, \pi^*)$	286	1,00	444	1,00
		$S_2(n, \pi^*)$	270	0,00	411	0,00
		$S_3(\pi, \pi^*)$	258	0,18	372	0,06

^a $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos em metanol [39].

^b S_n , onde n é a ordem de menor energia do estado singlete.

^c Força do oscilador normalizada.

Os espectros teóricos mostram que a banda de menor energia dos retinais sintéticos permaneceu similar à do retinal natural, havendo apenas deslocamentos batocrômicos possivelmente ocasionados pela introdução dos grupos contendo elétrons- π , Figura 11. Esses resultados corroboram com os indicativos discutidos previamente com os orbitais moleculares de fronteira.

FIGURA 11: (a) espectro de absorção teórico do retinal e dos retinais com substituintes cumarínicos e em (b) os espectros do retinal e dos retinais com substituintes poliaromáticos condensados. Todos calculados com o método ZINDO/S-CI a partir das geometrias obtidas com B3LYP/6-31G(d,p).

Os resultados obtidos com os métodos ZINDO/S-CI e TDDFT são quantitativamente equivalentes entre si e em relação aos medidos experimentalmente [39]. Contudo, é importante ressaltar que o método ZINDO/S-CI foi o único a apresentar a transição $n \rightarrow \pi^*$ como o estado de menor energia para o retinal, como proposto pelos estudos experimentais

[36, 77]. O $\lambda_{\text{máx}}$ dos retinais é derivado de uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e apresenta a segunda menor energia de excitação.

3.5. PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS

A análise comparativa entre algumas propriedades calculadas para os retinais sintéticos e o retinal propriamente dito, discutida previamente, forneceu indicativos de que as modificações estruturais existentes nos análogos do retinal não são suficientes para alterar o comportamento eletrônico típico do retinal.

Nas próximas seções serão apresentados e discutidos os resultados referentes aos análogos do retinal incorporados à apoproteína, utilizando o método ONIOM. Com isso, será possível aprofundar as discussões sobre as estruturas dessas moléculas e as influências estruturais exercidas pelo ambiente protéico.

3.6. VALIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS

De modo análogo ao estudo precedente, realizado com os retinais, foi avaliada a precisão da metodologia híbrida entre métodos *ab initio* com o UFF para descrever o sistema real. Em virtude do elevado número de átomos do modelo estudado, recorreu-se ao gráfico de Ramachandran, amplamente utilizado para análises de proteínas [78]. Esse tipo de análise avalia o grau de rotação na ligação entre o nitrogênio e os carbonos α da cadeia polipeptídica, denotado pelo ângulo Φ ; e entre o carbono α e o átomo de carbono da carbonila da mesma cadeia, designado pelo ângulo Ψ . A conformação da cadeia principal é totalmente definida quando Φ e Ψ são especificados para cada aminoácido da cadeia, entretanto alguns valores

são virtualmente proibidos devido a impedimentos espaciais. As faixas permitidas para os ângulos podem ser previstas e visualizadas em diagramas de contorno espaciais conhecidos como gráfico de Ramachandran [2]. O critério adotado neste trabalho foi o mesmo utilizado para analisar proteínas resolvidas por raios-X [78].

Os gráficos de Ramachandran, apresentados na Figura 12, mostram que as estruturas obtidas com ambos os métodos são capazes de representar muito bem o sistema real, e forneceram resultados equivalentes. Contudo, apenas um aminoácido não se correlacionou de maneira aceitável, talvez isso se deva à sua localização na alça da proteína. Como se trata de uma região afastada do retinal assumiu-se, neste caso, que as interações entre o cromóforo e este aminoácido são pequenas e que não influenciariam os objetivos deste trabalho.

FIGURA 12: Gráficos de Ramachandran apresentando os ângulos Ψ e ϕ dos aminoácidos da proteína BR, obtidas com os métodos (a) HF/6-31G(d,p):UFF e (b) B3LYP/6-31G(d,p):UFF.

O RMSD foi calculado com a finalidade de verificar os desvios dos átomos de C, N e O dos sistemas calculados em relação ao experimental [22]. Os resultados estão representados

na Figura 13 e Tabela 8. Esses dados sustentam a análise discutida anteriormente, isto é, quaisquer das duas metodologias híbridas podem ser empregadas para a obtenção das estruturas. Os desvios mais acentuados observados na Figura 13 são referentes, principalmente, aos aminoácidos localizados nas alças da proteína que, de modo geral, são regiões difíceis de serem caracterizadas morfologicamente e por isso apresentam baixa resolução em resultados experimentais.

FIGURA 13: RMSD das posições dos átomos de C, N e O dos modelos calculados em relação ao experimental [8]. Em vermelho os resultados referentes ao método HF/6-31g(d,p):UFF e em preto os calculados com B3LYP/6-31g(d,p):UFF.

TABELA 8: RMSD dos átomos de C, N, O e S das estruturas teóricas da BR em relação à estrutura cristalográfica.

Método	Desvio (Å)
HF/6-31g(d,p):UFF	1,63
B3LYP/6-31G(d,p):UFF	1,60

Para facilitar a visualização dos resultados, as estruturas calculadas foram sobrepostas à cristalográfica [8], Figura 14, onde visualmente nota-se que os maiores desvios ocorrem nas alças das proteínas, já que as α -hélices e o retinal das três estruturas são praticamente superpostas.

FIGURA 14: sobreposição das estruturas da BR obtidas respectivamente por difração de raios-X [8] (estrutura azul), pelo método HF/6-31G(d,p):UFF (verde) e com B3LYP/6-31G(d,p):UFF (vermelha).

A partir da Figura 14, pode ser observado ainda que o método UFF descreveu bem as ligações de hidrogênios das α -hélices da região protéica. Apesar de ter ocorrido um pequeno desvio de dois aminoácidos, um aspartato e uma alanina, em uma das α -hélices próxima ao ciclo do retinal, possivelmente decorrente da diferença de polaridades entre o anel β -ionona do retinal e o grupo ácido do aspartato, o que afasta os dois aminoácidos vizinhos. Nestas áreas, as estruturas teóricas desviam-se em aproximadamente 0,7 Å das experimentais, sendo essa diferença menor que uma ligação química C—C, cujo comprimento médio é de 1,44 Å. As representações individuais das conformações calculadas estão apresentadas na Figura 15.

FIGURA 15: Representações das estruturas secundárias da BR: (a) obtidas por difração de raios-X; e as calculadas com (b) B3LYP/6-31G(d,p):UFF e (c) HF/6-31G(d,p):UFF. As regiões com baixa resolução estão destacadas em vermelho nas estruturas teóricas.

As análises de validação efetuadas para a BR também foram aplicadas às proteínas substituídas pelos retinais sintéticos e os resultados mostraram-se similares aos observados para a BR natural. Como as duas metodologias utilizadas geraram geometrias equivalentes, optou-se por apresentar apenas os resultados calculados com B3LYP/6-31G(d,p):UFF.

Analogamente, os gráficos de Ramachandran calculados para as demais proteínas demonstraram que os métodos teóricos escolhidos neste trabalho forneceram resultados satisfatórios para descrever os ângulos Ψ e ϕ das ligações peptídicas, conforme apresentado na Figura 16.

FIGURA 16: Gráficos de Ramachandran das proteínas com substituintes cumarínicos (a) B e (b) C e os policíclicos (c) D e (d) E, segundo a ordem apresentada na Figura 7. Todas as estruturas foram calculadas combinando-se os métodos B3LYP/6-31G(d,p):UFF. A região destacada refere-se aos aminoácidos com maiores desvios em relação a BR.

Na Figura 17 estão representadas as estruturas tridimensionais das proteínas contendo os retinais sintéticos.

FIGURA 17: Representação dos monômeros das proteínas com os retinais sintéticos, com substituintes cumarínicos (a) e (b) e com substituintes poliaromáticos (c) e (d). Todas as estruturas foram obtidas com o método B3LYP/6-31G(d,p):UFF. Em destaque os aminoácidos que apresentaram maiores desvios do gráfico de Ramachandran.

A análise qualitativa dessas moléculas, Figura 17, indica a existência de diferentes interações entre os retinais e as regiões protéicas. Entretanto, somente com investigações mais detalhadas dessas interações será possível confirmar essas observações. Contudo, nota-se que a região mais afastada é referente aos mesmos aminoácidos descritos para a BR. Na Figura 17 (b) verifica-se que os desvios são relativamente menores, na região em questão, provavelmente decorrente do oxigênio presente no anel cumarínico, diminuindo a polarização entre os aminoácidos e o anel.

3.7. ESTRUTURA DOS GRUPOS PROSTÉTICOS

O conhecimento sobre a disposição dos ligantes nas proteínas é um fator essencial para o estudo de sua atividade biológica. No caso do retinal, espera-se que a cadeia poliênica permaneça em um plano no estado fundamental devido a sua estabilização por efeito de conjugação. Entretanto, os resultados teóricos sugerem ser mais provável a existência de três planos quando os cromóforos ligam-se à apoproteína, como representado na Figura 18. Segundo os mesmos, o ângulo ϕ_1 pode ser explicado da mesma maneira que os observados nos retinais isolados, ou seja, a introdução de um anel ou ciclo volumoso pode desfavorecer a estrutura planar em consequência das interações intramoleculares [57]. O segundo ângulo ϕ_2 é provavelmente decorrente das diferentes interações com os aminoácidos da proteína. Porém vale ressaltar que neste caso a torção ocorreu no centro de isomerização do processo primário. Os desvios dos planos α e δ em relação ao plano β para todos os cromóforos foram destacados na Figura 18, e seus valores correspondentes estão expostos na Tabela 9.

FIGURA 18: Planos da cadeia poliênica observados na estrutura dos retinais ligados à BR.

TABELA 9: Ângulos entre os planos $\alpha\beta$ e $\beta\delta$, indicados na Figura 18.

Molécula	Experimental ^a		HF/6-31G(d,p)		B3LYP/6-31G(d,p)	
	ϕ_1 (grau)	ϕ_2 (grau)	ϕ_1 (grau)	ϕ_2 (grau)	ϕ_1 (grau)	ϕ_2 (grau)
Retinal	4	24	6	17	7	15
B	-	-	29	12	13	14
C	-	-	10	10	9	9
D	-	-	38	13	29	17
E	-	-	24	16	3	14

Analizando os ângulos ϕ_1 dos retinais calculados no vácuo com os retinais ligados à BR, pode ser constatado que esses ângulos variam consideravelmente, respaldando a justificativa de que a energia potencial de rotação de ciclos contendo duplas ligações ligadas às cadeias π -conjugadas, pode ser relativamente mais baixa quando comparadas com cadeias abertas, em função de efeitos eletrostáticos.

Os efeitos de conjugação no retinal foram avaliados através do diagrama de energia potencial de rotação do ângulo diedro entre os carbonos C12C13C14C15, Figura 19. Com isso, foi possível estimar também o potencial de isomerização da cadeia poliênica do modelo

apresentado na Figura 18, considerando o estado fundamental. Assumindo que a energia termodinâmica máxima kT não é superior a 0,03 eV à temperatura ambiente ($T = 298,15$ K), sendo k a constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin, as torções superiores a 20° são improváveis, pois qualquer variação superior a esta violaria o princípio da conservação de energia.

FIGURA 19: Diagrama de energia potencial da rotação do ângulo diedro existente entre os carbonos C12C13C14C15 no modelo apresentado na Figura 18. Esses dados foram calculados com HF/6-31G(d,p). A energia térmica à $T = 298,15$ K está indicada com pela linha azul.

A proteína promove uma tensão relativamente grande nessas estruturas e isso foi indicado tanto pelos resultados experimentais quanto nos teóricos. É importante salientar que em condições ambientes o ϕ_2 está praticamente no limite máximo de energia termodinâmica em relação à estrutura mais estável (180°), essa observação pode explicar a especificidade da isomerização nessa conformação do cromóforo ligado à proteína, o que não é observado em soluções com tanta eficiência.

3.8. EXCITAÇÕES ELETRÔNICAS DOS CROMÓFOROS

Nesta secção foram investigados os estados eletrônicos de mais baixa energia dos cromóforos ligados à proteína. Devido ao grande número de transições calculadas, necessárias para se gerar o espectro de UV, as análises dos resultados se restringiram às transições envolvidas nas proximidades do $\lambda_{\text{máx}}$, por ser esta região espectral a responsável pelo evento primário do fotociclo da BR [1, 6, 34, 79]. A excitação da região QM no modelo estudado apresentou apenas duas transições singletes $\pi\pi^*$, enquanto que a transição proibida $n\pi^*$ foi observada em algumas estruturas e em regiões de maior energia. Esse deslocamento é possivelmente oriundo da protonação da base de Schiff.

As transições teóricas calculadas com o ZINDO/S-CI mostraram-se satisfatórias, visto que os desvios entre os $\lambda_{\text{máx}}$ teóricos e os experimentais não são superiores a 11 %, para geometria otimizada com HF, e de 7 % para as calculadas com DFT, com exceção do estado estacionário do retinal calculado com a DFT, onde se observa desvio de 26 %. As energias das transições calculadas com ZINDO/S-CI a partir das estruturas completamente otimizadas com o método HF/6-31G(d,p):UFF apresentaram valores próximos para os estados de interesse e, por isso, não foi possível obter as transições para uma das estruturas. Na Tabela 10 são mostrados os resultados teóricos e experimentais para estas propriedades.

TABELA 10: Comprimentos de onda teóricos e experimentais das proteínas. Os resultados teóricos foram calculados com ZINDO/S-CI na região QM do modelo da BR.

Molécula	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{a}}$ (nm)	Estados	HF		DFT	
			$\lambda(\text{nm})$	f	$\lambda(\text{nm})$	f
Retinal	568	$S_1(\pi\pi^*)$	610	1	718	1
		$S_2(\pi\pi^*)$	588	0,01	686	0,08
B	497, 438, 413	$S_1(\pi\pi^*)$	566	0,05	520	0,07
		$S_2(\pi\pi^*)$	472	1	509	1
C	478	$S_1(\pi\pi^*)$	612	0,10	524	0,02
		$S_2(\pi\pi^*)$	530	1	495	1
D	490	$S_1(\pi\pi^*)$	-	-	485	1
		$S_2(\pi\pi^*)$	-	-	415	0,00
E	499	$S_1(\pi\pi^*)$	511	1	474	1
		$S_2(\pi\pi^*)$	499	0,00	424	0,00

^a $\lambda_{\text{máx}}$ das proteínas com os respectivos cromóforos[39]

A partir dos dados da Tabela 9, foi discutido anteriormente que para o cromóforo natural o ϕ_2 experimental apresenta maior torção que os teóricos, ou seja, as cadeias poliênicas preditas por ambos os métodos são relativamente mais planas que a cristalográfica. Esta condição favorece o deslocamento das transições eletrônicas das estruturas teóricas para o vermelho.

Uma importante observação retirada destes resultados é o indicativo da inversão dos estados eletrônicos dos retinais com os substituintes cumarínicos (B e C). Nessas estruturas, as transições teóricas de maior ϵ possuem maior energia ao contrário do cromóforo natural. Quanto às moléculas D e E, nota-se que a ϵ da transição proibida tende a minimizar-se em relação às demais estruturas estudadas.

3.9. ESTADOS ELETRÔNICOS DO RETINAL

A hipótese mais aceita atualmente para explicar o mecanismo de isomerização do cromóforo da BR sugere o envolvimento de três estados eletrônicos: o fundamental (S_0) e dois excitados como descrito no Capítulo 1. Os resultados teóricos aqui apresentados confirmam essa proposição no que diz respeito ao número de estados e estimam dois estados decorrentes de transições $\pi\pi^*$, diferentemente do retinal livre, que além dois estados $S(\pi\pi^*)$ possui ainda um estado $S(n\pi^*)$ de mais baixa energia.

A dependência da energia de excitação em relação à rotação do ângulo diedro referente a fotoisomerização do retinal no fotociclo da BR, é objeto de estudo desta seção. Essa é uma razoável aproximação para os estados eletrônicos, segundo o princípio de Frank-Condon [80]. Sendo assim, foram utilizados os diagramas de energia potencial dos estados S_1 e S_2 para o retinal, Figura 20. A partir deste gráfico percebe-se que as transições apresentam comportamentos energéticos opostos, à medida que o S_1 se aproxima de 90° a isomerização torna-se energeticamente desfavorecida, em contraste, o estado S_2 assume a maior estabilidade nestas condições. Portanto, o modelo envolvendo três estados eletrônicos parece ser coerente e a conformação de 90° é energeticamente minimizada no S_2 , além de possibilitar a passagem para o S_1 com energias menores.

FIGURA 20: Energias de excitação das transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$ em função do ângulo diedral do cromóforo da BR, calculadas com o método ZINDO/S-CI.

As duas transições singletes observadas são características de sistemas poliênicos conjugados [81-83], onde a primeira é a esperada para as transições do tipo $\pi\pi^*$ e a segunda é decorrente dos movimentos vibracionais das ligações π , que quebra a degenerescência dos orbitais ligantes das moléculas e apresentam menor força do oscilador. Quanto às moléculas análogas ao retinal estudadas, foi verificado que a substituição do anel β -ionona pelos grupos cumarínicos invertem essas transições, o que implicaria em uma provável mudança no processo de isomerização, onde fosse necessário apenas dois estado eletrônico ao invés de três como as demais moléculas. O comportamento diferenciado destes novos retinais pode levar a processos mais eficientes e aplicações mais rápidas no que diz respeito a transmissão de informação óptica em novos dispositivos, já que a força do oscilador das transições eletrônicas investigadas nos grupos prostéticos B e C são da mesma magnitude que a do retinal.

Capítulo 4

4. CONCLUSÕES

Os resultados discutidos neste trabalho permitiram compreender alguns aspectos eletrônicos concernentes às excitações de retinais sem o efeito da vizinhança e como grupo prostético da BR. Foi constatado que os procedimentos teóricos empregados são adequados para efetuar investigações sobre os efeitos estruturais observados nas moléculas e, principalmente, permitiram estimar as energias envolvidas nos estados eletrônicos de baixa energia dessas moléculas e correlacioná-las com os dados experimentais.

O método semi-empírico ZINDO/S-CI forneceu resultados coerentes com os medidos experimentalmente e, algumas vezes, foram superiores às observadas com o método *ab initio* TDHF. Além disso, seu principal atrativo é o tempo computacional requerido para realizar estes cálculos em relação aos demais.

As investigações realizadas para os retinais indicaram que as modificações químicas introduziram no sistema π conjugado, significativos orbitais ligantes no HOMO, por outro lado verificou-se que os orbitais de fronteira LUMO, dessas moléculas, não são afetados expressivamente. As análises referentes às energias dessas propriedades, também sugerem que essas moléculas potencializam as transições verticais dos retinais sintéticos, ou seja, necessitam de energias menores para transições verticais.

O efeito de conjugação causado pelas ligações- π da cadeia poliênica confere razoável rigidez e, conseqüentemente, a localização em um único plano. No entanto, o anel ligado diretamente a essa cadeia insaturada desloca-se em relação a este plano, e isso provavelmente é ocasionado pelos efeitos intramoleculares repulsivos. Entretanto, para afirmar esta hipótese seria necessário realizar estudos utilizando métodos pós-HF similares

aos descritos por Pinto [57]. Foi observado, ainda, que no diedro envolvendo os átomos C12, C13, C14 e C15 dos grupos prostéticos ocorrem torções que desfavorecem as suas estabilidade estrutural que não foi constatado nas moléculas calculadas no vácuo. Isso se deve, provalvemente, as imposições exercidas pela parede da proteína que envolve os cromofóros, fornecendo uma energia pontencial de isomerização inicial. Além, dos desvios entre a cadeia poliênica e o anel, intrínsecos das moléculas.

Os resultados teóricos referentes aos estados eletrônicos indicaram a presença de três estados eletrônicos na banda de maior absortividade molar e são respaldados pelos resultados experimentais. Embora os resultados teóricos discordem quanto ao estado de mais baixa energia, ambos distinguiram os outros dois estados subsequentes nos aldeídos como sendo resultantes de transições $\pi\pi^*$, sendo que o segundo apresentou $\lambda_{\text{máx}}$. Diante dessas observações, averiguou-se que o método semi-empírico ZINDO/S-CI é satisfatório por apresentar resultados tão bons quanto os da TDDFT e, principalmente, por ter sido o único a estimar a transição $n\pi^*$ como a de menor energia, como observado experimentalmente [34, 36, 37]. As transições teóricas calculadas para os grupos protéticos são coerentes com as medidas experimentais, onde foi observado que há apenas dois estados próximos à região de $\epsilon_{\text{máx}}$ no espectro, possivelmente resultantes da protonação do grupo imina.

A partir das análises dos diagramas de energia dos estados eletrônicos, considera-se que o mecanismo envolvendo três estados é o mais coerente, uma vez que o processo seria energeticamente desfavorável no primeiro estado eletrônico excitado (S_1), mas ao envolver o S_2 ele tenderia às energias mais baixas próximas ao ângulo 90° no centro de isomerização. Por outro lado, é possível que as moléculas com grupos cumarínicos respondam diferenciadamente devido a ordem das transições eletrônicas, onde a que apresentam a maior absortividade molar é observada em comprimento de ondas maiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BIRGE, R. R., Photophysics of Light Transduction in Rhodopsin and Bacteriorhodopsin. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, v. 10, n. 1, p. 315-354, 1981.
- [2] STRYER, L., **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- [3] EBREY, T.; KOUTALOS, Y., Vertebrate Photoreceptors. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 20, n. 1, p. 49-94, 2001.
- [4] BIRGE, R. R., Photophysics and Molecular Electronic Applications of the Rhodopsins. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, v. 41, n. 1, p. 683-732, 1990.
- [5] BIRGE, R. R.; HUBBARD, L. M., Molecular-Dynamics of Cis-Trans Isomerization in Rhodopsin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 102, n. 7, p. 2195-2205, 1980.
- [6] LANYI, J. K.; LUECKE, H., Bacteriorhodopsin. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 11, n. 4, p. 415-419, 2001.
- [7] KOUYAMA, T.; KINOSITA, J., KAZUHIKO; IKEGAMI, A., Structure and function of bacteriorhodopsin. *Advances in Biophysics*, v. 24, n., p. 123-175, 1988.
- [8] LUECKE, H.; SCHOBERT, B.; RICHTER, H. T.; CARTAILLER, J. P.; LANYI, J. K., Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 291, n. 4, p. 899-911, 1999.
- [9] PALCZEWSKI, K.; KUMASAKA, T.; HORI, T.; BEHNKE, C. A.; MOTOSHIMA, H.; FOX, B. A.; TRONG, I. L.; TELLER, D. C.; OKADA, T.; STENKAMP, R. E.; YAMAMOTO, M.; MIYANO, M., Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*, v. 289, n. 5480, p. 739-745, 2000.
- [10] KANDORI, H.; SHICHIDA, Y.; YOSHIZAWA, T., Photoisomerization in Rhodopsin. *Biochemistry (Moscow)*, v. 66, n. 11, p. 1197-1209, 2001.
- [11] PEPE, I. M., Recent Advances in Our Understanding of Rhodopsin and Phototransduction. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 20, n. 6, p. 733-759, 2001.

- [12] PEPE, M. I., Rhodopsin and phototransduction. J. Photochem. Photobiol. B: Biol, v. 48, n. 1, p. 1-10, 1999.
- [13] DUGAVE, C., *cis-trans Isomerization in biochemistry*. Willey-VCH: Weinheim, 2006; p 368.
- [14] KHODONOV, A. A.; DEMINA, O. V.; KHITRINA, L. V.; KAULEN, A. D.; SILFSTEN, P.; PARKKINEN, S.; PARKKINEN, J.; JAASKELAINEN, T., Modified bacteriorhodopsins as a basis for new optical devices. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 39, n. 3, p. 218-221, 1997.
- [15] LENSU, L.; FRYDRYCH, M.; PARKKINEN, J.; PARKKINEN, S.; JAASKELAINEN, T., Photoelectric properties of bacteriorhodopsin analogs for color-sensitive optoelectronic devices. Optical Materials, v. 27, n. 1, p. 57-62, 2004.
- [16] BIRGE, R. R., Protein-Based Computers. Scientific American, v. 6, n., p. 90-95, 1995.
- [17] BOLL, P. F., On the anatomy and physiology of the retina. Vision Research, v. 17, n. 11-12, p. 1249-1265, 1977.
- [18] BAUMANN, C., Franz Boll. Vision Research, v. 17, n. 12, p. 1267-1268, 1977.
- [19] WALD, G., Carotenoids and the Visual Cycle. J. Gen. Physiol., v. 19, n., p. 351-371, 1935.
- [20] WALD, G., Pigments in the Retina I. J. Gen. Physiol., v. 19, n., p. 781-795, 1936.
- [21] WALD, G., Molecular Basis of Visual Excitation. Science, v. 162, n., p. 230-239, 1968.
- [22] LUECKE, H.; SCHOBERT, B.; RICHTER, H. T.; CARTAILLER, J. P.; LANYI, J. K., Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Angstrom Resolution. Science, v. 286, n. 5438, p. 255-260, 1999.
- [23] YOKOYAMA, S., Molecular evolution of color vision in vertebrates. Gene, v. 300, n. 2, p. 69-78, 2002.
- [24] FAIN, G. L.; MATTHEWS, H. R.; CORNWALL, M. C.; KOUTALOS, Y., Adaptation in Vertebrate Photoreceptors. Physiol. Rev., v. 81, n. 1, p. 117-151, 2001.

- [25] KARNAUKHOVA, E.; HU, S.; BOONYASAI, R.; TAN, Q.; NAKANISHI, K., Bioactivity of Visual Pigments with Sterically Modified Retinal Analogs. *Bioorg. Chem.*, v. 27, n., p. 372-382, 1999.
- [26] GAI, F.; HASSON, K. C.; MCDONALD, J. C.; ANFINRUD, P. A., Chemical Dynamics in Proteins: The Photoisomerization of Retinal in Bacteriorhodopsin. v. 279, n. 5358, p. 1886-1891, 1998.
- [27] TRSIC, M., May Rhodopsin be a Photoresistor? *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química*, v. 65, n. 9-10, p. 833-836, 1969.
- [28] PINTO, M. F. S. **Estudo Químico Quântico de Pigmentos Visuais de Vertebrados. Considerações Sobre a Geração da Informação Visual.** 2003. f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- [29] PINTO, M. F. S.; TRSIC, M., Quantum Chemical Calculations for Protonated Rhodopsin and Considerations on the Transduction Process in the Retina. *Internet Electron. J. Mol. Des.*, v. 3, n. 1, p. 45-54, 2004.
- [30] AQUINO, A. J. A.; BARBATTI, M.; LISCHKA, H., Excited-State Properties and Environmental Effects for Protonated Schiff Bases: A Theoretical Study. v. 7, n. 10, p. 2089-2096, 2006.
- [31] STRAMBI, A.; COTO, P. B.; FRUTOS, L. M.; FERRE, N.; OLIVUCCI, M., Relationship between the Excited State Relaxation Paths of Rhodopsin and Isorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 130, n. 11, p. 3382 -3388, 2008.
- [32] CEMBRAN, A.; BERNARDI, F.; OLIVUCCI, M.; GARAVELLI, M., Counterion Controlled Photoisomerization of Retinal Chromophore Models: a Computational Investigation. v. 126, n. 49, p. 16018-16037, 2004.
- [33] SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; GOODMAN, D. S., **Biology, chemistry and medicine: The retinoids.** New York.: Raven Press,1996.

- [34] BIRGE, R. R.; BENNETT, J. A.; HUBBARD, L. M.; FANG, H. L.; PIERCE, B. M.; KLIGER, D. S.; LEROI, G. E., 2-Photon Spectroscopy of All-Trans-Retinal. Nature of the Low-Lying Singlet-States. *Journal of the American Chemical Society*, v. 104, n. 9, p. 2519-2525, 1982.
- [35] ISHII, K.; TAKEUCHI, S.; TAHARA, T., A 35-fs time-resolved absorption study of all-trans retinal in a nonpolar solvent: Ultrafast photophysics revisited. *Chemical Physics Letters*, v. 418, n. 4-6, p. 307-310, 2006.
- [36] LARSON, E. J.; PYSZCZYNSKI, S. J.; JOHNSON, C. K., Solvent dependence of electronic relaxation in all-trans retinal studied by one- and two-photon induced transient absorption. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 105, n. 35, p. 8136-8144, 2001.
- [37] TALLENT, J. R.; BIRGE, J. R.; ZHANG, C. F.; WENDERHOLM, E.; BIRGE, R. R., Conformational Energetics and Excited-State Level Ordering in 11-Cis Retinal. *Photochemistry and Photobiology*, v. 56, n. 6, p. 935-952, 1992.
- [38] HUDSON, B.; KOHLER, B., Linear Polyene Electronic Structure and Spectroscopy. In 1974; Vol. 25, pp 437-460.
- [39] IVANOVA, D.; KOLEV, V.; LAZAROVA, T.; PADRÓS, E., Synthesis of New Heterocyclic and Polycyclic Aromatic Retinals and their Bacteriorhodopsin Analogues. *Tetrahedron Lett.*, v. 40, n., p. 2645-2648, 1999.
- [40] HENDERSON, R.; BALDWIN, J. M.; CESKA, T. A.; ZEMLIN, F.; BECKMANN, E.; DOWNING, K. H., Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *Journal of Molecular Biology*, v. 213, n. 4, p. 899-929, 1990.
- [41] DOBLER, J.; ZINTH, W.; KAISER, W.; OESTERHELT, D., Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, v. 144, n. 2, p. 215-220, 1988.
- [42] MATHIES, R. A.; BRITO CRUZ, C. H.; POLLARD, W. T.; SHANK, C. V., Direct observation of the femtosecond excited-state cis-trans isomerization in bacteriorhodopsin. *Science*, v. 240, n. 4853, p. 777-779, 1988.

- [43] HASSON, K. C.; GAI, F.; ANFINRUD, P. A., The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three-state model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 26, p. 15124-15129, 1996.
- [44] HUMPHREY, W.; LU, H.; LOGUNOV, I.; WERNER, H.-J.; SCHULTEN, K., Three Electronic State Model of the Primary Phototransformation of Bacteriorhodopsin. *Biophysical Journal*, v. 75, n. 4, p. 1689-1699, 1998.
- [45] SZABO, A.; OSTLUND, N. S., **Modern Quantum Chemistry**. New York, 1989.
- [46] LEVINE, I., **Quantum Chemistry**. New York: Prentice Hall, 2000.
- [47] ATKINS, P. W.; FRIENDMAN, R. S., **Molecular Quantum Mechanics**. Oxford, 1997.
- [48] CRAMER, J. C., **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. Ontario: John Wiley & Sons, 2002.
- [49] JENSEN, F., **Introduction to Computational Chemistry**. New York: John Wiley, 1999.
- [50] CRAMER, C. J., **Essentials of computational chemistry: theories and models**. Chichester: John Wiley, 2003.
- [51] PARR, R. G.; YANG, W., **Density-functional theory of atoms and molecules**. New York: Oxford University Press, 1989.
- [52] KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C., **A chemist's guide to density functional theory**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- [53] ESCHRIG, H., **The fundamentals of density functional theory**. Berlin: Springer, 1989.
- [54] ORTIZ, J. V., One-electron density-matrices and energy gradients in the random-phase-approximation. *J. Chem. Phys.*, v. 101, n. 8, p. 6743-6749, 1994.
- [55] VAN LEEUWEN, R., Mapping from densities to potentials in time-dependent density-functional theory. *Phys. Rev. Lett.*, v. 82, n. 19, p. 3863, 1999.
- [56] MARQUES, M. A. L.; GROSS, E. K. U., Time-dependent density functional theory. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, v. 55, n. 1, p. 427-455, 2004.

- [57] PINTO, M. F. S. **Estudo químico-quântico de propriedades estruturais e eletrônicas de oligofluorenos com potencial aplicações tecnológicas**. 2007. 95 f. Tese (Doutorado em Físico-Química)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [58] SAVEDRA, R. M. L.; PINTO, M. F. S.; TRSIC, M., Quantum chemical study of electronic and structural properties of retinal and some aromatic analogs. *J. Chem. Phys.*, v. 125, n. 14, p. 144901-144907, 2006.
- [59] ZERNER, M. C.; BENDALE, R. D., Computational Strategies for Locating Transition-State Structures. *American Chemical Society*, v. 200, n., p. 25-Phys, 1990.
- [60] ZERNER, M. C.; LOEW, G. H.; KIRCHNER, R. F.; MUELLERWESTERHOFF, U. T., Intermediate Neglect of Differential-Overlap Technique for Spectroscopy of Transition-Metal Complexes - Ferrocene. *Journal of the American Chemical Society*, v. 102, n. 2, p. 589-599, 1980.
- [61] VREVEN, T.; FRISCH, M. J.; KUDIN, K. N.; SCHLEGEL, H. B.; MOROKUMA, K., Geometry optimization with QM/MM methods II: Explicit quadratic coupling. *Molecular Physics*, v. 104, n. 5-7, p. 701-714, 2006.
- [62] VREVEN, T.; MOROKUMA, K.; FARKAS, O.; SCHLEGEL, H. B.; FRISCH, M. J., Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints. *Journal of Computational Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 760-769, 2003.
- [63] RAPPE, A. K.; CASEWIT, C. J.; COLWELL, K. S.; GODDARD, W. A.; SKIFF, W. M., UFF, A FULL PERIODIC-TABLE FORCE-FIELD FOR MOLECULAR MECHANICS AND MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATIONS. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, n. 25, p. 10024-10035, 1992.
- [64] VREVEN, T.; MOROKUMA, K., Investigation of the $S_0 \rightarrow S_1$ excitation in bacteriorhodopsin with the ONIOM(MO : MM) hybrid method. *Theoretical Chemistry Accounts*, v. 109, n. 3, p. 125-132, 2003.
- [65] HAMANAKA, T.; MITSUI, T.; ASHIDA, T.; KAKUDO, M., The crystal structure of all-trans retinal. *Acta Crystallographica Section B*, v. 28, n. 1, p. 214-222, 1972.

- [66] HEHRE, W. J.; RADOM, L.; SCHLEYER, P. V. R.; POPLE, J. A., *Ab initio molecular orbital theory*. New York: John Wiley, 1986.
- [67] SASAKI, J.; LANYI, J. K.; NEEDLEMAN, R.; YOSHIZAWA, T.; MAEDA, A., Complete Identification of C=O Stretching Vibrational Bands of Protonated Aspartic-Acid Residues In The Difference Infrared-Spectra Of M-Intermediate And N-Intermediate Versus Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, v. 33, n. 11, p. 3178-3184, 1994.
- [68] BROWN, L. S.; SASAKI, J.; KANDORI, H.; MAEDA, A.; NEEDLEMAN, R.; LANYI, J. K., Glutamic-Acid-204 is the Terminal Proton Release Group at the Extracellular Surface of Bacteriorhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 45, p. 27122-27126, 1995.
- [69] FRISCH, M. J.; G. W. T., H. B. S.; G. E. SCUSERIA; ROBB, M. A.; J. R. CHEESEMAN, J. A. M., JR., T. VREVEN, K. N. KUDIN, J. C. BURANT, J. M. MILLAM, S. S. IYENGAR, J. TOMASI, V. BARONE, B. MENNUCCI, M. COSSI, G. SCALMANI, N. REGA, G. A. PETERSSON, H. NAKATSUJI, M. HADA, M. EHARA, K. TOYOTA, R. FUKUDA, J. HASEGAWA, M. ISHIDA, T. NAKAJIMA, Y. HONDA, O. KITAO, H. NAKAI, M. KLENE, X. LI, J. E. KNOX, H. P. HRATCHIAN, J. B. CROSS, C. ADAMO, J. JARAMILLO, R. GOMPERTS, R. E. STRATMANN, O. YAZYEV, A. J. AUSTIN, R. CAMMI, C. POMELLI, J. W. OCHTERSKI, P. Y. AYALA, K. MOROKUMA, G. A. VOTH, P. SALVADOR, J. J. DANNENBERG, V. G. ZAKRZEWSKI, S. DAPPRICH, A. D. DANIELS, M. C. STRAIN, O. FARKAS, D. K. MALICK, A. D. RABUCK, K. RAGHAVACHARI, J. B. FORESMAN, J. V. ORTIZ, Q. CUI, A. G. BABOUL, S. CLIFFORD, J. CIOSLOWSKI, B. B. STEFANOV, G. LIU, A. LIASHENKO, P. PISKORZ, I. KOMAROMI, R. L. MARTIN, D. J. FOX, T. KEITH, M. A. AL-LAHAM, C. Y. PENG, A. NANAYAKKARA, M. CHALLACOMBE, P. M. W. GILL, B. JOHNSON, W. CHEN, M. W. WONG, C. GONZALEZ, J. A. POPLE., *GAUSSIAN03*, 6.0, Revision B.04; Gaussian Inc: Pittsburgh, 2003.
- [70] HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K., VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- [71] DELANO, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*, 0.97; DeLano Scientific: Palo Alto, 2002.

- [72] SANCHO-GARCIA, J. C.; PEREZ-JIMENEZ, A. J.; MOSCARDÓ, F., Description of C(sp²)-C(sp²) rotation in butadiene by density functionals. *J. Chem. Phys.*, v. 105, n. 51, p. 11541-11548, 2001.
- [73] SANCHO-GARCÍA, J. C.; PÉREZ-JIMENEZ, A. J.; PÉREZ-JORDA, J. M.; MOSCARDÓ, F., Torsional potential of 1,3-butadiene: ab initio calculations. *Mol. Phys.*, v. 99, n. 1, p. 47-51, 2001.
- [74] KARPEN, A.; CHOI, C. H.; KERTESZ, M., Single-bond torsional potentials in conjugated systems: a comparison of ab initio and density functional results. *J. Phys. Chem. A*, v. 101, n. 40, p. 7426-7433, 1997.
- [75] ITATANI, J.; LEVESQUE, J.; ZEIDLER, D.; NIKURA, H.; PEPIN, H.; KIEFFER, J. C.; CORKUM, P. B.; VILLENEUVE, D. M., Tomographic imaging of molecular orbitals. *Nature*, v. 432, n. 7019, p. 867-871, 2004.
- [76] BRION, C. E.; COOPER, G.; ZHENG, Y.; LITVINYUK, I. V.; MCCARTHY, I. E., Imaging of orbital electron densities by electron momentum spectroscopy[mdash]a chemical interpretation of the binary (e, 2e) reaction. *Chem. Phys.*, v. 270, n., p. 13-30, 2001.
- [77] LARSON, E. J.; FRIESEN, L. A.; JOHNSON, C. K., An ultrafast one-photon and two-photon transient absorption study of the solvent-dependent photophysics in all-trans retinal. *Chemical Physics Letters*, v. 265, n. 1-2, p. 161-168, 1997.
- [78] DAVIS, I. W.; LEAVER-FAY, A.; CHEN, V. B.; BLOCK, J. N.; KAPRAL, G. J.; WANG, X.; MURRAY, L. W.; ARENDALL, W. B., III; SNOEYINK, J.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C., MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. v. 35, n. suppl_2, p. W375-383, 2007.
- [79] BIRGE, R. R.; FINDSEN, L. A.; PIERCE, B. M., Molecular-Dynamics of the Primary Photochemical Event in Bacteriorhodopsin - Theoretical Evidence for an Excited Singlet-State Assignment for the J-Intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, v. 109, n. 16, p. 5041-5043, 1987.
- [80] TURRO, N. J., **Modern Molecular Photochemistry**. California: Science Books, 1991.

[81] KLESSINGER, M.; MICHL, J., **Excited States and Photochemistry of Organic Molecules**. New York: VHC,1995.

[82] KOPECKÝ, J., **Organic Photochemistry: a visual approach**. New York: VHC,1991.

[83] SUZUKI, H., **Electronic absorption spectra and Geometry of Organic Molecules: An application of molecular Orbital Theory**. Londres: Academic Press,1967.