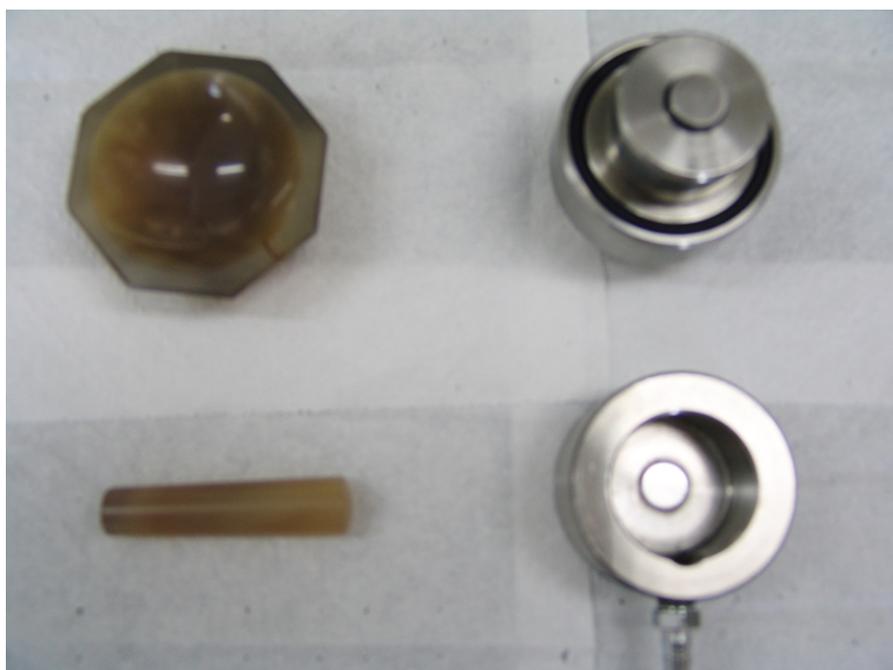


Documentos

51

A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações.



ISSN 1518-7179

Outubro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 51

A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações.

Lucimara Aparecida Forato
Rubens Bernardes Filho
Denise Osiro
Tatiana de Campos Bicudo
Luiz Alberto Colnago

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Sandra Protter Gouvea
Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Capa: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2010): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Instrumentação

F692e Forato, Lucimara Aparecida
A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. / Lucimara Aparecida
Forato, Rubens Bernardes Filho, Denise Osiro, Tatiana de Campos Bicudo, Luiz Alberto Colnago. –
São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010.
14 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos 51, ISSN 1518-7179; 51).
1. Espectroscopia. 2. Infravermelho. 3. Estrutura secundária de proteínas. 4.
Bactérias. I. Bernardes Filho, Rubens. II. Osiro, Denise. III. Bicudo, Tatiana de Campos.
IV. Colnago, Luiz Alberto. V. Título. IV. Série.

Autores

Lucimara Aparecida Forato,
Química, D.Sc., pesquisadora,
Embrapa Instrumentação,
Rua XV de Novembro, 1452
São Carlos, SP, CEP 13560-970
lucimara@cnpdia.embrapa.br

Rubens Bernardes Filho,
Físico, D.Sc., pesquisador
Embrapa Instrumentação,
Rua XV de Novembro, 1452
São Carlos, SP, CEP 13560-970
rubens@cnpdia.embrapa.br

Denise Osiro,
Química, D.Sc., Docente,
UNIFEG - Centro Universitário da
Fundação Educacional Guaxupé,
Av. Dona Floriana 465 - Centro
CEP: 37800-000 -
Guaxupé/MG
deniseosiro@hotmail.com

Tatiana de Campos Bicudo,
Química, D.Sc., Docente,
UFRN – Escola de Ciências e Tecnologia,
Campus Universitário Lagoa Nova |
CEP 59072-970 - Natal/RN
tatianabicudo@ect.ufrn.br

Luiz Alberto Colnago,
Farmácia, D.Sc, pesquisador,
Embrapa Instrumentação,
Rua XV de Novembro, 1452
São Carlos, SP, CEP 13560-970
colnago@cnpdia.embrapa.br

Apresentação

A espectroscopia na região do infravermelho, uma das espectroscopias vibracionais, é extremamente útil para análise da presença de grupos químicos em diversos tipos de amostras. Neste trabalho apresentamos resultados obtidos com essa técnica para análise de estruturas secundárias de proteínas de forma rápida e sem uso de solventes. Além disso, apresenta-se resultados de análises de metabolismo de bactérias relacionadas às doenças dos citros.

Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Chefe Geral

Sumário

Introdução	6
O espectrômetro de infravermelho	8
Digitalização de sinal	10
Aplicações realizadas pelo grupo de pesquisa	11
Referências	13

A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações.

Lucimara Aparecida Forato
Rubens Bernardes Filho
Denise Osiro
Luiz Alberto Colnago

Introdução

A espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) ou espectroscopia IV tem uma larga faixa de aplicações que vai desde a análise de moléculas pequenas até sistemas complexos como células e tecidos (BERTHOMIEU e HIENERWADEL, 2009). Ela é uma das espectroscopias vibracionais e sofreu grandes avanços principalmente pelo fato de que os espectrômetros de infravermelho são facilmente encontrados na maioria dos laboratórios de pesquisa, pela possibilidade de usar a amostra em estado sólido amorfo ou cristalino, soluções aquosas, solventes orgânicos, filmes, pastilhas de KBr e membranas (MANTSCH e CHAPMAN, 1995; FORATO et. al., 1998a; COLNAGO, 1991).

Assim como qualquer técnica espectroscópica, a espectroscopia no IV é devida à interação da radiação, no caso IV, com a matéria, e ocorre com o acoplamento do campo elétrico oscilante da vibração molecular e o da radiação incidente. A faixa de radiação do infravermelho, no espectro eletromagnético, ocorre na faixa entre o visível e microondas (Figura 1), sendo que a faixa de maior interesse se encontra na região de 4000 a 400 cm^{-1} (CANTOR e SCHIMMEL, 1980).

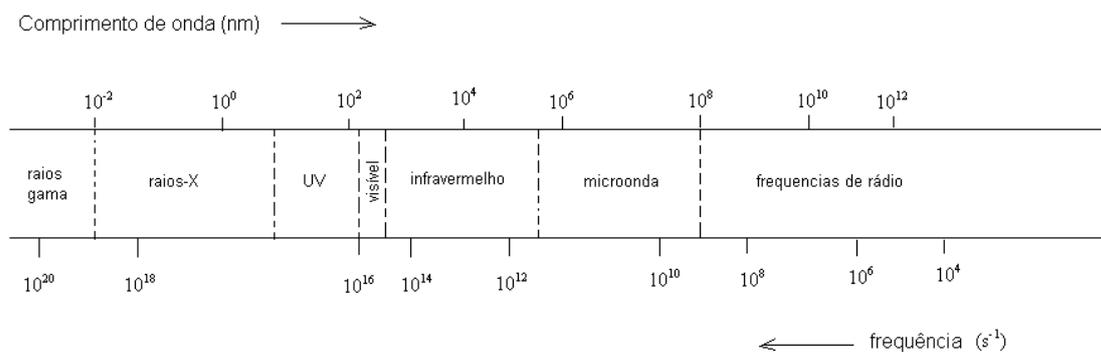


Figura 1: Representação esquemática do espectro eletromagnético.

Para que uma determinada molécula apresente absorção no IV, suas vibrações moleculares devem resultar numa alteração do momento dipolar. As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais ou estiramentos e deformações angulares. Os estiramentos são as alterações da distância internuclear dos átomos envolvidos, ou seja, aumento e diminuição dessa distância, alternadamente. Já as deformações angulares podem consistir de uma mudança no ângulo de ligação com um grupo de átomos ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao restante da molécula.

O número de modos vibracionais de uma molécula é determinado de acordo com seus graus de liberdade de vibração, por exemplo, uma molécula não linear (de n átomos) tem $3n-6$ graus de liberdade vibracionais, já moléculas lineares apresentam $3n-5$ graus de liberdade vibracionais (CANTOR e SCHIMMEL, 1980) Uma molécula triatômica como a água apresenta três vibrações

fundamentais ($3 \times 3 - 6 = 3$): estiramento simétrico e assimétrico e deformação do tipo tesoura, com absorções em 3652 , 3756 e 1596 cm^{-1} respectivamente (Figura 2).



Figura 2: Representação esquemática dos modos vibracionais fundamentais da molécula de água.

No caso de uma molécula linear como o CO_2 há 4 modos vibracionais ($3 \times 3 - 5 = 4$), no entanto o modo simétrico de estiramento é inativo no IV uma vez que esse modo vibracional não resulta numa alteração do momento de dipolo da molécula (SILVERSTEIN et al., 2005; CANTOR e SCHIMMEL, 1980).

Quando há interesse sobre um grupo funcional específico que pertence a uma molécula, a regra dos $3n-6$ graus de liberdade não é aplicável, pois se trata de uma pequena porção da molécula. Dessa forma devem aparecer vários modos vibracionais.

As transições vibracionais normalmente observadas num espectro de IV são conhecidas como transições fundamentais que geram as bandas fundamentais; elas ocorrem entre o nível fundamental vibracional da molécula e o seu primeiro estado excitado, respeitando a regra de seleção para osciladores harmônicos. Além da banda fundamental existem ainda as bandas de sobreposição (overtone), "hot bands" etc. A energia necessária para que haja a transição fundamental é quantizada e é dada pela equação 1

$$\Delta E = hf \quad (1)$$

Onde ΔE é a diferença de energia entre os níveis excitado e fundamental, h a constante de Planck e f a frequência vibracional. Note que nos espectros de IV a posição de absorção da radiação é dada em termos de número de onda que é o inverso do comprimento de onda (λ) Uma vez que a frequência é dada por:

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (2)$$

pode-se então relacionar frequência, f , com comprimento de onda, λ , e conseqüentemente número de onda, ν . É possível calcular o número de onda (ν) de absorção das deformações axiais aplicando-se a lei de Hooke, em um sistema onde dois átomos e suas ligações são representados por duas massas presas a uma mola. O sistema é tratado como um oscilador harmônico simples. A equação abaixo dá o valor de ν para uma molécula diatômica:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3)$$

onde: c é a velocidade da luz; k é a constante de força de ligação interatômica; μ é a massa reduzida de uma molécula diatômica, cada um de seus átomos tem massas m_1 e m_2 , respectivamente, de modo que $\mu = m_1 m_2 / m_1 + m_2$ (SILVERSTEIN et al., 2005; CANTOR e SCHIMMEL, 1980).

Pela equação 3 pode-se observar que o número de onda no qual a molécula absorve radiação IV, para deformações axiais, varia diretamente com a força das ligações e inversamente com as massas atômicas envolvidas. Por isso a espectroscopia de IV é largamente usada em química para a identificação de vários tipos de ligação e grupos funcionais.

Um exemplo de um espectro de IV de uma proteína é apresentado na Figura 3. Nos espectros de IV a intensidade das bandas de absorção é dada em termos de transmitância ou absorbância, e a

posição em número de onda (cm^{-1}), as bandas assinaladas (banda de amida A, I e II) são típicas de proteínas e serão posteriormente melhor discutidas (Forato et. al 1998a). As bandas típicas de uma proteína são baseadas na molécula modelo N-metil-acetamida (Figura 4), onde a banda de amida em 3300 cm^{-1} corresponde ao estiramento dos grupos N-H; a banda de amida I compreende 80% do estiramento do grupo carbonila, 10% de deformação angular $-\text{CNH}$ e 10% de estiramento $-\text{CN}$. Ainda há a banda de amida III não indicada na Figura 3 em 1300 cm^{-1} que corresponde a uma sobreposição de vários modos vibracionais. (CANTOR e SCHIMMEL, 1980).

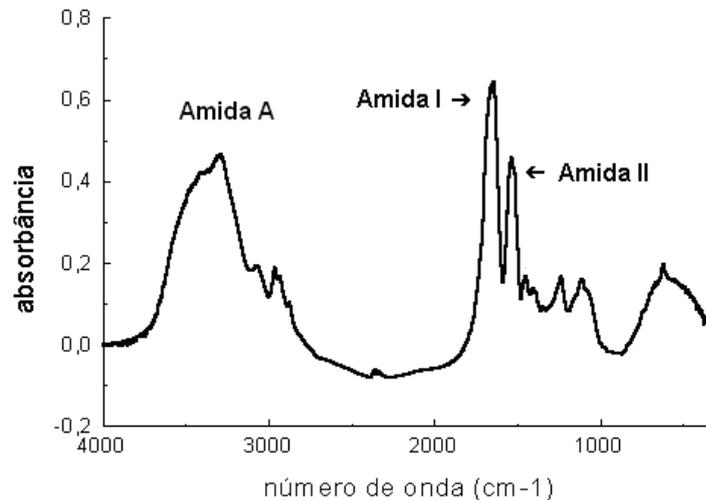


Figura 3: Espectro de Infravermelho para a proteína Tripsinogênio.

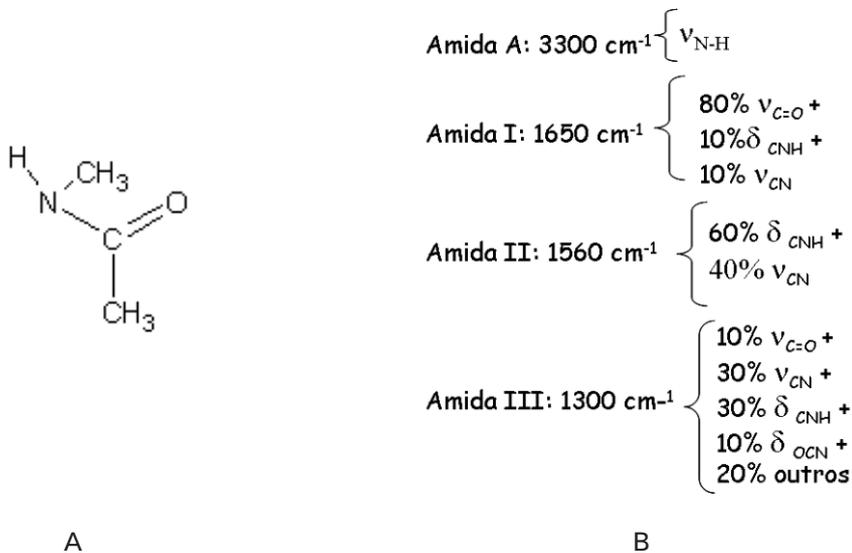


Figura 4: A: Estrutura da N-metilacetamida e B: as atribuições das suas absorções pela espectroscopia IV. Onde ν indica estiramento (ou deformação axial) e δ deformação angular.

O espectrômetro de Infravermelho

Os primeiros espectrômetros de IV desenvolvidos e utilizados para análise química foram do tipo dispersivo, onde se fazia a varredura do espectro com luz monocromática. Esses espectrômetros eram, em sua grande maioria, do tipo analógico, de baixa sensibilidade e longo tempo de varredura (em torno de 15 minutos por amostra) (RIFFTHS, 1975; BRAIMAN e ROTHCHILD, 1988).

Com o advento dos microcomputadores, os espectrômetros com Transformada de Fourier passaram a ser os mais utilizados, pois apresentam algumas vantagens sobre os dispersivos. Uma dessas vantagens é a de Fellgett que resulta da detecção de todos os sinais simultaneamente, permitindo uma rápida varredura do espectro. Além desta, há uma melhora da razão sinal/ruído, resultante do

aumento da intensidade ótica através da amostra devido à ausência de fenda. Há, também, a vantagem de Connes, advinda da utilização do comprimento de onda padrão (usualmente um laser He-Ne) para medir a posição do espelho móvel do interferômetro. Isso resulta numa escala de número de onda mais acurada e reproduzível do que as escalas obtidas nos instrumentos dispersivos (GRIFFITHS, 1975; GRIFFITHS et. al., 1977; BRAIMAN e ROTHSCCHILD, 1988).

Finalmente, há a vantagem de que as frequências de infravermelho, fora da faixa de interesse e que contribuem para deslocar a linha de base em espectrômetros dispersivos, são excluídas nos aparelhos de FTIR, pois não são moduladas pelo interferômetro. Essa vantagem permite medidas acuradas de IV de amostras em altas concentrações. Isso é importante para amostras biológicas em meio aquoso pois possibilita obter espectros acurados da substância de interesse em presença da forte absorção do sinal da água.

Os espectrômetros de FTIR utilizam o interferômetro de Michelson. O sinal é um interferograma, que é a variação da amplitude da luz absorvida ou transmitida em função da varredura do espelho móvel. O espectro similar ao dos aparelhos dispersivos só é obtido com a Transformada de Fourier desse sinal.

O interferômetro de Michelson (Figura 5) é um arranjo que permite dividir um feixe de radiação, em dois e, então, recombiná-los de forma que as variações de intensidade do feixe de saída podem ser medidas por um detetor como função da diferença de trajeto entre os dois feixes. O modelo consiste de dois espelhos planos perpendiculares, sendo um fixo, e outro movido a velocidade constante. Entre os dois espelhos há um divisor de feixe, onde a radiação da fonte externa pode ser parcialmente refletida no espelho fixo e parcialmente transmitida ao espelho móvel. Os feixes então retornam ao divisor de feixe, passam pela amostra e finalmente chegam ao detetor. O interferograma resultante é digitalizado e transferido para um microcomputador. Com a transformada de Fourier desse sinal obtém-se o espectro de IV, em absorbância/transmitância por número de ondas, similar aos obtidos em aparelhos dispersivos.

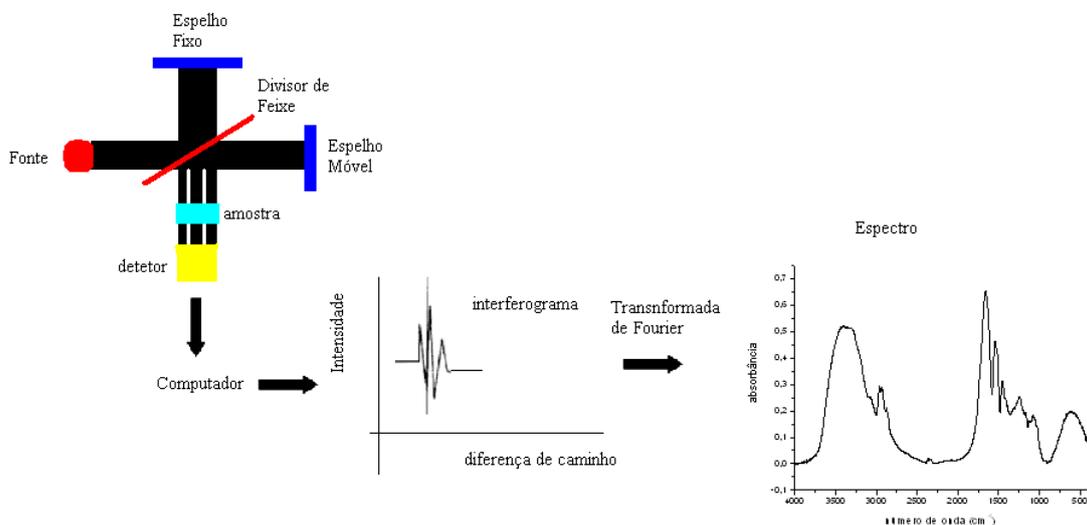


Figura 5: Representação esquemática do interferômetro de Michelson, o interferograma gerado e o espectro.

Como descrito anteriormente, no interferômetro de Michelson há uma diferença de caminho ótico entre os feixes que vão ao espelho fixo e ao móvel. Essa diferença é chamada de atraso (do inglês : "retardation") do sinal, que é dado pelo símbolo x . Esse parâmetro é de grande importância para a condição de construtividade. Quando os espelhos estão equidistantes, $x = 0$, os feixes estão em fase e interferem construtivamente e a intensidade do sinal que chega ao detetor é a soma das intensidades dos feixes que passaram pelos espelhos fixo e móvel. Se o espelho móvel for deslocado a uma distância $\lambda/4$ cm, então x é igual a $\lambda/2$ cm e os feixes estão fora de fase e interferem destrutivamente. Neste ponto, a luz retorna à fonte e não chega ao detetor. Com um deslocamento adicional do espelho móvel de $\lambda/4$ cm, faz $x = \lambda$ cm e, então, os feixes estão mais uma vez interferindo construtivamente.

Como no espectrômetro o espelho se movimenta de $x = 0$ até $x = n\lambda$, o sinal no detetor varia senoidalmente com os máximos de intensidade ocorrendo quando x é um múltiplo de λ . Este sinal é o interferograma.

O interferograma é representado por:

$$I(x) = \int_0^{+\infty} B(\nu) \cos 2\pi\nu x d\nu \quad (4)$$

e o espectro é a sua transformada de Fourier:

$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x) \cos 2\pi\nu x dx \quad (5)$$

Pelo fato de $I(x)$ ser uma função par, isto é, os sinais do interferograma à esquerda e à direita do ponto zero de atraso ($x = 0$) são equivalentes, a equação (5) pode ser escrita como:

$$B(\nu) = 2 \int_0^{+\infty} I(x) \cos 2\pi\nu x dx \quad (6)$$

Na prática, a amplitude ($I(x)$) do interferograma observado não é proporcional apenas à intensidade da fonte ($I(\nu)$) mas, também, à eficiência do divisor de feixe à resposta do detetor e às características dos amplificadores.

$$I(x) = B(\nu) \cos 2\pi\nu x \quad (7)$$

onde $B(\nu) = 0,5H(\nu)I(\nu)$, e $H(\nu)$ é um fator de correção dependente da frequência.

O parâmetro $B(\nu)$ dá a intensidade da fonte no número de onda, ν (cm^{-1}), modificada por parâmetros instrumentais.

Matematicamente, $I(x)$ é o cosseno da Transformada de Fourier (TF) de $B(\nu)$, enquanto que $I(t)$ (em função do tempo) é o cosseno da TF de $B(\nu)$ em função da frequência). O espectro de IV é, então, determinado a partir do interferograma, calculando-se a TF de $I(x)$ ou $I(t)$, o que justifica o nome da técnica: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (GRIFTHS, 1975).

As análises até aqui efetivadas se restringem ao interferograma e aos espectros da fonte. Para a obtenção do espectro de uma substância em um aparelho de feixe único, normalmente usado em FTIR, é necessário fazer um interferograma/espectro de referência (I_r) e o interferograma/espectro com a amostra (I_a). O espectro da substância é, então, calculado a partir dessas medidas pela equação:

$$A(\nu) = -\log \left[\frac{I_a(\nu)}{I_r(\nu)} \right] \quad (8)$$

A equação (6) mostra que, teoricamente, pode-se medir um espectro completo de 0 a $+\infty \text{ cm}^{-1}$ com resolução infinita, uma vez que $\Delta\nu \rightarrow 0$. No entanto a equação (6) mostra que para a obtenção dessa resolução, o espelho móvel deveria percorrer uma distância infinitamente longa, com o atraso variando de 0 a $+\infty \text{ cm}$, o que é fisicamente impossível. Além disso, há outras limitações experimentais que serão mais discutidas no item de digitalização do sinal.

Digitalização do sinal

Para a obtenção de espectros passíveis de análise é necessário aplicar a transformada de Fourier ao interferograma obtido. Esse cálculo é realizado em computador o sinal tem que ser digitalizado. Devido a limitações de memória e tempo de processamento, essa digitalização tem que ser realizada em intervalos (Δx) e atraso (x) finitos. Com isso, há o problema da escolha de qual intervalo e atraso usar, sem causar distorção espectral. De acordo com o teorema de Nyquist, qualquer função cosseno (como os interferogramas) de tempo (t) ou distância (x) pode ser amostrada sem ambiguidades, usando-se uma frequência de amostragem duas vezes a faixa espectral¹². Isso é equivalente à digitalização do sinal a intervalos de atraso, Δx igual a :

$$\Delta x = \frac{1}{2(\nu_{\max} - \nu_{\min})} \quad (9)$$

ou seja a faixa espectral:

$$\nu_{\max} - \nu_{\min} = \frac{1}{2\Delta x} \quad (10)$$

Se a amostragem ocorrer a intervalos acima de $2\Delta x$, os sinais de alta freqüência (acima de ν_{\max}) ocorrerão em uma freqüência baixa, ou seja com valor incorreto. Esse fenômeno é conhecido como "folding" ou "aliasing".

A resolução espectral máxima $\Delta \nu$ é dada pelo inverso do valor máximo de atraso:

$$\Delta \nu = \frac{1}{x_{\max}} \quad (11)$$

Com esses dois parâmetros, é possível obter espectros de IV digitalizados, sem distorções, com resolução adequada e com um número finito de pontos, que é dado por:

$$n_{pt} = \frac{2(\nu_{\max} - \nu_{\min})}{\Delta \nu} \quad (12)$$

onde n_{pt} é o número de pontos digitalizados.

O ponto x_{\max} , escolhido pelo operador gera o truncamento do interferograma (interrupção abrupta do sinal) e isso produz batimentos laterais indesejados no espectro. O efeito do truncamento pode ser amenizado utilizando-se funções de apodização, que fazem com que o interferograma termine em zero, amenizando tais batimentos. Normalmente utilizam-se funções triangulares, trapezoidais etc (GRIFFTHS, 1975).

Há também outros fatores que afetam a resolução espectral além de x_{\max} e dentre eles estão a faixa dinâmica de digitalização e a razão sinal/ruído. A faixa dinâmica é a capacidade do conversor analógico digital distinguir sinais pequenos em presença de outros de grande intensidade. Ela é dependente da resolução do conversor analógico-digital (CAD), que é dada por 2^n , onde n é o número de bits e representa o número de intervalos de intensidades que podem ser digitalizados. Para um conversor de 12 bits, pode-se digitalizar um sinal em 2^{12} (4086) passos. Assim como no caso da freqüência de amostragem, Δx , a digitalização da intensidade é discreta e alguns cuidados têm que ser observados para evitar distorção nos espectros.

Como nos interferogramas é comum uma variação de sinal acima de 10^4 para 1 (do pico central, $x=0$ para os sinais próximos do x_{\max}), o CAD tem que ter resolução acima desse valor, que é um conversor de pelo menos 14 bits, com 2^{14} (16384) passos. Quando o conversor tem resolução abaixo da razão das intensidades dos sinais máximos e mínimos, os de baixa intensidade não podem ser distinguidos corretamente e geram um ruído conhecido como ruído digital. Esse problema pode causar sérias distorções espectrais.

A razão sinal/ruído (S/R) também pode reduzir a resolução espectral, pois contribui para a incerteza da amplitude do sinal. Nos espectrômetros de FTIR, a S/R pode ser melhorada facilmente, com o somatório de um grande número de espectros. A razão S/R aumenta com a raiz quadrada do número de varreduras (\sqrt{n}), sendo assim necessário somar 4 espectros para duplicá-la (GRIFFTHS, 1975).

Aplicações realizadas pelo grupo de pesquisa

A espectroscopia no IV é capaz de fornecer informações sobre as estruturas secundárias de proteínas (ESP). Na Fig.3 é apresentado um espectro no infravermelho de uma proteína, região de 4000 a 400 cm^{-1} , onde são indicadas as absorções características de amida A, I, II e III. O estudo das ESP com IV utiliza geralmente a absorção de amida I (estiramento da ligação C=O dos grupos peptídicos), pois a posição dessa absorção (1700-1600 cm^{-1}) depende do tipo de estrutura

Na Figura 6 estão os espectros na região da absorção de amida I de uma proteína rica em hélices α (Citocromo-C) e de uma proteína rica em folhas β (tripsina). Nesta figura observa-se que a absorção de amida I da proteína rica em hélices α é simétrica e centrada em 1656 cm^{-1} , e da proteína rica em folhas β ocorre entre 1620 e 1640 cm^{-1} (FORATO et al., 1998a).

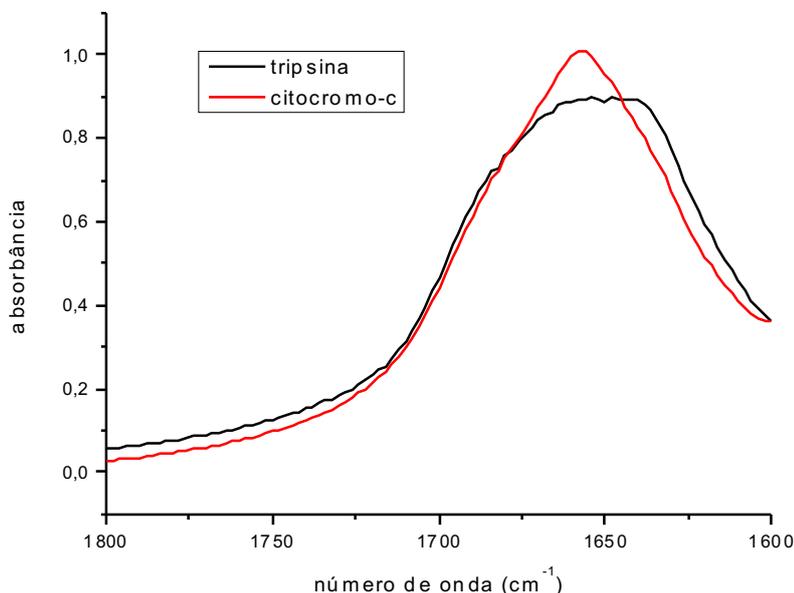


Figura 6: Espectros de IV para as proteínas tripsina (preto) e citocromo-C (vermelho) na região da banda de amida I, obtidos em pastilha de KBr.

Há duas classes de métodos usados para a quantificação das ESP: os de aumento de resolução e os de reconhecimento de padrões. Os métodos de aumento de resolução consistem em determinar as proporções das ESP baseados nas áreas dos sinais relativos à cada ES (FORATO et al., 1998b; MANTSCH e CHAPMAN, 1995; BYLER e SUSI, 1986). Esses métodos usam as técnicas de segunda derivada, desconvolução de Fourier e ajuste do sinal. Esses métodos começaram a ser usados na década de 80 principalmente para análise de espectros de proteínas em solução (MANTSCH e CHAPMAN, 1995; BYLER e SUSI, 1986). Alternativamente aos métodos de aumento de resolução, os de reconhecimento de padrões vêm sendo empregados na quantificação das estruturas secundárias de proteínas. Com esses métodos é possível obter resultados rápidos e sem interferência do operador (SARVER JR. E KRUEGER, 1991; FORATO et al., 1998a).

Os métodos de reconhecimento de padrões baseiam-se na obtenção de uma matriz de calibração pela correlação entre uma matriz de espectros no Infravermelho e as respectivas concentrações (frações conformacionais) das ESP determinadas a partir de dados de raios X pelos algoritmos de Kabsch & Sander (KS) e Levitt & Greer (LG) (SARVER e KRUEGER, 1991).

Com a matriz de calibração obtém-se os valores das estruturas secundárias para uma proteína desconhecida, multiplicando seu espectro por essa matriz.

Em 1998 foi publicado pelo nosso grupo um trabalho na revista *Analytical Biochemistry* (Forato et. al 1998a), no qual utilizou-se um método de reconhecimento de padrões baseado em decomposição de valor singular. Foi gerada uma matriz com espectros obtidos no infravermelho para treze proteínas com estruturas secundárias determinadas por raios-X. As amostras de proteínas foram preparadas sob a forma de pastilhas de KBr. A outra matriz gerada é constituída pelas estruturas secundárias correspondentes a cada proteína da primeira matriz, determinadas por raios X. Usando-se o ambiente de programação MatLab, que já contém o comando que faz a decomposição de valor singular, obteve-se uma matriz de calibração que faz uma correlação entre as duas primeiras. Por este método desenvolvido ao se multiplicar a matriz de calibração pela região da banda de amida I de uma proteína em estudo, obtém-se as proporções de estruturas hélices α , folhas β , voltas e outras estruturas. Ao se retirar uma a uma das proteínas da matriz e recalculá-las suas estruturas secundárias, observou-se que as estruturas secundárias dessas proteínas não foram alteradas.

Com a técnica de quantificação de estruturas secundárias desenvolvida no trabalho citado acima, analisou-se as estruturas secundárias das zeínas α no estado sólido. Essas proteínas são as prolaminas do milho, são insolúveis em água e solúveis em soluções alcoólicas. Devido à sua insolubilidade suas estruturas geralmente são analisadas com a proteína dissolvida em solventes orgânicos. O resultado das análises dessas proteínas no estado sólido, com a espectroscopia IV usando o método de reconhecimento de padrões desenvolvido, indicou que elas apresentam 43% de estruturas do tipo hélices α , o que está de acordo com aquelas calculadas por dicróismo circular (CD) encontradas na literatura para esta proteína em solução. Além disso, os resultados também indicaram que a extração das proteínas com etanol 70% (v/v) não desnatura as zeínas α (FORATO et al., 2003).

Também propôs-se um modelo para as zeínas α , utilizando-se a informação obtida por infravermelho de que as zeínas α não têm hélices muito longas pois hélices α longas dão sinal da amida I, 10 cm^{-1} abaixo do observado (cerca de 1647 cm^{-1} contra 1657 cm^{-1} para zeínas) para proteínas com hélices α curta (FORATO et al., 2004).

Ainda com o método de reconhecimento de padrões foram analisadas as estruturas secundárias das zeínas γ . Essas proteínas são menos abundantes do que as zeínas α e correspondem em torno de 10 a 15 % das zeínas totais no endosperma do milho, enquanto que as zeínas α de 75 a 80%. No entanto, as primeiras são pouco estudadas e têm um papel importante na deposição das zeínas nos corpos protéicos, organelas nas quais todas as zeínas são depositadas. Assim as zeínas γ foram analisadas sob a forma de corpos protéicos e a espectroscopia IV revelou que elas apresentam 33% de estruturas do tipo hélices α e 31% de folhas de β (BICUDO et al., 2005).

O método de reconhecimento de padrões permitiu também a análise do glúten trigo, grupo formado pelas proteínas insolúveis em água e que conferem as massas obtidas a partir de farinha de trigo características viscoelásticas. Os cálculos forneceram para o glúten de trigo 47% hélice α , 26 % de folha β , 25% de voltas β e 14% de estrutura desordenada.

Foram realizados experimentos para avaliar o efeito da temperatura nas ESPs do glúten. Os resultados são similares de 60 a 120 graus centígrados indicando que as proteínas do glúten tem ESPs bastante estáveis. Esta estabilidade com a temperatura é um fator muito importante para que o glúten mantenha suas propriedades mesmo durante o processo de cozimento dos pães e massas (BERNARDES FILHO, 1998).

Referências

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynth. Res.**, [S. l.], v. 101, n. 2-3, p. 157-170, 2009.

BERNARDES FILHO, R. **Estudo de Proteínas do Glúten de Trigo por Técnicas Espectroscópicas e Microscópicas**. 1998. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

BICUDO, T. C.; FORATO, L. A.; BATISTA, L. A. R.; COLNAGO, L. A. Study of the Conformation of γ -Zeins in Purified Maize Protein Bodies by FTIR and NMR Spectroscopy. **Anal. Bional. Chem.**, [S. l.], v. 383, p. 291-296, 2005.

BRAIMAN, M. S.; ROTHSCHILD, K. J. Fourier Transform Techniques for Probing Membrane Protein Structure. **Ann. Rev. Biophys. Chem.**, [S. l.], v. 17, p. 541-70, 1988.

BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvoluted FTIR Spectra. **Biopolymers**, New York, [S. l.], v. 25, p. 69-487, 1986.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical Chemistry: Part I**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980.

COLNAGO, L. A. Desvendando os mistérios da vida molecular. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 13, p. 24-29, 1991.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy. **Anal. Biochem.**, New York, v. 259, p. 136-141, 1998a.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, p. 136-141, 1998b.

FORATO, L. A.; BiCUDO, T. C.; COLNAGO, L. A. Conformation of α Zeins in Solid State by Fourier Transform IR. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, [S. l.], v. 72, p. 421-426, 2003.

FORATO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; FISCHER, H.; MASCARENHAS, Y. P.; CRIAEVICH, A.; COLNAGO, L. A. Conformation of Z19 Prolamin by FTIR, NMR and SAXS. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 52, n. 8, p. 2382-2384, 2004.

GRIFFITHS, P. R. **Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 1975.

GRIFFITHS, P. R.; SLOANE, H. J.; HANNAH, R. W. Interferometers vs Monochromators: Separating the Optical and Digital Advantages. **Appl. Spectrosc.**, Baltimore, v. 31, n. 6, p. 485-495, 1977.

MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. **Infrared Spectroscopy of Biomolecules**. New York: John Wiley & Sons, 1995.

SARVER JR.; R. W.; KRUEGER, W. C. Protein secondary structure from Fourier Transform infrared spectroscopy. **Anal. Chem.**, Washington, v. 29, p. 61-67, 1991.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Instrumentação

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP

Telefone: (16) 2107 2800 - Fax: (16) 2107 2902

www.cnpdia.embrapa.br - sac@cnpdia.embrapa.br

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

