

Nº 8, dez/96, p. 1-4

RECOMENDAÇÕES SOBRE A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DERIVAÇÃO PARA AUMENTO DE RESOLUÇÃO EM ESPECTROS DE FTIR DE PROTEÍNAS

Rubens Bernardes Filho¹
Lucimara Aparecida Forato²
Luiz Alberto Colnago³

Um dos principais objetivos da determinação das estruturas tridimensionais de proteínas é fornecer subsídios para a compreensão dos processos biológicos, como os mecanismos de reações enzimáticas, da ação de anticorpos, transporte de oxigênio e transporte através de membranas, dentre outros. Além da importância científica, a determinação da estrutura das proteínas tem grande interesse econômico, pois é uma das mais importantes informações usadas no planejamento de drogas e vacinas. Conhecendo-se as estruturas das proteínas envolvidas num processo de infecção viral, é possível projetar drogas para seu controle com grande precisão, como nos inibidores de protease.

Neste contexto, a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido bastante usada para quantificação de estruturas secundárias de proteínas, por ser rápida e simples, além de ser bastante difundida, pois o aparelho é encontrado e utilizado na maioria dos laboratórios das universidades e centros de pesquisa do Brasil. Outra vantagem é que pode ser usada tanto para amostras em solução como em estado sólido (Forato, 1996). Um dos problemas da FTIR reside no fato de que a análise das estruturas secundárias de proteínas (ESP) é baseada na banda de amida I (1600 a 1700 cm^{-1}), que é uma banda larga formada pela sobreposição de vários picos. Esse fato dificulta a identificação e quantificação dos mesmos dentro da banda.

A resolução e quantificação desses componentes têm sido motivo de controvérsias. Por esse motivo avaliou-se, neste trabalho, a capacidade de quantificação da segunda derivada com o uso de espectros simulados, que possibilitam o controle sobre todos os parâmetros usados. Para espectros reais isso não é possível por diferentes motivos, por exemplo: podem ocorrer distorções instrumentais, interferência de solventes, impurezas, ruídos, sobreposição de bandas, entre outros.

¹ Físico, MSc, EMBRAPA-CNPDIA, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP

² Química, MSc, USP-IQSC, Caixa Postal 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP

³ Farmacêutico, PhD, EMBRAPA-CNPDIA, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP

CT/8, CNPDIA, dez/96, p.2

Os espectros foram simulados, em ambiente MATLAB, utilizando a função lorentziana da equação (1).

$$A = \frac{A_0 \gamma^2}{(\gamma^2 + (\nu - \nu_0)^2)} \quad (1)$$

onde: A_0 = intensidade do sinal; γ = meia largura na meia altura; ν = faixa espectral; ν_0 = frequência do sinal.

Os espectros foram simulados com resolução de 2 cm^{-1} e faixa espectral de 1550 a 1750 cm^{-1} e transferidos para Origin 4.0, onde foram calculadas as derivadas usando o algoritmo de Savitsky & Golay (1964).

Os espectros foram simulados, como função lorentziana, considerando-se que as absorções do infravermelho são do tipo lorentzianas, com pouca contribuição de gaussiana.

É importante salientar que a quantificação baseada no uso das derivadas é dependente da relação entre as áreas e/ou intensidades relativas e não dos valores absolutos.

A segunda derivada de um sinal lorentziano (A'') é:

$$A'' = \left\{ \frac{-2A_0\gamma}{[\gamma^2 + (\nu - \nu_0)^2]} \right\} \left\{ 1 - \frac{4(\nu - \nu_0)^2}{[\gamma^2 + (\nu - \nu_0)^2]} \right\} \quad (2)$$

Pode-se observar pela equação (2) que a segunda derivada tem sinal negativo e nas figuras a seguir o seu sinal será invertido para facilitar a visualização.

A figura 1 mostra que a derivada reduz a largura de linha do sinal; no entanto, ocasiona uma distorção do mesmo alterando a sua base. A meia largura da segunda derivada, γ'' , está relacionada à meia largura do sinal original por meio da equação (3).

$$\gamma'' = \left(\frac{1}{2,7} \right) \gamma \quad (3)$$

CT/8, CNPDIA, dez/96, p.3

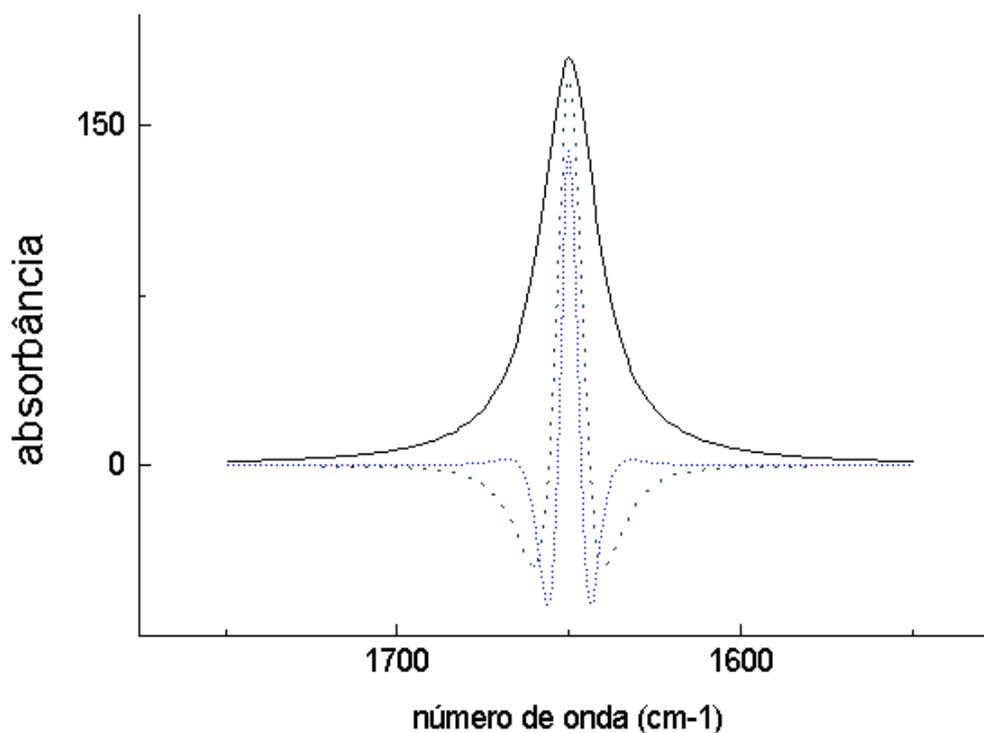


Figura 1 - Sinal lorentziano em 1650 cm^{-1} (—) e suas 2ª (- - -) e 4ª (....) derivadas multiplicadas por (-1).

Para um sinal composto de dois picos de mesma intensidade e 10 cm^{-1} de meia largura na meia altura, a distinção entre os dois picos pelas derivadas só começa a ser observada a partir de 8 cm^{-1} e 6 cm^{-1} , para a segunda e quarta derivadas respectivamente. Para sinais com diferenças de intensidade como os da figura 2, a distinção pela segunda e quarta derivadas, só começa em 10 e 8 cm^{-1} , respectivamente, ou seja, a segunda derivada só distingue sinais com separação igual ou superior à sua meia largura na meia altura.

CT/8, CNPDIA, dez/96, p.4

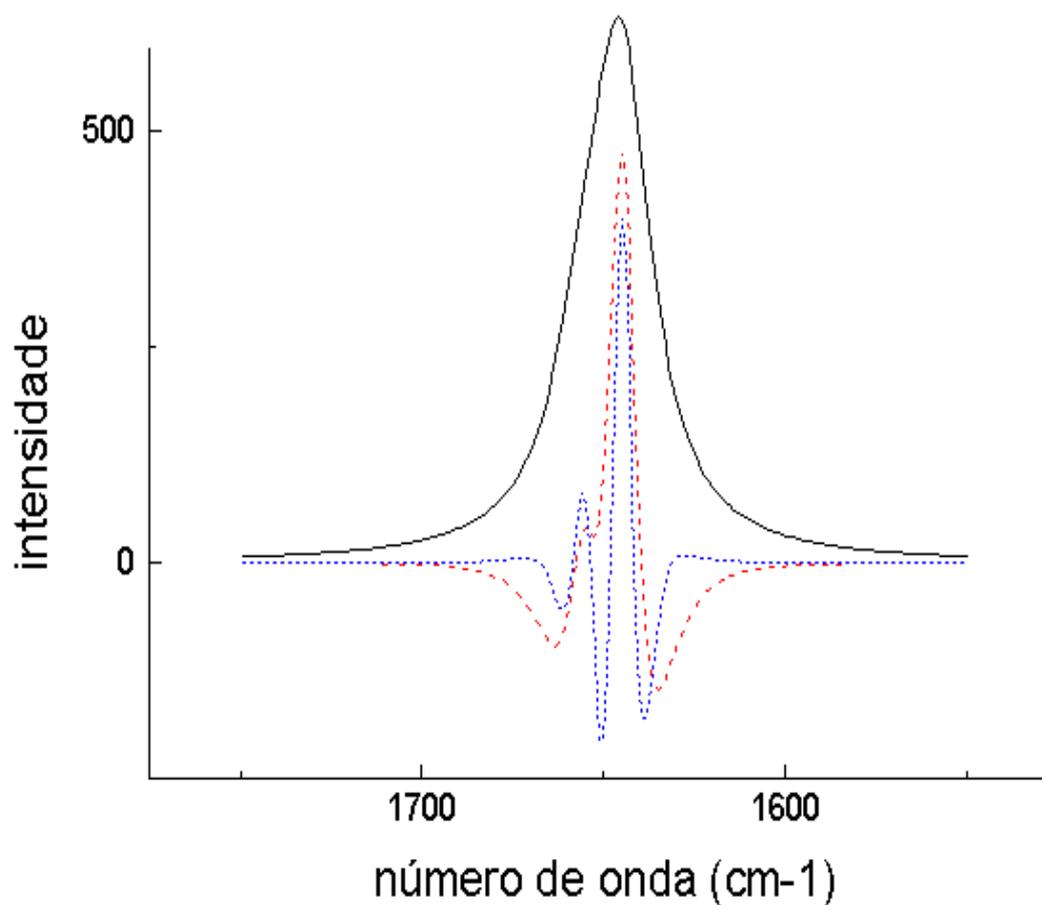


Figura 2 - Sinal (—) composto por dois picos e sua 2ª (---) e 4ª (- - -) derivadas multiplicadas por -1, com razão de intensidades 3:1, 10 cm⁻¹ de meia largura na meia altura e faixa de absorção de 1645-1655 cm⁻¹.

Na figura 2 pode-se notar a grande distorção do sinal de baixa intensidade. Além disso, não há como definir com precisão uma linha de base, tanto para o cálculo das intensidades quanto das áreas.

Um problema adicional é encontrado com o uso de derivadas quando as larguras de linhas dos sinais não são iguais. A intensidade da segunda derivada de um sinal lorentziano (33) é dada por:

$$I'' = -\frac{2I}{(2,7\gamma'')^2} \quad (4)$$

ou seja, a intensidade da derivada do sinal é inversamente proporcional ao quadrado da meia largura original. Um exemplo desse efeito pode ser visto na figura 3, onde foram simulados espectros com mesma intensidade e largura de linha 11 e 10 cm⁻¹. A separação foi de 60 cm⁻¹ para melhor visualização do problema.

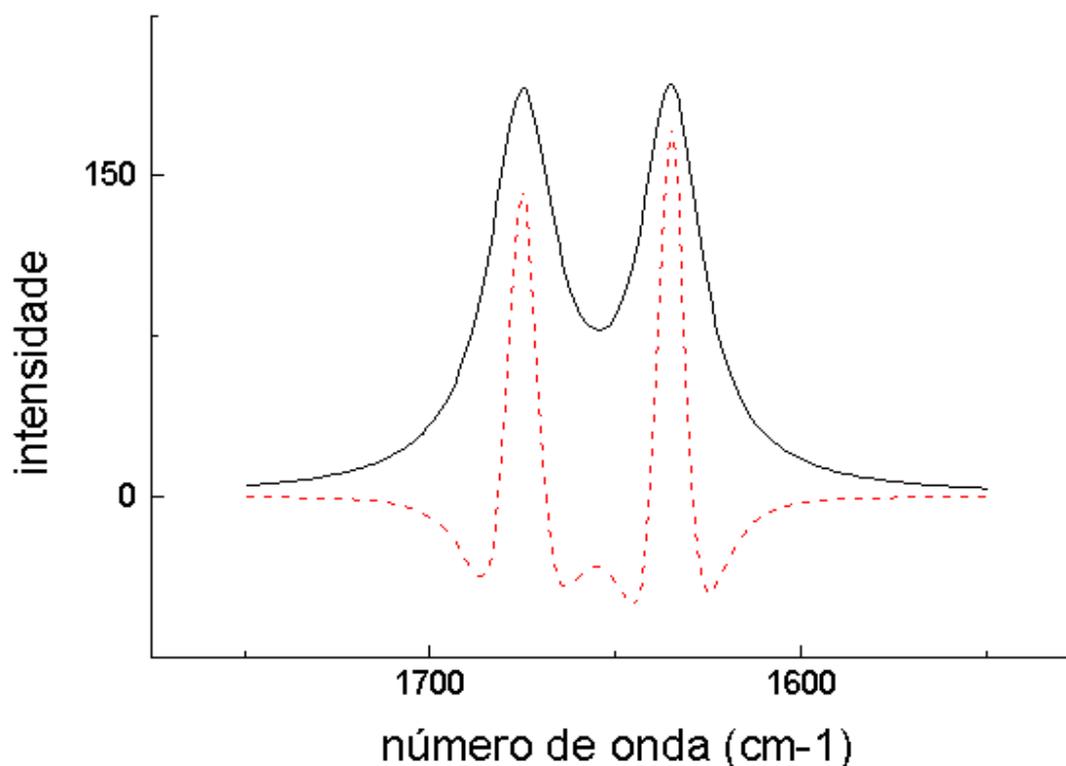


Figura 3 - O sinal simulado (—) com dois picos separados por 60 cm^{-1} , intensidades iguais e com meia largura de linhas de 10 e 11 cm^{-1} e a sua segunda derivada (- - -).

Após derivação, o pico com maior largura de linha teve sua intensidade reduzida a 80% da intensidade do sinal mais estreito (10 cm^{-1}) (figura 3). A área do sinal mais largo sofreu uma redução de 82% em relação ao sinal mais estreito.

Com base nesses dados, fica evidente que as derivadas só podem ser usadas em análises quantitativas quando as larguras de linha são iguais e quando os sinais estão separados em número de ondas maiores que suas meias larguras à meia altura e com pequenas diferenças de intensidade. Como em espectros reais de proteínas isso não é garantido, as derivadas só devem ser utilizadas em análises qualitativa ou semiquantitativa, e não como método quantitativo.

Referências Bibliográficas

- FORATO, L.A. **Determinação das estruturas secundárias de proteínas, em estado sólido, por FTIR.** São Carlos : USP -IQSC, 1996, Dissertação Mestrado.
- SAVITSKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, Washington, v.36, n.8, p.1627-1639, 1964.