UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

# "ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA DOS EFEITOS DA HIDRATAÇÃO EM HEMOPROTEÍNAS"

Marinônio Lopes Cornélio

[redacted]

Dissertação apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Física Aplicada.

Orientador: Profa. Dra. Rosemary Sanches

Departamento de Física e Ciência dos Materiais

São Carlos - 1989

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

Marinônio Lopes Cornélio APRESENTADA

AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 21 DE abril DE 1989.

COMISSÃO JULGADORA:

R Sanches

Dr. Rosemary Sanches Orientador

Dr. José Nelson Onuchic

Dr. Helion Vargas

## AGRADECIMENTOS

- A Profa. Rosemary Sanches, pela sua orientação, por sua amizade e dedicação.

- Ao Prof. Helion Vargas, pela oportunidade e acessibilidade ao seu laboratório, pelo seu estímulo e pela amizade.

- Ao Prof. Otaciro R. Nascimento, pelo estímulo e amizade.

- Ao Prof. José N. Onuchic, pelo estímulo e amizade.

- Ao Dr. Mauro H. de Paula pelas discussões, seu estímulo e amizade.

- Ao Prof. Sartori (Dep. Engenharia) pelas discussões e amizade.

- Ao Prof. Rene Ayres, pelas discussões, seu estímulo e amizade.

- Aos colegas do laboratório de Biofísica, S. Crestana, C. Fonzar, E. Koury, L. Martin, L. Fernando, P. Cesar, W. Luiz, V. Barbanti, pelo companheirismo e amizade.

- Ao colega Paulo Estevão (Juca), pela colaboração, estimulo e amizade.

- Aos colegas do DFCM, Elder, Marcos, Titão, Dulcinei, Stella, Bras, Nagib, Artemis, etc., pelo seu apoio e amizade.

- Aos colegas do Laboratório de Eletrônica Quântica (UNICAMP), Vinhas e Noberto pelo seu apoio e amizade.

- Aos técnicos da Oficina de Mecânica.

- Aos técnicos da Oficina de Ótica.

- Aos técnicos da Oficina de Eletrônica, Ferro, Valdir e João, pela amizade e estímulo.

- Aos técnicos da Biofísica, Sanches, Izabel e Roberto, pela acessoria técnica e pela sua amizade.

- Aos técnicos do Laboratório de Eletrônica Quântica, Dina pelo seu apoio e amizade.

- À Sueli, pela sua colaboração, dedicação e amizade.

- Ao Samuel pela confecções dos desenhos.

- Ao DFCM pelo acolhimento que tenho recebido.

- Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

- Também agradeço aos meus pais Manoel Cornélio da Silva e Waldete Lopes Cornélio, pelo amor e dedicação.

- Desejo agradecer à minha esposa Lírida da Silva Cornélio, pelo encorajamento, por sua resignação e pelo amor e alegria que tem me proporcionado.

## ÍNDICE DE ASSUNTOS


Lista de Tabelas i

Lista de Figuras ii

Resumo iii

Abstract iv

**Capítulo I** Introdução 1

**Capítulo II** Teoria do Efeito Fotoacústico 9

II.1 - Histórico 10

II.2 - Teoria de Rosencwaig-Gersho 12

II.2.1 - Introdução 12

II.2.2 - Equações de Difusão Térmica 13

II.2.3 - Distribuição de Temperatura na Célula 17

II.2.4 - Produção do Sinal Acústico 21

II.2.5 - Casos Especiais 26

II.2.5.1 - Amostras Óticamente Transparentes 28

II.2.5.2 - Amostras Óticamente Opacas 30

**Capítulo III** Procedimento Experimental 33

III.1 - Materiais e Métodos 34

III.1.1 - Preparação das Amostras 34

III.1.1.a - Hemoglobina-CO 34

III.1.1.b - Mioglobina-CO 35

III.2 - Método e Procedimento Experimental 35

III.2.1 - Espectrômetro Fotoacústico 36

III.2.1.1 - Fonte de Luz 37

III.2.1.2 - Componentes Óticos 39

III.2.1.3 - Monocromador 39

III.2.1.4 - "Chopper" 42

III.2.1.5 - Célula Fotoacústica 43

III.2.1.6 - Detetor de Potência (Piroelétrico) 45

III.2.1.7 - "Lock-In" 46

III.2.1.8 - Circuito Divisor para Obtenção da Absorção da Amostra 46

III.2.1.9 - Motor do Monocromador e Registrador X-Y 51

**Capítulo IV** Resultados 52

IV.1 - Resultados para Hemoglobina (300-700nm) 53

IV.2 - Resultados para Mioglobina (300-700 nm) 57

IV.3 - Resultados para Hemoglobina(1,6 - 2,4 μm) 57

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

IV.4 - Resultados para Mioglobina (1,6-2,4 μm) 64

IV.5 - Testes com o Espectrômetro Fotoacústico 66

IV.6 - Resultados para Hemoglobina 69

**Capítulo V** Discussão 74

**Capítulo VI** Conclusões 81

**Bibliografia** 86

## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 - Complexo ferro-porfírina para a mioglobina com a sexta coordenada desocupada 3

Figura I.2 - Estrutura quaternária da hemoglobina, cada subunidade contém um grupo heme 4

Figura I.3 - Estrutura terciária da mioglobina com o grupo heme, onde liga-se o oxigênio 5

Figura II.1 - Corte seccional da célula fotoacústica cilíndrica 13

Figura II.2 - Variação da temperatura dependente do tempo na interface gás-amostra 22

Figura II.3 - Representação esquemática dos casos especiais para a teoria fotoacústica dos sólidos 27

Figura III.1 - Diagrama de bloco do espectrômetro fotoacústico 38

Figura III.2 - Esquema ótico do monocromador 40

Figura III.3 - Corte seccional da célula fotoacústica 44

Figura III.4 - Esquema de funcionamento do ICL 8013 47

Figura III.5 - Diagrama de bloco do circuito divisor para obtenção do espectro da amostra 49

Figura IV.1 - Espectro fotoacústico de hemoglobina em pó a 11% UR obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 4 55

Figura IV.2 - Espectros fotoacústicos de hemoglobina a 11%, 58,5% e 93% UR obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 4 56

Figura IV.3 - Espectros fotoacústicos de mioglobina a 11% e 93% UR obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 4 58

Figura IV.4 - Espectros fotoacústicos no infravermelho para hemoglobina a 11% UR, mostrando as bandas de $H_2O$ e NH, obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 2 59

Figura IV.5 - Espectros fotoacústicos no infravermelho para hemoglobina mantida em várias umidades relativas nas mesmas condições anteriores 61

Figura IV.6 - Gráfico da curva de isoterma de absorção 62

Figura IV.7 - Gráfico da relação entre a razão das intensidades ($I_1/I_2$) e o conteúdo de água nas amostras 63

Figura IV.8 - Espectros fotoacústicos no infravermelho para mioglobina de cavalo a 11% e 93% UR obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 2 65

Figura IV.9 - Espectro fotoacústico para a lâmpada de Xenônio obtido no equipamento montado com 15,9 Hz e largura de banda de 6,4 nm demonstra a relação sinal ruído 67

Figura IV.10 - Espectro fotoacústico de hemoglobina-CO em solução obtido a 15,9 Hz e largura de banda 6,4 nm demonstra a reprodutibilidade do equipamento montado 68

Figura IV.11 - Espectro fotoacústioo de hemoglobina-CO em pó a 11% UR obtido no espectrômetro montado a 78,1 Hz e largura de banda de 3,2 nm 70

Figura IV.12 - Espectros fotoacústicos de hemoglobina-CO em pó em vários ambientes de umidade relativa obtido no equipamento montado, a 78,1 Hz e largura de banda de 3,2nm 71

Figura IV.13 - Gráfico da variação da banda de *Soret* com a umidade relativa 73

Figura V.1 - Representação esquemática do bolso heme, mostrando a relação do ligante, e a geometria da ligação no grupo heme 80

Figura IV.13 - Gráfico da variação da banda de *Soret* com a umidade relativa 73

Figura V.1 - Representação esquemática do bolso heme, mostrando a relação do ligante, e a geometria da ligação no grupo heme 80

OTECA E

# RESUMO

No presente trabalho, realizado com hemoproteínas na forma de pó, o efeito da hidratação foi observado através de espectroscopia fotoacústica. Amostras de carboxi-hemoglobina e carboxi-mioglobina mantidas em diferentes ambientes de umidade relativa (UR), mostraram variações em seus espectros na região da banda de *Soret*. Para amostras mantidas em baixa hidratação (abaixo de aproximadamente 35% UR) o espectro era característico do derivado carboxi, em alta hidratação (acima de aproximadamente 90% UR) o espectro era característico do derivado oxi e na região intermediária o espectro era de uma mistura dos dois derivados. Essa mudança de ligante observada em alta hidratação pode ser explicada supondo que a proteína tem flexibilidade e atinge um estado conformacional que possibilita a entrada e saída do ligante. Em baixa hidratação a estrutura da proteína é rígida e tal que o acesso ao grupo heme está fechado, impossibilitando a troca do ligante. Essa explicação é coerente com vários resultados experimentais que indicam a existência de duas estruturas para essas hemoproteínas em solução.

## ABSTRACT

At the present work accomplished with powder of hemoproteins, the hydration effect was observed through photoacoustic espectroscopy. Samples of carboxyhemoglobin and carboxymyoglobin kept at different relative humidity (RH) environments, showed variations in their spectra in the *Soret* band region. For the samples which were kept at low hydration (bellow about 33% RH) the spectrum was characteristic of carboxy derivative, whereas at high hydration (above about 93% RH) the spectrum was characteristic of oxy derivative, and in the intermediate region the spectrum was a mixture of both derivatives. This ligand change observed at high hydration, may be explained assuming that the protein has flexibility, and reach a conformational state which enables the ligand to go in and out. At low hydrations the protein structure is rigid and such that the access to the heme group is closed becoming impossible the ligand change. This explanation agrees with several experimental results that point to the existence of two structures to these hemoproteins in solution.



SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

# C A P Í T U L O I

## INTRODUÇÃO

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

Esta dissertação, tem como objetivo o estudo do efeito da hidratação em hemoproteínas na forma de pó. Para tanto, foi utilizada a técnica de espectroscopia fotoacústica [1-3] em um espectrômetro comercial e em um espectrômetro montado em nosso laboratório. Nossa escolha recaiu sobre esta técnica por desejarmos obter espectros de absorção de amostras opacas , o que inviabiliza a espectroscopia de absorção convencional.

Utilizamos dois tipos de hemoproteínas, a hemoglobina humana e mioglobina de cavalo. Tanto a hemoglobina como a mioglobina têm como parte de sua função a interação com o oxigênio. A hemoglobina é a responsável pelo transporte do oxigênio no sangue e a mioglobina pelo armazenamento do mesmo nos músculos [4]. A interação com o oxigênio acontece na sexta posição de coordenação de um íon de ferro que está ligado a um anel porfirínico e a um amino ácido da proteína. A figura I.1 mostra esta região para a mioglobina [5]. No caso da hemoglobina, formada por quatro subunidades similares à mioglobina, existem quatro desses grupos.

O anel porfirínico e o íon de ferro formam o grupo heme que é o responsável pela absorção de luz visível (grupo cromóforo). A localização desse grupo tanto para a hemoglobina e para a mioglobina pode ser melhor visualizado na figura I.2 e na figura I.3, respectivamente.

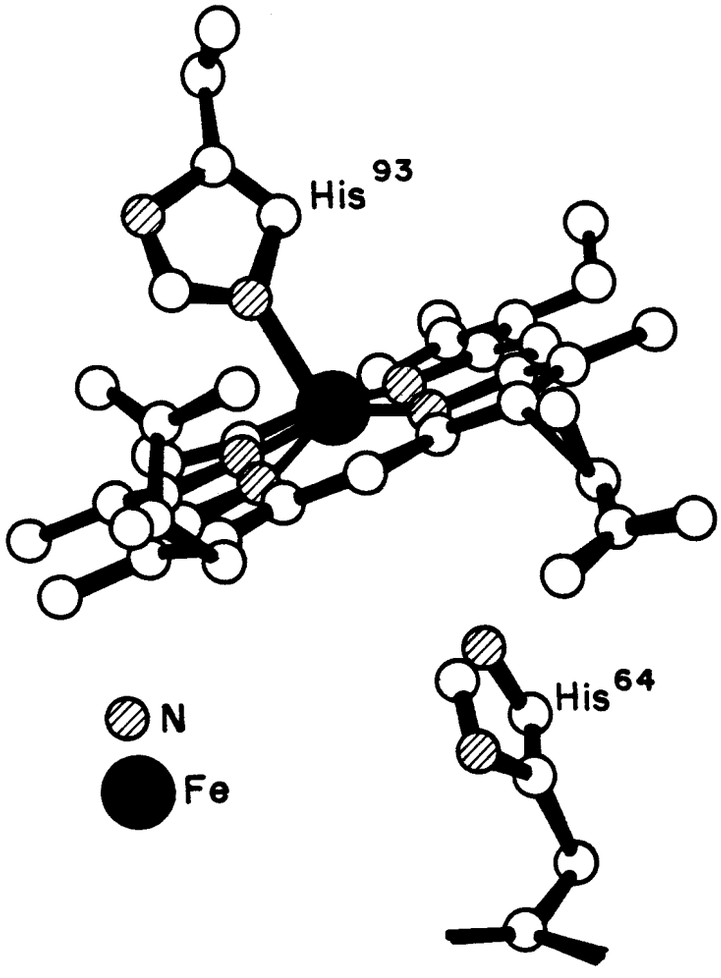



**FIGURA I.1**: Complexo ferro-porfirina para a mioglobina com a sexta coordenada desocupada [5].

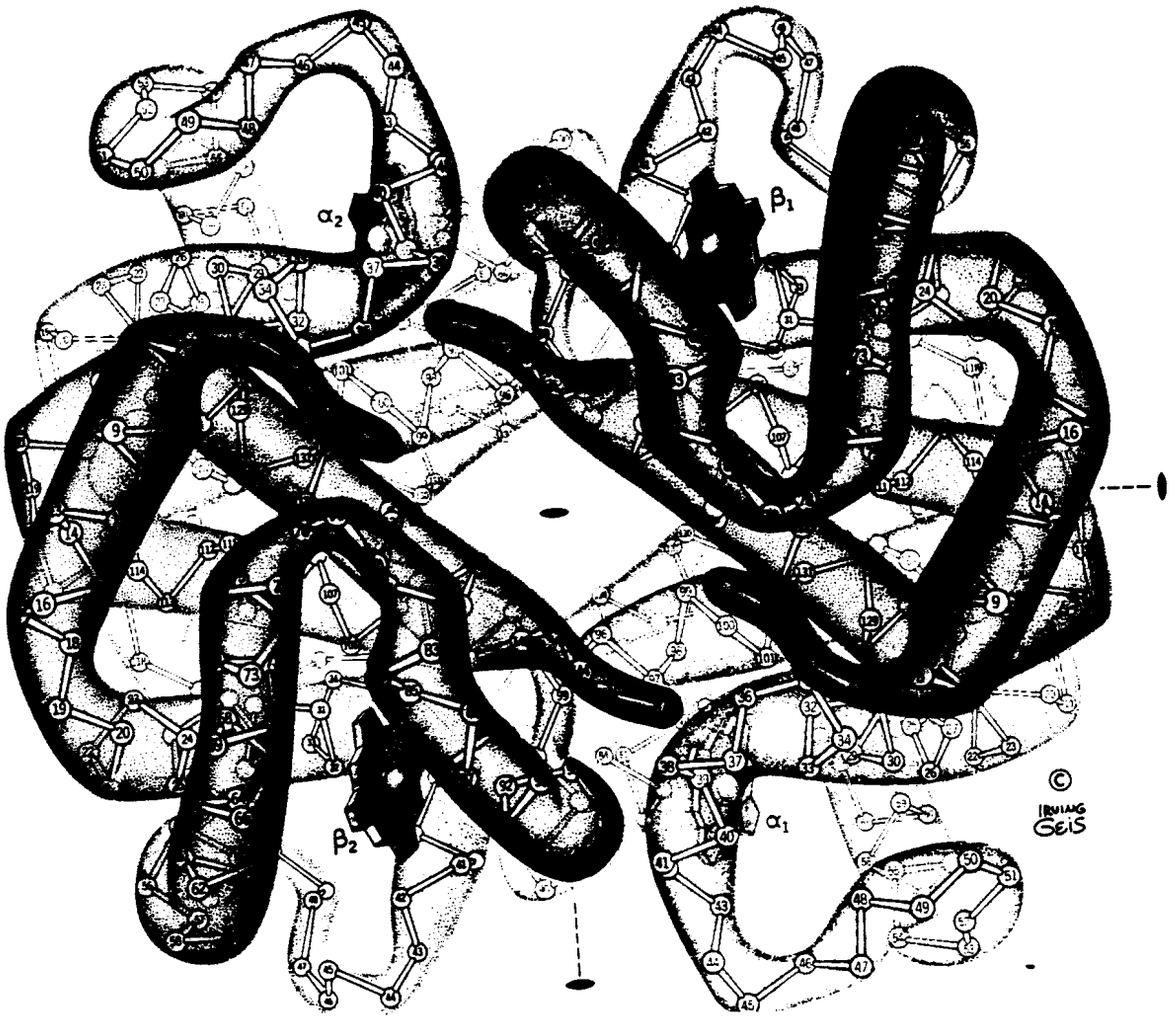



FIGURA I.2: Estrutura quaternária da hemoglobina, cada subunidade contém um grupo heme [6].

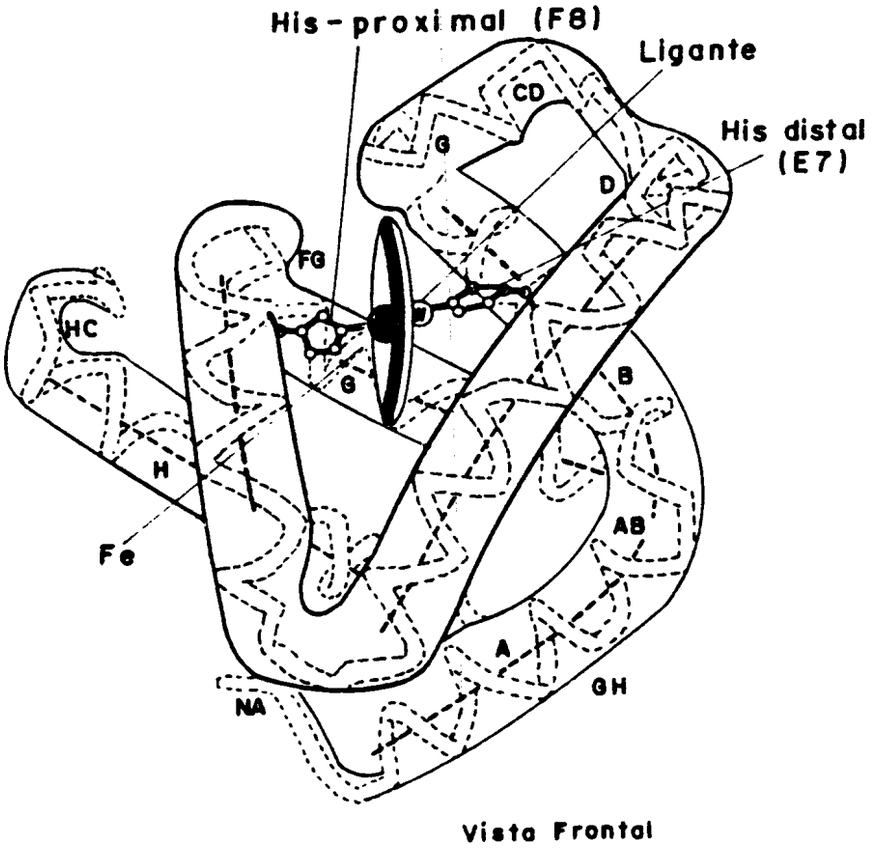



FIGURA I.3: Estrutura terciária da mioglobina com o grupo heme, onde liga-se o oxigênio [7].

Dependendo do tipo de ligante associado à sexta posição de coordenação do íon de ferro, observa-se uma localização das bandas de absorção, como é mostrado na tabela I.1 [4] para alguns derivados de hemoproteínas.

| Tipo | Posição (nm) | | |
|---|---|---|---|
| | *Soret* | banda-β | banda-α |
| Mioglobina Cavalo-$O_2$ | 418 | 542 | 580 |
| Mioglobina Cavalo-CO | 424 | 540 | 580 |
| Hemoglobina Humana-$O_2$ | 415 | 541 | 577 |
| Hemoglobina Humana-CO | 419 | 540 | 569 |

**TABELA I.1**: Posição das bandas de absorção de alguns derivados de hemoproteínas [4].

As proteínas contém grupos hidrofílicos capazes de ligar água através da formação de ligação de hidrogênio. Estes são grupos carregados ou polares que ocorrem predominantemente na parte externa da proteína [9]. O meio aquoso além de estabilizar a estrutura de biomoléculas, também é importante para a sua função [9], por isso é necessário entendermos como a hidratação afeta a atividade da proteína. Apesar da desidratação fazer com que a proteína perca a sua funcionalidade, ao ser rehidratada ela recupera sua função [10]. Portanto a proteína não sofreu nenhum dano estrutural irreversível, pois a proteína consegue desenvolver sua função, quando rehidratada.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

A perda de funcionalidade da proteína em baixa umidade tem sido relacionada com a perda de flexibilidade conformacional [9,11]. Esta flexibilidade conformacional é compreendida a partir do fato de que a proteína não possue uma estrutura rígida, mas que pode ter várias conformações, ou seja, ela tem uma dinâmica estrutural. A relação entre hidratação e flexibilidade estrutural foi confirmada mais recentemente por várias técnicas e para várias proteínas [12-16]

A idéia para esta dissertação teve como motivação trabalhos realizados anteriormente no grupo de biofísica [12,13,15]. Nesses estudos foi possível perceber o efeito da hidratação. Medidas de espectroscopia ótica de soluções aquosas de hemoglobina-CO em pó, mantidas em diferentes ambientes de umidade relativa, mostraram a banda de absorção em diferentes posições. A baixa hidratação a posição das bandas eram características do derivado carbonil, enquanto que a alta hidratação elas são características do derivado oxi. Parecia, então, que com a proteína em alta hidratação, o oxigênio conseguia deslocar o monóxido de carbono. Como foi necessário dissolver o pó para se obter os espectros, não era claro se a troca ocorria quando a amostra estava na forma de pó ou em solução. Nossa proposta era então, estudar diretamente o pó hidratado obtendo seu espectro de absorção por espectroscopia fotoacústica. Desta maneira o ligante da proteína nas diversas hidratações poderia ser determinado.

Este trabalho está composto por seis capítulos como descrevemos a seguir.

No capítulo I é feita uma introdução com uma ideia geral do efeito da hidratação em proteínas e o problema a ser abrangido.

No capítulo II temos o desenvolvimento da teoria feita por Rosencwaig-Gersho, que é importante por ter dado as explicações básicas para o efeito fotoacústico e sua diversidade de aplicações.

No capítulo III temos a descrição do espectrômetro fotoacústico montado em nosso laboratório.

No capítulo IV mostramos os resultados obtidos para as proteínas estudadas e os testes feitos com o equipamento montado.

No capítulo V temos a discussão dos resultados obtidos.

No capítulo VI temos as conclusões a respeito do presente trabalho. Explicamos as vantagens e dificuldades do nosso equipamento, bem como propomos soluções para alguns dos problemas encontrados. Propomos também trabalhos que podem ser desenvolvidos utilizando-se essa técnica.

# CAPÍTULO II

## TEORIA DO EFEITO FOTOACÚSTICO

# CAPÍTULO II

# TEORIA DO EFEITO FOTOACÚSTICO

## II.1 HISTÓRICO

O efeito fotoacústico descoberto no sec. XIX, foi primeiramente verificado em 1880, quando Alexander Graham Bell ao perceber que uma amostra mantida em um porta amostra fechado ao ser iluminado com uma luz modulada podia produzir um sinal acústico [17].

O efeito permaneceu quase que sem uso durante aproximadamente 50 anos até o advento do microfone. Então em 1938 Viengerov [17], trabalhando no State Optical Institute, Leningrado, usou tal fenômeno no infravermelho para o cálculo da concentração de gases em uma mistura. Por este método fotoacústico conseguiu detetar concentrações de $CO_2$ em $N_2$ abaixo de 0.2% do volume .

Um ano mais tarde, Pfund [17] descreveu um sistema de analizador de gases em uso no Johns Hopkins Hospital, Baltimore, para medidas de concentrações de CO em $CO_2$. O experimento de Pfund tem interesse adicional devido ao fato de como a deteção foi realizada. Ao invés de fazê-la observando a variação na pressão-volume do gás, ele a fez usando um termopar protegido da radiação da luz que incide diretamente no gás.

Nos anos 40 os cientistas reconheceram [17] que o sinal fotoacústico é essencialmente uma medida

calorimétrica da quantidade de energia radiante absorvida pela amostra gasosa que é dissipada por meio de um processo não radiante ou de produção de calor.

No entanto como mencionado antes, o mais intrigante é que o renascimento da fotoacústica foi aparentemente limitada aos estudos em amostras gasosas sendo esquecidos estudos para outros materiais como líquidos e sólidos.

A partir dos anos 70 a técnica de espectroscopia fotoacústica passou a ser largamente usada para estudo em moléculas biológicas, organelas, células e tecidos [18-19]. O método tem sido usado para se obter novas informações que não eram facilmente acessíveis pelos métodos convencionais; por exemplo, esboço de profundidade de camadas de cromóforos, foto-dano molecular, transferência de energia intermolecular *in vivo* e *in vitro*, interações moleculares *in situ*, caracterização dos componentes intracelular, processo de armazenamento de energia [20], espectro fotoativo , dissipação fototérmica *in vivo*, cálculo da evolução do oxigênio na fotossíntese [21].

Como podemos notar a técnica escolhida é vasta na sua utilização, bem como confiável na obtenção de resultados. Este grande avanço nas aplicações desta técnica foi devido principalmente ao trabalho de Rosencwaig e Gersho [2,22-24] que

não só desenvolveram uma teoria básica sobre fotoacústica, como mostraram sua utilização em inúmeros estudos. Uma idéia desta teoria está apresentada a seguir.

## II.2. TEORIA DE ROSENCWAIG-GERSHO

### II.2.1. Introdução

Um dos objetivos dos modelos teóricos para o efeito fotoacústico é permitir a interpretação do sinal fotoacústico em termos da absorção ótica pela amostra.

O sinal acústico tem sido entendido como devido ao aquecimento periodico da amostra mantida na célula; aquecimento que é resultado da absorção da luz pela amostra. A difusão térmica na amostra causa uma variação de temperatura em uma fina camada do gás na interface gás-amostra. O resultado é um comportamento similar ao de um pistão, modelo que foi utilizado para calcular a variação na pressão do gás no interior da célula. Na espectroscopia ótica usual a deteção é feita por uma foto-célula. No método utilizado aqui, em consequência do fluxo de calor da amostra para o gás, temos a formação de ondas de pressão dentro da célula, de maneira que a deteção é feita por um microfone. O "espectro ótico" pode ser obtido, então, registrando-se a resposta do microfone em função do comprimento de onda incidente.

Vamos explicar a seguir como este processo, desde o aquecimento da amostra até a produção do sinal acústico pode ser entendido teoricamente.

### II.2.2. Equações de Difusão Térmica

Iniciamos a descrever as equações de difusão térmica analizando a produção do sinal fotoacústico em uma dimensão para uma célula cilíndrica como mostrada na figura II.1.

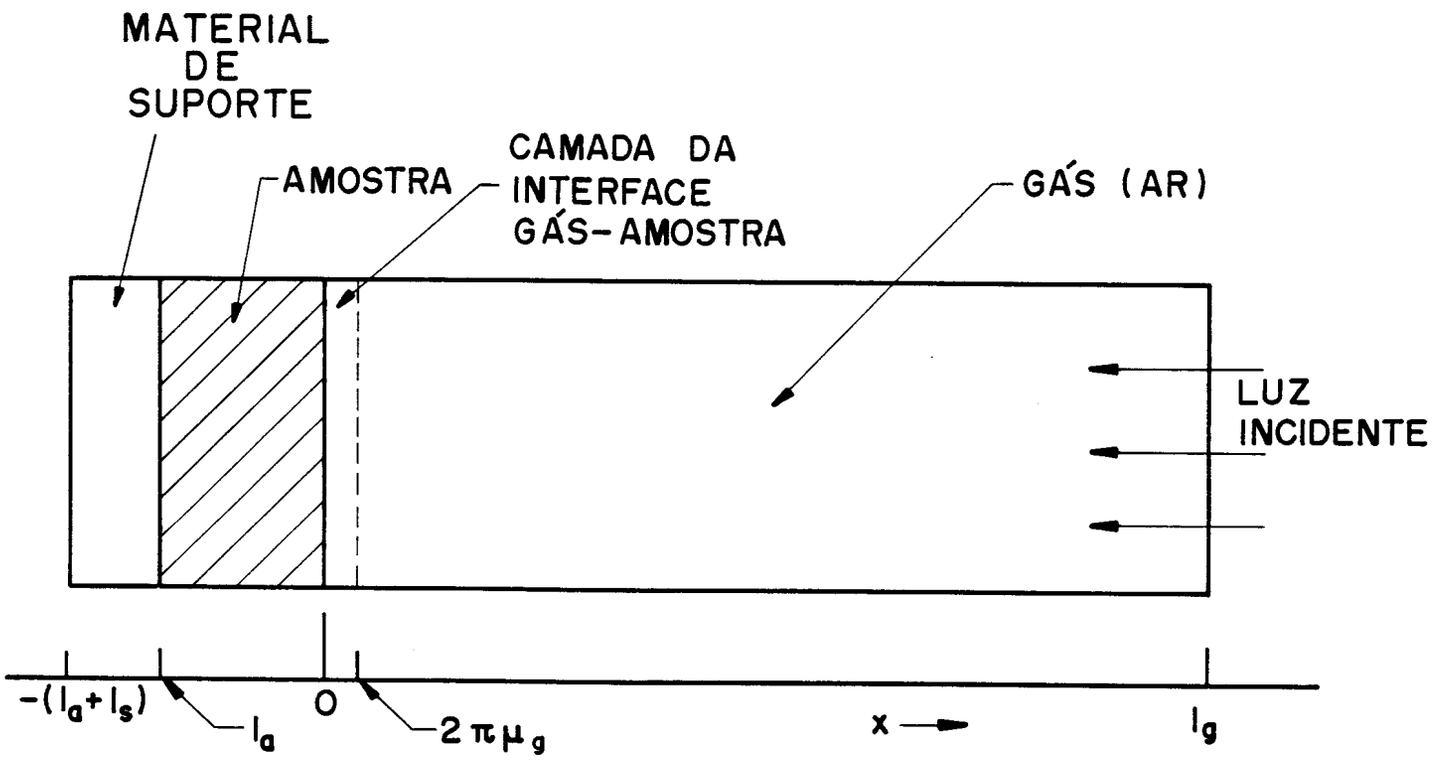



FIGURA II.1:Corte seccional da célula fotoacústica cilíndrica.

Definimos os seguintes parâmetros:

$\kappa$: condutividade térmica ($\frac{cal}{cm \cdot seg \cdot °C}$)

$\rho$: densidade ($\frac{g}{cm^3}$)

C: calor específico ($\frac{cal}{g \cdot °C}$)

$\alpha = \kappa/\rho C$: difusibilidade térmica ($\frac{cm^2}{seg}$)

$a = (\omega/2\alpha)^{1/2}$: coeficiente de difusão térmica ($cm^{-1}$)

$\mu = a^{-1}$: comprimento de difusão térmica (cm)

$l_a$ : comprimento da amostra (cm)

onde $\omega$ denota a modulação do feixe de luz incidente em radianos por segundo.

Definimos ainda :

$l_g$: comprimento do gás (cm)

$l_s$: comprimento do material de suporte (cm)

$\mu_g$: comprimento de difusão térmica no gás (cm)

Nós supomos que incide sobre a amostra luz

monocromática modulada com comprimento de onda $\lambda$ e intensidade

$$I = \frac{1}{2} I_o(1 + \cos \omega t) \qquad (II.1)$$

onde $I_o$ é o fluxo da luz monocromática incidente ($W/cm^2$). Definimos $\beta$ como o coeficiente de absorção ótica da amostra em ($cm^{-1}$) para o comprimento de onda $\lambda$. A densidade de calor produzida em qualquer ponto x da amostra é dada por

$$\frac{1}{2} \beta I_o \exp(\beta x)\cdot(1 + \cos \omega t) \qquad (II.2)$$

onde x tem valores negativos, pois a amostra extende-se de x=0 até $x= -l_a$, com a luz incidindo em x=0. Note que na figura II.1 a coluna de gás extende-se de x=0 até $x=l_g$ e o material de suporte de $x=-l_a$ até $x=-(l_a + l_s)$.

A equação de difusão térmica na amostra considerando-se a fonte de calor distribuida pode ser escrita como

$$\frac{\partial^2\theta}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha}\frac{\partial\theta}{\partial t} - A\cdot\exp(\beta x)\cdot\left(1 + \exp(i\omega t)\right) \qquad (II.3)$$

para $-l_a \leq x \leq 0$

com

$$A = \frac{\beta I_o \eta}{2 \kappa} \qquad (II.4)$$

onde $\theta$ é a temperatura e $\eta$ é a eficiência na qual a luz em um

comprimento de onda $\lambda$ é absorvida e convertida em calor por um processo de deexcitação não radiante. Nós supomos $\eta=1$, uma suposição razoável para a maioria dos sólidos a temperatura ambiente. Para o material de suporte e o gás, as equações de difusão térmica são dadas, respectivamente, por:

$$\frac{\partial^2\theta}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_s}\frac{\partial\theta}{\partial t} \qquad (II.5)$$

para $-l_s-l_a \leq x \leq -l_a$

$$\frac{\partial^2\theta}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_g}\frac{\partial\theta}{\partial t} \qquad (II.6)$$

para $0 \leq x \leq -l_g$

O campo real da temperatura é dado por

$$T(x,t) = \Re\ \theta(x,t) + \psi_o \qquad (II.7)$$

onde $\Re$ denota a parte real e $\psi_o$ é a temperatura ambiente.

Para especificar completamente a solução de (II.3), (II.5), e (II.6), condições de contorno apropriadas são obtidas das exigências de temperatura e continuidade de fluxo de calor nas interfaces $x=0$ e $x=-l_a$ e das restrições da temperatura nas paredes da célula em $x=+l_g$ e $x= -l_a- l_s$ que é a

temperatura ambiente. Esta última restrição é razoável para as paredes da célula que são metálicas. Finalmente, supomos que as dimensões da célula são pequenas o bastante e ignoramos a convecção de fluxo de calor no gás em um estado estacionário.

### II.2.3. Distribuição de Temperatura na Célula

A solução geral para $\theta(x,t)$ na célula desprezando os transientes pode ser escrita como

$$\theta(x,t)=\begin{cases} \frac{1}{l_a}(x+l_a+l_s)\cdot W_o + W\cdot\exp\left(\sigma_s(x+l_s)\right)\cdot\exp(i\omega t) & -l_a-l_s\leq x\leq -l_a \\ b_1+b_2x+b_3\exp(\beta x)+\left(U\exp(\sigma_a x)+V\exp(-\sigma_a x)-E\exp(\beta x)\right)\cdot \exp(i\omega t) & -l_a\leq x\leq 0 \\ \left(1-\frac{x}{l_g}\right)\cdot F+\theta_o\exp(-\sigma_g x)\exp(i\omega t) & 0\leq x\leq l_g \end{cases} \quad (II.8)$$

onde W, U, V, E, e $\theta_o$ são constantes complexas, $b_1$, $b_2$, $b_3$, $W_o$, e F são constantes reais, e $\sigma=(1+i)a$ com $a=(\omega/2\alpha)^{1/2}$. Em particular, deveria ser notado que $\theta_o$ e W representam a complexa amplitude da periodicidade da temperatura na interface gás-amostra (x=0), e na interface material de suporte-amostra ($x=-l_a$), respectivamente. A solução d.c. no material de suporte e no gás já fazem uso da suposição de que, a temperatura (relativa ao ambiente) é zero nos extremos da célula. As

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

quantidades $W_o$ e F denotam a componente d.c. da temperatura (referente ao ambiente) nas superfícies da amostra em $x= -l_a$ e $x=0$, respectivamente. As quantidades E e $b_3$ determinadas pela função em (II.3), são dadas por

$$b_3 = \frac{-A}{\beta^2} \qquad (II.9)$$

$$E = \frac{A}{(\beta^2 - \sigma^2)} = \frac{\beta\ I_o}{2\kappa(\beta^2 - \sigma^2)} \qquad (II.10)$$

Na solução geral (II.8) omitimos a componente crescente da exponencial nas soluções da região do gás e da região do material de suporte, porque para todas as frequências $\omega$ de interêsse o comprimento de difusão térmica é pequeno comparado ao comprimento do material, seja no gás ou no material de suporte. Isto é, $\mu_s < l_s$, e $\mu_g < l_g$, ($\mu_g \sim 0,02$ cm para o ar quando $\omega=630$ rad/seg), e por isso a componente senoidal destas soluções são suficientemente amortecidas tais que são efetivamente zero nas paredes da célula. Portanto, para satisfazer as condições de temperatura nas paredes da célula, a componente crescente da exponencial nas soluções teriam seus coeficientes sendo essencialmente zero.

As condições de continuidade para temperatura e fluxo nas superfícies da amostra são explicitamente dadas por

$$\theta_g(0,t) = \theta_a(0,t) \qquad (II.11a)$$

$$\theta_s(-l_a,t) = \theta_a(-l_a,t) \qquad (II.11b)$$

$$\kappa_g \frac{\partial\theta_g}{\partial x}(0,t) = \kappa_a \frac{\partial\theta_a}{\partial x}(0,t) \qquad \text{(II.11c)}$$

$$\kappa_s \frac{\partial\theta_s}{\partial x}(-l_a,t) = \kappa_a \frac{\partial\theta_a}{\partial x}(-l_a,t) \qquad \text{(II.11d)}$$

Estas condições são aplicadas separadamente à componente d.c. e à componente senoidal das soluções. De (II.11), obtemos para as soluções da componente d.c.

$$F_o = b_1 + b_3 \qquad \text{(II.12a)}$$

$$W_o = b_1 - b_2 + b_3 \exp(-\beta l_a) \qquad \text{(II.12b)}$$

$$\frac{-\kappa_g}{l_g} F_o = \kappa_a b_2 + \kappa_a \beta b_3 \qquad \text{(II.12c)}$$

$$\frac{\kappa_s}{l_s} W_o = \kappa_a b_2 + \kappa_a \beta b_3 \exp(-\beta l_a) \qquad \text{(II.12d)}$$

As equações (II.12) determinam os coeficientes $b_1$, $b_2$, $b_3$, $W_o$ e $F_o$ para as componentes independentes do tempo (d.c.) da solução. Aplicando (II.11) para a componente senoidal da solução, resulta:

$$\theta_o = U + V - E \qquad \text{(II.13a)}$$

$$W = \exp(-\sigma_a l_a)\cdot U + \exp(\sigma_a l_a)\cdot V - \exp(-\beta l_a) \qquad \text{(II.13b)}$$

$$-\kappa_g\sigma_g\theta_o = \kappa_a\sigma_a U - \kappa_a\sigma_a V - \kappa_a\beta E \qquad (II.13c)$$

$$\kappa_s\sigma_s W = \kappa_a\sigma_a U\cdot\exp(-\sigma_a l_a) - \kappa_a\sigma_a V\cdot\exp(\sigma_a l_a) - \kappa_a\beta E\cdot\exp(-\beta l_a) \qquad (II.13d)$$

Estas quantidades juntas com a expressão para E em (II.10) determinam os coeficientes U, V, W, e $\theta_o$. Por isso as soluções para (II.12) e (II.13) permiti-nos calcular a distribuição de temperatura (II.8) na célula em termos dos parâmetros óticos, térmicos e geométricos do sistema. A solução explicita de $\theta_o$, a amplitude complexa da temperatura periódica na interface amostra-gás (x=0) é dada por

$$\theta_o = \frac{\beta I_o}{2\kappa(\beta^2 - \sigma^2)}\left(\frac{(r-1)(b+1)\cdot\exp(\sigma l) - (r+1)(b-1)\cdot\exp(-\sigma l) + 2(b-r)\cdot\exp(-\beta l)}{(g+1)(b+1)\cdot\exp(\sigma l) - (g-1)(b-1)\cdot\exp(-\sigma l)}\right)$$

(II.14)

onde

$$b = \frac{\kappa_s a_s}{\kappa_a a_a} \qquad (II.15)$$

$$g = \frac{\kappa_g a_g}{\kappa_a a_a} \qquad (II.16)$$

$$r = (1-i)\frac{\beta}{2a} \qquad (II.17)$$

e, já visto antes, $\sigma=(1+i)a$. Por isso (II.14) pode ser calculada

para parâmetros com valores específicos, resultando em um número cuja parte real e imaginária, $\theta_1$ e $\theta_2$, respectivamente determinam os componentes periódicos da variação de temperatura, em fase e quadratura na superficie x=0 para a amostra. Especificamente, o valor real da temperatura em x=0 é dado por

$$T(0,t) = \psi_o + F_o + \theta_1 \cos(\omega t) - \theta_2 \mathrm{sen}(\omega t) \qquad (II.18)$$

onde $\psi_o$ é a temperatura ambiente nas paredes da célula e $F_o$ é o aumento na temperatura devido a componente do estado estacionário da absorção do calor.

### II.2.4. Produção do Sinal Acústico

O processo de difusão periódica produz uma variação na temperatura do gás dada pela componente senoidal (a.c.) da solução (II.8)

$$\theta_{a.c}(x,t) = \theta_o \cdot \exp(-\sigma_g x) \cdot \exp(i\omega t) \qquad (II.19)$$

onde $\sigma_g = (1-i)a_g$.

Tomando-se a parte real de (II.19), obtemos a variação de temperatura física real no gás que é dada por:

$$T_{a.c}(x,t) = \exp(-a_g x)\left(\theta_1 \cos(\omega t - a_g x) - \theta_2 \operatorname{sen}(\omega t - a_g x)\right) \qquad (II.20)$$

onde $\theta_1$ e $\theta_2$ são a parte real e imaginária de $\theta_0$, como dado pela equação (II.14). Como pode ser visto na figura II.2, para o gás a componente da temperatura dependente do tempo atenua rapidamente a zero com o aumento da distância da superficie da amostra.

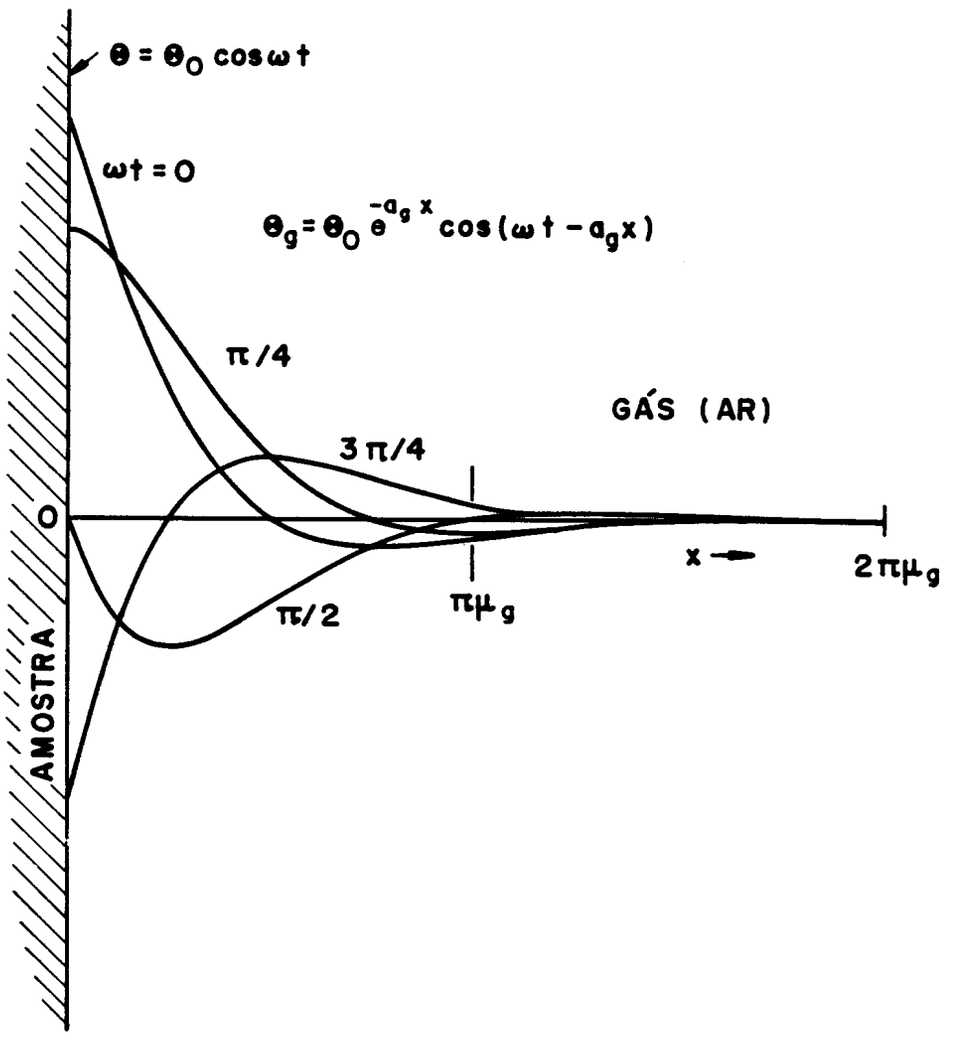



FIGURA II.2: Variação da temperatura dependente do tempo na interface gás-amostra.

A uma distância de apenas $2\pi/a_g = 2\pi\mu_g$ a variação periódica da temperatura no gás é efetivamente amortecida. Por isso podemos definir uma camada de interface, como mostrado na figura II.1, cuja espessura é $2\pi\mu_g$ (~0,1 cm em $\omega/2\pi$=100 Hz) e utilizando a aproximação que apenas esta espessura do gás é capaz de responder térmicamente à temperatura na superfície da amostra.

A variação média espacial da temperatura do gás dentro desta camada como uma função do tempo, pode ser determinada calculando-se:

$$\bar{\theta} = \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} \theta_{a.c}(x,t)\, dx \qquad (II.21)$$

de (II.19) obtemos

$$\bar{\theta} \cong \frac{1}{2\pi\sqrt{2}}\, \theta_o \exp i(\omega t - \pi/4) \qquad (II.22)$$

onde usamos a aproximação $e^{-2\pi} \ll 1$.

Por causa do aquecimento periódico da camada da interface, esta camada de gás se expande e se contrai periódicamente como a ação de um pistão sobre o restante da coluna de gás, produzindo um sinal de pressão acústica que

viaja por toda coluna de gás.

O deslocamento deste pistão devido ao aquecimento periódico pode ser estimado usando-se a lei dos gases ideais,

$$\delta x(t) = 2\pi\mu_g \frac{\bar{\theta}(t)}{T_o} = \frac{\theta_o \mu_g}{\sqrt{2}\ T_o} \exp i(\omega t - \pi/4) \qquad (II.23)$$

onde estabelecemos a temperatura média d.c. desta camada de gás igual a temperatura d.c. na superficie da amostra, $T_o = \psi_o + F_o$.

Se supomos que o restante do gás responde adiabáticamente a esta ação, então a pressão acústica na célula devido ao deslocamento do pistão é derivado da lei adiabática dos gases

$$PV^{\gamma} = cte. \qquad (II.24)$$

onde P é a pressão, e V é o volume do gás na célula, e $\gamma$ é a razão entre os calores específicos. Portanto o aumento na pressão é

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_o}{V_o}\ \delta V = \frac{\gamma P_o}{l_g}\ \delta x(t) \qquad (II.25)$$

onde $P_o$ e $V_o$ são a pressão e o volume ambiente respectivamente, e $-\delta V$ é o incremento do volume. Então de (II.23)

$$\delta P(t) = Q \exp(i\omega t-\pi/4) \qquad (II.26)$$

onde

$$Q = \frac{\gamma P_o \vartheta_o}{\sqrt{2}\ l_g a_g T_o} \qquad (II.27)$$

Portanto a variação real da pressão, $\Delta p(t)$, é dado pela parte real de $\delta P(t)$ como

$$\Delta p(t) = Q_1 \cos(\omega t-\pi/4) - Q_2 \mathrm{sen}(\omega t-\pi/4) \qquad (II.28)$$

ou

$$\Delta p(t) = q \cos(\omega t-\psi-\pi/4) \qquad (II.29)$$

onde $Q_1$ e $Q_2$ são as partes real e imaginária de Q, q e $\psi$ são a magnitude e fase de Q, isto é,

$$Q = Q_1 + iQ_2 = q\cdot\exp(-i\psi) \qquad (II.30)$$

Assim Q especifica o complexo envelope senoidal da variação de pressão. Combinando (II.14) e (II.27) obtemos explicitamente a formula

$$Q=\frac{\beta I_o \gamma P_o}{2\sqrt{2}\ T_o \kappa l_g a(\beta^2-\sigma^2)} \times \frac{(r-1)(b+1)\exp(\sigma l)-(r+1)(b-1)\exp(-\sigma l)+2(b-r)\exp(-\beta l)}{(g+1)(b+1)\exp(\sigma l)-(g-1)(b-1)\exp(-\sigma l)}$$

(II.31)

onde $b=\frac{\kappa_s a_s}{\kappa_a a_a}$, $g=\frac{\kappa_g a_g}{\kappa_a a_a}$, $r=(1+i)\frac{\beta}{2a}$, e $\sigma=(1+i)a$ como definido

anteriormente. Em temperatura usual onde $T_o \approx \psi_o$ tal que as componentes d.c. da distribuição de temperatura não precisam ser calculadas. Portanto (II.31) pode ser calculada pela magnitude e fase da onda de pressão acústica produzida na célula pelo efeito fotoacústico.

### I.2.5. Casos Especiais

A expressão completa para $\Delta p(t)$ é difícil de interpretar por causa da expressão para Q que é muito complicada como dada por (II.31). Contudo, com um pouco de intuição física podemos obtê-la examinando os casos especiais onde a expressão para Q torna-se relativamente simples. Os casos foram agrupados de acordo com a opacidade ótica das amostras determinada pela relação do comprimento de absorção ótica $l_\beta = 1/\beta$ com a espessura da amostra. Para cada categoria de opacidade ótica, foram então considerados três casos segundo as magnitudes relativas do comprimento de difusão térmica $\mu$, comparado ao comprimento $l_a$ da amostra e ao comprimento de absorção ótica $l_\beta$. Para todos os casos calculados a seguir, foi feito uso da suposição que g<b e que b~1, isto é, que $\kappa_g a_g < \kappa_s a_s$ e $\kappa_s a_s \approx \kappa_s a_a$.

Os seis casos são mostrados na figura II.3 e discutidos a seguir.

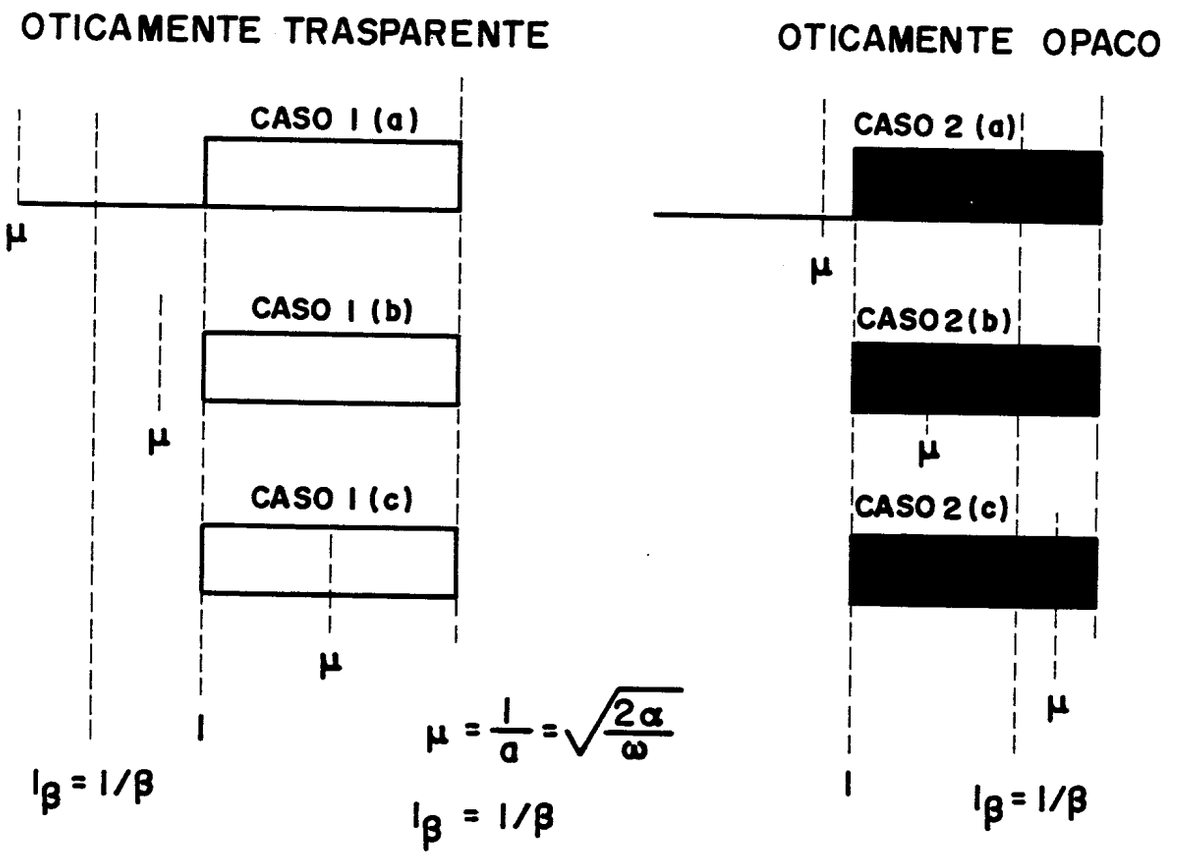



FIGURA II.3 : Representação esquemática dos casos especiais para a teoria fotoacústica dos sólidos.

Antes, porém, é conveniente definir

$$Y=\frac{\gamma P_0 I_0}{2\sqrt{2}\ T_0 l_g} \qquad (II.32)$$

que sempre aparece na expressão para Q como um fator constante. Também definimos o comprimento do caminho ótico como

$$l_\beta=\frac{1}{\beta} \qquad (II.33)$$

### II.2.5.1. Amostras Óticamente Transparentes

$(l_\beta > l_a)$

Nestes casos, a luz é absorvida por todo o comprimento da amostra, e alguma parte da luz é transmitida pela amostra.

*Caso 1a: Amostras Térmicamente Finas*

$(\mu \gg l_a ; \mu > l_\beta)$

Aqui tomamos $e^{-\beta l_a} \simeq 1-\beta l_a$, $e^{\pm\sigma l_a} \simeq 1$, e $|r|>1$ em (II.32). Assim obtemos

$$Q=\frac{Y}{2a_g a_s \kappa_s}(\beta-2a\beta-i\beta) \simeq \frac{(1-i)\beta l_a}{2a_g}\left(\frac{\mu_s}{\kappa_s}\right)Y \qquad (II.34)$$

O sinal acústico é por isso proporcional a $\beta l_a$, e desde que $\mu_s/a_g$ é proporcional a $1/\omega$, o sinal acústico tem uma dependência de $\omega^{-1}$. Para este caso (térmicamente fino com

IFSC — SE... TECA E

$\mu \gg l$), as propriedades térmicas do material de suporte surgem na expressão de Q.

*Caso 1b: Amostras Térmicamente Finas*

$(\mu > l_a ; \mu < l_\beta)$

Aqui tomamos $e^{-\beta l_a} \simeq 1-\beta l_a$, $e^{\pm\sigma l_a} \simeq (1 \pm \sigma l_a)$, e $|r|<1$ em (II.33). Então obtemos

$$Q = \frac{\beta l_a Y}{4\kappa_a a_g a^3_a b}[(\beta^2+2a^2)+i(\beta^2-2a^2)] \simeq \frac{(1-i)\beta l_a}{2a_g}\left(\frac{\mu_s}{\kappa_s}\right)Y \qquad (II.35)$$

O sinal acústico é mais uma vez proporcional a $\beta l_a$, varia com $\omega^{-1}$ , e depende das propriedades térmicas do material de suporte. A equação (II.35) é identica a (II.34).

*Caso 1c: Amostras Térmicamente Espessas*

$(\mu < l_a ; \mu \ll l_\beta)$

Na (II.32) tomamos $e^{-\beta l_a} \simeq 1-\beta l_a$, $e^{-\sigma l_a} \simeq 0$, e $|r| \ll 1$. O sinal acústico então torna-se

$$Q \simeq -i\frac{\beta\mu}{2a_g}\left(\frac{\mu_a}{\kappa_a}\right)Y \qquad (II.36)$$

Aqui o sinal é proporcional a $\beta\mu$ ao invés de $\beta l_a$. Isto é, apenas a luz absorvida dentro do primeiro comprimento de difusão térmica contribui para o sinal, mesmo em

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

vista do fato de que a luz está sendo absorvida em todo o comprimento $l_a$ da amostra. Também, desde que $\mu < l_a$, as propriedades térmicas do material de suporte presentes na equação (II.36) são substituidas pelas da amostra. A dependência de Q em (II.37) com a frequência é $\omega^{-3/2}$.

Os casos 1a,1b e 1c para as assim chamadas amostras óticamente transparentes mostram uma capacidade da espectroscopia fotoacústica igual a nenhuma outra técnica, de obtermos o efeito de "depth profile" devido a absorção ótica dentro da amostra. Ou seja, com a variação da frequência nós podemos obter informações de diferentes camadas do material.

### II.2.5.2. Amostras Óticamente Opacas

$(l_\beta \ll l_a)$

Nestes casos a maioria da luz é absorvida dentro de uma distância pequena comparada a $l_a$, e essencialmente nenhuma luz é transmitida.

*Caso 2a: Amostras Térmicamente Finas*

$(\mu \gg l_a ; \mu \gg l_\beta)$

Na equação (II.32) tomamos $e^{-\beta l_a} \simeq 0$, $e^{\pm \sigma l_a} \simeq 1$, e $|r| \gg 1$. Então obtemos

$$Q \simeq \frac{(1-i)}{2a_s}\left(\frac{\mu_s}{\kappa_s}\right)Y \qquad (II.37)$$

Neste caso, temos a "opacidade" fotoacústica bem como a opacidade ótica, no sentido de que o nosso sinal é independente de $\beta$. Isto seria o caso para um corpo negro muito absorvedor tal como carvão preto. O sinal é muito forte (é $1/\beta l$ vezes tão forte como no caso 1a), depende das propriedades térmicas do material de suporte, e varia com $\omega^{-1}$.

*Caso 2b: Amostras Térmicamente Finas*

$(\mu < l_a ; \mu > l_\beta)$

Na equação (II.32) tomamos $e^{-\beta l_a} \simeq 0$, $e^{-\sigma l_a} \simeq 0$, e $|r| > 1$. Então obtemos

$$Q \simeq \frac{Y}{2 a_g a_a K_a \beta} (\beta - 2a - i\beta) \simeq \frac{(1-i)}{2 a_g} \left(\frac{\mu_a}{K_a}\right) Y \qquad (II.38)$$

Equação (II.38) é analoga a (II.37), mas com os parâmetros térmicos do material de suporte substituidos pelos da amostra. Mais uma vez o sinal é independente de $\beta$ e varia com $\omega^{-1}$.

*Caso 2c: Amostras Térmicamente Espessas*

$(\mu \ll l_a ; \mu < l_\beta)$

Na equação (II.32) tomamos $e^{-\beta l_a} \simeq 0$, $e^{-\sigma l_a} \simeq 0$, $|r| > 1$. Então obtemos

$$Q \simeq \frac{-i\beta Y}{4 a_g a_a^3 \kappa}(2a-\beta+i\beta) \simeq \frac{-i\beta\mu_a}{2a_g}\left(\frac{\mu_a}{\kappa_a}\right)Y \qquad (II.39)$$

Este é um caso muito interessante e importante. Óticamente estamos tratando com amostras muito opacas ($\beta l_a \gg 1$). Contudo, se $\beta\mu < 1$ (i.e., $\mu < l_\beta$), esta amostra não é fotoacústicamente opaca, pois como no caso ic, a luz absorvida no primeiro comprimento de difusão térmica, $\mu$, contribui para o sinal acústico. Por isto, embora a amostra seja oticamente opaca, o sinal fotoacústico é proporcional a $\beta$. Como no caso ic, o sinal é também dependente das propriedades térmicas da amostra e varia com $\omega^{-3/2}$.

# CAPÍTULO III

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

# CAPÍTULO III

# PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

## III.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### III.1.1. Preparação das Amostras

#### III.1.1.a. Hemoglobina-CO

A hemoglobina utilizada foi obtida de sangue humano. A purificação foi feita com o seguinte procedimento: a amostra foi lavada em solução de salina tamponada com pH igual a 7.4 , em seguida foi posta para centrifugar a 3500 rpm a uma temperatura de 4°C durante um tempo de 15 min. O sobrenadante foi, então, descartado e o mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes. Dessa maneira conseguimos a separação das hemáceas às quais foi, então, adicionada água destilada para que a parede celular fosse rompida liberando a hemoglobina. O hemolizado foi centrifugado por 30 min. a 15000 rpm na mesma temperatura. O material depositado foi descartado e nós obtivemos a hemoglobina em solução. Em seguida esta solução foi colocada na presença de Monóxido de Carbono (CO) obtido através da reação de Ácido Fórmico (HCOOH) com Ácido Sulfúrico ($H_2SO_4$). Pelo fato do monóxido de carbono ser obtido em meio ácido fizemos com que o gás passasse por uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH), precaução esta para evitar uma possível desnaturação da proteína. A ligação do CO à hemoglobina foi comfirmada por medidas de espectroscopia convencional [4] . Após a obtenção da hemoglobina-CO ela foi congelada a temperatura de nitrogênio líquido e foi, então, posta para liofilizar de modo a termos a amostra em forma de pó. Ela foi divida em porções de

cerca de 40 mg, que foram então postas em ambientes com diferentes umidades relativas, conseguidas com diferentes soluções saturadas de sais [25-26]. Após um período de quatro dias as amostras já estavam equilibradas com o ambiente [12] e estavam prontas para serem medidas .

### III.1.1.b. Mioglobina-CO

Foi utilizada mioglobina de coração de cavalo tipo III proveniente da Sigma. Ela é adquirida na forma meta-mioglobina liofilizada. Para se conseguir o derivado mioglobina-CO foi feito o seguinte procedimento. Dissolveu-se um pouco da amostra em água destilida e centrifugou-se por um período de 15 min. a 15000 rpm a uma temperatura de 4°C. O material depositado foi descartado e o sobrenadante foi colocado em presença de CO obtido da maneira descrita anteriormente. Como a mioglobina estava na forma meta foi necessário adicionar Ditionito de Sódio ($Na_2S_2O_4$) para reduzir o Fe do grupo heme e este poder ligar CO. A adição do ditionito de sódio deve ser feita em presença de CO pois reage com o oxigênio. A amostra foi passada por uma coluna de Sephadex G-25 para que o ditionito de sódio fosse retirado. Isto foi feito na cetrifuga a 2500 rpm por 15 min. As amostras foram, então, colocadas para hidratar seguindo o mesmo procedimento da hemoglobina.

## III.2. Método e Procedimento Experimental

Em geral a metodologia comumente aplicada

para a obtenção do espectro de absorção ótica é a deteção da luz transmitida através da amostra. No caso em que a amostra em uso seja gel, pó, sólido, ou que tenha efeito de espalhamento, este tipo de deteção torna-se ineficaz. O nosso caso encaixa-se exatamente nesta situação pois temos em mãos hemoproteínas que foram liofilizadas, isto é, estão na forma de pó e são opacas. Isto levou-nos a utilizar a técnica de espectroscopia fotoacústica para podermos estudar as transições eletrônicas dessas proteínas.

Como não dispunhamos deste equipamento as medidas iniciais foram feitas no laboratório do Prof. Helion Vargas na UNICAMP. Posteriormente foi montado em nosso laboratório um equipamento para fotoacústica que está descrito a seguir.

### III.2.1. Espectrômetro Fotoacústico

O espectrometro fotoacústico é constituido das seguintes partes (esquema da Figura III.1).

1. Fonte de Luz
2. Componentes Óticos (lentes e fibra ótica)
3. Monocromador
4. Chopper

5.Célula Fotoacústica

6.Detetor de Potência (Piroelétrico)

7.Lock-In

8.Motor do Monocromador Registrador X-Y

9.Circuito Divisor para Obtenção da Absorção da Amostra

### III.2.1.1. Fonte de Luz

A fonte de luz utilizada é uma lâmpada de Xenônio da Oriel (XBO 150 W/1) cujo espectro varre todo o visível e infra-vermelho próximo. Algumas de suas características estão na tabela III.1.

| Características da lâmpada de Xe | |
|---|---|
| Modelo ..... | XBO 150 W/1 |
| Tempo de Vida ..... | 1200 hs |
| Voltagem de Operação ..... | 20 volts |
| Corrente de Operação ..... | 7,5 amp |
| Posição de Operação ..... | vert. ±15° |

**TABELA III.1** [29]

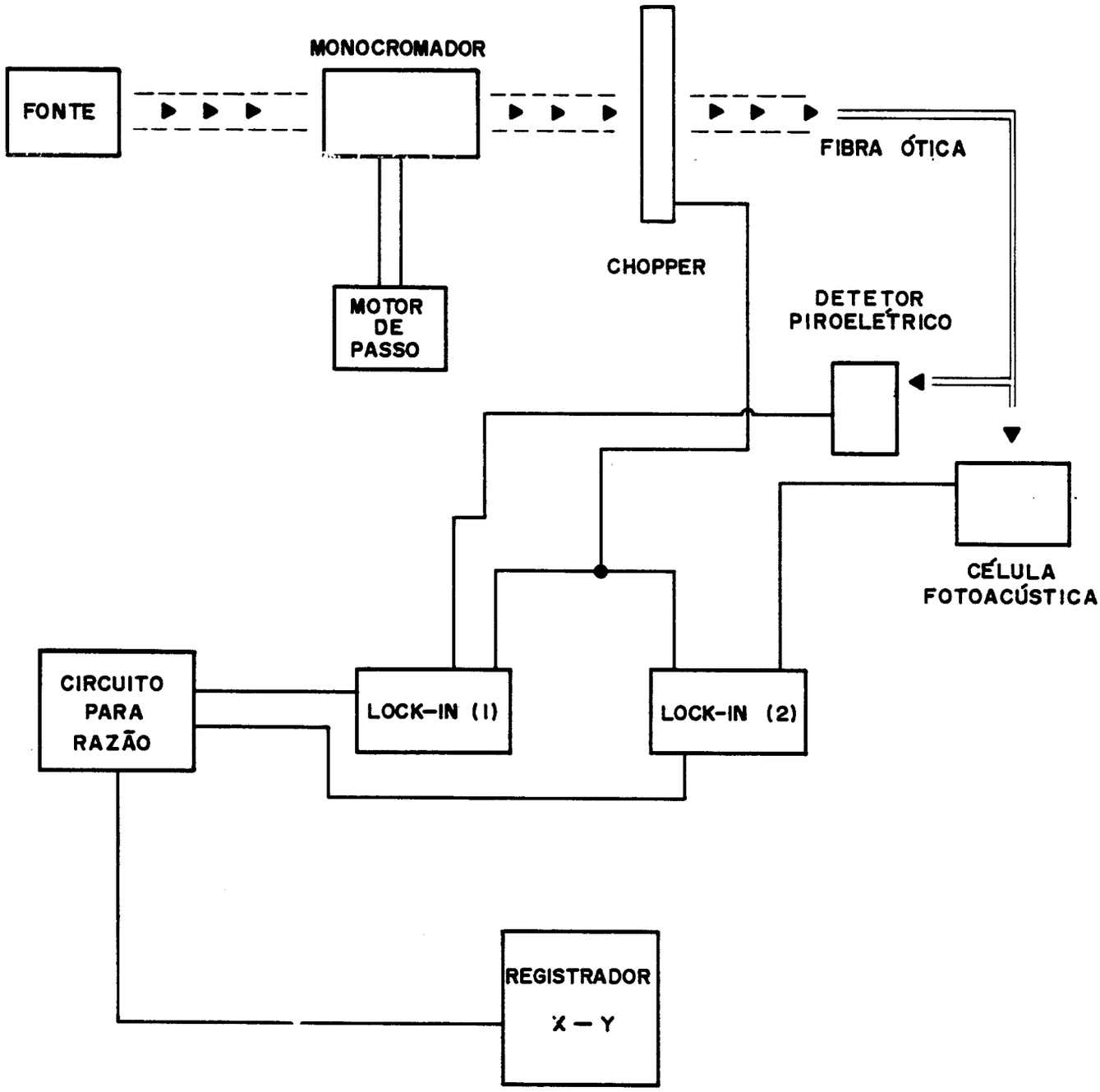



FIGURA III.1: Diagrama de bloco do espectrômetro fotoacústico

### III.2.1.2. Componentes Óticos

O espectrômetro fotoacústico tem um sistema ótico simples, que é formado por lentes para a convergência do feixe de luz na fenda de saída do monocromador, sendo este, então, coletado por uma fibra ótica que se bifurca emitindo o feixe de luz para a célula fotoacústica e para o detetor piroelétrico. As lentes e janelas utilizadas são de BK7/A que tem uma região espectral com baixissima absorção na região que vai de 350 nm até 2.5 μm [27].

### III.2.1.3. Monocromador

A Figura III.2 ilustra o esquema do monocromador. A máxima eficiência é obtida quando a área da fenda de entrada do monocromador está totalmente iluminada. Uma lente coletora na frente da fenda de entrada coleta a luz incidente.

A luz incide sobre a grade de difração e é angularmente dispersa segundo os comprimentos de onda, isto é, cada comprimento de onda presente na luz é disperso em um ângulo diferente. A grade pode ser girada por um eixo para dirigir a luz de um comprimento de onda selecionado ao centro de um espelho côncavo. O espelho côncavo coleta a luz e, juntamente com uma lente corretora na entrada da fenda de

saída, projeta a imagem da fenda de entrada na fenda de saída. A imagem da fenda de entrada é reduzida em tamanho por um fator de 0,56. A fenda de saída tem dimensões que é 56% da fenda de entrada [28].

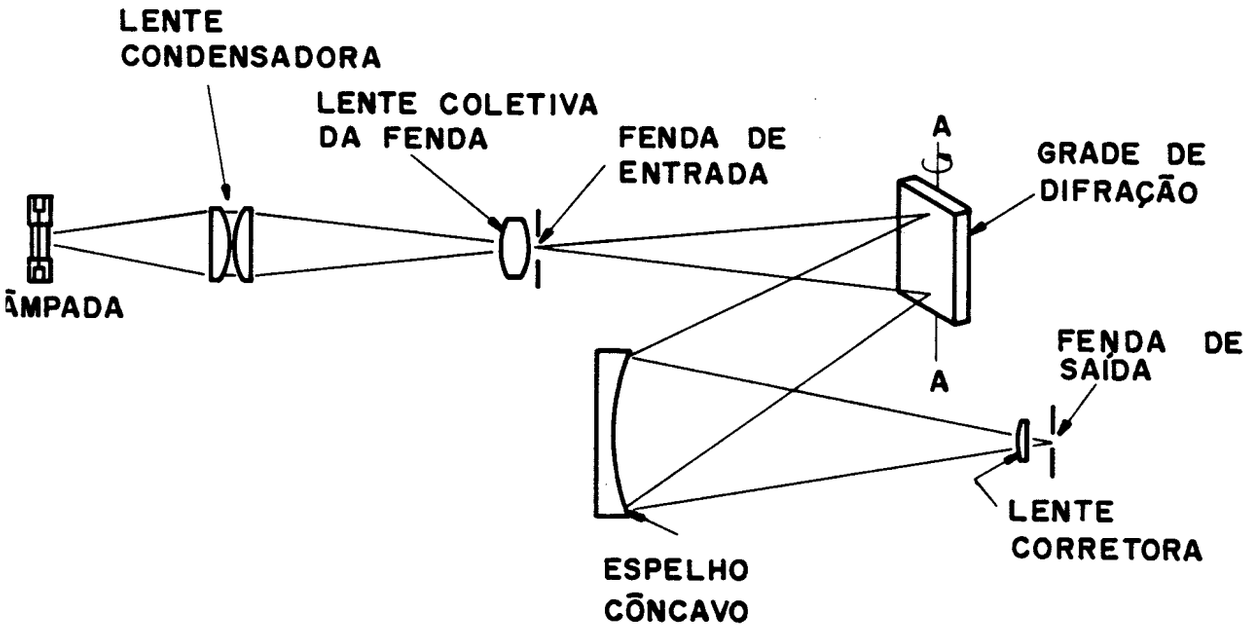



FIGURA III.2: Esquema ótico do monocromador[29].

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

A tabela III.2 mostra algumas das características da grade de difração.

| Características da grade de difração | |
|---|---|
| Linhas / mm ..... | 1350 |
| Intervalo de comprimento de onda .. | 200 - 800 nm |
| Dispersão recíproca ..... | 6,4 nm / mm |
| Eficiência da grade ..... | 70% |
| Eficiência do instrumento ..... | 47% |

**TABELA III.2 [29]**

Para calcular a largura espectral da fenda multiplica-se a dispersão recíproca pela largura da fenda de saída. Por exemplo, se a fenda de saída tiver largura de 0,5 mm, sendo a disperção recíproca de 6,4 nm/mm então teremos 3,2 nm de largura de banda passando pela fenda de saída.

Tanto a fenda de entrada como a fenda de saída são variáveis e possuem uma graduação que varia de 0 a 6,0 mm dividida em intervalo de 0,1 mm . Estas fendas devem ser ajustadas proporcionalmente uma em relação a outra segundo o fator de 56%.

O monocromador tem um "dial" de 3 dígitos que informa o comprimento de onda da grade de difração. O instrumento deve ser ajustado de modo que o que é mostrado no "dial" seja exatamente o comprimento de onda selecionado. A calibração do monocromador é feita utilizando-se um laser de He-Ne cujo comprimento de onda é 632 nm.

### III.2.1.4. "Chopper"

O chopper utilizado é o modelo 125A da PRINCETON APPLIED RESEARCH CORPORATION, construido para operar em junção com qualquer Lock-In da mesma marca.

A frequência do "chopper" é conseguida por uma chave seletora do motor e também pelo posicionamento correspondente entre as polias. A variação conseguida vai desde 13 Hz até 2000 Hz. A referência de saída é uma onda quadrada em sincronismo com a frequência selecionada. O nível nominal mais baixo da onda quadrada é -0,6 V. O nível superior é +4.0 V, que é obtido através de um diodo emissor de luz (LED) e por um respectivo transistor foto-sensível. Ambos estão montados lado a lado no interior de uma cavidade circular na parte interna do "chopper" de modo que com o movimento da pá ocorra reflexões entre eles e um espelho. Foi verificado que a frequência designada pelo manual não estava correspondendo a sua seleção como é mostrado na tabela III.3. [30]

| Nº de aberturas | Chave | Posição | Frequência | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Man. | Med. |
| 4 | slow | front | 27 | 33 |
| | fast | " | 54 | 62 |
| | slow | middle | 68 | 78 |
| | fast | " | 134 | 80 |
| | slow | rear | 85 | 89 |
| | fast | " | 169 | 178 |
| 2 | slow | front | 13 | 16 |
| | fast | " | 26 | 33 |
| | slow | middle | 34 | 35 |
| | fast | " | 68 | 80 |
| | slow | rear | 42 | 45 |
| | fast | " | 84 | 89 |

TABELA III.3

### III.2.1.5. Célula Fotoacústica

A Figura III.3 ilustra o esquema da célula fotoacústica utilizada. Ela foi, construída para medidas de

absorção e de transmissão e por isso contém duas janela para permitir a entrada e a saída de luz. O material utilizado para a janela foi BK7/A com uma região espectral sem absorção indo de 300 nm a 2.5 μm. Foi utilizado um microfone de eletreto de três fios, que possue um "FET" interno como um preamplificador do sinal.

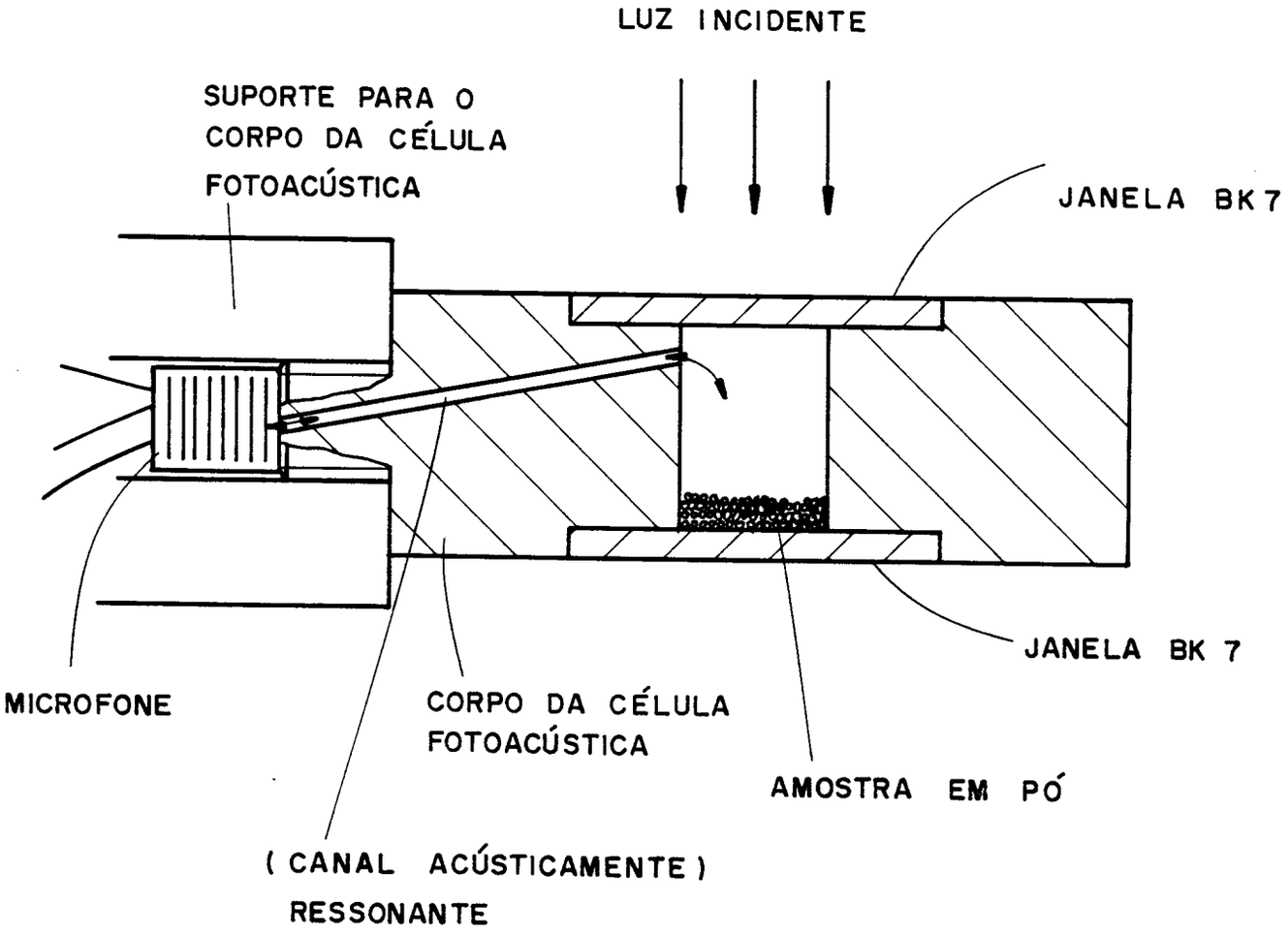



FIGURA III.3: Corte seccional da célula fotoacústica.

### III.2.1.6. Detetor de Potência (Piroelétrico)

Estes são detetores que utilizam a mudança de carga na superfície que resulta quando certos cristais assimétricos (ou seja, que possuem um momento de dipolo elétrico interno) são aquecidos. O material cristalino é fabricado como um dielétrico em um pequeno capacitor, e a mudança na carga é medida quando o elemento é irradiado.

Se a frequência de modulação da radiação incidente é baixa comparada ao tempo de relaxação térmica do cristal, o cristal permanece próximo ao equilibrio térmico e a corrente de resposta é pequena.

Quando o período de modulação torna-se mais curto do que o tempo de relaxação térmica, há um aquecimento muito maior que resulta em uma corrente de resposta maior.

Os detetores piroelétricos têm respostas para frequências que estendem-se de alguns poucos hertz até cerca de 100 GHz. Sua detectividade é comparada aos dos termopares e eles também tem uma resposta que depende da frequência da radiação incidente com $1/\omega$. E são sensíveis desde o visível até o infravermelho. Por estas características e pela simplicidade de operação e manutenção, e uma ótima resposta com a radiação

modulada incidente ele é usualmente utilizado em equipamento de fotoacústica [27].

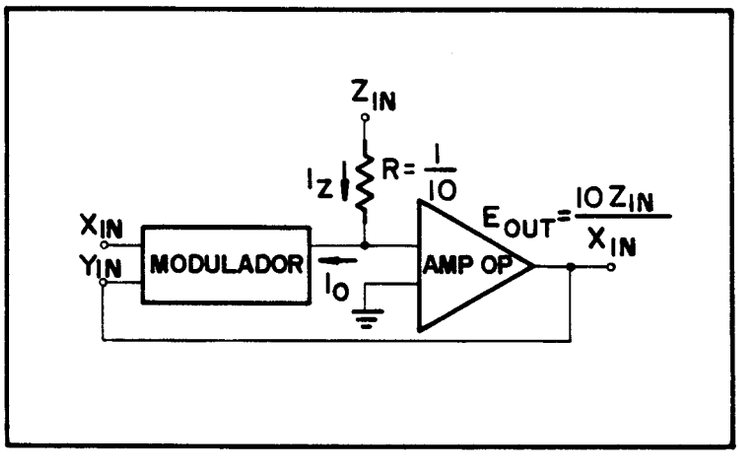
### III.2.1.7. "Lock-In"

É necessário a utilização de dois desses equipamentos como pode ser visto no esquema da Figura III.1. Os dois que estão sendo usados são da PRINCETON APPLIED RESEARCH CORPORATION, modelo 124A e modelo 126 e destinam-se, no nosso caso, a servir como um amplificador que obtem medidas acuradas da amplitude e fase de sinais fracos e muitas vezes encobertos com ruídos. A melhora do sinal é conseguida usando como referência para o Lock-In o sinal do chopper. Isto faz com que apenas o sinal com frequência igual a do chopper seja amplificado. A absorção da luz pela amostra é obtida comparando o sinal da célula fotoacústica com o sinal do detetor de potência. Desta maneira eliminamos o espectro da lâmpada que estaria superposto ao espectro que desejamos.

### III.2.1.8. Circuito divisor para obtenção da absorção da amostra

O circuito para obtenção da razão entre os sinais da amostra e referência é baseado em um multiplicador analógico de quatro quadrantes (ICL 8013) cuja saída é proporcional ao produto algébrico de dois sinais de entrada.

Para que o mesmo trabalhe como um divisor de sinais o seu funcionamento é baseado no seguinte, como mostra o esquema III.1.[31].




**ESQUEMA** III.1: Esquema de funcionamento do ICL 8013.

Se o terminal Z é usado como uma entrada, e a saída do amplificador operacional é conectada a entrada Y, o dispositivo funciona como um divisor. Como a entrada do amplificador operacional está em um terra virtual, e exige uma corrente de "bias" desprezível, toda a corrente de realimentação força a corrente de saída do modulador ser igual a corrente produzida por Z.

Portanto

$$I_0 = X_{in} \cdot Y_{in} = \frac{Z_{in}}{R} = 10 \cdot Z_{in} \qquad (III.1)$$

Como

$$Y_{in} = E_{out} \qquad (III.2)$$

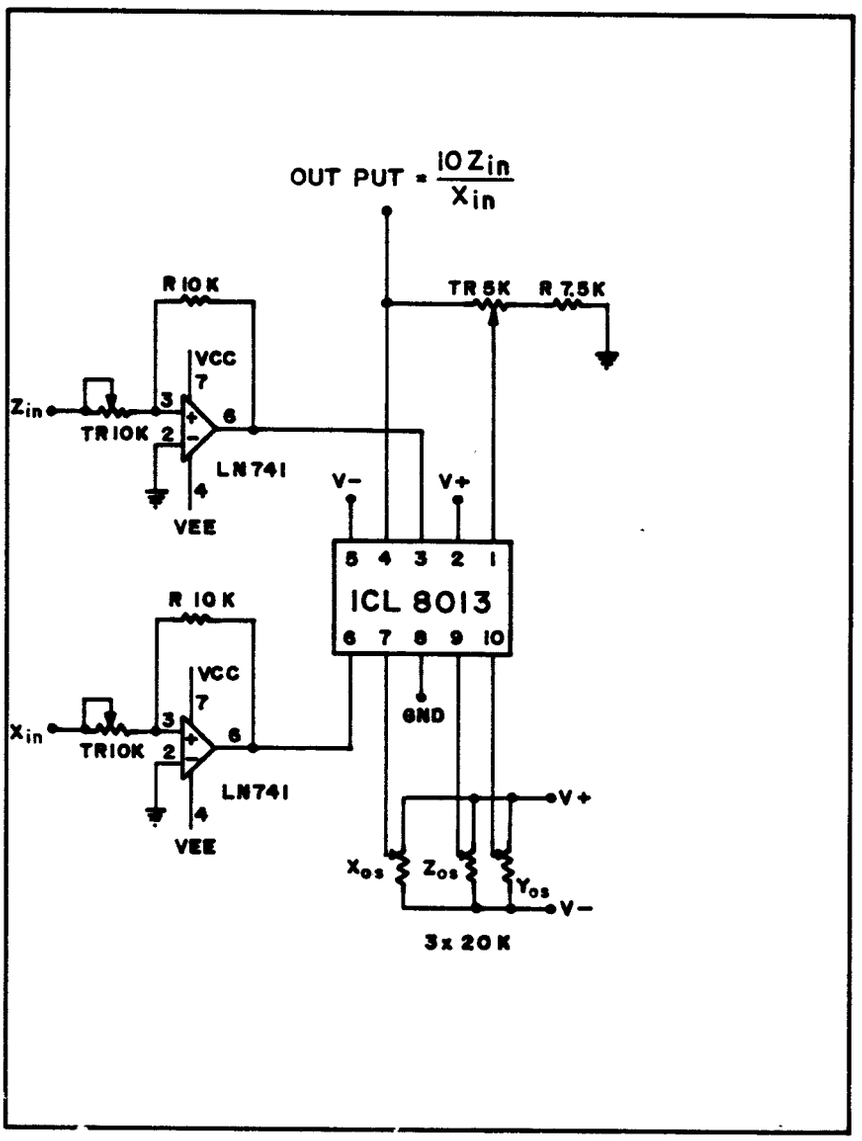
substituindo em (II.1) temos,

$$E_{out} = \frac{10\ Z_{in}}{X_{in}} \qquad (III.3)$$

O circuito para a obtenção da absorção é mostrado no esquema III.2. Uma modificação foi realizada tendo em vista a configuração original do dispositivo (ICL 8013) que exige que os sinais de entrada variem entre (0 até -10V). Ao invés de trabalharmos sempre com os "Lock-in's" defasados de $\pi$, preferimos fazer inversores para os sinais de entrada

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

utilizando amplificadores operacionais.




ESQUEMA III.2: Diagrama de bloco do circuito divisor para obtenção do espectro da amostra.

O ajuste para o funcionamento correto do circuito é o seguinte:

1) Coloca-se os potênciometros em meia escala, isto é conseguido ajustando-se as voltagens nos pinos 7, 9 e 10 ($X_{os}$, $Y_{os}$, $Z_{os}$) para zero volts.

2) Com $Z_{in}$= 0 V, ajuste $Z_{os}$ de modo a manter a saída constante, quando $X_{in}$ varia de -10 V até -1 V.

3) Com $Z_{in}$= 0 V e $X_{in}$= -10,0 V ajuste $Y_{os}$ para obter-se zero na voltagem de saída.

4) Com $Z_{in}$= $X_{in}$ (e/ou $Z_{in}$= $-X_{in}$) ajuste $X_{os}$ para uma variação mínima da saída, quando $X_{in}$ varia de -10 V até -1 V.

5) Repetir os procedimentos 2 e 3 se o procedimento 4 exigir um grande ajuste inicial.

6) Com $Z_{in}$= $X_{in}$ (e/ou $Z_{in}$= $-X_{in}$) ajuste o controle de ganho até a saída estar próxima de um valor médio +10,0 V (-10 V para $Z_{in}$= $-X_{in}$) quando $X_{in}$ varia de -10 V até -3 V.

Com o circuito do esquema III.2 descrito é possível obtermos a absorção em um dado comprimento de onda. Para obtermos o espectro fotoacústico precisamos fazer o comprimento de onda da luz variar.

IFSC — SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

### III.2.1.9. Motor do Monocromador e Registrador X-Y

O comprimento de onda da luz é variado pelo motor acoplado ao monocromador, que tem uma velocidade constante de 0,34 nm/seg. Portanto de um comprimento de onda conhecido e registrando o sinal do circuito divisor em função do tempo consegue-se o espectro fotoacústico. O registrador utilizado é o Modelo 7004B X-Y da Hewlett-Packard. Sua versatilidade encontra-se no fato da utilização de varios módulos que nos permitem registrar gráficos em coordenadas cartesianas, como voltagem versus tempo. Ele tem uma sensibilidade básica de 100 mV/inch ou (50 mV/cm). Com este equipamento conseguimos obter espectros de 370 a 700 nm em cerca de 15 min [32].

IFSC —

# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS

# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS

Os resultados apresentados são dividos em dois grupos: o primeiro deles são referentes a dados obtidos de medidas realizadas na UNICAMP junto ao grupo de Eletrônica Quântica em colaboração com o Prof. Dr. Helion Vargas, utilizando o espectrômetro fotoacústico comercial *"edt research OAS 400"*. Estas primeiras medidas foram feitas para a hemoglobina e mioglobina em pó. O segundo grupo de resultados foram conseguidos com o espectrômetro fotoacústico montado em nosso laboratório. Os resultados iniciais na região do visível foram repetidos e foi feito um estudo mais detalhado sobre o efeito da hidratação na hemoglobina. Também estão mostrados alguns testes realizados com o equipamento montado, reprodutibilidade. A seguir são mostrados dados obtidos pelo espectrômetro fotoacústico comercial.

### IV.1. Resultados para Hemoglobina (300 - 700 nm)

Como foi apresentado no capítulo III, a preparação da amostra foi feita de modo que a hemoglobina tivesse como seu ligante inicial o monóxido de carbono (CO). Este derivado se caracteriza por picos de absorção em 419 nm (conhecida como banda de *Soret*) e também em 540 e 569 nm, que são as bandas $\alpha$ e $\beta$ respectivamente [4]. Na figura IV.1 é mostrado

o espectro fotoacústico para a hemoglobina em pó onde pode-se ver perfeitamente a banda de *Soret* em 419 nm. Já as bandas $\alpha$ e $\beta$ não são bem resolvidas, mas são visíveis em torno das posições esperadas. A semelhança entre este espectro e o espectro ótico já era esperada e já havia sido observada para os derivados oxi e meta hemoglobina [33].

Com relação à hidratação, foi observado que para a amostra mantida seca 11% de umidade relativa (UR) a banda de *Soret* estava em 419 nm, característica do derivado hemoglobina-CO (figura IV.2). Para as amostras mais úmidas a banda se desloca para valores menores, sendo que para 93% de umidade relativa ela se encontra em 414 nm (figura IV.2).

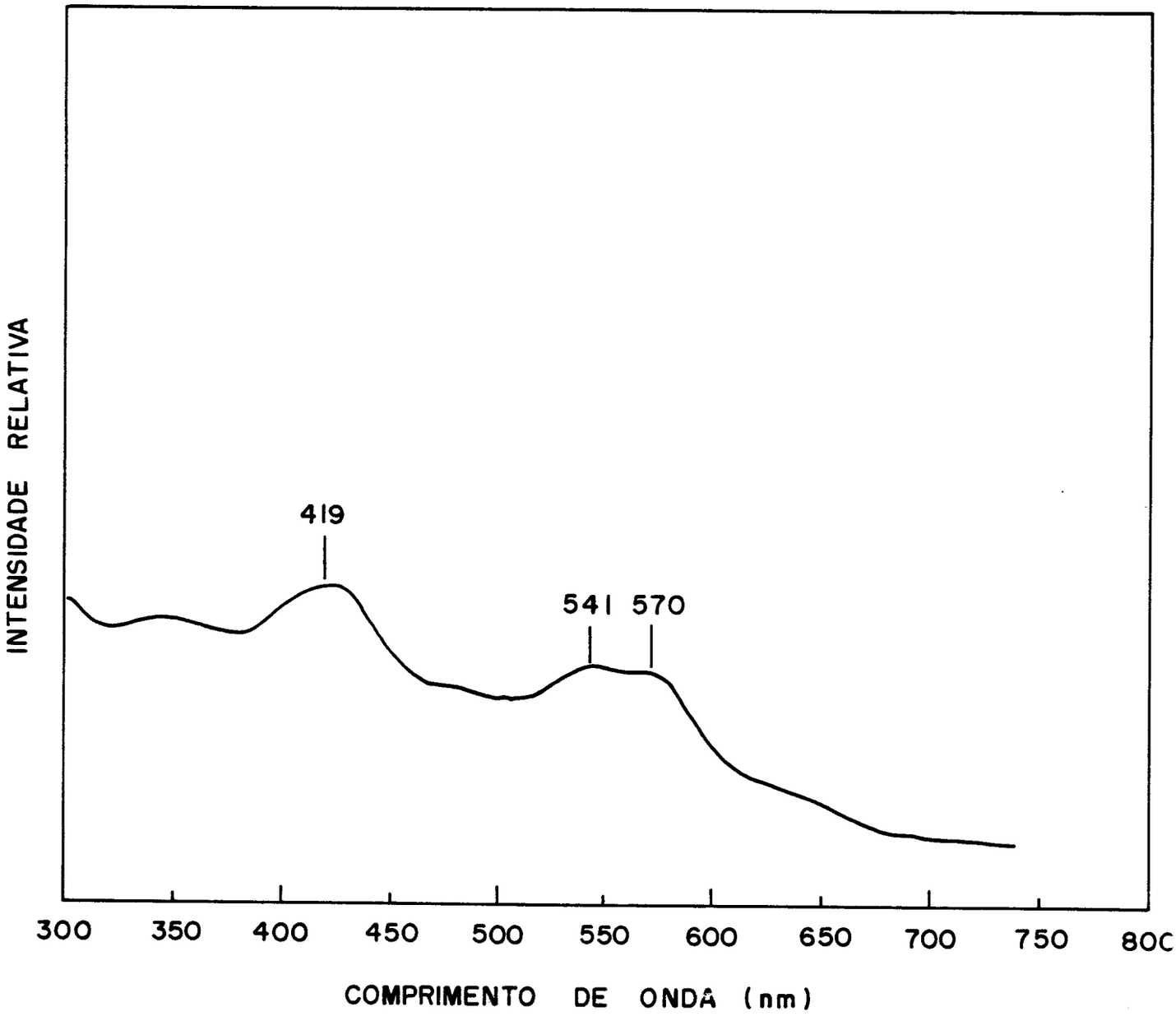



FIGURA IV.1:Espectro fotoacústico de hemoglobina em pó a 11% UR obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 4.

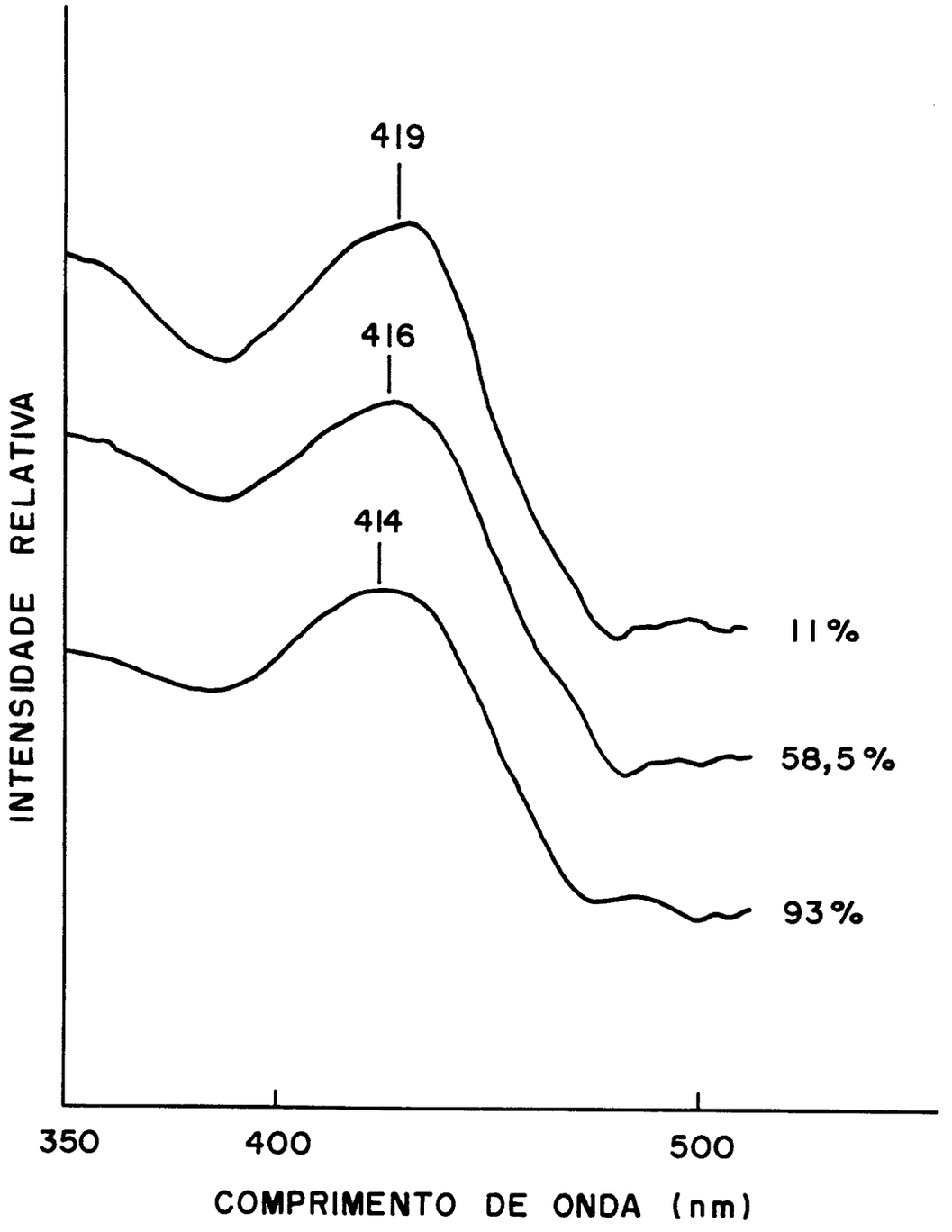


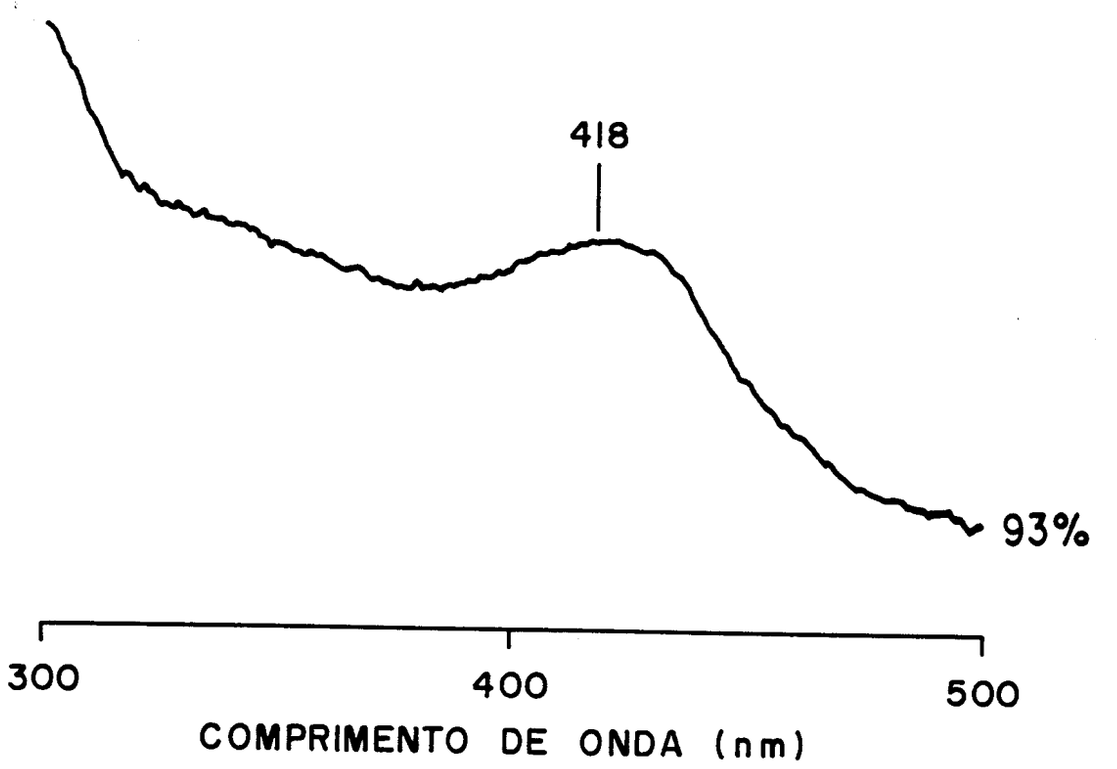

FIGURA IV.2:Espectros fotoacústicos de hemoglobina a 11%, 58,5% e 93% UR obtido em equipamento comercial a 80 HZ e *band pass* 4.

## IV.2. Resultados para Mioglobina (300 - 700 nm)

O mesmo comportamento foi observado para a mioglobina, como mostra os espectros da figura IV.3. Em baixa umidade (11%) a posição da banda de *Soret* está em torno de 424 nm, é característica do derivado hemoglobina-CO, enquanto que a alta umidade (93%) a posição da banda muda para 418 nm. Para a mioglobina também não foi possível resolver as bandas $\alpha$ e $\beta$, por isso elas não são apresentadas aqui.

## IV.3. Resultados para Hemoglobina (1,6 - 2,4 μm)

Devido ao fato de estarmos manuseando as amostras para colocá-las na camâra fotoacústica, seria interessante quantitar o conteúdo de água na amostra pelo próprio espectro. Na região do infravermelho de 1,6 a 2,4 μm nós temos uma banda devido a vibração da água em 1,95 μm [34] que tem a vantagem de ser intensa e não ter superposição com outras bandas. Além disso, há outra banda que é localizada em 2,2 μm devido as vibrações de N-H da proteína [35,36]. A intensidade da banda de água nos dá uma medida da hidratação da amostra, e a intensidade da banda de proteína nos dá uma medida da quantidade de amostra utilizada. Com a razão entre essas duas intensidades ($I_1$ e $I_2$ como mostrado na figura IV.4) obtem-se uma medida proporcional ao conteúdo de água por grama de proteína na amostra.



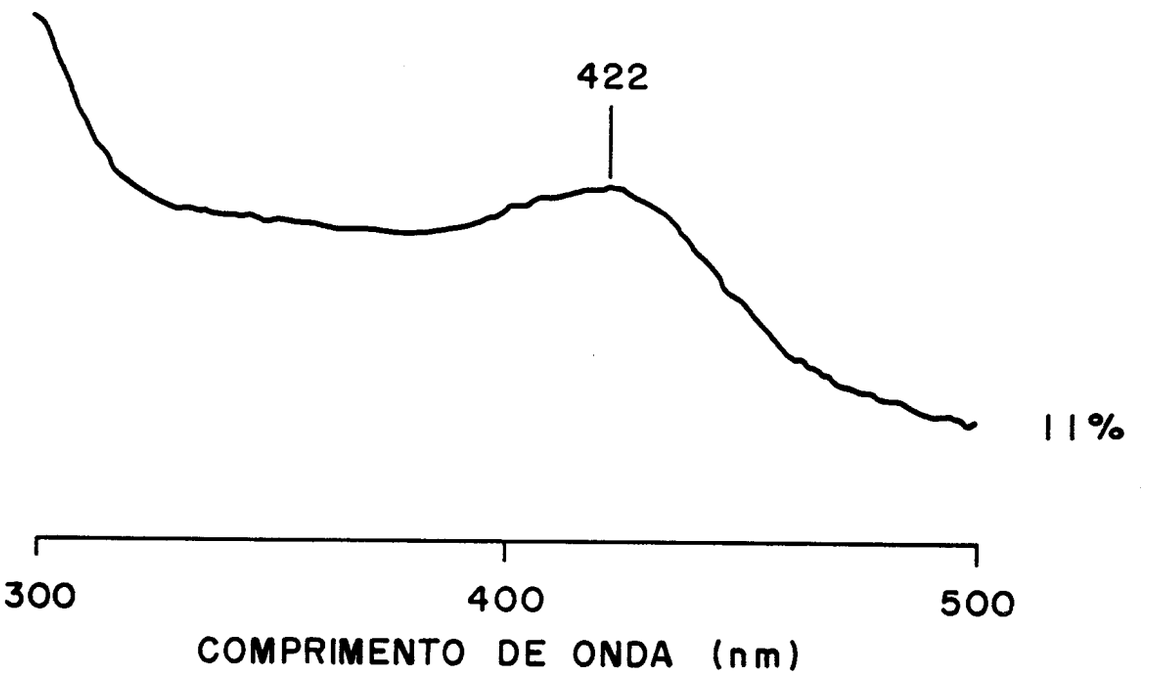




FIGURA IV.3:Espectros fotoacústicos de mioglobina a 11% e 93% UR obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 4.

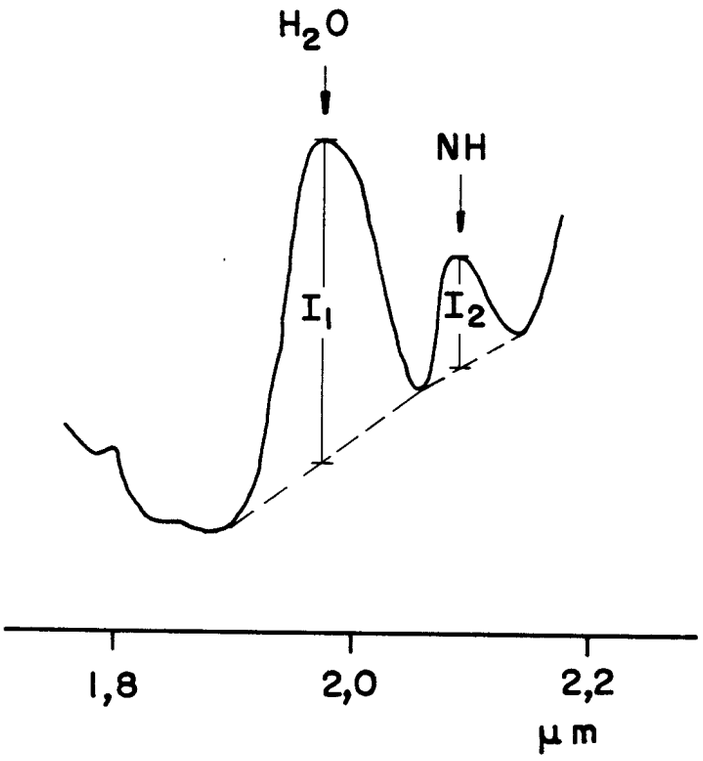



FIGURA IV.4:Espectro fotoacústico no infravermelho para hemoglobina a 11% UR, mostrando as bandas de $H_2O$ e NH, obtido em equipamento comercial a 90 Hz e *band pass* 2.

Foram obtidos, então, espectros na região do infravermelho para amostras mantidas em diferentes ambientes de umidade relativa, como mostra a figura IV.5.

Para, de fato, termos o conteúdo de água na proteína foram realizadas pesagens com as amostras após terem alcançado o equilíbrio com o ambiente de hidratação. Depois de pesadas elas foram mantidas por 24 horas em uma estufa a uma temperatura de 110°C e em seguida foram feitas outras pesagens. Comparando o peso das amostras secas com o das amostras úmidas obtivemos o conteúdo de água nas amostras, dado em g $H_2O$ por g proteína. A isoterma de absorção está mostrada na figura IV.6.

Agora podemos relacionar a quantidade de água obtida pela pesagem com a obtida pelas razões entre as intensidades $I_1$ e $I_2$. Esta relação está mostrada na figura IV.7 para as umidades relativas utilizadas. A reta traçada foi ajustada aos pontos experimentais utilizando o método de mínimos quadrados. O coeficiente de correlação do ajuste foi 0,93.

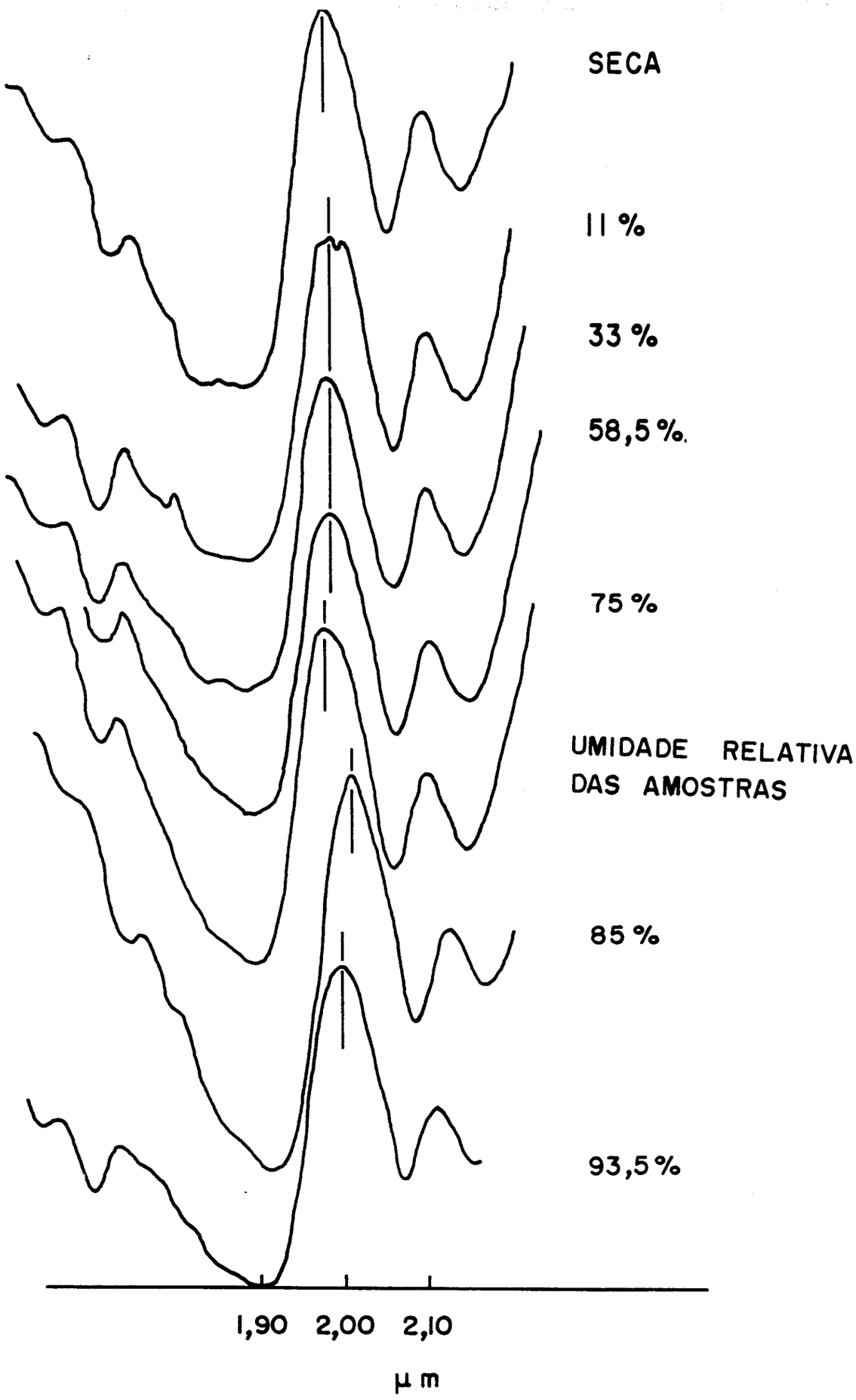



FIGURA IV.5: Espectros fotoacústicos no infravermelho para hemoglobina mantida em várias umidades relativa nas mesmas condições anteriores.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

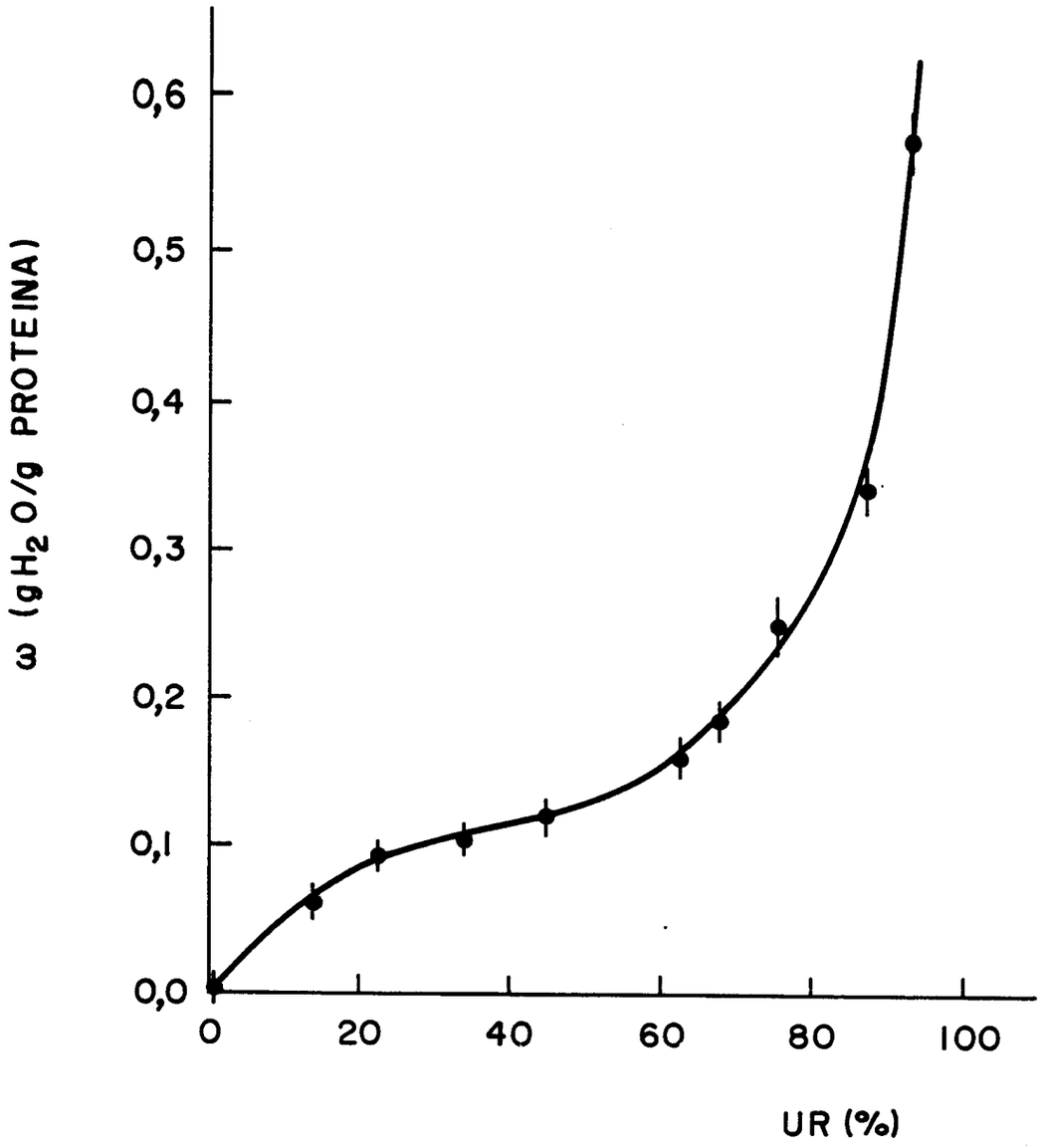



FIGURA IV.6:Gráfico da curva de isoterma de absorção.

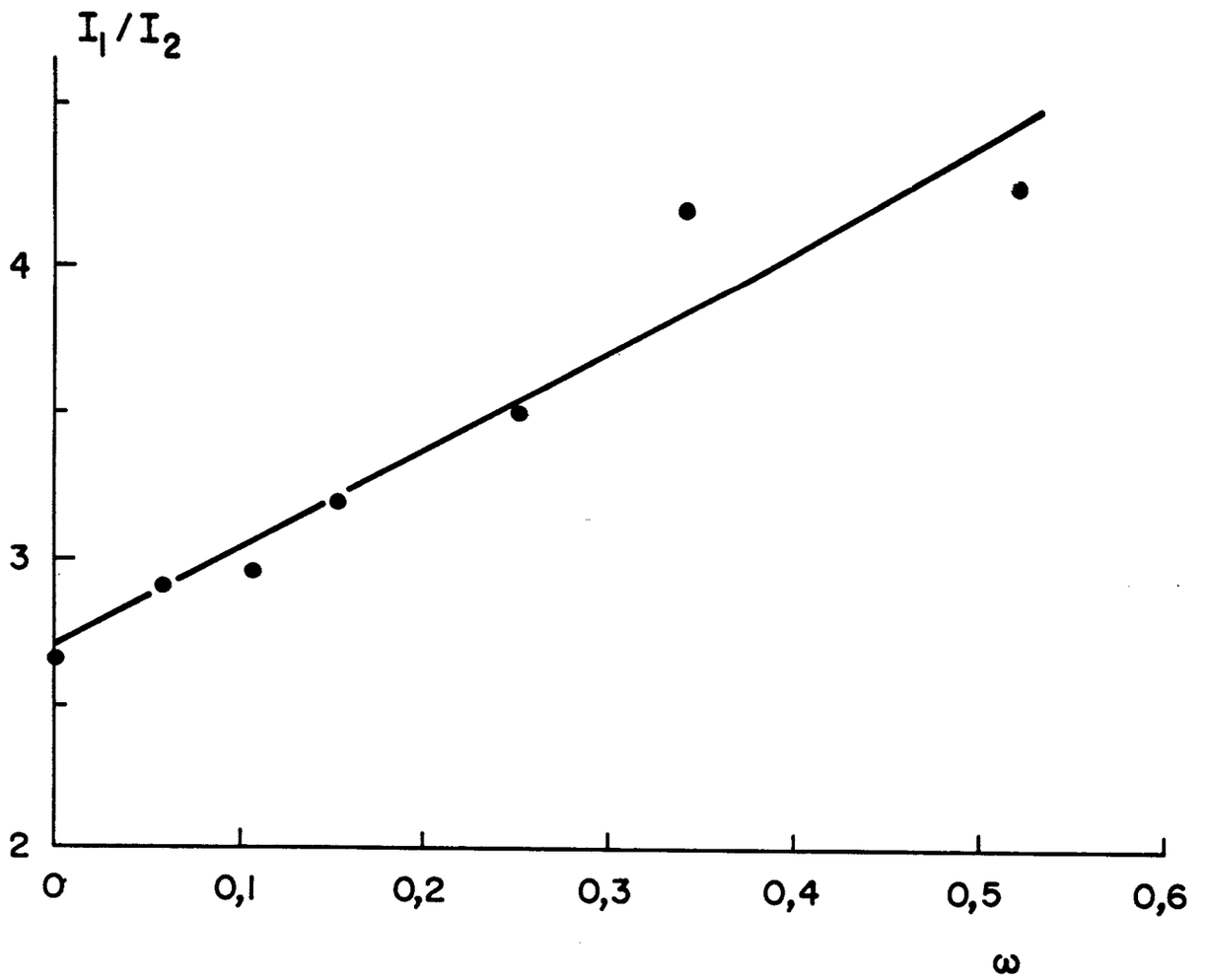



FIGURA IV.7:Gráfico da relação entre a razão das intensidades ($I_1/I_2$) e o conteúdo de água nas amostras.

O gráfico não mostra barras de erro porque as medidas não puderam ser repetidas. Esses dados preliminares indicam que a intensidade normalizada da banda em 1,95 μm pode servir como medida do conteúdo de água na amostra.

## IV.4. Resultados para Mioglobina ( 1,6 - 2,4 μm)

Espectros similares aos da hemoglobina foram obtidos para a mioglobina-CO de cavalo nesta mesma região do infravermelho, como está mostrado na figura IV.8 para amostras mantidas em 11% e em 93% de umidade relativa.

O estudo para a mioglobina não foi mais detalhado devido a pouca quantidade do material disponível.

Com a montagem de um espectrômetro fotoacústico em nosso laboratório, várias medidas foram feitas, visando complementar os dados para a hemoglobina na região visível. A seguir são mostrados os dados obtidos no equipamento montado em nosso laboratório para a hemoglobina.

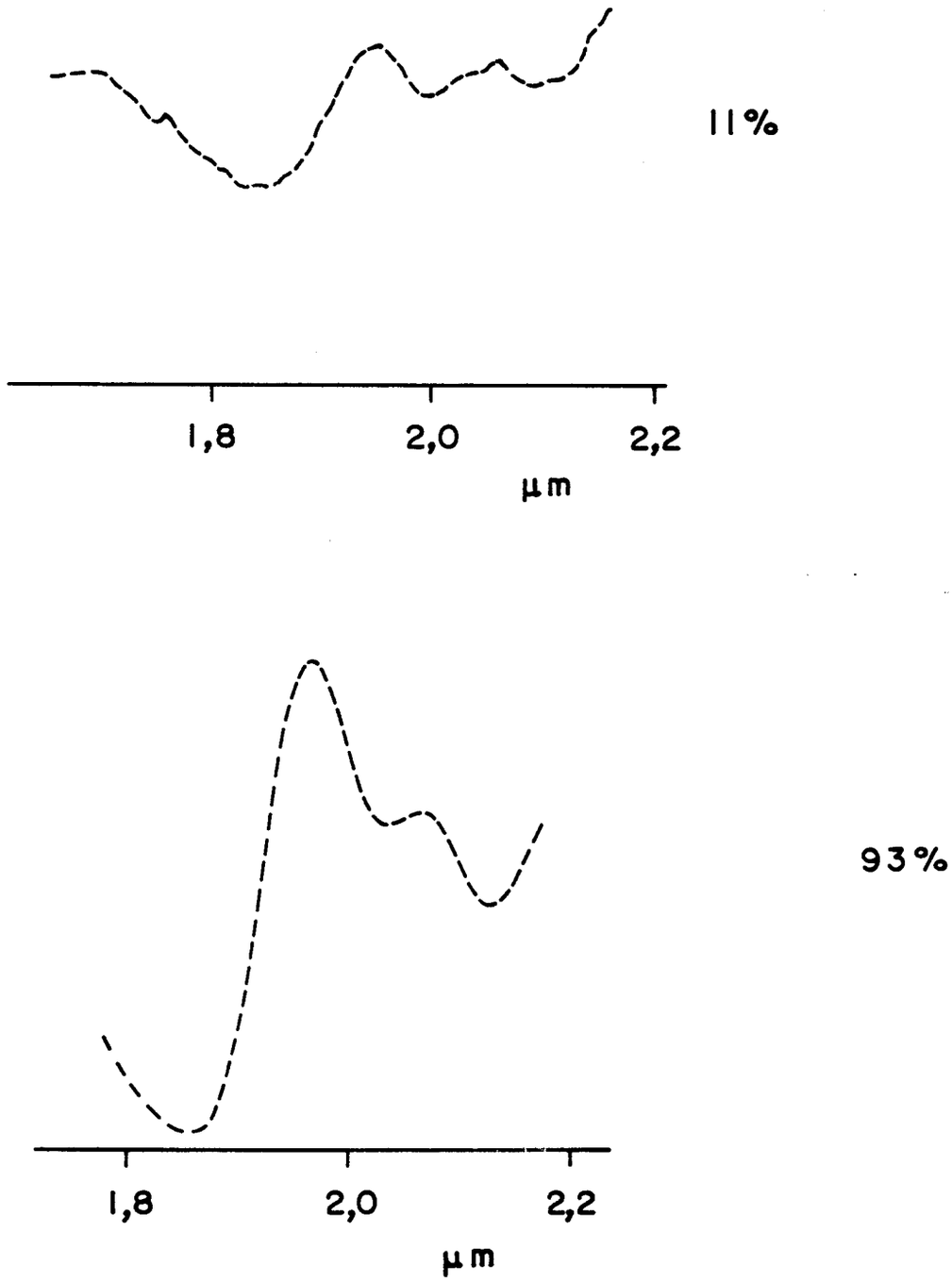



**FIGURA IV.8**:Espectros fotoacústicos no infravermelho para mioglobina de cavalo a 11% e 93% UR obtido em equipamento comercial a 80 Hz e *band pass* 2.

## IV.5. Testes com o Espectrômetro Fotoacústico

Um teste feito no equipamento foi quanto ao ruído originado na câmara fotoacústica. Para vermos isto foi feito o espectro para a lâmpada de xenônio, mostrado na figura IV.9. O espectro obtido mostra que na região entre 250 a 300 nm este sinal está bem próximo de zero. Nesta região é fácil perceber o nível de ruído do sinal, que sugere uma boa relação sinal/ruído.

Também verificamos a reprodutibilidade dos espectros obtidos, como mostrado na figura IV.10. A amostra utilizada foi a hemoglobina-CO em solução. Vê-se que ocorrem algumas variações na intensidade; mas o posicionamento das bandas não sofre deslocamento. Portanto, a determinação dos comprimentos de onda onde ocorrem as bandas são medidas bastante confiáveis.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

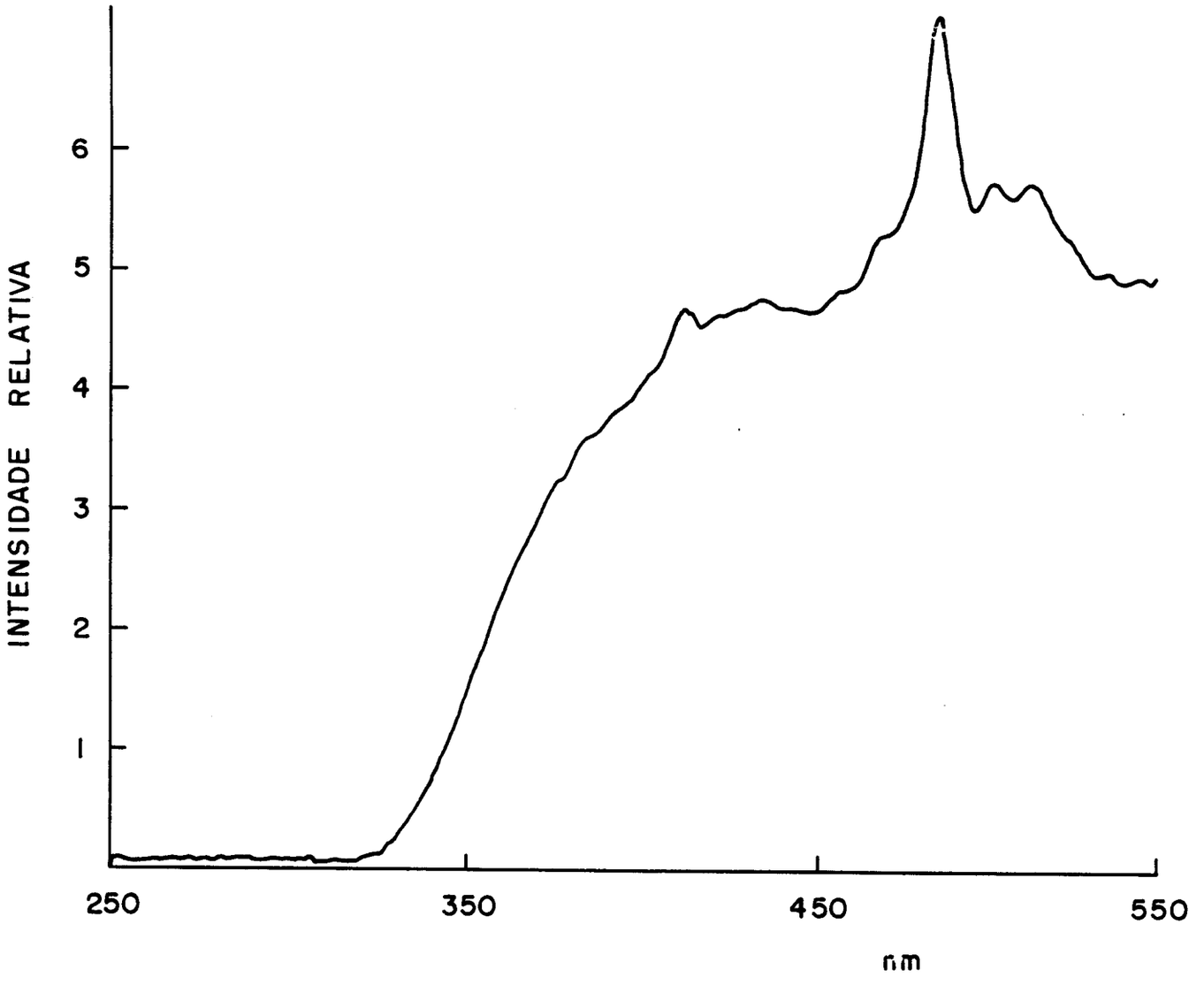



FIGURA IV.9:Espectro fotoacústico para a lâmpada de Xenônio obtido no equipamento montado com 15,9 Hz e largura de banda 6,4 nm demonstra a relação sinal ruído.

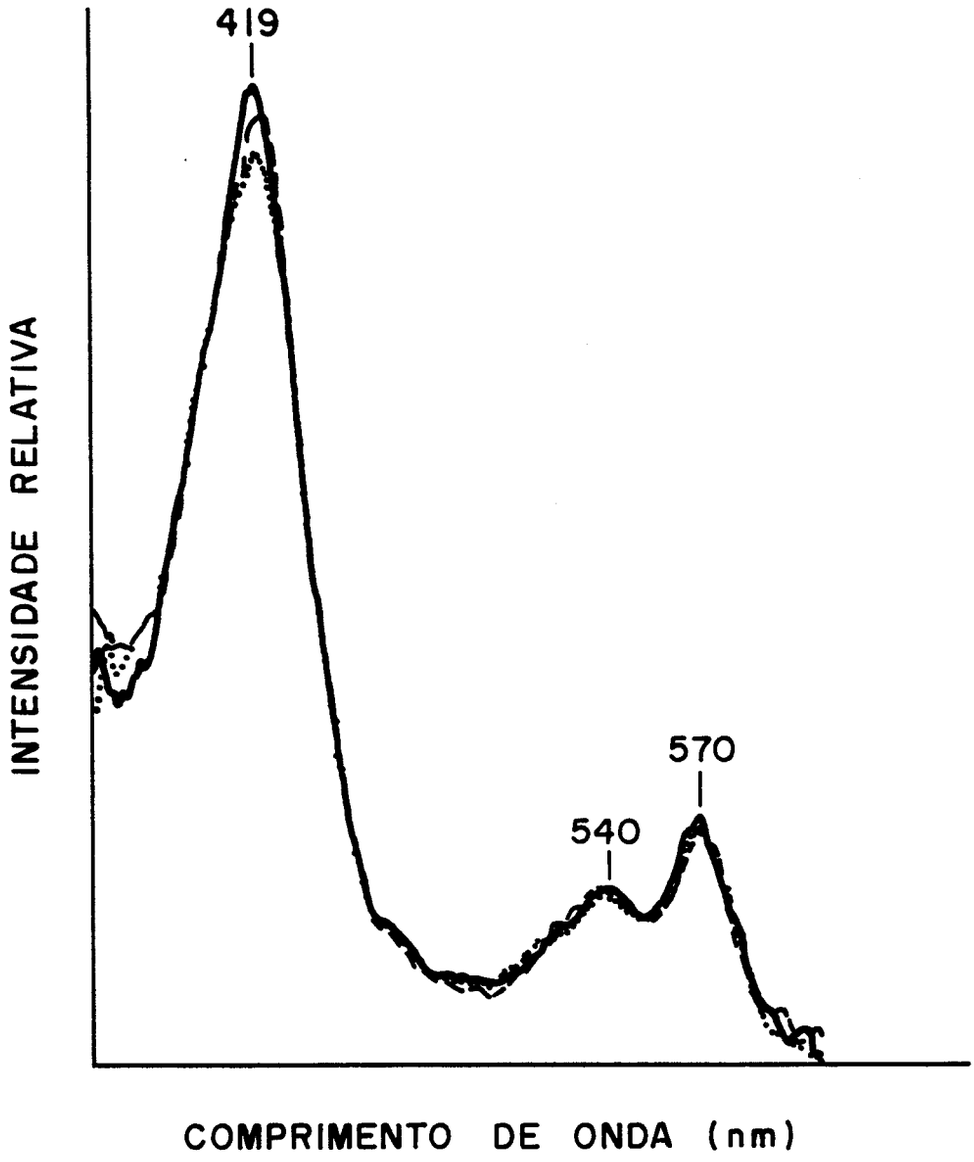



FIGURA IV.10:Espectro fotoacústico de hemoglobina-CO em solução obtido a 15,9 Hz e largura de banda 6,4 nm demonstra a reprodutibilidade do equipamento montado.

Fizemos ainda um espectro da hemoglobina-CO em pó a 11% UR, como mostra a figura IV.11. A posição das bandas é a esperada para este derivado da hemoglobina [23]. Além disso o espectro é bastante similar ao obtido com o espectrômetro fotoacústico comercial para a mesma amostra (ver figura IV.1).

### IV.6. Resultados para Hemoglobina

Com o espectrometro fotoacústico montado em nosso laboratório repetimos e ampliamos as medidas para hemoglobina mantida em vários ambientes de hidratação. A figura IV.12 mostra alguns dos espectros para hemoglobina-CO em pó na região da banda de *Soret*.

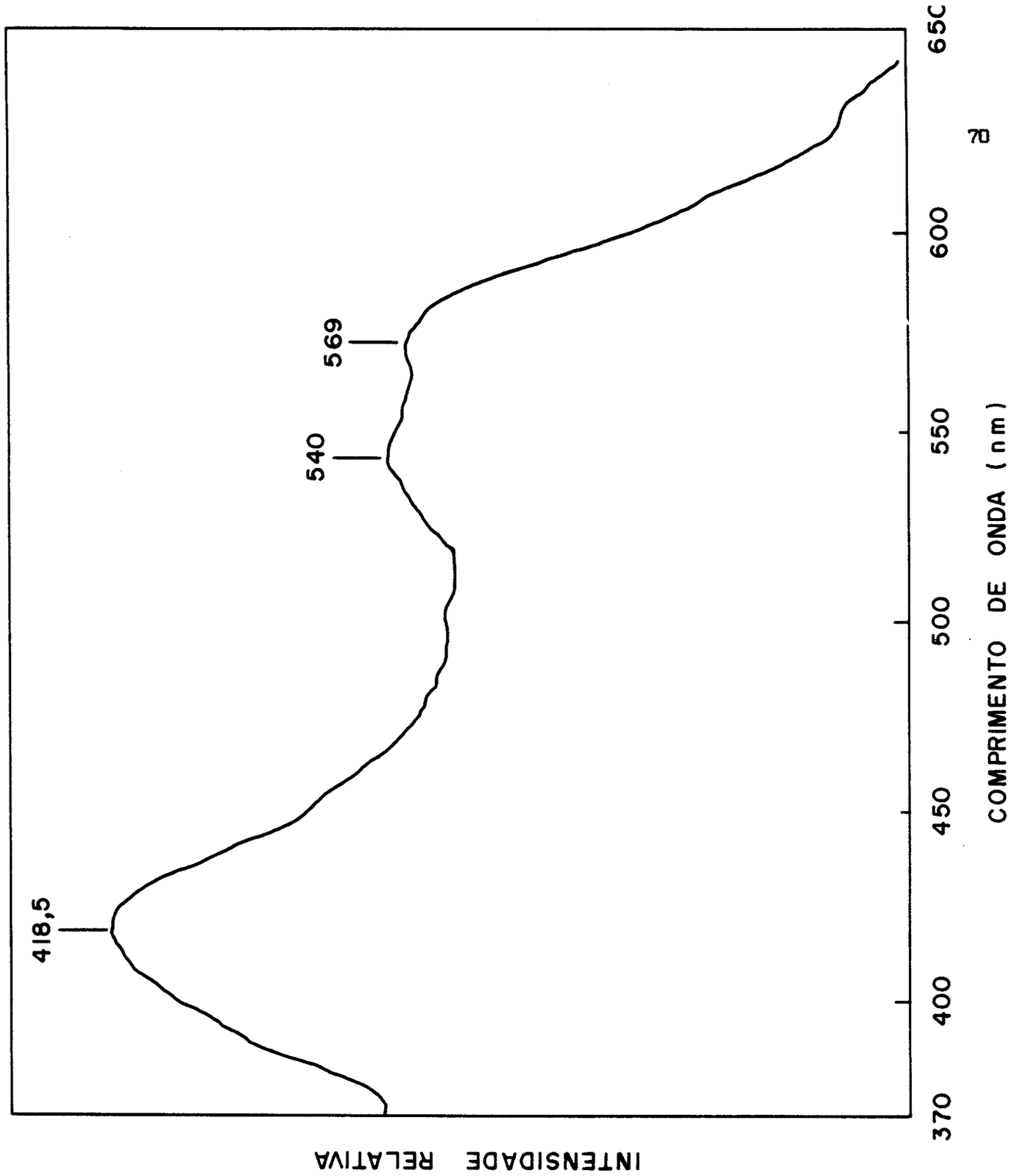



**FIGURA IV.11**:Espectro fotoacústico de hemoglobina-CO em pó a 11% UR obtido no espectrômetro montado a 78,1 Hz e largura de banda 3,2 nm.

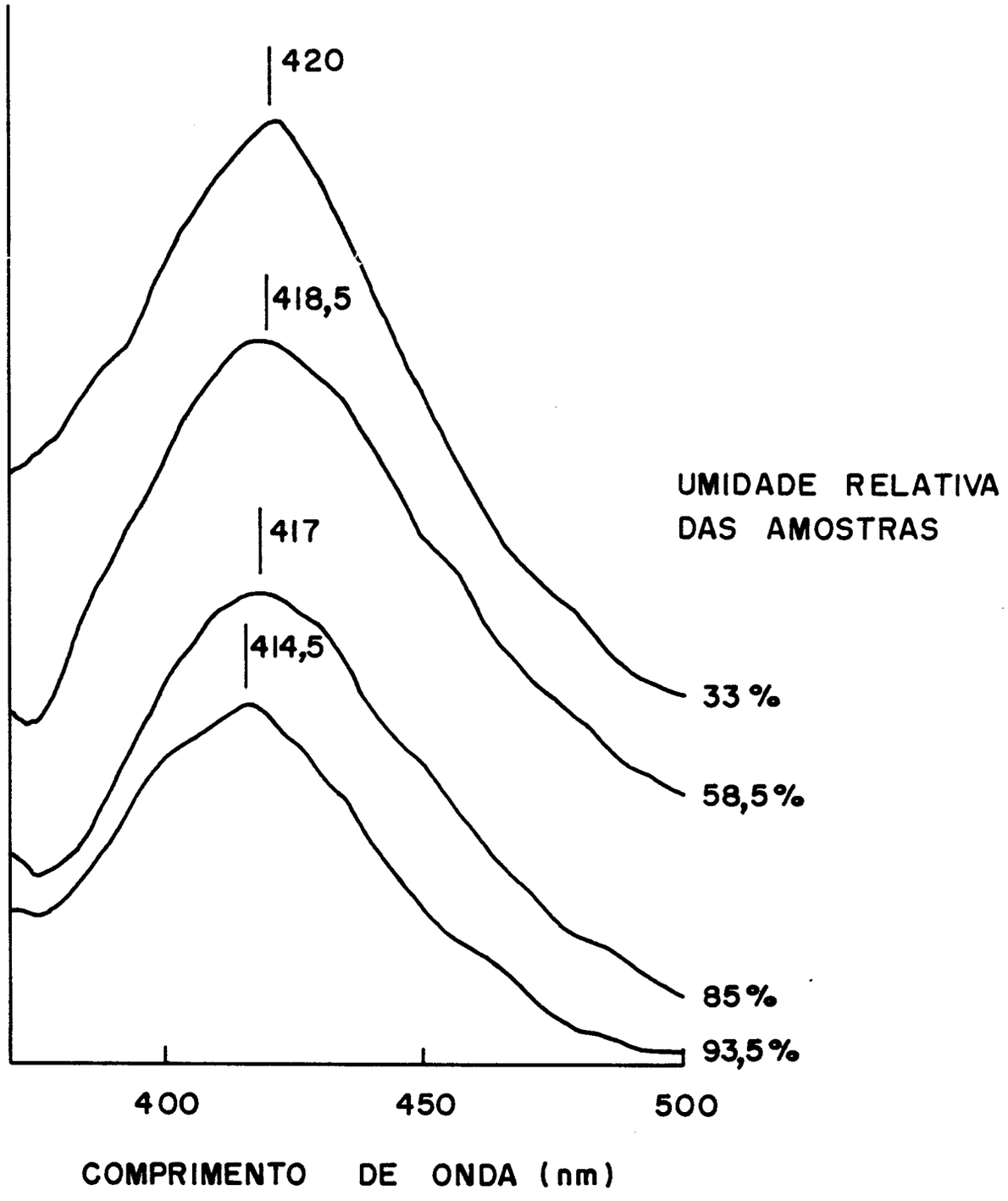



FIGURA IV.12: Espectros fotoacústicos de hemoglobina-CO em pó em vários ambientes de umidade relativa obtido no equipamento montado, a 78,1 Hz e largura de banda 3,2 nm.

Observa-se que a banda originalmente em torno de 420 nm para amostras mais secas, desloca-se para valores menores ao se aumentar a hidratação da amostra. Para a hidratação mais alta utilizada (93,5% de umidade relativa) a banda se encontra em torno de 414 nm.

Para melhor visualizar o deslocamento da banda de *Soret* como efeito da hidratação fizemos um gráfico da posição dessa banda em função da umidade relativa (figura IV.13).

Os valores assinalados foram obtidos da média de cinco medidas a partir das quais foram obtidos também os erros, indicados pelas barras. Apesar do erro ser grande, é evidente que com o aumento da umidade a posição da banda muda para valores menores. Uma possível explicação para esses erros é a variação da hidratação da amostra durante seu manuseio.

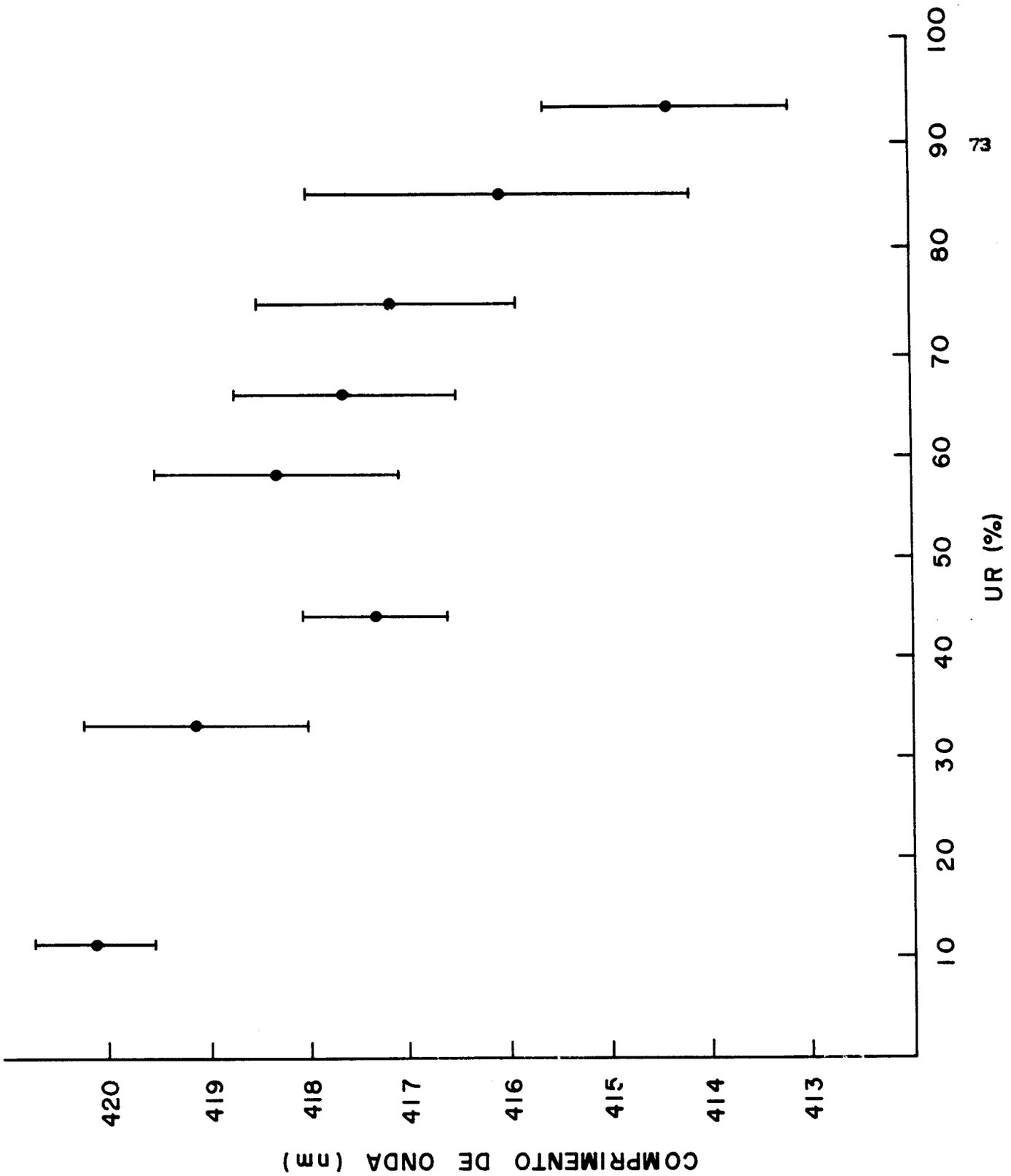





FIGURA IV.13:Gráfico da variação da banda de Soret com a umidade relativa.

# CAPÍTULO V

## DISCUSSÃO

# CAPÍTULO V

## DISCUSSÃO

Pelos dados obtidos e que foram apresentados no capítulo IV podemos comparar o espectrometro fotoacústico montado em nosso laboratório com o equipamento comercial. Também foi possível perceber o deslocamento na banda de *Soret* causado pela hidratação [12]. O equipamento não está em sua melhor performance, isto deve-se a problemas ou melhor a limitações da própria montagem, como por exemplo, fonte de luz com pouca potência, monocromador com rede de difração espectral apenas no visível, eficiência de apenas 47% do monocromador onde diminui ainda mais a potência de luz incidente sobre a amostra. Mesmo com estes pequenos detalhes é nos possível perceber a versatilidade do equipamento.

A performance do equipamento pode ser verificada a partir dos resultados mostrados no capítulo anterior. O teste da figura IV.9 nos mostra uma boa relação sinal ruído originado na câmara fotoacústica, não prejudicando assim os dados obtidos. Para testar a reprodutibilidade dos espectros, que era uma preocupação da nossa parte, foram feitas medidas com a mesma amostra de hemoglobina-CO nas mesmas condições (figura IV.10). Nota-se que a posição das bandas não muda, havendo apenas algumas variações de intensidade. Isto

deve ser devido às próprias oscilações de intensidade da fonte de luz utilizada. Isto mostra que os espectros posteriormente obtidos são confiáveis quanto a localização dos máximos de absorção. Como teste final do equipamento comparamos o espectro de hemoglobina-CO à 11% de umidade relativa (UR) obtido com o equipamento montado (figura IV.11) e com o equipamento comercial (figura IV.1) Percebe-se que eles são bastante similares, tanto na posição das bandas quanto na forma das linhas.

Como mostra nosso resultado na região do infravermelho (figura IV.5) uma vez obtida a curva de calibração (figura IV.7) é possível obter o conteúdo de água nas amostras a partir do próprio espectro. Este fato é de extrema importância no nosso caso, pois a hidratação pode variar durante o manuseio da amostra. Se é utilizado o próprio espectro, a quantidade de água obtida é aquela presente na amostra na hora da medida. Seria interessante, então, obter uma melhor curva de calibração.

Dos espectros para a hemoglobina na região do visível percebemos o efeito da hidratação através da mudança na posição da banda de *Soret*. A proteína preparada com CO e mantida a baixa umidade relativa tem a banda de *Soret* em torno de 419 nm, que é característica deste derivado [4]. No entanto, ao se aumentar a hidratação das amostras a posição da banda se move para valores menores chegando a 414 nm à 93% de umidade

relativa. A banda de *Soret* nesta posição caracteriza o derivado oxi [4]. Parece, então, que o oxigênio consegue deslocar o CO do grupo heme.

Abaixo de cerca de 33% podemos perceber que a proteína permanece com o CO como ligante. Acima de cerca de 33% de umidade relativa temos uma mistura dos derivados oxi e carbonil. Apenas em 93% de UR é que encontramos um espectro do derivado oxi puro.

O objetivo já anteriormente citado era de comparar os resultados para a hemoglobina na forma de pó obtidos por espectroscopia convencional, onde a amostra foi dissolvida em água, com os resultados da mesma proteína mantida na forma de pó obtidos por espectroscopia fotoacústica. Para os dados em que a amostra foi dissolvida, foi visto que abaixo de cerca de 45% de UR os espectros eram característicos do derivado carbonil [12]. Na faixa acima de cerca de 45% até cerca de 75% foi encontrada uma mistura de oxi e carbonil. Acima de cerca de 75% de UR passou a ter a forma oxi pura. Já os nossos dados diferem um pouco dos valores mencionados acima (33% ao invés de 45% e 93% ao invés de 75%). Essa diferença pode ter sido causada porque o pó tinha que ser posto em solução para serem feitas as medidas. Com isto tem-se a possibilidade da proteína ter obtido $O_2$ da água ao invés de tê-lo obtido do ar. No nosso caso a proteína foi mantida na forma de pó desde o preparo até serem realizadas as medidas e o

oxigênio só pode ter vindo do ar.

Através dos dados obtidos vimos que a proteína pode realizar a troca entre o CO e $O_2$. Isto é importante porque a função das hemoproteínas é de servirem como portadores para a molécula de $O_2$. Portanto podemos concluir que a funcionalidade da proteína não foi afetada pela desidratação ( pelo menos até 33% de UR).

A dependência da funcionalidade com a hidratação já havia sido estudada para a lisozima [37,38]. Foi visto que a baixa umidade relativa a funcionalidade da proteína era comprometida. A explicação dada foi que a proteína perdia a flexibilidade, que é essencial para a sua função. No entanto, com o aumento da hidratação a funcionalidade era readiquirida devido ao restabelecimento da flexibilidade conformacional. Este mesmo efeito de rígidez na estrutura deve ser observado para as hemoproteínas com baixa hidratação. Então, o que conseguimos com a desidratação é algo como o congelamento da sua estrutura. A desidratação causa, então, o mesmo efeito que a diminuição de temperatura, isto é, o congelamento de relaxações conformacionais que são essenciais para a atividade da proteina [39,40].

Uma interpretação plausível para os dados obtidos, quando a proteína é mantida a baixa umidade relativa. É que a proteína não possibilita a troca do ligante, devido a perda de flexibilidade conformacional. Para amostras mantidas a

alta umidade relativa, o que sugerimos é que com a recuperação da flexibilidade a proteína pode trocar CO por $O_2$. Também podemos perceber que a ligação Fe-CO para amostras mantidas na forma pó, é mais fraca do que quando as amostras estão em solução. Porque em solução não é observado a troca do CO por $O_2$. Há evidências da necessidade de flexibilidade da proteína para o acesso do ligante ao grupo heme por outras técnicas.

Além da flutuação conformacional há um outro fator importante na interpretação dos nossos dados. Dados de dinâmica molecular de mioglobina-CO [41], espectroscopia no infravermelho de mioglobina-CO e hemoglobina-CO desidratadas [42], espectroscopia Raman de mioglobina-CO à baixa temperatura [37], ressonância paramagnética eletrônica de hemoglobina-NO desidratada sugerem que na forma carbonil e nitrosil as hemoproteínas tem duas estruturas possíveis [13]. No caso da mioglobina, estudos de raio-X [43] mostraram que uma das conformações o acesso ao grupo heme está bloqueado pela histidina distal, enquanto que na outra conformação existe um canal que pode permitir a passagem do ligante (figura V.1). Nossos dados também podem ser interpretados sob este novo prisma como uma indicação de que à baixa umidade a proteína se mantém na forma fechada, enquanto que à alta umidade relativa a forma aberta também é acessível.

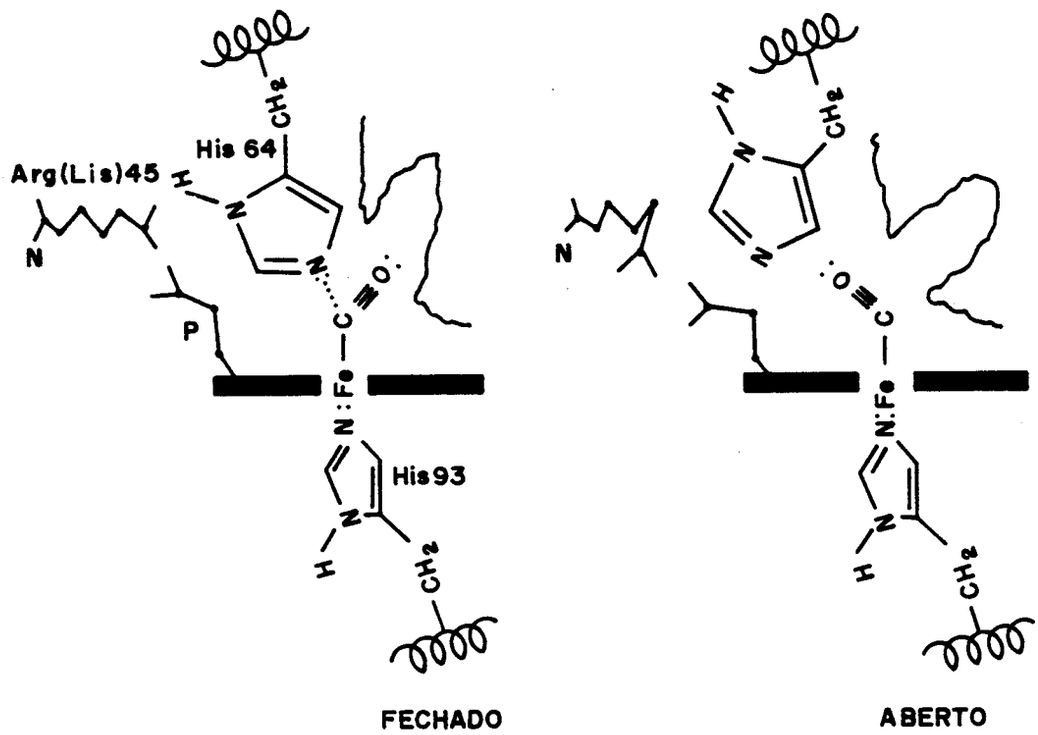



FIGURA V.1:Representação esquemática do bolso heme, mostrando a relação do ligante, e a geometria da ligação no grupo heme [37].

# CAPÍTULO VI

## CONCLUSÕES

# CAPÍTULO VI

## CONCLUSÕES

Nesta dissertação foram estudados os efeitos provocados pela hidratação na relaxação conformacional da hemoglobina utilizando um espectrômetro fotoacústico montado no nosso laboratório e um equipamento comercial.

Para verificar a performance do equipamento montado foram realizados testes e as vantagens e desvantagens em relação ao equipamento comercial estão citadas a seguir.

Vantagens sobre o espectrômetro fotoacústico comercial:

1. pelo fato de ser uma montagem, temos as partes do espectrômetro em modulos de modo que o sistema não impede que o mesmo equipamento seja utilizado com alguma modificação, para outros fins;

2. a utilização de fibra ótica facilita o alinhamento e proporciona uma maior flexibilidade para variações na câmara fotoacústica;

3. o *design* da câmara fotoacústica permite que sejam realizadas medidas de absorção bem como de transmissão e de reflexão do material estudado;

Limitações ou, propriamente dificuldades, que são apresentadas pelo equipamento, da maneira como ele se

encontra montado:

1. tempo de varredura do intervalo espectral maior que o do espectrometro comercial. Este tempo pode ser melhorado se tivermos um motor de passo mais rápido;

2. efeitos de flutuações na rede e na fonte que podem ser corrigidos com estabilizador e um *feedback*, respectivamente;

3. não interfaceamento com microcomputador onde os dados poderiam ser trabalhados. Por exemplo, fazer diferença espectral, deconvolução de bandas, etc... Isto pode ser solucionado tão logo sejam terminadas as placas de interface;

4. região espectral limitada ao visível. Um novo monocromador que chega até a região do infravermelho já está sendo adiquirido.

Em resumo, concluímos que o equipamento montado é muito versátil e eficiente.

É nossa intenção, em prosseguimento ao projeto, procurar efetuar as soluções propostas aos problemas encontrados.

Os resultados preliminares obtidos na região do infravermelho mostram que é possível quantitar a hidratação da proteína através do próprio espectro. Como foi visto podemos relacionar o conteúdo de água na proteína com a intensidade das bandas $I_1$ e $I_2$. A obtenção de uma boa curva de calibração é um dos nossos objetivos futuros.

Os estudos mais detalhados com a hemoglobina foram realizados para a região do visível, onde vimos a mudança na posição da banda de *Soret* como efeito de hidratação. Foi observado para altas umidades que a banda de *Soret* tem seu máximo em 414 nm que é característico de hemoglobina-$O_2$. Quando a proteína é mantida em baixas umidades relativas a banda de *Soret* está em 419 nm que é característico da hemoglobina-CO. Com este resultado sugerimos que a proteína precisa ter flexibilidade para possibilitar a troca do ligante, o que não ocorre à baixa hidratação. Sugerimos ainda que existem duas possíveis conformações para a hemoglobina, uma com o acesso ao bolso heme aberto e outra com o acesso fechado. A baixa hidratação a conformação deve ser a fechada (pois não há troca de ligante), enquanto que à alta hidratação a flutuação conformacional faz com que a estrutura da proteína oscile entre as duas conformações. Portanto, o ligante pode ser trocado quando a estrutura da proteína chega na forma aberta. O mesmo comportamento foi observado para a mioglobina. Para esta proteína, no entanto, não foi feito um estudo mais completo. Este resultado inicial análogo ao da hemoglobina é incentivador e justifica uma continuação do trabalho.

Propomos, como projeto futuro, utilizar esta técnica para procurar resolver uma controversia quanto ao efeito da desidratação de hemoproteínas. A questão a ser abordada é quanto ao estado de oxidação do íon de ferro do grupo heme. Os dados obtidos com a técnica de Ressonância

Paramagnética Eletrônica em meta-mioglobina em pó sugerem que a desidratação proporciona a redução deste íon [44]. O outro resultado conflitante, obtido de medidas realizadas com espectroscopia convencional para meta-mioglobina na forma de filme, indicam que o ferro do grupo heme permanece oxidado à baixa hidratação. Como os trabalhos utilizaram amostras preparadas de maneiras diferentes, a diferença dos resultados poderia vir daí. Utilizando a técnica de espectroscopia fotoacústica, podemos obter espectros de absorção da amostra na forma de pó, e assim verificar o resultado obtido por Ressonância Paramagnética Eletrônica. As medidas preliminares realizadas mostram que os espectros fotoacústicos para a meta-mioglobina mantida em ambiente com $P_2O_5$, tem suas bandas características para o derivado hemicromo [45], portanto com o ferro oxidado. Estes dados precisam ser mais trabalhados, pois seria importante verificar se não existe uma fração de ferro reduzido e que não é evidente no espectro. Com o interfaceamento do equipamento ao microcomputador será fácil fazer a simulação dos espectros.

Finalizando, temos certeza que a montagem deste equipamento acrescido dos melhoramentos propostos, abre um caminho para o estudo de inúmeros materiais e processos biológicos, que vão poder ser melhor entendidos. A possibilidade do estudo de material *in vivo*, torna o método de extrema valia na área de biofísica.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

## BIBLIOGRAFIA

1. Rosencwaig, A. *Rev. Sci. Instrum.*, **48**, (9) 1133-1137 (1977).

2. Rosencwaig, A., e Gersho, A. *J. Appl. Phys.* **47**, (1) 64-69 (1976).

3. McDonald, F. A., e Wetsel Jr., G. C. *J. Appl. Phys.* **49**, (4) 2313-2322 (1978).

4. Antonini, E. e Brunori, M. *"Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligand"*. NORTH-HOLAND, (1971).

5. Cantor, C. R. e Schimmel, P. R. *"Biophysical Chemistry Part I"*. W. H. Freeman and Company (1980).

6. Dickerson, R. E. e Geis, I. *"The Struture and Actoin of Protein"* W. A. BENJAMIN, INC. (1976).

7. Dickerson, R. E. e Geis, I. *"Hemoglobin: Struture, Function, Evolution, and Pathology"*, W. A. BENJAMIN, INC. (1983).

8. Kuntz, I. D. e Kauzmann, W. *Adv. Protein Chem.* **28**, 239-345 (1974).

9. Finney, J. L. e Poole, P. L. *Comments Mol. Cell. Biophys.* **2**, 129 (1984).

10. Maricic, S., Pifat, G. e Pravidic, G. *Berichet der Bunsengesellsdraft fur physikalishe Chemie (fruher Zectschrift fur Elektrochemie)* **68**, 787-793 (1964).

11. Bone, S. e Pethig, R. *J. Mol. Biol.* **181**, 323 (1985).

12. Sanches, R., Melo., L., B., W., e Colombo M., F.

*Biochim. Biophys. Acta,* ***874,*** 19-22 (1986).

13. Sanches, R. *Bioch. et Biophy. Acta,* ***955,*** 310-314 (1988).

14. Colombo M. F., Tese de Doutoramento DFCM, IFQSC, USP 1988.

15. Parak, F. , *"Methodos in Enzymology"* ***127,*** 196-207 (1986).

16. Rupley, J. A., Gratton, E. e Careri, G. *Trends Biochem. Sci.* ***8,*** 18 (1983).

17. Rosencwaig, A. *"Photoacoustic and Photoacoustic Spectroscopy"*. JOHN WILEY & SONS (1980).

18. Balasubramanian, D. *Biosci. Rep. (U.K.)* ***3,*** 981 (1983).

19. Moore, T. A. *Photochem. Photobiol. Rev.* ***7,*** 187 (1983).

20. Canaani, O. *Biochim. Biophys. Acta.* ***852,*** 74 (1986).

21. Carpentier, R., Matthijs, H. C. P., Leblanc, R. M., Hind, G. *Can. J. Phys.* ***64,*** 1136 (1986).

22. Rosencwaig, A. *Opt. Commmun.* ***7,*** 305 (1973).

23. Rosencwaig, A., Gersho, A. *Science.* ***190,*** 556 (1975).

24. Pao Y. H., *"Optoacoustic Spectroscopy and Detection"*, ACADEMIC PRESS (1977).

25. Bull, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* ***66,*** 1499-1507 (1944).

26. Schneider, M. J. e Schneider, A. S. *J. Membr. Biol.* ***9,*** 127-140 (1972)

27. Moore, J. H., Davis, C. C., Caplan, M. A. *"Building*

*Scientific Apparatus"*. ADDISON-WESLEY Publishing Company (1983).

28. BAUSH-LOMB - Instructions High Intensity Granting Monocromator 2a. edição - USA.

29. W. L. de B. Melo Tese de Dissertação de Mestrado DFCM, IFQSC, USP (1985).

30. PRINCETON APPLIED RESEARCH - Operating and Service Manual LIGHT CHOPPER MODEL 125A.

31. INTERSIL *"Component Data Catalog"*. INTERSIL, INC. 1987.

32. HEWLETT - PACKARD - Operating and Service Manual X-Y RECORD 7004B.

33. Alter, M. G. *J. Biol. Chem.* ***258,*** 14966 (1983).

34. Di Ioro., E. E. . *Methodos in Enzymology* ***76,*** 57 (1981).

35. W. C. McCabe, S. Subramanian e H. F. Fisher. *J. Phys. Chem.* ***74*** , 4360 (1970).

36. N. Ressler, Ziauddin, C. Vygantas, W. Janzen e K. Karachourlu. *Applied Spectroscopy* ***30*** , 295 (1976).

37. Campbell, B. F., Chance, M. R. e Friedman, J. M. *J. Biol. Chem.* ***262,*** (31), 14885-14890 (1987).

38. Careri, G., Giansanti, A. e Rupley, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* ***83,*** 6810-6814 (1986).

39. Doster, W., Bachleitner, A., Dunau, R., e Dransfeld, K. *Phys. Rev. Lett.* ***47*** , 685 (1981).

40. Kent, M. *J. Microwave Power* ***12,*** 341 (1977).

41. Kuriyan, J., Wilz, S., Karplus, M., e Petsko, G. A. J. *Mol. Biol.* ***192*** , 133-154 (1986).

42. Brown III, W. E., Sutcliffe, J. W. e Pulsinelli, P. D. *Biochemistry,* ***22,*** 2914-2923 (1983).

43. Ringe, D., Petsko, G. A., Kerr, D. E. e de Montellano, P. R. O. *Biochemistry,* ***23,*** 2-4 (1984).

44. Martin, L. N., Nascimento, O. R., Tabak, M. e Caracelli, I. *Biochim. Biophys. Acta,* ***956,*** 189-196 (1988).

45. Bohm, S. e Abaturov, L. V. *FEBS Letters* ***77,*** (1) 21-24 (1977).