

João Pedro Freire Barraca Cardoso Santos

MODIFICAÇÕES CONFORMACIONAIS EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE AMINOÁCIDOS E DE ÁCIDO POLIMETACRÍLICO INDUZIDAS POR SALTO DE PH

Mestrado em Química
Departamento de Química
FCTUC

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Pedro Freire Barraca Cardoso Santos

**MODIFICAÇÕES
CONFORMACIONAIS EM
SOLUÇÕES AQUOSAS DE
AMINOÁCIDOS E DE ÁCIDO
POLIMETACRÍLICO INDUZIDAS
POR SALTO DE PH**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,
Área de especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente

Professor Doutor Carlos Serpa

Setembro 2016

Universidade de Coimbra

*Sucesso não é o final, falhar
não é fatal: é a coragem para
continuar que conta.*

Winston Churchill

À minha mãe, mesmo não estando cá fisicamente, sei que foi ela uma das grandes responsáveis por não ter desistido dos meus objetivos e sobretudo de ser quem sou.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

ao Doutor Carlos Serpa por tudo! Mas genericamente pela sua paciência, orientação, ajuda preciosa e por me transmitir o seu conhecimento infundável dos aparelhos com que trabalhei;

ao Doutor Gonçalo de Sá pela ajuda, motivação, disponibilidade e amizade que inclui espontaneidade e maluqueira;

ao Professor Doutor Luís Arnaut pela orientação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos;

ao Doutor Fábio Schaberle pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos;

ao meu pai por me aturar, apoiar, motivar e, evidentemente, financiar;

à minha irmã pelo apoio, mas também pela consumição e já agora pelas correções ortográficas indispensáveis;

aos meus avós Barraca pelos conselhos, orações, paciência e já agora pela “semanadita”;

ao Sr. Alcides e a D. Filomena pelo acolhimento, amizade e refeições, mas sobretudo por me deixarem cozinhar;

aos meus amigos Diana, Nelson, Renato, Hélder, Lili e Vítor Hugo pelos dias e noites de “trabalho”, divertimento, boa disposição, possibilidade de grandes cozinhados e um especial agradecimento ao novo membro deste grupo de amigos, a Luisinha ;

a todos os meus restantes amigos pela boa disposição e pelos insultos carinhosos;

e, por fim, à Clara por tudo o que significa para mim, por estar incondicionalmente presente, pela cumplicidade, pelo afeto, pela paciência e pelos legos também.

Obrigado!

Conteúdo

Agradecimentos.....	vii
Abreviações.....	xi
Resumo	xiii
Abstract.....	xv
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 Proteínas e Aminoácidos	1
1.1.1 Protonação de Aminoácidos	3
1.1.2 Tirosina	4
1.1.3 Arginina.....	5
1.2 Ácido Polimetacrílico	6
1.3 Calorimetria Fotoacústica Resolvida no Tempo	7
1.3.1 Fundamentos	7
1.3.2 Aplicação prática da PAC	9
1.3.3 Análise de Dados.....	11
1.3.4 Método das duas Temperaturas.....	11
Capítulo 2.....	13
Resultados e Discussão	13
2.1 Ensaio com o Fotoácido (o-NBA).....	13
2.2 Ensaio da solução aquosa de Tirosina em presença de o-NBA	18
2.3 Ensaio da solução aquosa de Arginina em presença de o-NBA	21
2.4 Discussão dos resultados dos aminoácidos	23
2.5 Resultados e Discussão da solução aquosa de Ácido Polimetacrílico	25
Capítulo 3.....	31
Conclusões.....	31
Capítulo 4.....	33
Experimental.....	33
4.1 Material e métodos	33
4.1.1 Material.....	33
4.1.2 Preparação de soluções	33
4.2 Otimização Estrutural da PAC.....	34
Bibliografia.....	39

Abreviações

PAC – Calorimetria Fotoacústica resolvida no tempo

o-NBA – o-Nitrobenzaldeído

Tyr – Tirosina

Arg – Arginina

Cis – Cisteína

PMAA – ácido polimetacrílico

ϕ_{lum} – rendimento quântico de luminescência

E_{lum} – energia do estado emissor

β – coeficiente de expansão térmica

κ_T – compressibilidade isotérmica do solvente

C_p – capacidade calorífica

ρ – densidade (g/mL)

v_0 – volume inicial

K – constante de proporcionalidade

α – coeficiente de expansão térmica da água

$E_{h\nu}$ – a energia molar dos fótons incidentes

ϕ – rendimento quântico

τ – tempo de vida

Resumo

As proteínas são bio polímeros que desempenham as suas funções biológicas quando dispostas numa forma específica – conformação nativa. Alterações nas suas conformações nativas originam conformações não funcionais que induzem mudanças na cinética de processos de desdobraimento e transições de estado que podem ser verificados em patogéneses de várias doenças graves, tais como Alzheimer, Parkinson e Creutzfeldt-Jakob. A protonação de cadeias laterais de aminoácidos específicos é por vezes suficiente para induzir processos de desdobraimento em peptídeos e proteínas, pelo que a caracterização das mudanças conformacionais e da dinâmica de reações de protonação que envolvem aminoácidos é essencial para a compreensão das primeiras etapas de desdobraimento de proteínas induzido por transições de pH. O comportamento em solução aquosa de alguns polímeros polielectrólitos pode ser considerado como um modelo químico para o comportamento das proteínas aquando de alterações significativas de pH.

No presente trabalho propomos obter dados de cinéticas e variações de volume associadas ao processo de protonação de dois aminoácidos ionizáveis (Tirosina e Arginina) e ainda analisar mudanças conformacionais em polímeros de ácido policarboxílico sensíveis a mudanças de pH (ácido polimetacrílico). A súbita mudança de pH é induzida por fotoexcitação de o-nitrobenzaldeído com um laser pulsado de nanosegundos. As variações de volume em causa apresentam um tempo de vida muito curto, sendo difícil acompanhar o processo por métodos espectroscópicos tradicionais pelo que foram acompanhadas pela técnica de Calorimetria Fotoacústica resolvida no tempo.

Os resultados obtidos relacionam-se primariamente com as variações de volume rápidas resultantes de reações de protonação em soluções aquosas. Analisámos a fotoinjeção de protão do o-NBA a seis pH's iniciais diferentes que variaram de 5 até 11. Até ao pH 8 não se denotou a presença de iões OH⁻, mas para pH's de 10 e 11 um segundo processo associado à formação de água é detetado. A nossa proposta de trabalho encontra-se pois condicionada pelo elevado pKa da Tirosina e Arginina, pois a protonação de iões de OH⁻, presentes na solução a concentrações elevadas, apresenta-se como uma reação competitiva ao processo de protonação dos aminoácidos. Ainda assim foi possível detetar variações do sinal fotoacústico, devido à presença dos aminoácidos em solução, que associamos a uma pequena expansão volumétrica, aquando da protonação da Tirosina e da Arginina. A protonação de ácidos polimetacrílicos (PMAA) com pesos moleculares distintos

foi estudada com a intenção de verificar como tamanho da cadeia polimérica influencia a reação de protonação e o seu comportamento conformacional. Para PMAA de 75000 Da foi possível seguir a reação de protonação subsequente à fotoinjecção enquanto para PMAA de 500000 Da a presença de um número elevado de ácidos carboxílicos protonáveis não permitiu detetar isoladamente o processo de protonação. Processos conformacionais subsequentes à protonação não foram detectados, provavelmente devido ao facto de serem demasiado lentos para o detector piezoeléctrico usado.

Abstract

Proteins are bio polymers that play their biological functions when displayed in a specific form – native conformation. Changes in this native conformation originate nonfunctional conformational changes that induce changes in the kinetics of the unfolding process and state transitions that can be verified with the pathogenesis of several diseases, such as Alzheimer, Parkinson and Creutzfeldt-Jakob. The protonation of the side chains in specific amino acids is sometimes enough to induce unfolding process of peptides and proteins, so that the characterization of the conformational changes and the dynamics of the protonation reactions that have essential amino acids present in it, is to the comprehension of the first steps of unfolding the proteins induce by pH transitions. The behavior in solution of some polyelectrolyte polymers can be consider as a chemical model for behavior of a protein when significate pH changes occur.

In the present work we propose to obtain data from kinetic and volume changes associated to the protonation process of two ionizable amino acids (tyrosine and Arginine) and still study the conformational changes in the polymers that are sensitive to pH changes like poly methacrylic acid. A sudden change in pH is induce by photoexcitation of the o-nitrobenzaldehyde by a nanosecond pulsed laser. This volume changes presents short lifetimes that are not visible in traditional spectroscopic methods so we add time resolved Photoacoustic Calorimetry.

The data we got relate primarily to quick volume changes resulting from protonation reactions in solution. We analyze the photo injection of a proton of o-NBA at six different initial pH's from 5 to 11. Until an initial pH of 8 we didn't detect a presence of OH⁻ ions, but at 10 and 11 pH's a second process is detected. Due to that, our work proposal was conditioned because of the high pKa of Tyrosine and Arginine, so that the protonation of OH⁻ ions, present in solution in high concentrations, presents as a competitive reaction to the protonation process of the amino acids. There yet it is possible to detect variations in the photoacoustic signal due to the presence of the amino acids in solution that we associated to a small expansion when the protonation of Tyrosine and Arginine occur. The protonation of poly methacrylic acids with different molecular weight was studied to verify how the size of the polymer chain affects their conformation and it

conformational behavior. For the PMAA of 75000 Da was possible to follow a protonation reaction after the photoinjection while with PMAA of 500000 Da the very high presence of highly protonable carboxylic acids didn't allow us to isolate the protonation process. Conformational process next to the protonation wasn't detected probably due to that process being very slow to detect with our detector.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Proteínas e Aminoácidos

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes em sistemas celulares biológicos. A sua presença manifesta-se pela variedade de natureza química, conformacional e atividade celular, uma vez que podemos encontrar peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros com pesos moleculares de milhões de Daltons, numa só célula [1].

As proteínas são constituídas por subunidades monoméricas denominadas aminoácidos que representam a chave para o conhecimento de toda estrutura proteica, sendo esta construída a partir de um conjunto de 20 aminoácidos ligados covalentemente. Cada aminoácido apresenta cadeias laterais distintivas (grupo R), o que determina as propriedades químicas e respetiva conformação das proteínas. A sequência linear de aminoácidos de uma proteína é conhecida como a sua estrutura primária. É geralmente aceite que a dobragem (folding) de proteínas origina a sua estrutura nativa, sendo regulada e determinada pela sequência de aminoácidos da proteína e pelo ambiente químico envolvente (o solvente). A protonação de cadeias laterais de aminoácidos específicos é por vezes suficiente para induzir processos de desdobraimento que podem ocorrer em escalas de tempo entre os nanossegundo e os microssegundos. Assim, a caracterização das mudanças conformacionais, energéticas e da dinâmica das reações de protonação que envolvem aminoácidos é essencial para a compreensão das primeiras etapas de desdobraimento de proteínas, induzidas por transições de pH.

Aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis representam 30% dos aminoácidos das proteínas [30]. Existem muitos exemplos de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis em locais ativos de proteínas que desempenham um papel central em funções de proteína. Em particular, a protonação dos resíduos, tais como o ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) acompanha o bombeamento de prótons por bacteriorodopsina [27], as reacções de transferência de electrões [28] ou ainda libertação de Ca^{2+} a partir do Ca^{2+} ATPase [29]. Os resíduos de histidina são frequentemente identificados como essenciais para a atividade enzimática.

Todos os aminoácidos encontrados nas proteínas são α -aminoácidos com um grupo carboxílico e amino ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono α). Contudo, as diferenças entre os seus grupos R condicionam e alteram a estrutura, carga elétrica, tamanho e, por consequência, a solubilidade do aminoácido em água. O entendimento das propriedades químicas dos aminoácidos permite compreender e antever o comportamento bioquímico destes, se simplificarmos e agruparmos os aminoácidos em classes, consoante as suas cadeias laterais. O principal fator distintivo é a sua polaridade, pelo que temos o grupo dos aminoácidos i) não-polares e alifáticos, ii) aromáticos, iii) não-carregados, mas polares, iv) carregados positivamente, e v) carregados negativamente.

Neste trabalho propôs-se estudar dois grupos de aminoácidos: os carregados positivamente (Arginina) e os aromáticos (Tirosina). Os aminoácidos carregados positivamente são aqueles que apresentam uma cadeia lateral carregada positivamente, neste caso o grupo guanidina, mas isto é o que sabemos à partida, sendo que temos de ter em conta que o pKa e o pH da solução vão afetar o comportamento destes aminoácidos, em relação à sua carga.

Os aminoácidos aromáticos apresentam cadeias laterais apolares (hidrofóbicas), sendo que o grupo hidroxilo da tirosina pode formar pontes de hidrogénio, o que lhe permite atuar como principal grupo funcional em várias atividades enzimáticas. A tirosina apresenta absorção de luz na região ultravioleta do espectro eletromagnético com um pico característico a 280 nm [1].

Cada proteína possui uma estrutura tridimensional característica que é estabilizada por múltiplas interações fracas das suas estruturas monoméricas, ou seja, a conformação é o arranjo espacial dos átomos constituintes das proteínas, e possíveis conformações podem ser caracterizadas desde que não ocorra a eliminação das ligações covalentes das cadeias polipeptídicas. A conformação mais estável é aquela que minimiza a energia livre de Gibbs. As interações hidrofóbicas são o principal contribuinte para a estrutura das proteínas, contudo a natureza das ligações covalentes das cadeias polipeptídicas impõem restrições estruturais, visto que a ligação dupla mantém todo o grupo peptídico numa configuração planar rígida [1]. Todas estas questões estruturais (secundária e terciária) resultam numa estrutura tridimensional dividida em duas classes: proteínas fibrosas e globulares. As proteínas fibrosas possuem funções estruturais com elementos repetitivos nas suas cadeias polipeptídicas e que servem de modelo para a estrutura proteica final: α -hélice e conformação β . Em ambas conformações ocorrem ligações de hidrogénio otimizadas ao longo das cadeias polipeptídicas. As proteínas globulares apresentam estruturas e conformações contendo elementos diferentes na mesma cadeia polipeptídica – domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, por exemplo.

O processo físico pelo qual uma proteína adquire a sua estrutura tridimensional denomina-se por enrolamento (folding), ou seja, a conformação espontânea das suas cadeias mais simples em estruturas secundárias, terciárias, e, finalmente, na estrutura proteica com funções biológicas relevantes. As proteínas são moléculas dinâmicas cujas funções dependem do ambiente fisiológico (nomeadamente pH), e este pode alterar consideravelmente a conformação final proteica. O estudo das alterações conformacionais induzidas pelo pH que ocorrem em proteínas e péptidos requer a caracterização das reações de protonação ou desprotonação envolvendo os resíduos de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis.

1.1.1 Protonação de Aminoácidos

Os 20 aminoácidos mais comuns são constituídos por um grupo carboxílico e um grupo amina ligados ao mesmo átomo de carbono. Eles diferem entre si no grupo ligando lateral (designado por grupo R) que varia em tamanho, estrutura e carga elétrica.

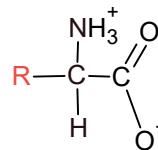
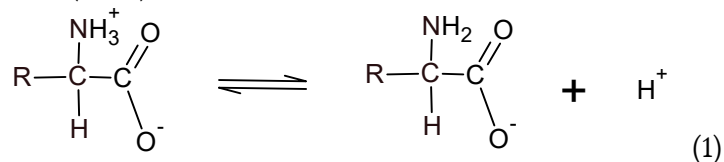


Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido [1].

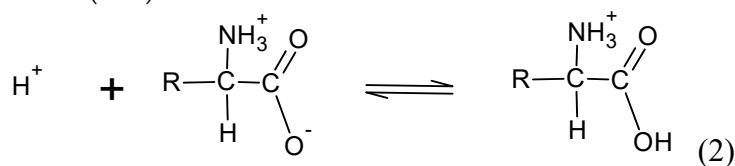
Os aminoácidos quando se encontram em solução comportam-se como ácidos ou bases fracos influenciados pelo carácter ácido do grupo $-\text{COOH}$ ou básico do grupo $-\text{NH}_2$.

Estas características vão influenciar a protonação ou desprotonação do aminoácido, já que se encontra na solução na forma zwitteriónica que tanto pode ser:

- Doadora de protões (ácido)



- Aceitador de prótons (base)



Os aminoácidos com o grupo R não ionizável são ácidos dipróticos a pH baixo e apresentam diversas formas à medida que o pH aumenta. Aminoácidos com grupo R ionizável apresentam espécies iônicas adicionais dependendo do pKa do grupo R [1]. Sete das cadeias laterais dos 20 aminoácidos contêm grupos que ionizam prontamente. A pH elevado (condições de baixa acidez), as cadeias laterais de aminoácidos que contêm ácidos carboxílicos tendem a ser carregadas negativamente (desprotonado), enquanto os que contêm aminas tendem a ser descarregadas. Com pH baixo, o oposto é verificado.

Assim, para aspartato (Asp), glutamato (Glu), tirosina (Tyr), e cisteína (Cis), as cadeias laterais ionizáveis são não-carregadas abaixo do seu pKa e carregadas negativamente acima do seu pKa. Para a histidina (His), lisina (Lys) e arginina (Arg), as cadeias laterais são carregadas positivamente abaixo do seu pKa e não carregadas acima do seu pKa. O valor médio de pKa para as cadeias laterais ionizáveis de tirosina e de arginina, os dois aminoácidos estudados neste trabalho é reportado por Pace et al. [30] como tendo os valores de: Tyr de 10,3 e Arg de 12,3.

O estudo das cadeias laterais de aminoácidos e do seu papel na estabilização da estrutura da proteína tem sido investigado ao nível molecular por técnicas tais como espectroscopia de infravermelho e de cristalografia de proteínas. No entanto, as técnicas capazes de avaliar os parâmetros conformacionais e dinâmicos, em correlação com o estado de protonação de cadeias laterais de aminoácidos em proteínas são ainda muito limitadas. No presente trabalho, a dinâmica de protonação de dois aminoácidos ionizáveis foi estudada após salto pH provocado pela libertação de prótons induzida por laser, a partir do composto o-nitrobenzaldeído (O-NBA), juntamente com calorimetria fotoacústica resolvida no tempo.

1.1.2 Tirosina

A tirosina (Figura 2) pertence ao grupo dos ligandos aromáticos, isto é, contém um grupo aromático na cadeia, o que a torna relativamente não polar. O grupo hidroxilo da tirosina pode formar ligações de hidrogénio, o que torna uma função importante para algumas enzimas. Este grupo também pode influenciar a polaridade deste aminoácido tornando-o polar em certas condições.

Este aminoácido tem a característica de absorver luz ultravioleta, fazendo com que esta característica seja muito utilizada para a caracterização de proteínas [1].

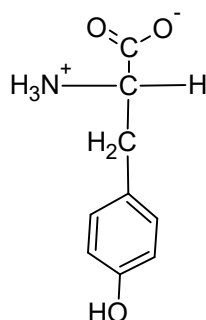


Figura 2. Estrutura da Tirosina [1].

1.1.3 Arginina

A arginina é um aminoácido constituído por um grupo R carregado positivamente. Este grupo caracteriza este aminoácido como um dos mais hidrofílicos, juntamente com os aminoácidos com grupos R carregados negativamente [1]. O grupo guanidina é o responsável por esta característica. Este aminoácido é um dos principais fornecedores de azoto fundamental ao funcionamento de todas as células e tecidos vivos.

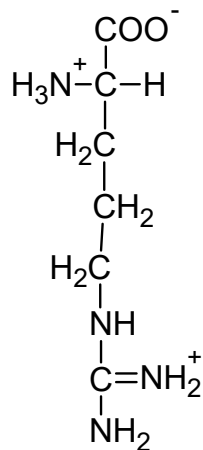


Figura 3. Estrutura da Arginina [1].

Refira-se que numa proteína os terminais do aminoácido estão envolvidos em ligações peptídicas com os aminoácidos vizinhos. Sendo assim, compostos modelo a ser usados devem ser o mais semelhante possível a um resíduo de aminoácido numa proteína. Estudos utilizando derivados de aminoácidos como compostos modelo mostraram que o grupo imidazol de Ac-His-NHMe e os grupos carboxilato, tanto de Ac-Glu-NH₂ e Ac-Asp-NH₂ têm valores de pKa semelhantes

aos normalmente encontrados em proteínas ou peptídeos [31 - 33]. Aqui, os dois compostos modelo que foram utilizados para caracterizar as reações de protonação envolvendo Tirosina e Arginina foram protegidos com grupos acetil e amina, ou seja, usou-se tirosina acetilada (Ac-Tyr-NH₂) e Arginina acetilada (Ac-Arg-NH₂).

1.2 Ácido Polimetacrílico

Polímero é um composto de elevado peso molecular que resulta da ligação covalente entre várias moléculas denominadas por monómeros. Atualmente, os polímeros são usados nas mais diversas aplicações desde embalagens, roupas, tintas e biomateriais, pelo que esta indústria representa um dos principais pilares da economia mundial. Em Portugal, a celulose constitui a base da indústria do papel colocando a economia portuguesa enquanto um dos principais exportadores desta matéria-prima, a nível mundial. Por outro lado, podemos realçar centros de produção de polietilenos e poliuretanos em Sines e de PVC em Estarreja.

Atendendo às características físico-químicas dos polímeros (nomeadamente, o peso molecular) e ao seu comportamento em solução aquosa podem ser considerados modelos químicos para o comportamento das proteínas aquando de alterações significativas de pH [2]. Um dos polímeros mais usados neste contexto é o ácido polimetacrílico (PMAA, figura 3) que apresenta elevada solubilidade em água e no qual podem ocorrer alterações conformacionais em elevada magnitude e extensão, ao longo da cadeia polimérica. Estas características permitem uma variedade de aplicações do PMAA.

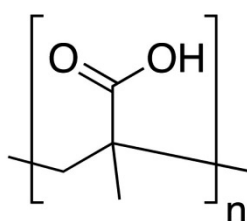


Figura 3. Estrutura do ácido polimetacrílico.

Em solução aquosa, este polímero é um ácido fraco com uma particular transição conformacional induzida pela mudança de pH. O estudo desta transição foi efetuado por várias técnicas que revelaram que a pH 4, o PMAA se encontra na forma helicoidal, mas que a pH 6 ocorre uma expansão da cadeia (abertura) devido a repulsões entre os grupos carboxílicos [3].

A extensão desta abertura da estrutura polimérica depende do pH da solução, mas também da sua concentração, força iónica e da presença de outras espécies carregadas em solução que possam competir pelo H⁺.

O pH da solução e o grau de ionização estão relacionados com o pK_a através da equação de Henderson-Hasselbach [4]:

$$pK_a = pH - \log \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (3)$$

A partir da equação podemos deduzir que repulsões electrostáticas levam a uma diminuição da constante ionização à medida que o grau de ionização (α) aumenta. O pK_a deste ácido é de 6-7, uma vez que o peso molecular induz ligeiras variações.

1.3 Calorimetria Fotoacústica Resolvida no Tempo

1.3.1 Fundamentos

Em seguida é descrita a principal técnica deste trabalho, a calorimetria fotoacústica resolvida no tempo (PAC). A descrição desta técnica é útil visto que a maioria da instrumentação foi construída e desenvolvida pelo nosso laboratório.

Esta técnica é baseada principalmente no efeito fotoacústico descoberto por Bell [7] que se baseia no princípio que a absorção de ondas eletromagnéticas por um certo meio provoca uma sequência de eventos que culmina na geração de ondas sonoras. Este feito foi mais tarde extensivamente estudado por Patel e Tam [8,9].

Esta absorção de ondas electromagnéticas sob a forma de radiação monocromática origina a formação de ondas de calor por relaxação não-radiativa. As ondas de calor vão provocar uma expansão termoelástica do meio originando ondas de pressão que podem ser detetadas por meio de um transdutor para análise da sua amplitude e perfil temporal. Na figura 4 podemos ver este processo esquematizado.

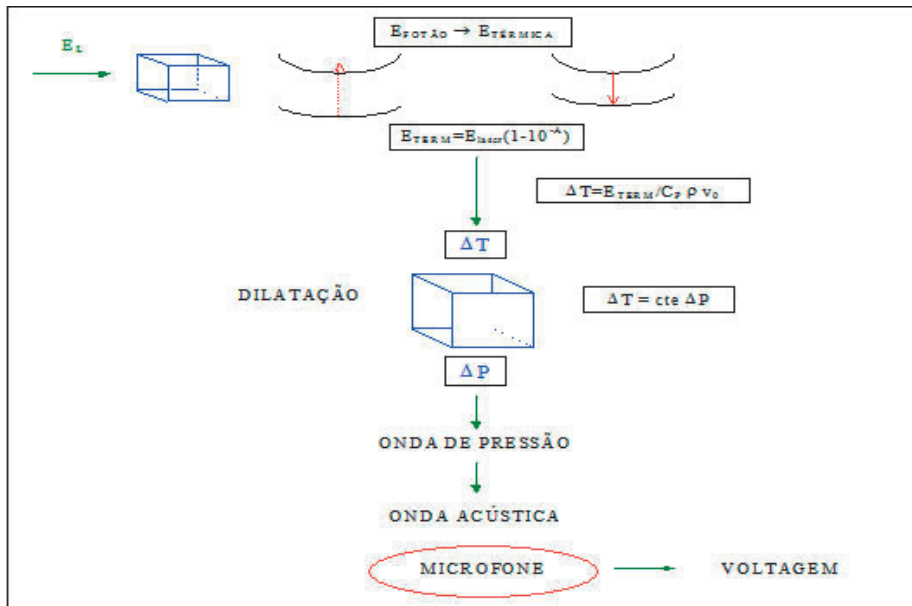


Figura 4 - Descrição esquemática dos fenômenos envolvidos na detecção da energética e cinética de processos fotoinduzidos por calorimetria fotoacústica [34].

Em termos teóricos a energia absorvida pelas moléculas, por absorção de um pulso de laser, é dissipada pelas espécies excitadas por várias formas,

$$E_{abs} = \varphi_{lum} E_{lum} + \varphi_{cal} E_{abs} + \varphi_{nl} E_{nl} \quad (4)$$

Segundo a expressão (4) a primeira parcela dessa energia é dissipada por luminescência, sendo φ_{lum} o rendimento quântico de luminescência e E_{lum} a energia do estado emissor. A segunda parcela representa a fração de energia libertada sob a forma de calor – $E_{TERM} = \varphi_{cal} E_{abs}$. A terceira parcela representa a fração de energia correspondente a espécies com tempo de vida mais longo do que a resolução temporal da experiência e que em termos práticos pode ser considerada energia não libertada [34].

Do ponto de vista da termodinâmica, a onda de pressão gerada por processos não radiativos de deposição de calor causa uma variação de temperatura dada pela equação (5) onde o C_p é a capacidade calorífica, ρ é a densidade da solução e v_0 o seu volume inicial.

$$\Delta T = \frac{E_{TERM}}{C_p \rho v_0} \quad (5)$$

A equação 6, em que β é o coeficiente de expansão térmica e κ_T a compressibilidade isotérmica do solvente, mostra que a variação de pressão fotoinduzida é proporcional ao calor depositado. Logo numa experiência fotoacústica, a variação de pressão pode ser determinada a partir das propriedades termoelásticas do solvente e usando um transdutor calibrado. Em termos de variações de volume a dependência é expressa na expressão(7).

$$\Delta P = \left(\frac{\beta}{\kappa_T} \right) \Delta T \quad (6)$$

$$\Delta V = \beta v_0 \Delta T \quad (7)$$

A amplitude do sinal fotoacústico, PA, é proporcional à variação de pressão fotoinduzida, daí pode escrever-se,

$$PA = K \cdot \Delta P \quad (8)$$

A constante de proporcionalidade, K, depende de fatores instrumentais e da geometria da experiência.

Além da onda fotoacústica gerada através dos processos térmicos, uma onda também pode ser gerada por mudanças de volume molecular durante o processo de excitação e desativação. Para medir apenas efeitos produzidos por mudança de volume deve-se trabalhar num regime onde o coeficiente de expansão térmico da água seja zero, ou seja $\beta=0$.

1.3.2 Aplicação prática da PAC

A calorimetria fotoacústica (PAC, acrónimo inglês) resolvida no tempo é uma técnica complementar da fotólise por relâmpago. Na fotólise por relâmpago os transientes de estados moleculares excitados são analisados com base nas suas transições radiativas (absorção e emissão de luz) que ocorrem na gama de comprimentos de onda analisados. Por oposição, a PAC permite-nos o estudo de transições não-radiativas (relaxação vibracional, supressão física do estado excitado ou reações químicas). As transições energéticas obtidas correspondem à conversão da energia da luz absorvida em energia térmica, que por sua vez originam variações de pressão locais, uma vez que a amostra encontra-se volumetricamente confinada (paredes rígidas). As variações de pressão originam ondas acústicas que podem ser

detetadas acoplando um transdutor de alta frequência à célula irradiada. O transdutor converte a pressão que atua sobre ele numa escala de voltagem [5]. Experimentalmente, a detecção de ondas fotoacústicas utilizam absorvâncias baixas da amostra para garantir uma irradiação homogênea do seu volume e rege-se pelos seguintes passos: i) registo da onda acústica de uma solução de referência fotoacústica, que converte toda a energia da luz absorvida em energia térmica num tempo muito curto, ii) medição da onda acústica produzida pela solução contendo um tempo de vida semelhante à frequência do transdutor, e uma absorvância igual à da solução da referência, e iii) determinação da onda acústica do solvente utilizado (esta onda do solvente é subtraída à da referência e da amostra).

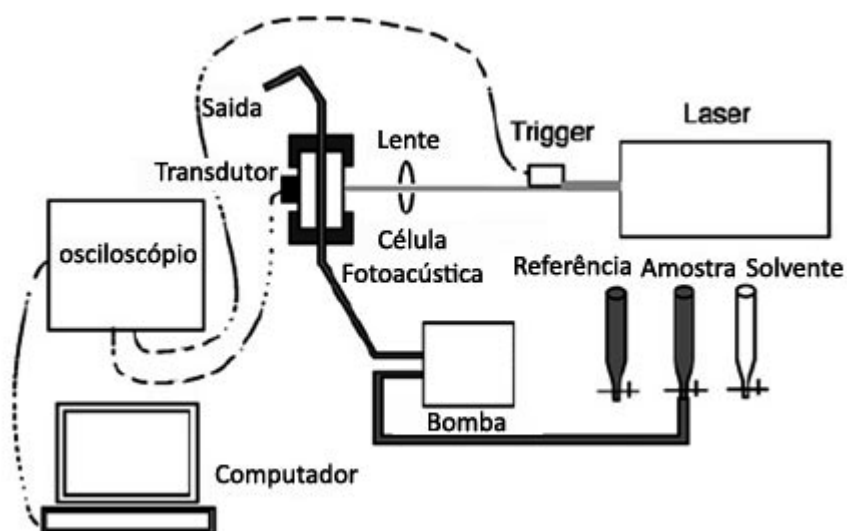


Figura 5. Esquema da aparelhagem para realizar calorimetria fotoacústica, segundo o modelo de irradiação frontal.

Através de tratamento computacional das ondas é possível determinar, pelas diferenças de fase e amplitude, o tempo de vida das espécies em estudo bem como a entalpia de reação gerada. O cálculo deste dado calorimétrico requer o conhecimento do rendimento quântico respetivo. Esta técnica apresenta uma limitação importante visto não permitir identificar os transientes cujos calores de reação e tempos de vida são medidos. A figura 5 apresenta o esquema do sistema utilizado na PAC.

1.3.3 Análise de Dados

O sinal fotoacústico, H , resulta de alterações de volume produzidas pela fração de energia libertada pela conversão da energia da luz absorvida em energia térmica (β), e por alterações de volume resultantes de rearranjos do solvente ou associados ao sistema molecular ($\Delta V_{\text{estrutural}}$) sendo proporcional à quantidade de fótons absorvidos (n) - (9)

$$H = k n \left[\alpha \frac{\beta}{c_p \rho} E_{h\nu} + \Delta V_{\text{estrutural}} \right] \quad (9)$$

onde α é o coeficiente de expansão térmica cúbico da solução, C_p é a capacidade calorífica específica e ρ é a densidade. $E_{h\nu}$ é a energia molar dos fótons incidentes, sendo o seu valor de $80.54 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

A análise das ondas fotoacústicas foi efetuada recorrendo ao programa desenvolvido no departamento de Química da Universidade de Coimbra e disponível online em <http://cpac.qui.uc.pt>. A onda da amostra é resultado da convolução da onda de referência $T(t)$ e um somatório de funções de decaimento exponenciais, $H(t)$ (10).

$$H(t) = \sum_i \left(\frac{\phi_i}{\tau_i} \right) e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (10)$$

Onde ϕ_i é o fator pré-exponencial do transiente com tempo de vida τ_i (10). Os valores de ϕ_i e τ_i são resultados da desconvolução do sinal e cada decaimento sequencial individual contém a deposição de calor num dado intervalo de tempo.

1.3.4 Método das duas Temperaturas

Como a água é utilizada como solvente as suas propriedades termoelásticas são aqui tidas em conta, especialmente o β que depende fortemente da temperatura. Os valores de $\frac{c_p \rho}{\beta}$ para a água são obtidos a partir de valores tabelados.

$$\Delta V_{\text{estrutural},i} = \varphi_{i,\beta=0} E_{h\nu} \left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right)_{\beta \neq 0} \quad (11)$$

O valor do coeficiente de expansão térmica da água pura é nulo para $T=3.9^\circ\text{C}$ [23]. A esta temperatura, o sinal fotoacústico resulta apenas de alterações estruturais na solução não havendo contribuição entálpica. Os resultados obtidos estão corrigidos pelo rendimento quântico da injeção de prótons de o-NBA fotoinduzida ($\varphi = 0.4$).

A partir da equação 11 desenvolveu-se o denominado método das duas temperaturas, que consiste na análise das ondas fotoacústicas da amostra a $T_{\beta=0}$ (que

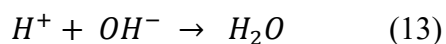
pode ser determinada experimentalmente) e comparar com a onda fotoacústica da referência $T_{\beta \neq 0} = 6.0 \text{ } ^\circ\text{C}$ isto porque a referência não apresenta sinal à temperatura $T_{\beta=0}$. O método das duas temperaturas permite a determinação da variação do volume molar associado a variações conformacionais das moléculas envolvidas ou a movimentos articulados das moléculas do solvente, determinando assim a cinética relacionada com essas variações.

Capítulo 2

Resultados e Discussão

2.1 Ensaio com o Fotoácido (o-NBA)

A reação de fotoexcitação do o-NBA é a seguinte:



Quando ocorre a fotólise do o-NBA, verifica-se uma súbita libertação de H^+ para a solução (12), prótons que são rapidamente solvatados pelas moléculas de água, resultando numa contração que se expressa por uma onda invertida em relação à onda da referência (Figura 6). Com o aumento do pH, aumenta a reação com o OH^- levando à formação de H_2O e à neutralização das cargas (13), o que resulta na expansão da solução e à semelhança desta com a onda da referência utilizada. Sendo assim, após uma reação unimolecular (12) que induz uma contração, segue-se uma reação bimolecular que induz uma expansão, sendo que a cinética desta última reação depende da concentração de iões OH^- em solução, isto é, do pH da solução. Foram efetuados vários ensaios de fotoinjeção com as soluções de o-NBA em água e estes permitem revelar a importância do controlo de pH em solução na obtenção dos parâmetros volumétricos requeridos através da desconvolução das ondas experimentais.

Os resultados da experiência das ondas fotoacústicas das soluções de o-NBA em água foi dividida em duas partes. Primeiro analisou-se a pH 5, 6 e 7 devido a este ser um pH para o qual, aparentemente, a quantidade de iões OH^- em solução não deve permitir detetar a reação de formação de água.

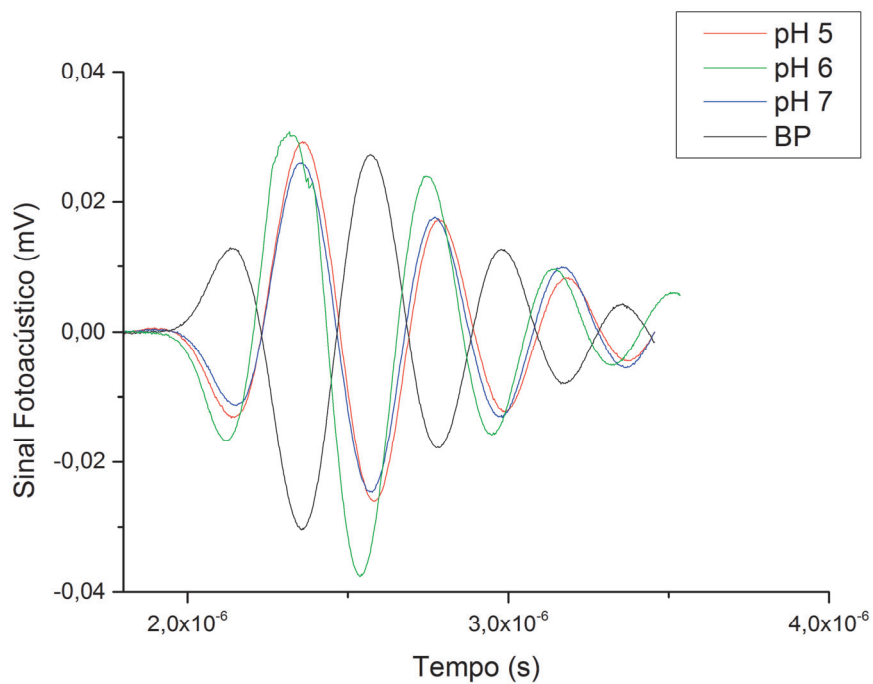


Figura 6. Ondas fotoacústicas de soluções de o-NBA em água a pH 5, 6 e 7 e referência fotoacústica bromocresol purple (BP) obtidas à temperatura de 3°C e 6°C respectivamente.

Em seguida analisou-se os resultados a pH 8, 10 e 11 (figura 7). Nestes casos será porventura possível associar dois eventos de variação de volume às reações 11 e 12. Por outro lado, à medida que o pH aumenta (maior concentração de OH), a cinética da reação 12 torna-se mais rápida e porventura os dois processos deixam de ser distinguíveis.

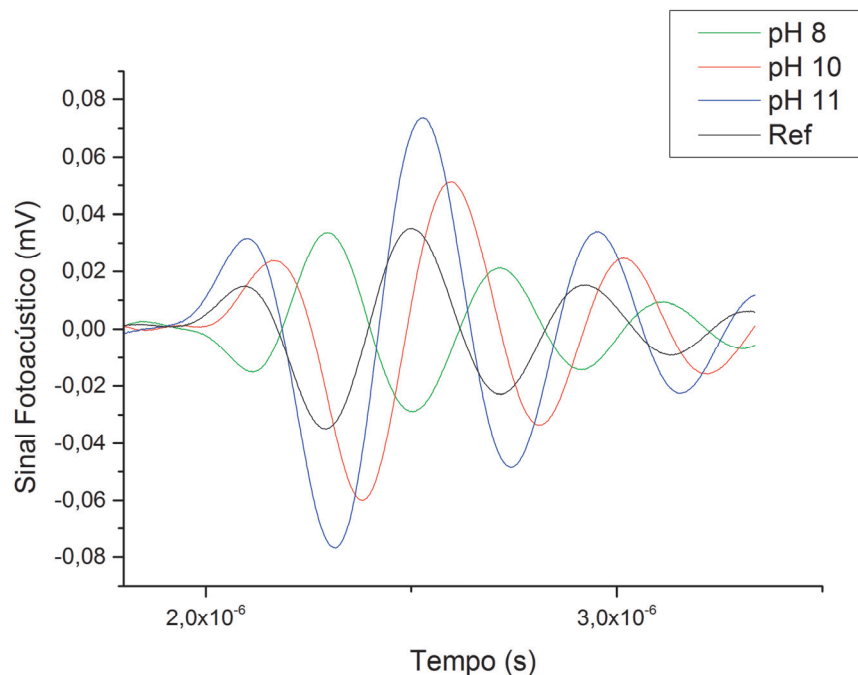


Figura 7. Ondas fotoacústicas de soluções de o-NBA em água a pH 8, 10 e 11 e referência fotoacústica bromocresol purple (BP) obtidas às temperaturas de 3°C e 6°C respectivamente.

Tabela 1. Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA em água a pH 5, 6 e 7. Concentrações experimentais em água.

	φ_1	τ_1 (ns)	$\Delta V(\text{cm}^3)$	$\Delta V/\text{H}^+$ (cm^3/mol)
pH 5	$-0,989 \pm 0,063$	$17,68 \pm 1,40$	-2,688	-6,720
pH 6	$-0,843 \pm 0,001$	$10,11 \pm 1,37$	-2,730	-6,825
pH 7	$-0,895 \pm 0,031$	$11,71 \pm 1,65$	-2,404	-6,009

Os resultados da desconvolução das ondas experimentais a $\text{pH} \leq 7$ encontram-se na tabela 1. Os tempos τ_1 são inferiores 20 ns e os valores de φ_1 estão de acordo com o esperado em comparação com a literatura [24], mas isto já era espectável visto não haver competição entre as duas reações (12) e (13).

Tabela 2. Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA em água a pH 8, 10 e 11. Concentrações experimentais em água. (*) Valor fixado

quando efetuada a desconvolução								
	φ_1	φ_2	τ_1	τ_2	$\Delta V_1(\text{cm}^3)$	$\Delta V_1/\text{H}^+$	$\Delta V_2(\text{cm}^3)$	$\Delta V_2/\text{H}^+$
			(ns)	(ns)		(cm^3/mol)		(cm^3/mol)
pH 8	-1,035 ± 0,034	-	16,54 ± 1,595	-	-2,709	-6,771	-	-
pH 10	- 1,008*	4,214 ± 0,275	10,00* ± 14,79	202,5	-2,639	-6,598	11,030	27,576
pH 11	-	2,372 ± 0,023	-	28,01 ± 1,325	-	-	6,208	15,520

Na Tabela 2, os resultados das melhores desconvoluções para pH 8, 10 e 11 são mostrados. Sem fixar qualquer um dos parâmetros aquando da desconvolução foi impossível associar dois processos sequenciais a qualquer um dos valores de pH. A única forma visível de obter uma separação das duas reações (e que produz o melhor ajuste para o caso em apreciação) foi quando se fixa o valor de φ_1 e τ_1 para o pH 10 (*). Deste modo, um primeiro processo de contração é proposto (com valores em linha com os obtidos a pH's entre 5 e 8) e obteve-se um valor τ_2 de cerca de 200 ns, associado a uma expansão de 27,6 cm^3/mol para formação de moléculas de água nestas condições. Este valor pode ser comparado ao obtido por Bonneti et al [24] onde se afirma que a um pH acima de 9,5 a formação de moléculas de água leva a uma expansão de 24,5 + 0,4 ml/mol. Para os restantes valores de pH também foi tentado fixar valores mas nunca se conseguiu obter melhores desconvoluções do que as obtidas sem fixar valores. Assim, não foi possível obter φ separados a pH 8, provavelmente porque a quantidade de iões OH⁻ leva a que a respetiva reação se dê em pequena extensão e com uma cinética lenta.

Para pH 11, ainda que as ondas fotoacústica obtidas tenham sido também ajustada por um único processo exponencial, a natureza dos valores obtidos para devem ser enquadrados de diferente forma. Neste caso podemos associar o processo a uma expansão com um tempo de cerca de 30 ns. A expansão (15 cm^3/mol) tem um valor menor do que o encontrado para o processo de formação de água pH 10, indicador do facto de que a pH 11, ainda que se consiga detetar tanto a contração associada à injeção de prótons como a expansão da formação de água, os dois processos não foram separáveis com a nossa metodologia.

Também segundo a literatura para pH superior a 9 não é possível separar as duas reações devido a haver uma contração rápida devida à solvatação das cargas, seguida de uma expansão e ocorrendo formação de moléculas de água [24].

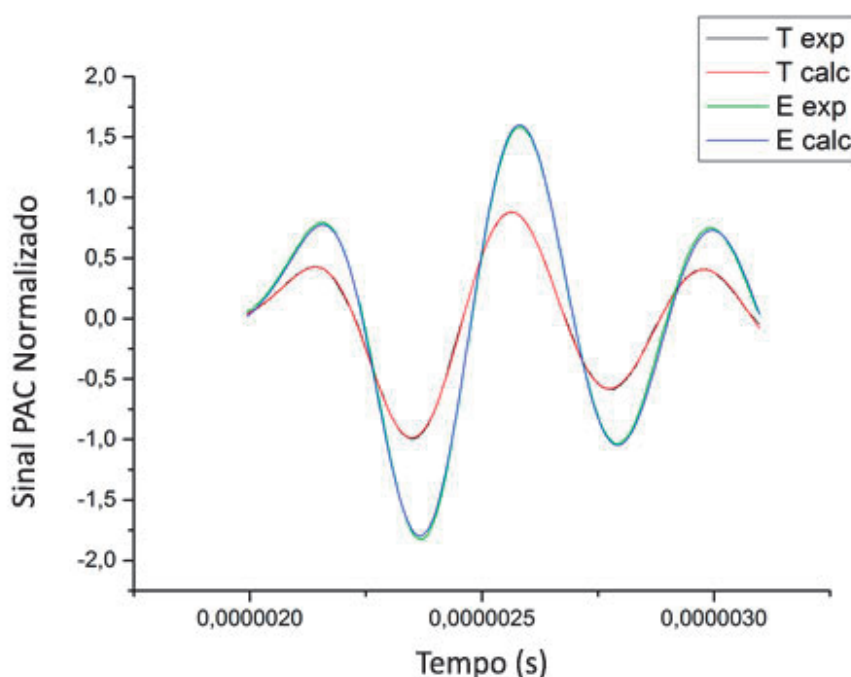


Figura 8. Exemplo de uma desconvolução do o-NBA em água e referência fotoacústica bromocresol purple (BP). T_{exp} sinal experimental do BP, T_{calc} sinal do BP após ajuste, E_{exp} sinal do o-NBA experimental, E_{calc} sinal do o-NBA após ajuste a pH 6 e com o o-NBA a $T = 3^{\circ}\text{C}$ e BP a $T = 6^{\circ}\text{C}$.

Conclui-se assim que para concentrações de OH^- menores do que 1×10^{-6} M (pH=8) não se consegue detectar a formação de moléculas de água, enquanto para concentrações de OH^- maiores do que 1×10^{-4} M (pH=10), a nossa técnica de Calorimetria Fotoacústica consegue detectar essa formação e em circunstâncias ótimas associar um valor de variação de volume a essa formação.

Por último, na figura 8 podemos ver um exemplo de uma desconvolução obtida a partir do programa C-PAC, onde podemos verificar como o ajuste do sinal é obtido a partir de um sinal experimental.

2.2 Ensaios da solução aquosa de Tirosina em presença de o-NBA

Nesta experiência era esperado ocorrer uma expansão associada à fotoinjeção de H^+ pelo o-NBA. A um pH inicial de 11, conjuntamente com a reação dos prótons com OH^- do meio, a presença de Tirosina e a respetiva protonação da Tirosina segundo a reação (14) estão em competição.



Esta experiência apresenta inúmeros desafios à sua compreensão, visto que é realizada a $\text{pH}=11$ e tal como foi visto anteriormente, a reação de excitação do o-NBA a este pH apenas permite detetar um único processo, que foi associado tanto à contração pelo aparecimento de prótons, como à subsequente protonação de OH^- do meio.

Com a presença de tirosina (negativamente carregada a este pH) podemos prever a uma segunda expansão, relativa à protonação da tirosina, cuja cinética seria dependente da concentração de Tirosina.

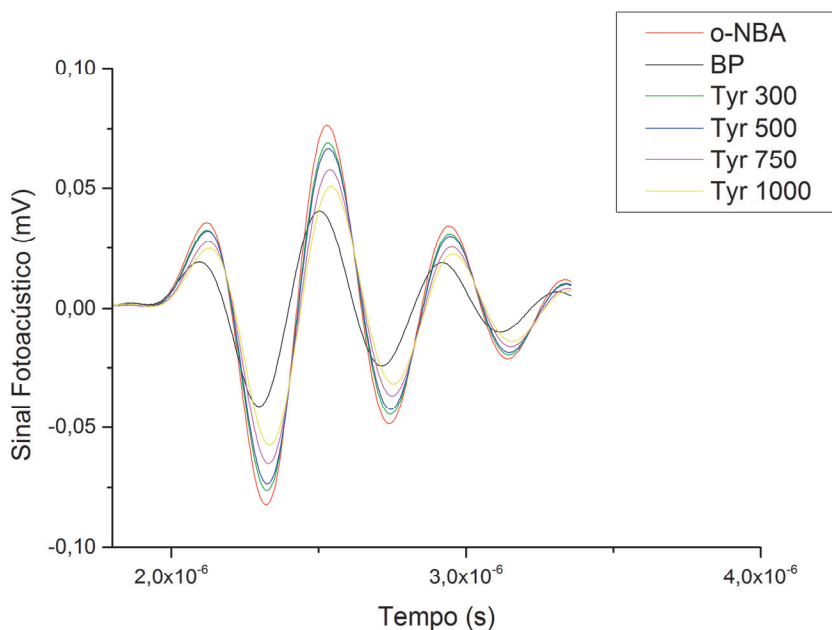


Figura 9. Ondas fotoacústicas de solução de o-NBA em água a $\text{pH}=11$, referência fotoacústica bromocresol purple (BP) e solução aquosa de Tirosina em o-NBA a diferentes concentrações sendo realizada à temperatura de 6°C o BP e o restante a 3°C .

A figura 9 mostra os sinais puramente volumétricos para a Tirosina de um dos ensaios realizados. Podemos verificar que como o pH inicial é elevado as ondas

tanto do o-NBA como da Tirosina são da mesma forma que a referência o que evidencia que detetamos essencialmente uma expansão.

Tabela 3. Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos da solução aquosa de Tirosina em o-NBA.

	φ_2	τ_2 (ns)	$\Delta V(\text{cm}^3)$	$\Delta V/\text{H}^+$ (cm^3/mol)
o-NBA	$2,428 \pm 0,089$	27,88 1,065	$\pm 6,355$	15,887
300 μM	$2,383 \pm 0,061$	31,55 1,243	$\pm 6,237$	15,592
500 μM	$2,160 \pm 0,057$	36,99 1,102	$\pm 5,655$	14,137
750 μM	$2,109 \pm 0,039$	39,90 0,525	$\pm 5,521$	13,803
1000 μM	$1,887 \pm 0,045$	42,43 1,143	$\pm 4,938$	12,346

Como é possível verificar pela tabela 3 não foi possível separar as reações como era pretendido, obtendo-se desconvolúções com bons ajustes com uma única exponencial (parâmetros denominados na tabela 3 por valores φ_2 e τ_2). Uma única expansão tinha já sido observada para soluções de o-NBA na ausência de tirosina a pH 11. Provavelmente a formação da água em competição pelos iões H^+ da solução torna difícil relacionar a expansão observada à protonação da tirosina. Mas podemos notar algumas diferenças subtis à medida que a concentração de tirosina em solução aumenta: nesta experiência os valores de τ_2 observados vão aumentando à medida que a concentração da tirosina aumenta, enquanto os valores de variação de volume associados à expansão observada vão diminuindo.

Podemos também concluir que nesta experiência tanto o φ_2 e vão diminuindo à medida que a concentração da tirosina aumenta, isto sim ocorreu tal como era esperado mas o τ_2 vai aumentando o que não era espectável.

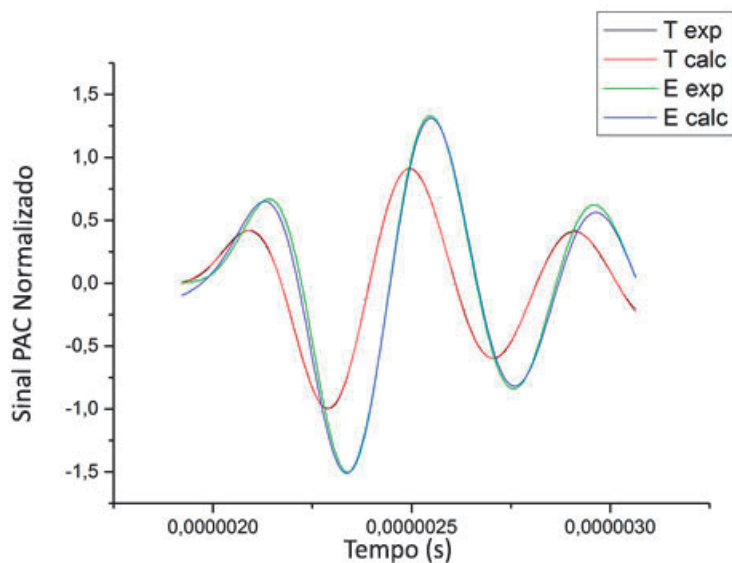


Figura 10. Exemplo de uma desconvolução da Tirosina em o-NBA a $1000 \mu\text{M}$ e referência fotoacústica bromocresol purple (BP). T_{exp} sinal experimental do BP, T_{calc} sinal do BP após ajuste, E_{exp} sinal da Tirosina experimental, E_{calc} sinal do Tirosina. Após ajuste a pH 11 e com o o-NBA a $T = 3^\circ\text{C}$ e BP a $T = 6^\circ\text{C}$.

O aumento do valor de τ_2 parece denunciar a presença de uma reação adicional com uma constante cinética menor do que a da formação de água, mas ainda assim competitiva com esta reação (seria a reação de protonação da tirosina). À medida que se aumenta a concentração de tirosina em solução o rendimento relativo desta reação aumentaria, resultando num tempo aparente τ_2 com um valor menor. Também interessante é a redução do valor de ΔV observado. Este valor vai sendo menor à medida que há maior quantidade de tirosina em solução. Ainda considerando o aumento do rendimento relativo da reação de protonação da Tirosina em relação à reação de formação de água que ocorre com o aumento da concentração de Tirosina em solução, teremos que concluir que o valor da variação de volume associado à protonação da Tirosina (assumindo que é uma expansão) é menor do que o valor associado à formação da água.

A Figura 10 representa um exemplo de como se obteve as desconvolúções para as experiências da tirosina utilizando o programa C-PAC.

2.3 Ensaios da solução aquosa de Arginina em presença de o-NBA

Realizaram-se experiências com diferentes concentrações de Arginina em presença de o-NBA. O pH inicial destas experiências foi igual ao da experiência de tirosina, ou seja pH=11, e de novo se prevê ser complicado obter resultados, de acordo com as razões anteriormente apresentadas. Para a reação de protonação da Arginina é também esperada uma expansão, pois duas espécies carregadas dão origem a uma espécie neutra, e a solvatação pelas moléculas (polares) de água far-se-á a uma distância maior, devido à diminuição da atração electroestáticas. Deste modo, espera-se que ocorra uma expansão devido à formação de água pela reação de OH⁻ com os iões H⁺ injetados pelo o-NBA e uma segunda expansão pela atuação da Arginina (15).

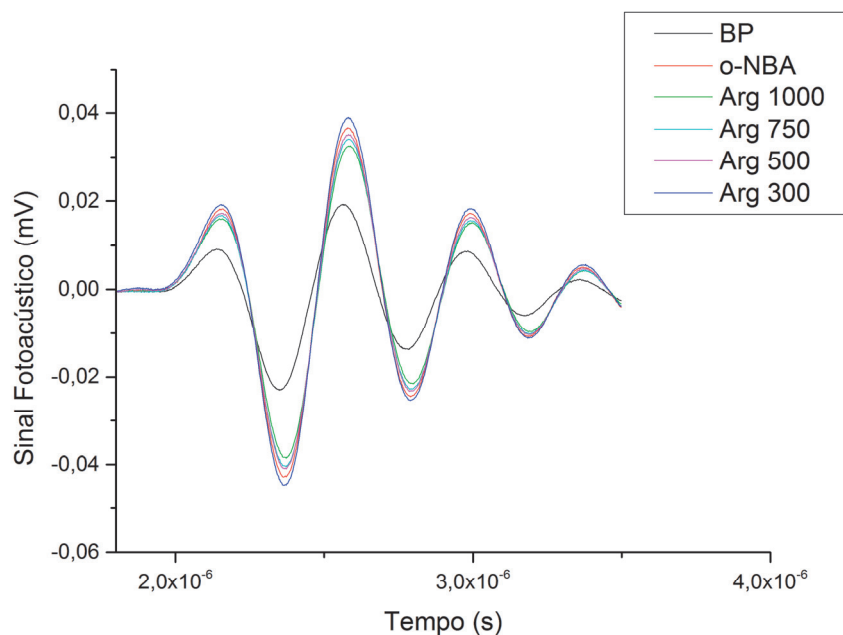


Figura 11. Ondas fotoacústicas de solução de o-NBA em água a pH=11, referência fotoacústica bromocresol purple (BP) e solução aquosa de Arginina em o-NBA a diferentes concentrações com a solução de BP realizada à temperatura de 6°C e o restante a 3°C.

A figura 11 mostra as ondas fotoacústicas de solução de o-NBA em água a pH=11, referência fotoacústica bromocresol purple (BP) e solução aquosa de

Tirosina em o-NBA a diferentes concentrações de um dos ensaios efetuados. As ondas obtidas para a Arginina são muito idênticas às observadas na tirosina como amostra. Tendo o seu comportamento sido idêntico em todos os aspetos.

Tabela 4. Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos da solução aquosa de Arginina em o-NBA.

	φ_2	τ_2 (ns)	$\Delta V(\text{cm}^3)$	$\Delta V/\text{H}^+$ (cm^3/mol)
o-NBA	$2,130 \pm 0,051$	$22,97 \pm 0,539$	5,574	13,936
300 μM	$2,082 \pm 0,028$	$23,58 \pm 0,533$	5,450	13,624
500 μM	$2,002 \pm 0,056$	$22,09 \pm 0,340$	5,239	13,097
750 μM	$1,911 \pm 0,037$	$22,78 \pm 0,328$	5,002	12,506
1000 μM	$1,910 \pm 0,027$	$24,02 \pm 0,448$	4,999	12,497

Na tabela 4 podemos verificar que os resultados obtidos para a Arginina são idênticos aos da Tirosina, apesar dos tempos evoluírem numa maneira menos coerente (mas isso pode dever-se a algum erro experimental). Também não foi possível separar a protonação da Arginina da formação da água levando à impossibilidade de relacionar diretamente a expansão que ocorre com a protonação da Arginina. Verifica-se a tendência para a diminuição da variação de volume com o aumento da concentração da Arginina presente em solução. Tal diminuição, à medida que a quantidade de Arginina presente em solução aumenta e portanto o rendimento relativo da reação de protonação da Arginina aumenta, deve ser relacionada com o facto da variação de volume associada à protonação da Arginina ser inferior à associada à da formação da água.

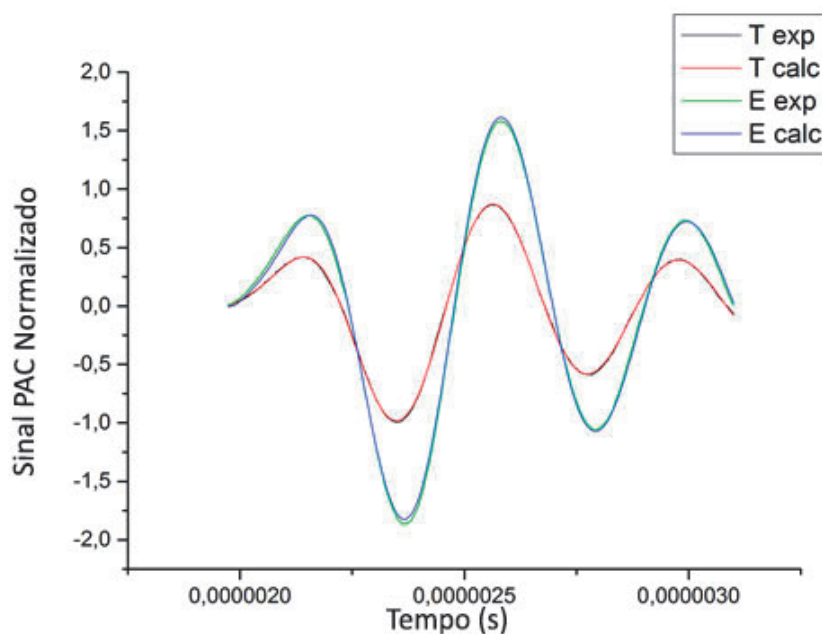


Figura 12. Exemplo de uma desconvolução da Arginina em o-NBA a $1000 \mu\text{M}$ e da referência fotoacústica bromocresol purple (BP). T_{exp} sinal experimental do BP, T_{calc} sinal do BP após ajuste, E_{exp} sinal da Arginina experimental, E_{calc} sinal da Arginina após ajuste a pH 11 e com o o-NBA a $T = 3^\circ\text{C}$ e BP a $T = 6^\circ\text{C}$.

A figura 12 mostra um exemplo do ajuste feito para as experiências da Arginina utilizando o programa C-PAC.

2.4 Discussão dos resultados dos aminoácidos

Os resultados obtidos para a protonação da Tirosina e da Arginina com um pH inicial elevado de 11 parecem indicar reações de protonação mais lentas e com valores associados de variação de volume menores do que as observadas para a reação de formação da água.

Para confirmar os resultados obtidos com a Tirosina e Arginina recorreu-se a dados referentes a um aminoácido com um pKa idêntico. Recorreu-se aos dados obtidos por outro investigador sobre o aminoácido Cisteína (pH inicial de 10,9) efetuados no mesmo laboratório, com um sistema e condições similares às utilizadas no presente estudo [25]. Nesse estudo foi possível obter para a protonação da cisteína o valor de variação de volume intrínseca de $2.1 \pm 0.4 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Ao contrário do conseguido para a Tirosina e Arginina, no estudo citado para a Cisteína os dados fotoacústicos poderão ser ajustados a dois decaimentos sequenciais, um associado à injeção de prótons e à formação de água e um segundo à protonação da

Cisteína. O resultado anteriormente citado para a variação de volume associada à protonação da cisteína corresponde ao segundo parâmetro desta desconvolução (φ_2).

De modo a comparar diretamente os resultados obtidos no presente estudo procedeu-se a nova desconvolução dos dados obtidos para a Cisteína. Neste caso uma comparação direta torna necessária uma desconvolução com apenas uma exponencial. Os resultados obtidos para esta desconvolução, que se revelou adequada para os dados experimentais, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos da solução aquosa de Cisteína em o-NBA [25].

	φ_2	τ_2 (ns)	$\Delta V(\text{cm}^3)$	$\Delta V/\text{H}^+$ (cm^3/mol)
o-NBA	$1,782 \pm 0,033$	$28,02 \pm 0,035$	4,663	11,657
300 μM	$1,295 \pm 0,014$	$30,32 \pm 0,098$	3,390	8,474
500 μM	$1,165 \pm 0,020$	$33,85 \pm 0,134$	3,049	7,623
750 μM	$1,133 \pm 0,006$	$36,61 \pm 0,148$	2,966	7,414
1000 μM	$1,015 \pm 0,014$	$40,44 \pm 0,523$	2,657	6,642

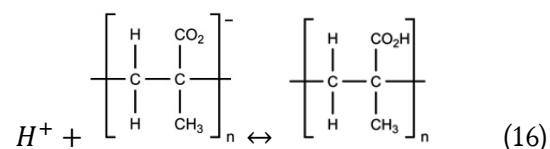
Os valores da Tabela 5 evoluem da mesma maneira relativamente aos outros aminoácidos analisados. De novo de nota um aumento do valor de τ_2 e uma diminuição do valor da variação de volume com o aumento da concentração de Cisteína em solução.

Para os três aminoácidos, Tirosina e Arginina aqui estudados e Cisteína aqui re-analisado, observa-se aquando de um súbito salto de pH da solução (com o pH inicial de valor elevado de 11), uma variação de volume que é aparentemente uma expansão, mas cuja magnitude é provavelmente menor do que a variação de volume associada à formação de água por reação do protão foto-ejetado com o ião OH^- . Evidências experimentais também parecem indicar que a reação de protonação dos aminoácidos ocorre com uma constante cinética menor do que a constante cinética de formação de água.

2.5 Resultados e Discussão da solução aquosa de Ácido Polimetacrílico

Neste conjunto de experiências com o ácido polimetacrílico pretende-se analisar se este polímero se comporta de uma maneira similar aos aminoácidos estudados. Para estas experiências utilizou-se o PMAA com dois pesos moleculares de aproximadamente 75000 e 500000 Da, pH inicial de 8, no qual se antevê que seja mais fácil obter resultados comparáveis com os dois aminoácidos testados anteriormente. Isto resulta do facto, do pH ser inferior, o que diminui a probabilidade da reação entrar em competição com a formação da água.

Realizaram-se experiências com diferentes concentrações em presença de o-NBA. Para a reação de protonação do PMAA é esperado que ocorra uma expansão associada à neutralização de grupos ácidos do PMAA (16) e porventura uma subsequente variação de volume referente a modificação conformacional do polímero.



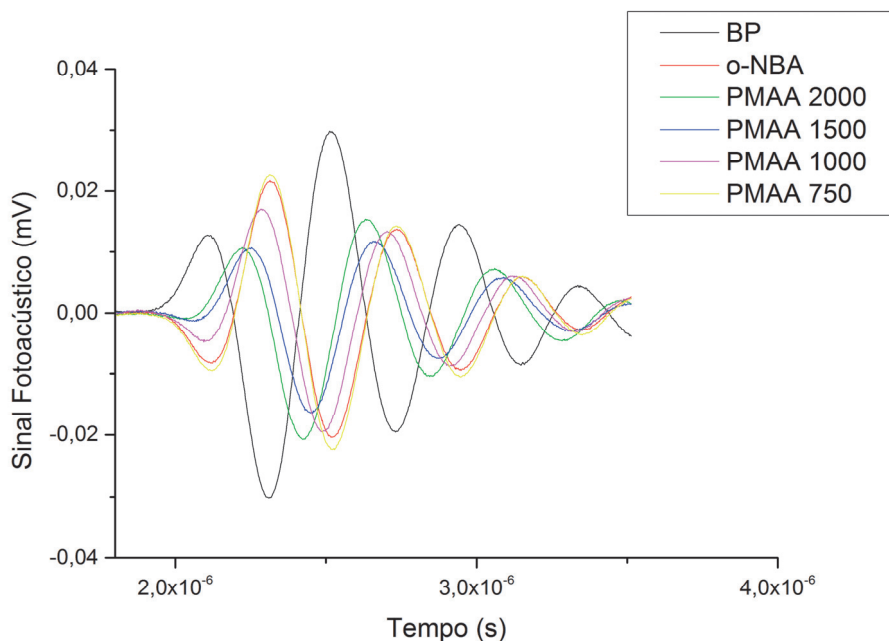


Figura 13. Ondas fotoacústicas de solução de o-NBA em água a pH=8 referência fotoacústica bromocresol purple (BP) e solução aquosa de PMAA 75000 Da a pH 8 em o-NBA a diferentes concentrações com a solução de BP realizada à temperatura de 6°C e o restante a 3°C.

Os resultados obtidos para os polímeros PMAA são complexos. Uma primeira análise qualitativa das Figuras 13 e 14, onde se mostram as ondas fotoacústicas obtidas para o PMAA em presença de o-NBA, permite ver que o comportamento do polímero de menor massa molecular (figura 13, 75000 Da) é distinto do comportamento do polímero de maior massa moléculas (Figura 14, 500000 Da). Neste último caso as ondas fotoacústicas experimentais mostram um sinal com a mesma forma do que o sinal da referência calorimétrica BP a 6°C. Este sinal torna-se maior à medida que se aumenta a quantidade de PMAA e o seu desfasamento em relação à onda obtida com a referência torna-se cada vez menor. Embora uma análise quantitativa possa revelar outras características, aparentemente o sinal dominante para o polímero PMAA de 500000 Da será uma expansão cuja cinética depende da concentração de PMAA, sendo o processo mais rápido à medida que a concentração de PMAA aumenta. Já para o PMAA de menor massa molecular os sinais fotoacústicos obtidos apresentam uma maior complexidade. O sinal fotoacústico aparente é “paralelo” ao sinal do o-NBA a pH 8, que corresponde a uma contração rápida, mas aparece desfasado para tempos menores; sendo que este desfasamento aumenta com o aumento da concentração de PMAA (Figura 13).

Nesta medida a onda fotoacústica observada é necessariamente uma composição de sinais de contração e expansão.

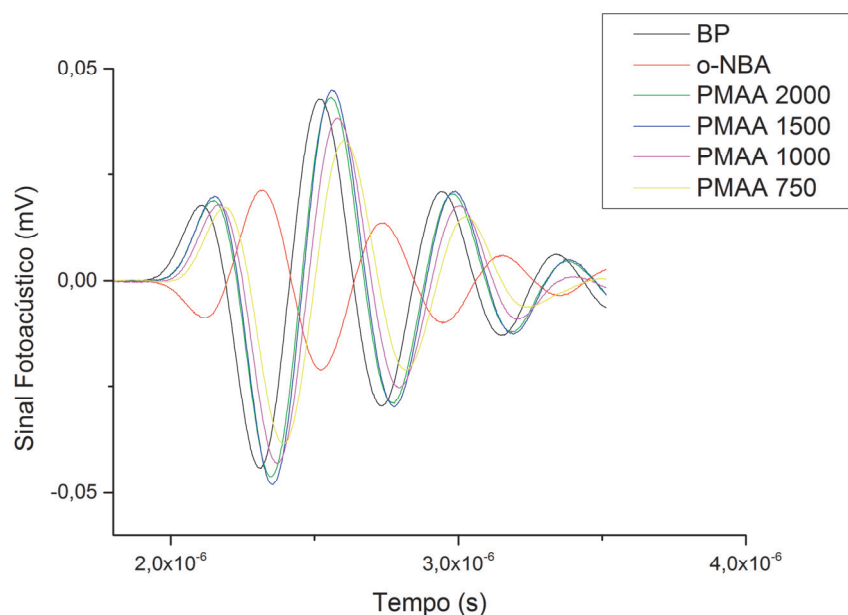


Figura 14. Ondas fotoacústicas de solução de o-NBA em água a pH=8, referência fotoacústica bromocresol purple (BP) e solução aquosa de PMAA 500000 Da a pH 8 em o-NBA a diferentes concentrações com a solução de BP realizada à temperatura de 6°C e o restante a 3°C.

Numa primeira análise, ainda qualitativa, poderíamos dizer que para o polímero de maior massa molecular a presença que um elevado número de cargas a neutralizar faria evidenciar o processo de neutralização (que seria uma expansão rápida), de algum modo foi observado nas experiências com o o-NBA com um pH de 11, onde apenas conseguimos observar uma expansão. Já para o polímero de menor massa molecular observaríamos o processo de fotoinjeção de prótons separável do processo de protonação do polímero. Nesta análise qualitativa não estamos a considerar os possíveis processos de movimentação conformacional subsequentes à protonação.

Realizou-se uma análise das ondas fotoacústicas utilizando duas exponenciais, deixando os quatro parâmetros livres. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de solução de o-NBA e de soluções de PMAA 75000 Da em o-NBA a pH 8 a diferentes concentrações. (*) Valor fixado quando efetuada a desconvolução

	φ_1	φ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	$\Delta V_1(\text{cm}^3)$	$\Delta V_1/\text{H}^+$ (cm^3/mol)	$\Delta V_2(\text{cm}^3)$	$\Delta V_2/\text{H}^+$ (cm^3/mol)
o-NBA	-0,708 \pm 0,020	-	8,21 \pm 0,046	-	-1,853	-4,634	-	-
750 nM	-0,635 \pm 0,014	-	8,31 \pm 0,015	-	-1,662	-4,156	-	-
1000 nM	-0,70*	0,67 \pm 0,026	8*	136,8 \pm 0,046	-	-	1,758	4,394
1500 nM	-0,70*	0,91 \pm 0,020	8*	56,07 \pm 0,083	-	-	2,393	5,983
2000 nM	-0,70*	1,54 \pm 0,0185	8*	35,91 \pm 0,015	-	-	4,048	10,120

Em relação à massa molecular de 75000 Da, a utilização de duas exponenciais foi necessária para ter um ajuste dos dados experimentais. Nesta série de experiências optou-se por fixar os valores dos parâmetros da primeira exponencial a partir dos valores obtidos para o-NBA, a pH 8. Corresponde isto a fixar uma contração rápida devido à solvatação de H^+ , como o primeiro processo após a excitação do o-NBA. Podemos então separar um segundo processo, mais lento, relativo à protonação dos grupos carboxílicos do PMAA. Este processo revelou uma expansão cujo valor aumenta na gama de concentrações estudada (Tabela 6). Este valor corresponde decerto à neutralização da carga no polímero e, aparentemente, a quantidade de cargas no polímero não permite neutralizar todos os prótons gerados, situação em que o valor deveria estabilizar. Não foi possível detetar uma terceira fase, possivelmente correspondente a variações conformacionais do polímero que tivessem origem na neutralização de carga, pois uma terceira exponencial não acrescenta qualidade à desconvolução. Isto deve-se ao facto de possíveis conformações ocorrerem a uma velocidade reduzida relativa aos detetores piezoelétricos usados.

Tabela 7. Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de solução de o-NBA e de soluções de PMAA 500000 Da em o-NBA a pH 8 a diferentes

concentrações.								
	φ_1	φ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	$\Delta V_1(\text{cm}^3)$	$\Delta V_1/\text{H}^+$ (cm^3/mol)	$\Delta V_2(\text{cm}^3)$	$\Delta V_2/\text{H}^+$ (cm^3/mol)
o-NBA	-		5,48					
	0,59		4 ±		-1,551	-3,879	-	-
	3 ±	-	0,02	-				
	0,02		6					
	0							
750 nM		1,41		69,0				
		5 ±		4 ±			3,704	9,261
	-	0,02	-	0,01	-	-		
		3		7				
1000 nM		1,58		41,5				
		5 ±		6 ±			4,150	10,374
	-	0,01	-	0,04	-	-		
		4		5				
1500n M		1,89		25,1				
		4 ±		3 ±			4,957	12,393
	-	0,01	-	0,02	-	-		
		3		5				
2000 nM		2,75		13,4				
		8 ±		9 ±			7,220	18,050
	-	0,01	-	0,01	-	-		
		2		3				

Em relação à massa molecular de 500000 Da, a utilização de duas exponenciais não aumentou a qualidade do ajuste em relação à utilização de apenas uma exponencial. Sendo assim apenas uma exponencial foi suficiente para ajustar corretamente os sinais fotoacústicos. Os resultados da desconvolução são apresentados na Tabela 7. À medida que a concentração do polímero aumenta, a expansão detetada aumenta de magnitude e o tempo correspondente ao processo diminui. Isto corresponde ao processo de neutralização cuja cinética depende da concentração de polímero (ou de grupos OH⁻) existente em solução. Os resultados obtidos nestas experiências encontram paralelo nas experiências realizadas com o-NBA com um pH inicial elevado (ph=11). Também nesse caso a quantidade de grupos OH⁻ em solução era elevada e não foi possível separar o processo de fotoinjecção do subsequente processo de neutralização, sendo as ondas fotoacústicas ajustáveis com apenas uma exponencial. Uma vez mais com o polímero de alta massa molecular não foi possível detetar nas condições experimentais usadas qualquer componente correspondente a movimentações conformacionais.

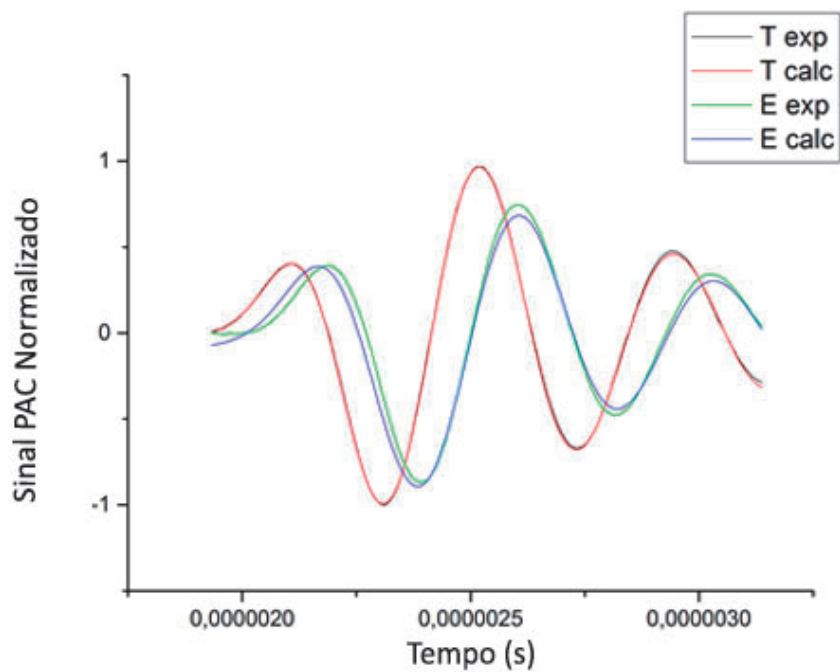


Figura 15. Exemplo de uma desconvolução do PMAA 75000 Da em o-NBA e da referência fotoacústica bromocresol purple (BP). T_{exp} sinal experimental do BP, T_{calc} sinal do BP após ajuste, E_{exp} sinal do PMAA experimental, E_{calc} sinal do PMAA após ajuste.

Capítulo 3

Conclusões

Um valor de -6.6 ml/mol é associado ao processo de contração associado à solvatação do ião H^+ fotoejectado pelo o-NBA (num tempo menor do que 10 ns). É de salientar que foi possível obter este valor médio sem grandes variações numa elevada gama de pH's entre 5 e 10. Entre 5 e 8 o valor foi obtido isoladamente, sem se detetar qualquer reação subsequente com moléculas de OH^- , sendo que para um pH de 10 este valor de volume foi assumido com sucesso numa desconvolução com duas exponenciais. A pH 10, após o primeiro processo de contração proposto obteve-se um valor τ_2 de cerca de 200 ns , associado a uma expansão de $27,6 \text{ cm}^3/\text{mol}$ para formação de moléculas de água. Este valor pode ser comparado ao obtido por *Bonneti et al.* [24] onde se afirma que a um pH acima de 9,5 a formação de moléculas de água leva a uma expansão de $24,5 + 0,4 \text{ ml/mol}$. O estudo das reações de protonação dos aminoácidos Arginina e Tirosina é condicionada pelo elevado pKa de ambas, já que a protonação de iões de OH^- , presentes na solução a concentrações elevadas, apresenta-se como uma reação competitiva ao processo de protonação dos aminoácidos. Ainda assim foi possível detetar variações do sinal fotoacústico devida à presença dos aminoácidos em solução, o que se associa, a uma pequena expansão aquando da protonação da Tirosina e da Arginina. A magnitude desta deverá ser menor do que a expansão observada para a formação de moléculas de água.

Os resultados obtidos para o polímero estudado (PMAA) são algo complexos. Observou-se que para o PMAA de 500000 Da ocorre uma expansão cuja cinética depende da concentração deste, sendo o processo mais rápido à medida que a concentração aumenta. Neste caso foi apenas possível detetar uma única expansão, provavelmente devido à presença de um elevado número de grupos carboxílicos ionizáveis no polímero. A expansão é associada à neutralização, mas não foi possível isolar este processo da contração provocada pela fotoinjecção do protão do o-NBA. Conclui-se então que o H^+ presente em solução se vai ligar ao longo da cadeia de PMAA ao OH^- rapidamente e apenas nos permite detetar este numa reação similar à formação da água que ocorre com o o-NBA a pH 11. Já no caso do PMAA a 75000 Da , o sinal fotoacústico apresenta uma similaridade com o sinal do o-NBA a pH 8, que corresponde a uma contração rápida, mas aparece desfasado para tempos menores. Neste caso foi possível separar o processo de contração provocada pela

fotoinjecção do protão do o-NBA da reacção de neutralização do PMAA. Para ambas as massas moleculares a quantidade de cargas no polímero (para as concentrações usadas) não permite neutralizar todos os protões gerados, situação em que os valores dos volumes de expansão obtidos deveriam estabilizar. Processos conformacionais subsequentes à protonação não foram destacados, provavelmente devido ao facto de serem demasiado lentos para o detetor piezoelectrico usado.

Capítulo 4

Experimental

4.1 Material e métodos

4.1.1 Material

Para este trabalho foi utilizado o fotoácido *m*-nitrobenzaldeído (*m*-NBA) e a referência fotoacústica Bromocresol Purple (BP, pKa 6,3) adquiridas à empresa Sigma-Aldrich. A tirosina acetilada (Ac-Tyr-NH₂) e a arginina acetilada (Ac-Arg-NH₂) foram adquiridas à empresa Bachem, o ácido polimetacrílico [Poli(acido metacrílico sal de sódio)] tanto com massa molecular de 75000 Da como 500000 Da forma adquiridos à empresa Sigma-Aldrich.

4.1.2 Preparação de soluções

As soluções de fotoácido foram preparadas com o pH ajustado desde 5 até 11. Como solvente utilizou-se Água desionizada que foi purificada num sistema Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation.

As soluções de aminoácidos foram preparadas utilizando como solvente o *m*-NBA a pH ajustado para 11.

As soluções de PMAA foram preparadas da mesma forma que os aminoácidos mas sendo o pH ajustado para 8.

Para o ajuste de pH foi adicionado NaOH concentrado. A absorção a 355nm de todas as soluções foi ajustada para 0,6 como mostra a figura 16.

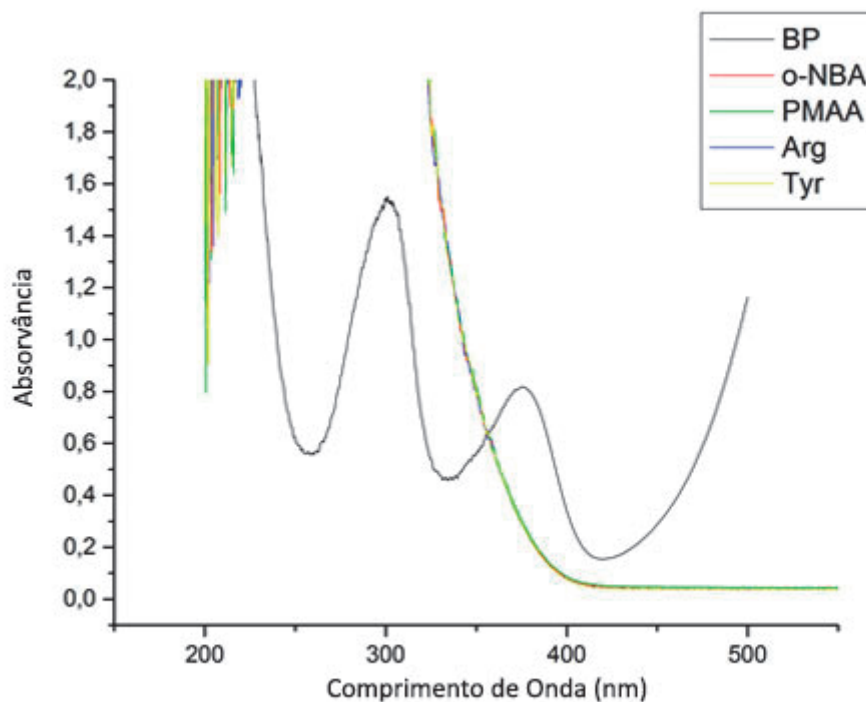


Figura 16. Gráficos de absorção das soluções de bromocresol purple (BP), de fotoácido (o-NBA) e misturas do fotoácido com a Arginina e Tirosina a 1mM e PMAA 500000 obtidos com um espectrofotômetro Shimadzu UV-2100. As soluções utilizadas nas experiências PAC apresentam absorvância 0,6 a 355nm, evidenciado pelo ponto de intersecção dos espectros de absorção com exceção do PMAA.

4.2 Otimização Estrutural da PAC

Na parte instrumental deste trabalho utilizou-se um sistema composto por uma célula fotoacústica de irradiação frontal (desenvolvida no nosso laboratório) com controlo de temperatura efetuado por um banho termostático externo com circulação de etanol, um tubo em serpentina imerso num banho de etanol, um laser pulsado (10 Hz), quatro filtros de densidade neutra (100%, 75%, 50% e 25%) e uma bomba para a introdução da amostra.

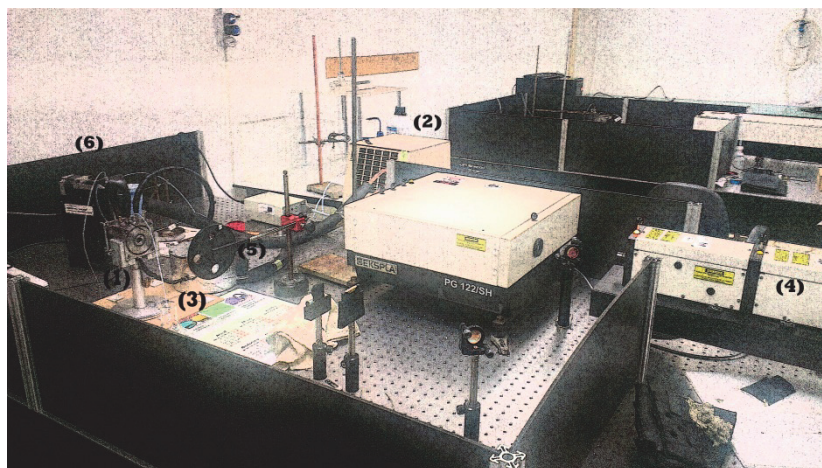


Figura 17. Sistema utilizado no trabalho, (1) Célula fotoacústica, (2) Banho termostático Julabo F-30C, (3) tubo em serpentina em banho de etanol, (4) Laser pulsado EKSPLA NL301G, (5) Filtros, (6) Bomba Kloehn V5.

A célula de irradiação frontal é composta por um espelho dielétrico com reflexão a 355 nm próxima de 100% e uma janela ótica de quartzo, ambas montadas num corpo de alumínio separado por um espaçador de cobre de 0,127 mm. Junto ao espelho dielétrico encontra-se um transdutor de 2,25 MHz da Parametrics pressionada contra o espelho com silicone para contacto ótico.

O percurso ótico utilizado foi de 0,127 mm. As amostras foram excitadas a 355 nm pelo laser com um perfil espacial do feixe de diâmetro circular de 3,5 mm e um máximo de energia de 1 mJ medido com um power meter Newport 1918C. O sinal fotoacústico foi obtido através de uma média de 200 disparos, ampliado por um amplificador de sinal Olympus panametrics-NDT e recolhido por um osciloscópio Tektronix DPO 7254.

Nesta parte do trabalho detetaram-se problemas experimentais associadas à leitura das ondas acústicas. Inicialmente foram encontrados alguns problemas na montagem do sistema, que necessita de ser o mais hermético possível, houve algumas fugas tanto do líquido de refrigeração como no circuito de circulação da amostra, sendo o primeiro solucionado mudando os tubos que ligam o sistema de refrigeração à célula e isolando com teflon. No segundo caso o problema foi maior devido a fugas nas junções da célula e na entrada da amostra no tubo da serpentina e que com a colocação de teflon e silicone nestas zonas críticas foi praticamente solucionado para fluxos pequenos como os utilizados para a análise da amostra.

Todavia, o principal problema relacionou-se com a amplitude de ruído, que satura a medição na escala designada, aquando da obtenção do sinal das ondas fotoacústicas (Figura 18) sendo que é diferente o ruído de alta frequência que temos em todo o sinal do ruído enorme que temos antes do sinal.

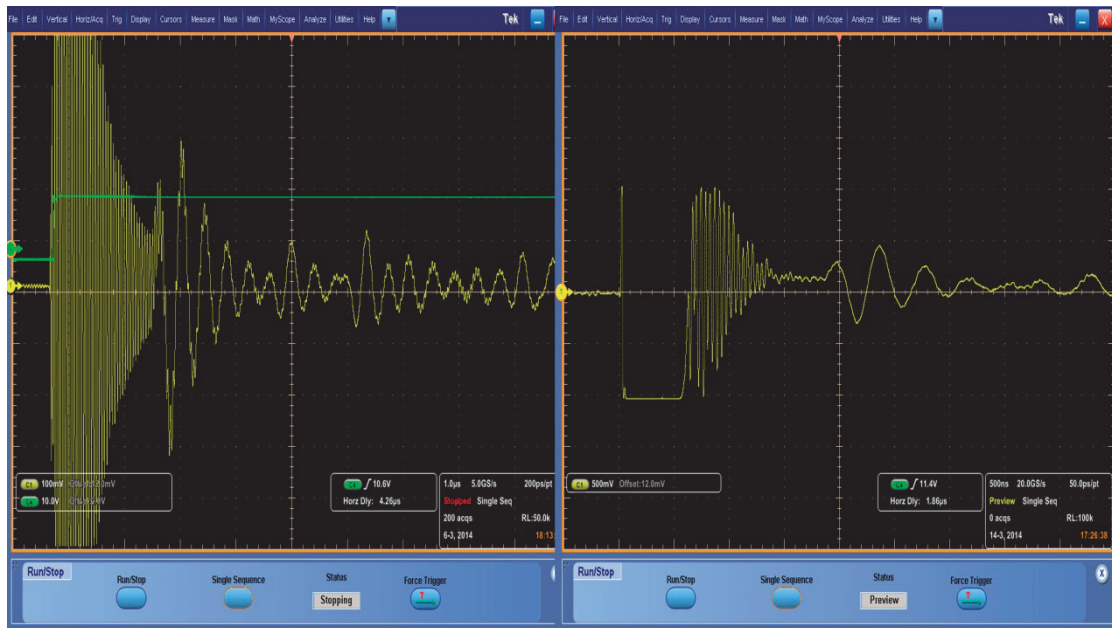


Figura 18. Exemplos do ruído obtido em algumas das experiências.

Inicialmente pensou-se que este ruído seria provocado por algum mau contacto logo passou-se a mudar todos os cabos de ligação e isolar estas ligações mas sem resultados logo o problema não vinha daí. Outra possibilidade seria o amplificador estar defeituoso mas procedendo à sua substituição não houve qualquer alteração em relação ao ruído. Seguidamente pensou-se que o problema poderia ter origem em algum sinal vindo do exterior do sistema então tentou-se isolar os componentes do sistema recorrendo a esferovite, madeira, malha metálica isolante e até foi contruído uma gaiola de Faraday para isolar o amplificador de sinal contudo sem qualquer sucesso.

Outra possibilidade era que este ruído teria origem no laser mas ao impedir o laser de incidir na amostra verificou-se que continuava a existir o ruído apesar da ausência de sinal da amostra (Figura 19).

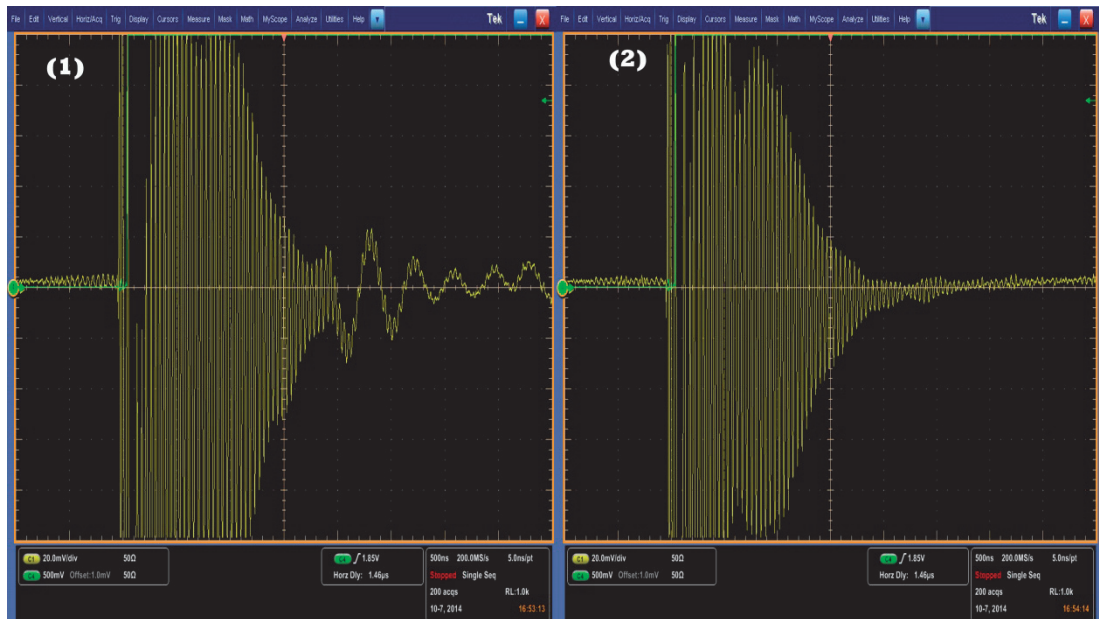


Figura 19. Comparação do sinal com e sem incidir o laser na amostra, (1) Sinal da amostra com o laser a incidir, (2) sinal da amostra sem o laser a incidir.

Outra alternativa sugerida foi o ruído ter uma proveniência elétrica ou seja ter origem na alimentação de alguns dos aparelhos que compõem o sistema por isso experimentou-se ligar os aparelhos a uma fase de corrente diferente mas sem resultado aparente então utilizou-se uma unidade de fonte de alimentação ininterrupta (UPS) para ver se conseguiu filtrar o sinal mas novamente sem resultados.

Após cálculos matemáticos, através da utilização de uma transformada de Fourier percebe-se que se utilizarmos um filtro de frequência que filtre sinal na ordem dos 10 MHz há a possibilidade do sinal melhorar, não podemos utilizar um filtro menor que 5 MHz correndo o risco de remover parte do nosso sinal (Figura 18) já que o transdutor utilizado é de 2,25 MHz.

Então foi utilizado um filtro lowpass L05M15M3 da marca AMTI Microwave Circuits capaz de filtrar frequências elevadas acima de 5 MHz.

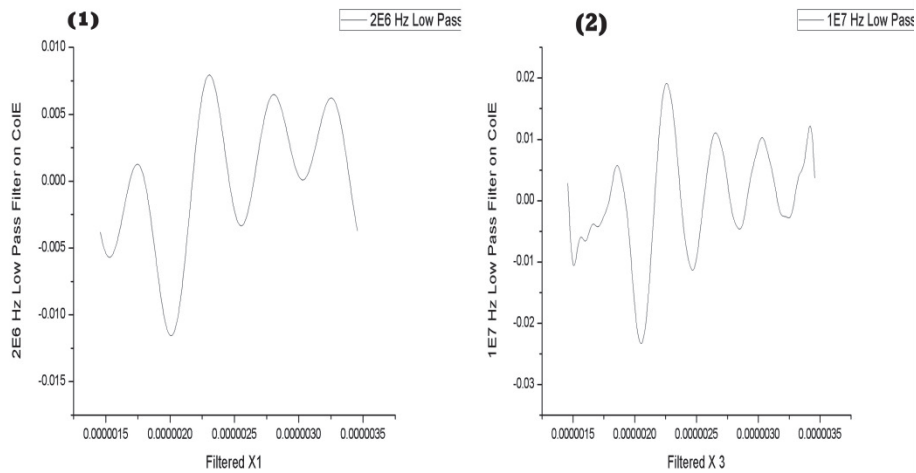


Figura 20. Análise do nosso sinal após uma análise de uma transformada de Fourier. (1) Filtro sinal superior a 2 MHz (2) Filtro de sinal superior a 10 MHz obtida pelo fornecedor do filtro.

Após a utilização do filtro de frequência tivemos uma melhoria significativa no sinal obtido tal como podemos comprovar pela figura 21.

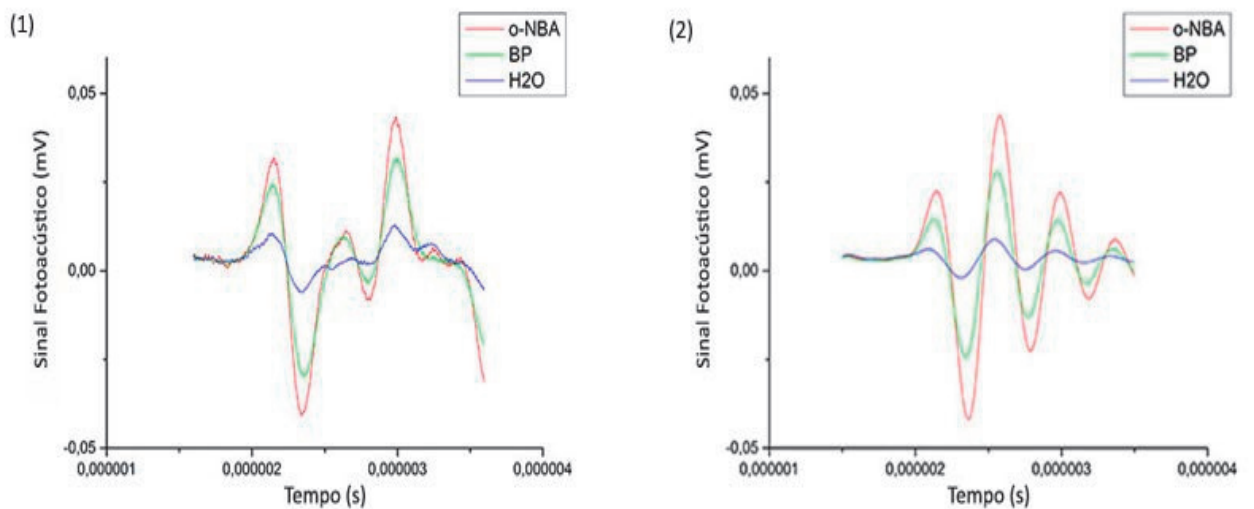


Figura 21. Comparação gráfica do sinal do fotoácido em água utilizando o filtro de frequência (2) e na ausência deste (1).

Bibliografia

- [23] Abbruzetti, S.; Viappiani, C.; Small, J. R.; Libertini, L.J.; Smaill, E.W.; Biophys. J., 79 (2000) 2714–2721.
- [14] Arnaut, L. G.; Caldwell, R. A.; Elbert, J. E.; Melton, L. A.; Rev. Sci. Instrum., 63 (1992) 5381.
- [5] Arnaut, L., Formosinho, S., Burrows, H.,(2007) - Chemical Kinetics. From Molecular Structure to Chemical Reactivity, in Experimental Methods, Amsterdam: Elsevier
- [29] Barth, A., Zscherp, C., FEBS Letters, 477(2000), 151–156.
- [7] Bell, A. G.; Conferência na American Association for the Advancement of Science (1880).
- [24] Bonetti, G.; Vecli, A.; Viappiani, C.; Chem. Phys. Lett., 269 (1997) 268–273.
- [18] Callis, J. B.; Parson, W. W.; Gouterman, M.; Biochim. Biophys. Acta, 267 (1972) 348.
- [2] Gensch T.; Viappiani C., Photochem. (2003) Photobiol. Sci. 2, 699-721.
- [17] Herman, M. S.; Goodman, J. L., J. Am. Chem. Soc., 111 (1989) 1849.
- [13] Hou, S. Y.; Hetherington III, W. M.; Korenowski, G. M.; Eisenthal, K. B.; Chem. Phys. Lett., 68 (1979) 282
- [19] Hung, R. R.; Grabowsky, J. J.; J. Am. Chem. Soc., 114 (1992) 351.
- [4] Laguecir, A., Ulrich, S., Labille, J., Fatin-Rouge, N., Stoll, S., Buffle, J., European Polymer Journal (2006), 42, 1135-1144
- [27] Lanyi, J. K., Journal of Structural Biology, 124(1998), 164–178.

- [33] Marti, D. N., *Biophysical Chemistry*, 118 (2005), 88–92.
- [28] Mezzetti, A., Nabedryk, E., Breton, J., Okamura, M. Y., Paddock, M. L., Giacometti, G., Leibl, W., *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1553 (2002), 320–330.
- [1] Nelson, David L., Cox, Michael M. (2005) - *PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*, in amino acid, peptides and proteins. 4th Edition, NY: W. H. Freeman and company.
- [12] Ni, T.; Melton, L. A.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 67 (1992) 162.
- [25] Oliveira, C., Jesus, C. S. H., Serpa, C., (2013) - Alterações estruturais da cisteína induzidas por salto de pH, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Portugal
- [30] Pace, C. N., Grimsley, G. R., Scholtz, J. M., *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009), 13285–13289.
- [8] Patel, C. K. N.; Tam, A. C.; *Rev. Mod. Phys.*, 53 (1981) 517.
- [31] Perutz, M. F., Gronenborn, A. M., Clore, G. M., Fogg, J. H., Shih, D. T., *Journal of Molecular Biology*, 183(1985), 491–498.
- [16] Peters, K. S., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33 (1994) 294.
- [15] Ricks, S. W.; Berne, B. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 3949.
- [6] Rotheberg, L. J.; Simon, J. D.; Bernstein, M.; Peters, K.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1982) 3464.
- [10] Rudzki, J. E.; Goodman, J. L.; Peters, K. S.; *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 7849.
- [3] Ruiz-Pérez, L.; Pryke, A.; Sommer, M.; Battaglia G.; Soutar, I.; Swanson, L.; Geoghegan, M., *Macromolecules* (2008), 41, 2203-2211

- [26] Sakurai, M., Imai, T., Yamashita, F., Nakamura, K., Komatsu, T., Nakagawa, T., *Polymer Journal* (1993), vol. 25, no. 12, 1247-1255
- [20] Schmidt, R.; Shutz, M.; *Chem. Phys. Lett.*, 263 (1996) 795.
- [21] Seixas de Melo, J., Moreno, M., Burrows, H., Gil, M., (2004) - *Química de polímeros: contribuições portuguesas*, Coimbra University Press
- [34] Soares, C. A. L., *Reacções fotoinduzidas de transferência de electrão em fluídos supercríticos*. Coimbra, ed. autor, 2004, 1vol., 204
- [9] Tam, A. C.; *Rev. Mod. Phys.*, 58 (1986) 381.
- [32] Tanokura, M., Tasumi, M. & Miyazawa, T., *Biopolymers*, 15 (1976), 393-401.
- [11] Van Haver, P. H.; Viane, L.; Van der Auweraer, M.; De Schryver, F.; J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 63 (1992) 265.
- [22] Viappiani, C.; Abbruzzetti, S.; Small, J. R.; Libertini, L. J.; Small, E. W., *Biophys. Chem.*, 73 (1998), 13- 22.