



Universidade Estadual de Maringá

Pós-Graduação em Física

Elizandra Sehn

*Dinâmica da desnaturação térmica das proteínas do sangue e
fotoestabilidade de formulações de uso tópico: Estudo quantitativo com
métodos fototérmicos*

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandes

Maringá/PR, Outubro de 2009.

Universidade Estadual de Maringá

Pós-Graduação em Física

Elizandra Sehn

Dinâmica da desnaturação térmica das proteínas do sangue e fotoestabilidade de formulações de uso tópico: Estudo quantitativo com métodos fototérmicos

Tese apresentada à

Pós-Graduação em Física da

Universidade Estadual de Maringá

Para obtenção do título de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandes

Maringá/PR, Outubro de 2009.

*Dedico este estudo:
aos meus pais,
Nilo Sehn e Irma Sehn
pelo carinho e confiança.*

“De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

“Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Foram muitos, os que me ajudaram a concluir este trabalho. Agradeço:

À toda minha família pelo apoio e confiança;

Ao Gustavo pelo carinho, apoio e paciência na realização deste trabalho, sempre estando do meu lado me incentivando;

À Fran, não só por sua competência e dedicação, mas também por ser essa pessoa amiga e sempre disposta a ajudar, agradeço por tudo;

Aos amigos Andrea, Breno, Fabi, Gi, Giselly, Ivan, Josi, Lisa, Manoel, Marcelo, Mônica, Otávio, Roseli e tantos outros pelo apoio e pelos bons momentos compartilhados;

A todos os amigos e colegas do GEF: Andressa, Aline, Ana, Carioca, Marcos Paulo, Márcio, Roni e Wesley;

Aos funcionários do hemocentro do Hospital Universitário por realizar a coleta e centrifugação das amostras de sangue;

Ao meu orientador, professor Mauro Luciano Baesso, pelo incentivo, ensinamentos e dedicação durante toda a pesquisa;

Aos professores Antônio Carlos Bento, Antônio Medina Neto e Jurandir H. Rohling pelo trabalho e colaboração nas realizações dos experimentos;

À professora Luzmarina pelos ensinamentos e co-orientação da tese, sempre muito atenciosa;

À professora Jorgete por fornecer as amostras de albumina e hemoglobina e pelos esclarecimentos na área de bioquímica;

À professora Silmara e à Lívia por fornecer as amostras de albumina e hemoglobina;

Aos funcionários do DFI, em especial à Akiko;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa;

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho, técnicas fototérmicas aliadas a métodos convencionais foram utilizadas para investigar a dinâmica da desnaturação térmica de proteínas do sangue e a fotoestabilidade de uma formulação de um protetor solar e de seus componentes. Os experimentos com as proteínas foram realizados com duas técnicas fototérmicas; Espectroscopias de Lente Térmica e Fotoacústica, e outras seguintes técnicas: Interferometria Óptica, Calorimetria Diferencial de Varredura, Termogravimetria, Espectroscopia no Infravermelho via Transformada de Fourier e medidas de densidade de massa. Os estudos foram realizados com amostras derivadas do sangue, como a albumina, a hemoglobina, o soro e o plasma. Os resultados mostraram modificações significativas nas propriedades medidas quando as temperaturas das amostras variam de 35 a 42 °C, intervalo na qual as proteínas passam da fase nativa para a desnaturada. A combinação dos vários métodos permitiu a realização de uma análise das mudanças conformacionais da estrutura proteica, em especial a diminuição de estruturas secundárias α -hélice e formação de β -folha, além da indução de agregados protéicos detectados na absorbância. Os resultados, em especial aqueles determinados com a técnica de lente térmica, mostraram a ocorrência de transições que são difíceis de serem obtidas por meio de técnicas calorimétricas convencionais, sugerindo este método como uma nova ferramenta para o estudo das propriedades conformacionais das proteínas. Além disso, os parâmetros medidos com estas técnicas foram utilizados para calcular as variações com a temperatura da entropia e da energia livre de Gibbs das amostras, as quais foram correlacionadas com os processos de desenovelamento das proteínas estudadas. No segundo estudo, um arranjo experimental modificado para a Espectroscopia Fotoacústica foi empregado para demonstrar a ocorrência de efeito fotoquímico em um filtro solar e em seus componentes. Em conclusão, este trabalho demonstrou, por meio de métodos não convencionais, a detecção dos processos de desnaturação térmica de proteínas do sangue e a fotoestabilidade de um filtro solar e de seus componentes. Finalmente, foi demonstrado que a espectroscopia de lente térmica, a espectroscopia fotoacústica e a interferometria óptica são novas ferramentas para o estudo dos processos de desnaturação de proteínas, indicando que o procedimento adotado poderá ser estendido para a avaliação de outras proteínas animais e vegetais, com o intuito de se correlacionar a estabilidade térmica de cada uma delas com suas estruturas conformacionais.

ABSTRACT

In this work photothermal methods allied to conventional techniques were employed to investigate the dynamics of thermal denaturation of blood proteins and the photo stability of a sunscreen formulation and its compounds. The experiments in the proteins samples were performed with two photothermal techniques, the thermal lens and the photoacoustic spectroscopies, and the following methods: Optical Interferometry, Differential Scanning Calorimetry, Thermogravimetry, Fourier Transform Infrared spectroscopy and the mass density measurements. The studies were performed in albumin, hemoglobin, blood plasma and blood serum. The results showed changes in the measured properties when the sample temperature was varied between 35 and 42 °C, which is the interval where proteins changes from native to denaturated phases. The combination of several methods allowed to perform an evaluation of the samples conformational changes, especially the decrease of the α -helix followed by the increase of the β -sheet structures, besides the formation of aggregates, detected in the absorbance data. The results, especially those obtained with the thermal lens technique showed, the occurrence of structural modifications that are difficult to detect via calorimetric methods, suggesting this technique as a new tool to study the conformational properties of proteins. Furthermore, the parameters measured with these methods were used to calculate the variations with temperature of both entropy and Gibbs free energy, which were correlated with the proteins denaturation processes. An additional study, was performed with a modified photoacoustic set up, that allowed to show the occurrence of photochemical reaction in a sun screen formulations and in its compounds. In conclusion, this work showed through non conventional methods the detection of the denaturation processes of blood proteins and the photo-stability of a suns screen and its compounds. Finally, it was demonstrated, that the thermal lens spectroscopy, the photoacoustic spectroscopy and the optical interferometry are new tools to study proteins denaturation processes, indicating that the adopted procedure can be used to investigate other animal and vegetal proteins, in order to correlate their thermal stability behavior with the conformational structures.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
Introdução	10
Capítulo 1-Aspectos Teóricos	16
1.1 Proteínas	16
1.1.1 Proteínas séricas	20
1.1.2 Desnaturação e enovelamento das proteínas	22
1.2 Mecanismos de permeação e a fotoestabilidade de formulações de uso tópico... ..	29
Capítulo 2 - Técnicas Fototérmicas	33
2.1 Introdução	33
2.2 Espectroscopia de lente térmica (ELT)	34
2.3 Interferometria óptica (IO)	38
2.4 Espectroscopia fotoacústica (PAS)	42
2.4.1 Efeito Fotoacústico	43
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	46
3.1 Amostra	46
3.1.1 Proteínas	46
3.2 Arranjo Experimental	48
3.2.1 Lente Térmica	48
3.2.2 Interferometria óptica	50
3.2.3 Espectrômetro Fotoacústico	51
3.3 Técnicas convencionais	53
3.3.1 Espectrômetro infravermelho de transformada de Fourier (FTIR)	53
3.3.2 Calorimetria diferencial de varredura	54
3.3.3 Densímetro	54

3.3.4 PH-metro	54
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	55
4.1 Proteínas	55
4.1.1 Albumina.....	55
4.1.1.1 Lente térmica e interferometria óptica.....	56
4.1.1.2 Resultados com a técnica PAS.....	77
4.1.1.3 Resultados com a técnica FTIR.....	80
4.1.2 Hemoglobina	84
4.1.2.1 Lente térmica e interferometria óptica.....	86
4.1.2.2 Resultados com a técnica FTIR.....	92
4.1.3 Plasma e soro.....	93
4.1.3.1 Lente térmica e interferometria óptica.....	93
4.1.3.2 Resultados com a técnica PAS.....	105
4.1.3.3 Resultados com a técnica FTIR.....	108
4.2 Resultados do efeito fotoquímico no protetor solar	111
5 Conclusão	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

Introdução

O aquecimento global talvez seja um dos mais importantes desafios a serem enfrentados pela sociedade contemporânea. Embora este fenômeno tenha se iniciado há mais de 200 anos com a descoberta da máquina térmica, seguida pela revolução industrial ocorrida na Inglaterra e com as invenções dos veículos automotores e aviões, só nos últimos 50 anos é que este tema passou a fazer parte da agenda da maioria das nações. Há evidências concretas de que o aumento de temperatura na terra pode degradar as condições ambientais de modo a ameaçar a existência da vida. A tabela I apresenta a temperatura do corpo de algumas espécies e mostra que em todos os casos ela ocorre em uma faixa entre aproximadamente 33 a 42,2 °C [1]. No caso dos humanos, a temperatura média é de $36,6 \pm 0,2$ °C. Como se trata de um fenômeno recente, não existem ainda dados científicos sobre o grau de influência que um determinado aumento de temperatura teria sobre a vida na terra. Talvez este seja um dos mais importantes exemplos de alterações de uma medicina darwiniana que poderá ocorrer se as previsões recentes de aquecimento vierem a se confirmar.

Tabela I. Temperaturas do corpo e de transição estrutural da hemácia de diferentes espécies[1].

Espécie	Temperatura do corpo °C	Temperatura de transição estrutural da hemácia °C
<i>Ouriço do mar</i>	$33,0 \pm 1,0$	$34,0 \pm 0,5$
<i>Ornitorrinco</i>	$33,0 \pm 1,0$	$34,0 \pm 0,5$
<i>Coala</i>	$35,2 \pm 0,5$	$36,5 \pm 1,5$
<i>Javali</i>	$36,17 \pm 0,5$	$36,5 \pm 0,5$
<i>Humano</i>	$36,6 \pm 0,2$	$37,1 \pm 0,5$
<i>Canguru</i>	$37,0 \pm 0,5$	$36,7 \pm 0,5$
<i>Gato selvagem</i>	$37,6 \pm 0,5$	$37,3 \pm 1,0$
<i>Gato</i>	$37,7 \pm 0,5$	$37,0 \pm 1,0$
<i>Camelo</i>	$38,0 \pm 0,5$	$37,5 \pm 0,5$
<i>Pavão</i>	$41,06 \pm 0,5$	$39,5 \pm 1,0$
<i>Ave 'quebra-nozes'</i>	$42,2 \pm 0,5$	$42,0 \pm 1,0$

O estresse térmico constitui-se, portanto, num dos problemas a serem enfrentados pela população como decorrência do processo de aquecimento planetário [3]. As previsões apontam que até o final deste século a temperatura da terra poderá aumentar em média de 1,4

a 5,8 °C, conforme descrito no painel intergovernamental sobre mudanças climáticas, de 2007 [4].

O organismo humano possui um sistema termorregulador, que em condições normais de saúde, mantém a temperatura interna entre 36 – 38°C, mantendo assim o funcionamento de todo o sistema biológico envolvido [3]. O sistema central de controle de temperatura é detectado por células nervosas situadas no interior do cérebro, o hipotálamo, e são denominadas de sensores de temperatura central. Nesse processo de controle de temperatura a pele desempenha a função de troca de calor com o meio ambiente por meio do fluxo sanguíneo. A sudorese ajuda a remover calor por evaporação, aumentando a perda de energia térmica, contribuindo para o resfriamento da pele, e como consequência, do próprio corpo [3]. Estudos de tratamento térmico de câncer com o uso da hipertermia, demonstraram a ocorrência de morte celular em temperaturas de 42 a 43 °C. Efeitos terapêuticos da hipertermia também foram observados em culturas celulares e em tumores espontâneos [7,8]. Portanto, os sistemas biológicos, quando submetidos às temperaturas entre 42 e 45 °C, denominada de região não fisiológica, sofrem inibição da síntese proteica, e morte celular [9].

Para compreender os efeitos que o aumento de temperatura pode ocasionar no organismo humano, é necessário investigar a bioquímica de seu funcionamento, mais especificamente das proteínas, em função da temperatura. As proteínas são macromoléculas que apresentam funções biológicas determinadas por suas estruturas tridimensionais e desempenham papel fundamental no funcionamento das células. A manutenção da integridade estrutural protéica é de vital importância para garantir a existência da vida. Em condições gerais, as proteínas apresentam estabilidade em sua estrutura conformacional nativa, mas quando submetidas a variações de temperatura, pressão, pH, ou diferentes concentrações de sais inorgânicos e solventes orgânicos, elas podem apresentar instabilidades estruturais, podendo se desenrolar. No processo de instabilidade sua função biológica fica parcialmente ou totalmente comprometida [5]. Dependendo da temperatura a que forem submetidas, podem ocorrer agregações proteicas que podem resultar em diversas doenças neurodegenerativas [6].

O organismo humano apresenta um eficiente controle de temperatura entre 35 e 40 °C [3]. Porém, durante processos de infecção a temperatura corporal pode atingir valores acima de 40°C, e neste caso, o sistema termorregulador deixa de ser eficiente, podendo resultar em instabilidades estruturais das proteínas, resultando em morte e/ou agregação celular. Assim, o

estudo da influência da temperatura sobre as propriedades estruturais das proteínas parece ser um tema importante e muito atual.

Uma outra consequência das mudanças climáticas é a degradação da camada de ozônio da atmosfera, resultando em aumento na incidência dos raios ultravioleta (UV) na superfície da terra e conseqüentemente no número de casos de câncer de pele, que pode ser prevenido pela utilização de protetores solares. A eficácia dos protetores depende de sua estabilidade fotoquímica e tempo de permanência na superfície da pele, fatores diretamente relacionados às formulações. Os estudos dos mecanismos de permeação e de fotoestabilidade são importantes para um melhor entendimento das formulas farmacêuticas dos filtros solares em relação à proteção oferecida e da segurança do indivíduo. Este é também um tema de grande relevância atual.

Entre os benefícios da evolução tecnológica, destaca-se o desenvolvimento de novas ferramentas de análise, cada vez mais sofisticadas, para serem aplicadas nas mais variadas áreas da ciência. As técnicas experimentais que utilizam lasers, por exemplo, já estão sendo empregadas de forma rotineira por um grande número de pesquisadores das áreas das ciências naturais. Aliados aos sistemas de detecção e processos de transferência de dados cada vez mais versáteis, têm-se atualmente importantes técnicas para os mais variados estudos.

De particular interesse para este trabalho, enfatizamos os métodos fototérmicos. Estas técnicas caracterizam-se pela avaliação de uma amostra-teste por meio da medida da mudança de sua temperatura induzida pela fração da energia de um feixe de luz incidente absorvida e convertida em calor. Existe um grande número destes métodos, que em geral são de alta sensibilidade, cujas aplicações são definidas pela configuração experimental de cada um deles. No entanto, a grande maioria não está disponível comercialmente, sendo frequentemente aprimorados nos laboratórios de pesquisa. Duas destas técnicas serão abordadas neste trabalho, a Espectroscopia de Lente Térmica (ELT) e a Espectroscopia Fotoacústica (PAS).

A espectroscopia de lente térmica é uma técnica fototérmica muito sensível para se medir as propriedades ópticas e térmicas das amostras e tem na sua natureza remota, de não exigir contato físico entre a amostra e o detector, uma vantagem essencial quando se pretende realizar estudos variando-se a temperatura da amostra. Ou seja, é possível inserir a amostra no sistema e variar sua temperatura com um dispositivo de aquecimento enquanto se procede a medida. Em comparação com as técnicas de calorimetria convencional, a grande vantagem

deste método é permitir a escolha da taxa de aquecimento tão baixa quanto desejada. Em trabalhos anteriores este método foi aplicado com sucesso para o estudo em função da temperatura de diversas amostras, na fase líquida e na sólida [11]. Nossa hipótese é que a técnica de lente térmica possa ser empregada para estudos das propriedades das proteínas do sangue em função da temperatura, com especial interesse na região de desnaturação térmica. Entre os desafios está a medida das amostras na fase líquida nas concentrações que são encontradas no sangue, além da escolha das taxas de aquecimento adequadas para se detectar as possíveis instabilidades térmicas. Isto porque é sabido que a Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e/ou Termogravimetria (TG) não são adequadas para a medida de amostra líquida e demandam o uso de taxas de aquecimento que são inadequadas para este tipo de estudo.

A espectroscopia fotoacústica é talvez uma das técnicas fototérmicas mais consolidadas na atualidade, com aplicações nas mais diversas áreas. Já no seu desenvolvimento inicial para o estudo de amostras sólidas, ocorrido na década de 70, este método se destacou por permitir a determinação do perfil de distribuição de substâncias de uso tópico na pele [12,13]. Em trabalhos recentes, desenvolvidos no Grupo de Estudos dos Fenômenos Fototérmicos (GEFF) da UEM com a participação da autora da presente tese [14-18], foram apresentadas inovações nos procedimentos das medidas. Nesses trabalhos foram realizados estudos de permeação de formulações de uso tópico na pele *in vivo* e *ex vivo*, obtendo-se os espectros de absorção óptica dos produtos aplicados ao invés de se medir a sua difusão monitorando-se a absorção óptica da substância em um único comprimento de onda. Talvez a observação mais relevante tenha sido a constatação de que a maioria das formulações se propaga através das camadas da pele, independentemente de serem medicamentos preparados com veículos promotores da difusão ou filtros solares que são projetados para se manterem na superfície da pele. Foi demonstrada, por exemplo, a permeação de substâncias até a derme, na região próxima dos melanócitos. Isto aponta para a necessidade de se investigar a possível ocorrência de reação fotoquímica quando as formulações são submetidas à incidência de luz, em especial a ultravioleta. Como a pele é parcialmente transparente desde a região do UVA, em 320nm, até o infravermelho, existe a possibilidade de que se for fotossensível, a substância ao ser irradiada no interior da pele, pode induzir reação fotoquímica, e como consequência, provocar danos em sua estrutura. Portanto, parece oportuno recuperar uma montagem modificada da espectroscopia

fotoacústica que, nas décadas de 80 e 90, foi utilizada para a detecção *in vivo* do efeito fotoquímico induzido durante a fotoexcitação de folhas de vegetais, ou seja, durante a geração do efeito fotossintético [19,20]. Nesta montagem, foi utilizada uma segunda fonte de luz para excitar a amostra de forma não modulada, contínua, de tal modo que a mudança no sinal fotoacústico fosse relacionada com a evolução do efeito fotossintético. Nossa segunda hipótese nesta tese é então a de que a espectroscopia fotoacústica parece ser adequada para avaliar a fotoestabilidade das formulações dos filtros solares e de seus componentes, por meio da medida com este arranjo experimental modificado, com a possibilidade de fornecer informações sobre a segurança destes compostos em termos de seu uso na pele.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi utilizar técnicas fototérmicas aliadas a métodos convencionais para investigar:

- 1) A dinâmica da desnaturação térmica da albumina e hemoglobina bovinas e do plasma e soro humanos;
- 2) A fotoestabilidade de um protetor solar e seus componentes.

Objetivos específicos foram:

- * Determinar a difusividade térmica e a amplitude do sinal de lente térmica em função da temperatura, visando identificar a região de desnaturação térmica;
- * Obter as funções matemáticas que permitem calcular as variações da energia livre de Gibbs e da entropia das amostras utilizando-se os parâmetros medidos com a lente térmica e as técnicas complementares empregadas, espectroscopia fotoacústica, interferometria óptica, calorimetria diferencial de varredura, termogravimetria, espectroscopia no infravermelho via transformada de Fourier e medidas de densidade de massa;
- * Determinar o valor do coeficiente de temperatura do índice de refração (dn/dT), utilizando a técnica de interferometria óptica;
- * Obter a absorvância em função da temperatura na região do UV com a técnica espectroscopia fotoacústica;

- * Verificar as estruturas secundárias e suas principais ligações químicas em função da temperatura empregando a técnica FTIR;
- * Empregar o arranjo experimental modificado da espectroscopia fotoacústica, com a incidência na amostra de um feixe de luz contínua, para avaliar a geração de efeito fotoquímico nas formulações de um protetor solar e de seus componentes.

Capítulo 1-Aspectos Teóricos

1.1 Proteínas

As proteínas são fundamentais porque definem a forma, a estrutura e a função das células. São constituídas a partir de 20 diferentes tipos de aminoácidos e cada espécie desempenha função biológica específica. Além disso, a maior parte da informação genética é expressa pelas proteínas [6].

As proteínas encontradas no sangue, como por exemplo, a albumina sérica e a hemoglobina, possuem funções importantes no sistema circulatório. A albumina sérica, a mais abundante no plasma, é fundamental para a manutenção da pressão osmótica, responsável pela distribuição correta dos líquidos corporais entre os vasos sanguíneos e os tecidos. A hemoglobina é responsável pelo transporte do oxigênio e gás carbônico no sangue. Esta proteína coleta o oxigênio nos pulmões, e o libera nos tecidos a fim gerar a energia necessária para a sobrevivência [6].

Proteínas são formadas por unidades chamadas aminoácidos que são unidos entre si por ligações covalentes denominadas ligações peptídicas. Uma ligação peptídica ocorre entre o grupamento amina (NH_2) de um aminoácido e o grupo carboxílico (COOH) do aminoácido seguinte. Os grupos funcionais amina e ácido carboxílico se ligam formando uma amida e uma molécula de água, a qual é liberada. A Figura 1.1 ilustra uma ligação peptídica entre os aminoácidos alanina e serina. Essencialmente cada aminoácido possui uma base comum, e um grupo lateral, o resíduo ou radical R (circulado em alaranjado), sendo este último o responsável pelas propriedades químicas de cada aminoácido [6]. Os radicais R são divididos basicamente nos grupos polares (hidrofílicos), não-polares (hidrofóbicos), anéis aromáticos, e carregados positivamente e negativamente.

As formas com que as moléculas de uma proteína são organizadas são chamadas de conformações. As conformações teoricamente possíveis são aquelas em que não há quebra das ligações covalentes e são termodinamicamente mais estáveis, isto é, possuem menor energia livre de Gibbs [6]. Esse estado é denominado de conformação nativa, como veremos em mais detalhes posteriormente.

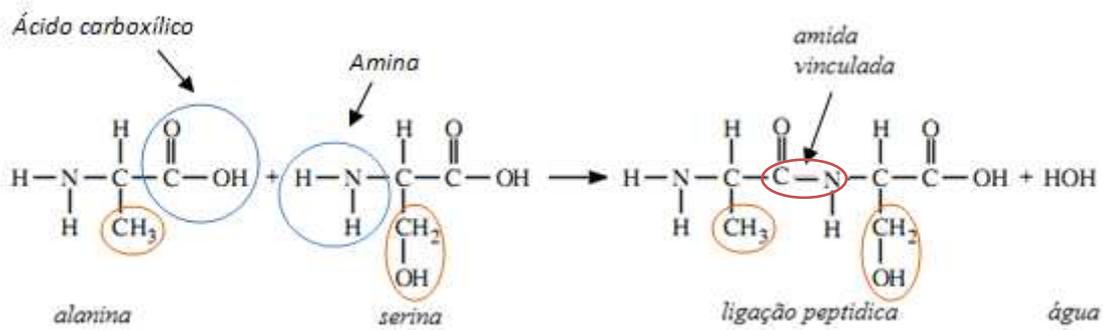


Figura 1.1 Ligação peptídica entre os aminoácidos alanina e serina [21].

As proteínas possuem estruturas espaciais complexas que podem ser organizadas em quatro níveis: primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária, ilustrada na Figura 1.2, é o nível estrutural mais simples. É representada pelo esqueleto covalente da cadeia peptídica, ou seja, a sequência de aminoácidos. É considerada como a mais importante porque é dela que deriva todo o arranjo espacial da molécula e, como consequência, a sequência de arranjos que determinará a função da proteína.

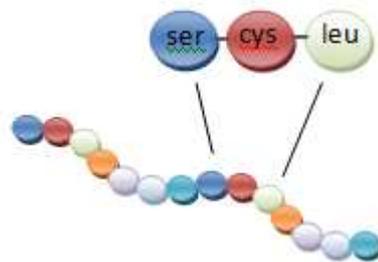


Figura 1.2 Estrutura primária de uma proteína: sequência de aminoácidos.

A estrutura secundária refere-se ao arranjo espacial da estrutura primária, sendo formada pela rotação das ligações entre os carbonos dos grupamentos amina e carboxila. O arranjo secundário de um polipeptídeo pode ocorrer de forma regular; isso acontece quando os ângulos das ligações entre carbonos e seus ligantes são iguais e se repetem ao longo de um segmento da molécula. As principais estruturas secundárias são: α -hélice, β -folha, β -volta, e randômicas (estrutura desordenada), sendo esta última uma estrutura enrolada de maneira aleatória [6].

Em uma α -hélice, o esqueleto polipeptídico se enrola em torno do eixo de uma hélice imaginária. A α -hélice, conforme mostra a Figura 1.3, é formada principalmente por pontes de

hidrogênio entre os agrupamentos N-H e C=O da cadeia principal, mas também permite interação não covalente, como forças de Van der Waals. Essa estrutura é encontrada principalmente nas proteínas globulares (hemoglobina, albumina e globulinas), e geralmente possuem um lado hidrofóbico e um hidrofílico devido à presença de radicais não-polares e polares, respectivamente [22-25].

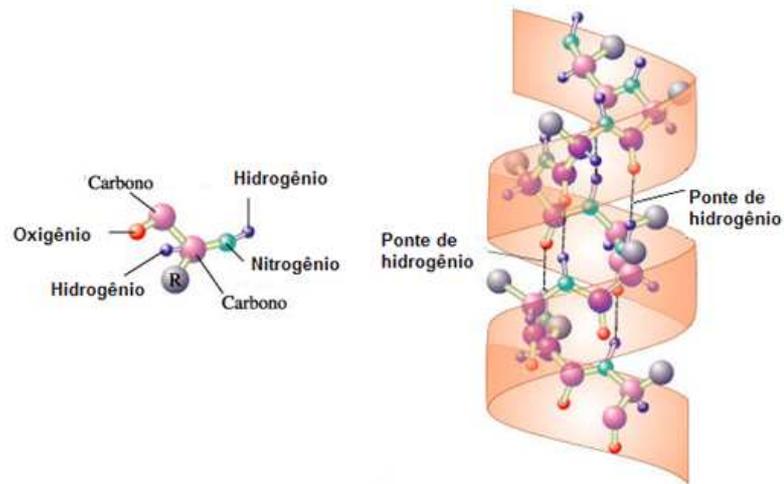


Figura 1.3 Estrutura α -hélice com ligações de ponte de hidrogênios[26].

Na estrutura secundária denominada β -folha, o esqueleto polipeptídico está quase completamente estendido. As cadeias polipeptídicas estão ligadas por pontes de hidrogênio em forma de ziguezague e a estrutura se assemelha a uma série de folhas, como mostra a Figura 1.4 [6]. As folhas podem ser paralelas (cadeias adjacentes na mesma posição) ou anti-paralelas (em posição contrária). A β -folha difere da estrutura α -hélice em relação à distribuição espacial da cadeia principal, pois numa β -folha a estrutura está completamente distendida, sendo assim mais fracamente enrolada que as estruturas em hélice [3].

A configuração do tipo β -volta é utilizada para dobrar a cadeia principal de aminoácidos e é constituída por pequenas quantidades de aminoácidos. Um quarto tipo de estrutura secundária é representada pelas estruturas desordenadas que não apresentam nenhuma regularidade [6].

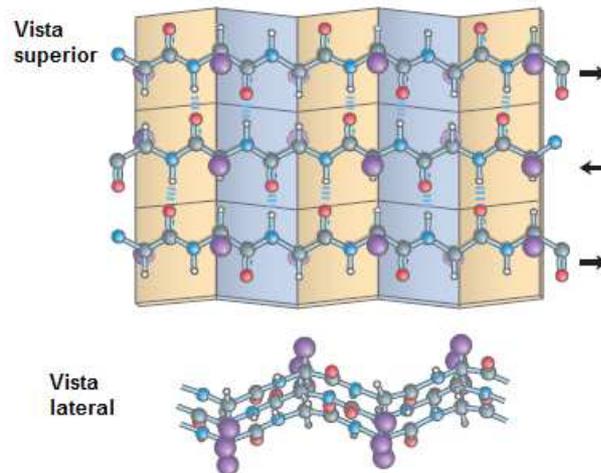


Figura 1.4 Estrutura β -folha antiparalela das cadeias polipeptídicas[6].

O próximo nível de configuração é a estrutura terciária que se refere à maneira pela qual a cadeia polipeptídica encurva-se ou dobra-se em três dimensões, formando uma estrutura compacta firmemente enovelada (Figura 1.5). Essa estrutura representa a geometria que minimiza a energia livre da proteína em solução. É uma estrutura tridimensional completa que forma-se a partir de interações não covalentes, como interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas, além de interações covalentes como ponte de dissulfetos [6].

Cadeias polipeptídicas muito longas podem se organizar em domínios, regiões com estruturas terciárias semi-independentes ligadas entre si por segmentos lineares da cadeia polipeptídica. Os domínios são considerados as unidades funcionais da estrutura tridimensional de uma proteína.

Por último, temos a estrutura quaternária dada pela distribuição espacial de mais de uma cadeia polipeptídica no espaço, as subunidades da molécula. Estas subunidades se mantêm unidas por forças covalentes, como pontes de dissulfetos, e ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc. As subunidades podem atuar de forma independente ou cooperativamente no desempenho da função bioquímica da proteína [6].

A Figura 1.5 ilustra a forma estrutural de uma hemoglobina em níveis de estrutura que acabamos de descrever, começando pela estrutura primária até a quaternária.

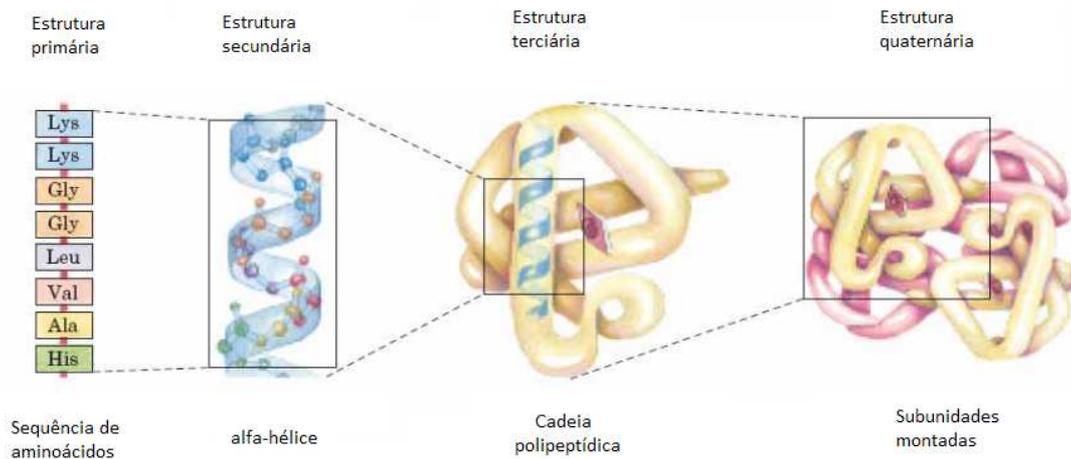


Figura 1.5 Sequência das estruturas da hemoglobina: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária [6].

1.1.1 Proteínas séricas

O sangue é composto basicamente pelo plasma, líquido amarelado e viscoso que representa 55% do seu volume total, 1% de leucócitos e por hemácias que representam cerca de 43% do volume total. O plasma consiste em 91,5% de água, 7% de proteínas (albumina, globulinas e fibrinogênio) e 1,5% de solutos não protéicos [23,27]. É obtido por meio de um processo de centrifugação do sangue total quando coletado em tubos com anticoagulante e o soro é obtido sem o uso do anticoagulante, constituído basicamente pelos mesmos componentes do plasma, exceto pelas proteínas de coagulação como fibrinogênio e fibrina.

Além do soro e do plasma, foram estudadas nesse trabalho duas proteínas séricas, a albumina e a hemoglobina, que serão discutidas a seguir.

A albumina sérica é uma das proteínas mais abundantes no sangue e corresponde 60% das proteínas do plasma. A albumina sérica humana (HSA) possui uma cadeia polipeptídica com 585 resíduos de aminoácidos [6]. Albuminas são caracterizadas por conterem um número pequeno de resíduos de triptofano e um alto número de cisteína. Tanto a albumina sérica bovina (BSA) quanto a humana possuem apenas um resíduo de cisteína livre, o Cys34. Os outros resíduos formam 17 pontes de dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A albumina é responsável pela manutenção do pH do sangue e desempenha papel fundamental

na ligação e transporte de moléculas importantes como ácidos graxos, hormônios, medicamentos e íons de metal no sangue [28].

A estrutura da albumina é formada por uma cadeia e está organizada em três domínios helicoidais homólogos, os quais têm dois subdomínios, cada um com uma forma helicoidal comum. Estes domínios estruturais são unidos por ligações peptídicas. A figura 1.6 representa os domínios I, II e III e os subdomínios A e B da HSA[29].

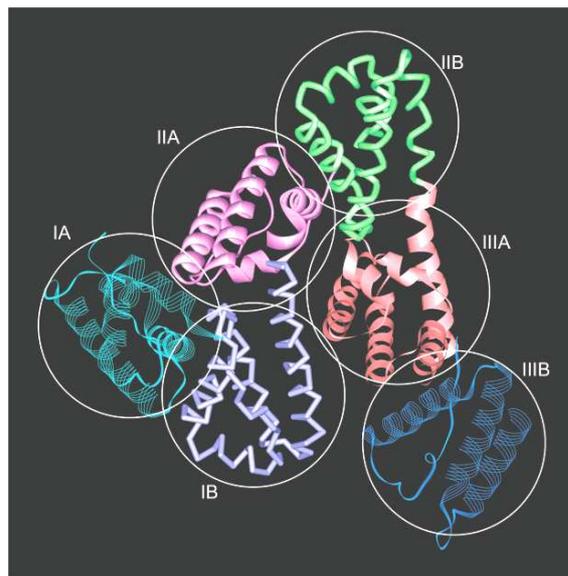


Figura 1.6 Domínios e subdomínios da HSA [29].

A hemoglobina é encontrada somente no interior das hemácias. É formada por duas cadeias α (141 aminoácidos) e duas β (147 aminoácidos), como pode ser observado na Figura 1.7. Os monômeros permanecem unidos por interações não-covalentes. No interior de cada subunidade encontram-se os grupos heme, onde os átomos de ferro são armazenados. A molécula de hemoglobina é formada principalmente por estruturas secundárias α -hélice [6].

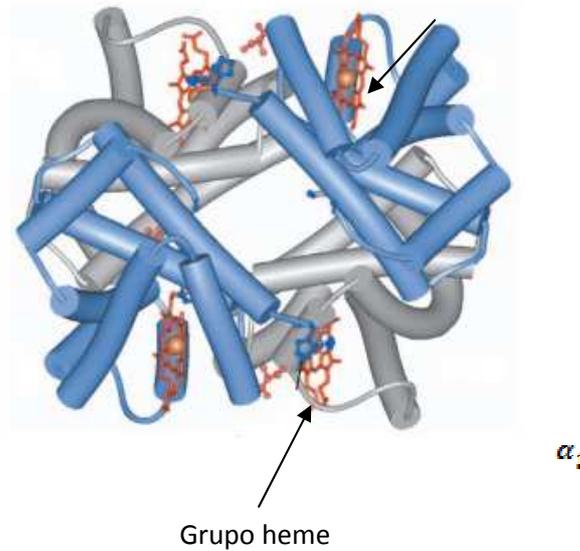


Figura 1.7 Estrutura molecular da hemoglobina[6].

Sob circunstâncias não-fisiológicas as moléculas das proteínas em geral apresentam diferentes mudanças conformacionais [3]. A exposição da proteína a mudanças do pH, de pressão ou a temperaturas elevadas, mesmo por curto período de tempo, faz com que a maioria delas apresente modificações físicas conhecidas como desnaturação. A agitação térmica faz com que a estrutura nativa da proteína, a qual se encontra no estado enrolado, apresente desnaturação térmica total ou parcial, perdendo assim sua atividade biológica [30]. Sob aquecimento as proteínas podem se agregar, tornando o estado nativo compacto mais flexível e frágil. A agregação da proteína é um assunto importante, pois está relacionada com doenças neurodegenerativas [6].

1.1.2 Desnaturação e enovelamento das proteínas

O processo de desnaturação das proteínas, também denominado de desenovelamento, é complexo de ser analisado. Há diversos modelos na literatura que procuram descrever as mudanças ocorridas durante a desnaturação. As proteínas globulares nativas, por exemplo, podem apresentar desnaturação que resulta em uma conformação desenrolada de suas cadeias polipeptídicas. Mesmo sendo acompanhadas por perda de atividade biológica, algumas proteínas desenoveladas, recuperam suas atividades biológicas e com isto sua forma nativa

enrolada podendo esse processo ocorrer rapidamente. Por exemplo, em 37°C uma molécula que contenha 100 aminoácidos pode voltar ao estado nativo em cerca de cinco segundos [6].

A Figura 1.8 mostra um esquema de um processo de enovelamento de uma pequena molécula de proteína (vilina) que contém apenas 36 resíduos de aminoácidos. Neste caso, a proteína encontra-se inicialmente no estado desnaturado parecendo um fio de lã desenovelado, esticado. Conforme a temperatura vai diminuindo, a proteína começa a enrolar-se recuperando seu estado nativo, também denominado enovelado. Neste exemplo específico, a macromolécula foi desnaturada de forma reversível, tornando-se possível a volta para o estado nativo, readquirindo suas funções biológicas [6].

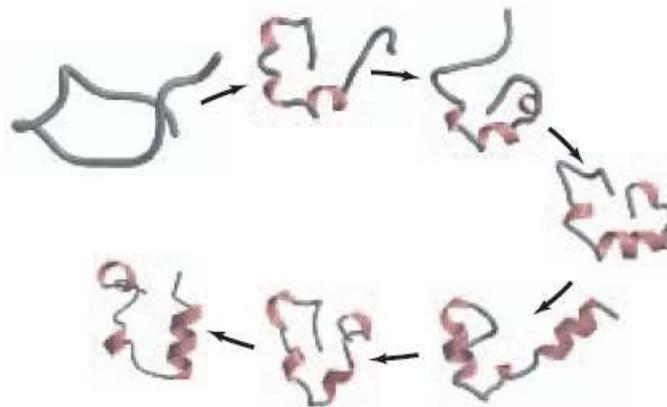


Figura 1.8 Simulação computadorizada de um enovelamento da proteína vilina [6].

Este enrolamento espontâneo, com uma conformação altamente ordenada e biologicamente ativa, reduz a entropia da cadeia polipeptídica para um valor mínimo. A segunda lei da termodinâmica estabelece que todos os processos ocorrem na direção que a entropia é máxima. A explicação deste dilema está no equilíbrio dos efeitos. Um dos efeitos está relacionado com a tendência da cadeia polipeptídica encontrar sua conformação própria de causalidade máxima ou de máxima entropia. O efeito oposto é a tendência das moléculas de água circundantes encontrarem sua posição de máxima causalidade ou entropia máxima. No estado nativo quando a cadeia está corretamente enovelada, o aumento na entropia das moléculas de água circundantes é maior que a redução na entropia da cadeia polipeptídica. Levando em consideração a combinação do sistema, proteína e moléculas de água, há um aumento na entropia em função do enovelamento, estando assim em acordo com a segunda lei da termodinâmica [6,31-33].

A estrutura final enovelada, ou conformação, é também determinada por fatores energéticos. A proteína em solução aquosa está em contato com moléculas de água formando camadas de hidratação ao seu redor. A quantidade de água está relacionada com a energia livre. A energia livre surge a partir de interações hidrofóbicas entre as moléculas de água e os aminoácidos não-polares dos agrupamentos R, que tendem a ficar protegidos da exposição à água [6,25].

O processo de enovelamento pode ser visto termodinamicamente em um diagrama na forma de um funil para a energia livre de Gibbs, como mostra a Figura 1.9 [6]. No topo do diagrama observa-se um número grande de estruturas desenoveladas, o qual corresponde a um valor alto de entropia e de energia. Neste estado, o número de conformações é grande. No caso de uma mudança de estado, em que a proteína desnatura-se de forma reversível, as estruturas secundárias tendem a voltar ao estado de menor entropia. Este estado corresponde ao estado nativo. O estreitamento do funil corresponde ao decréscimo de conformações da proteína. As pequenas variações nas laterais da energia livre representam estados intermediários semi-estáveis que geralmente ocorrem lentamente [31].

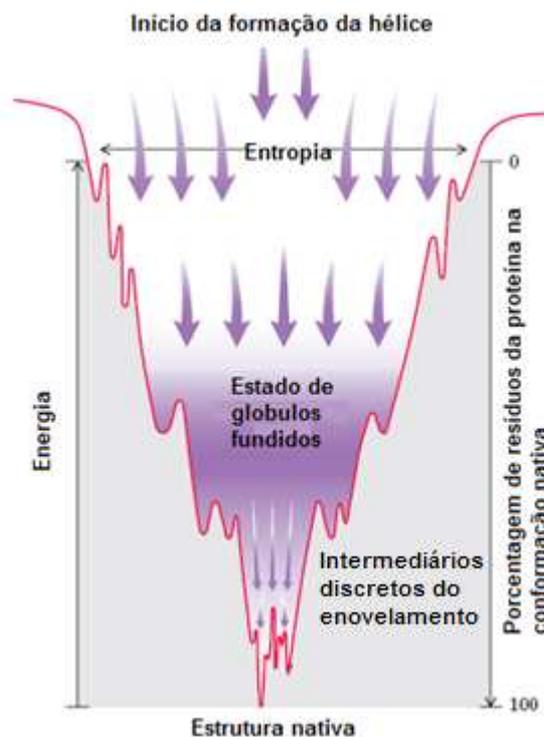


Figura 1.9 Diagrama termodinâmico do enovelamento da proteína[6].

Em geral, o processo de desnaturação térmica das proteínas mostra curvas muito inclinadas, que sugerem que uma cadeia polipeptídica apresenta dois estados bem definidos,

um completamente enovelado e outro completamente desenovelado [22]. A transição abrupta para a forma desenovelada, em um intervalo muito pequeno de temperatura, indica que a desnaturação é um processo cooperativo, no qual a ruptura das primeiras ligações fracas aumenta acentuadamente a probabilidade das rupturas restantes. Para moléculas proteicas maiores, como a albumina, estudos sugerem que o processo de desenovelamento seja constituído por estados intermediários de conformação [33]. A Figura 1.10 ilustra a estabilidade de uma proteína em seu estado nativo. Com o aumento de energia e temperatura a estabilidade da proteína é modificada até atingir uma temperatura crítica (T_C), também denominada de temperatura de desnaturação, após a qual perde sua estrutura inicial e, conseqüentemente, sua estabilidade cai abruptamente para um valor mínimo.

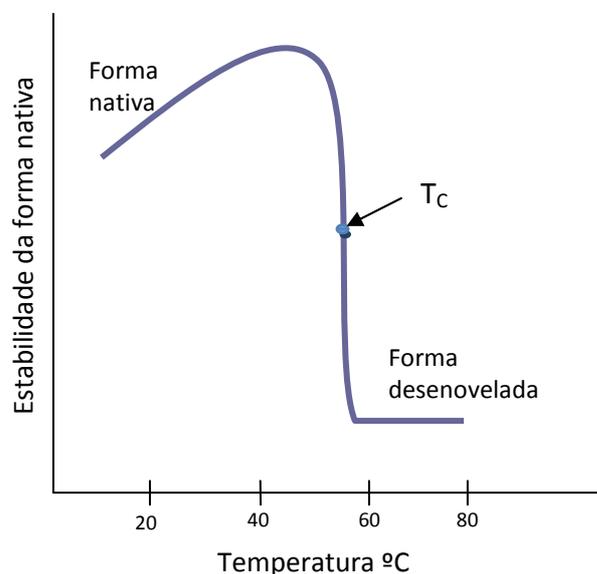


Figura 1.10 Curva de “fusão” térmica de uma proteína [22].

O calor interfere principalmente nas interações fracas como as pontes de hidrogênio e em solução aquosa os grupos hidrofóbicos também são modificados. O intervalo de temperatura em que ocorre a desnaturação das proteínas é muito estreito e de difícil detecção [6]. A região de temperatura crítica de mudança entre os estados está relacionada com a taxa de aquecimento, sendo que para taxas lentas ela é mais fácil de ser detectada.

As proteínas podem apresentar diversas conformações que podem ser representadas estatisticamente por microestados. Considerando um processo que contenha apenas dois estados bem definidos, nativo (N) e desnaturado (D), o *ensemble* (conjunto) desses microestados compõe os macroestados nativo, [N], e desnaturado, [D], da proteína. O

macroestado [N] é composto por uma quantidade pequena de microestados, pois a estrutura da proteína não varia muito, para não comprometer sua função. Mas o macroestado [D] pode apresentar um número muito elevado de microestados [34].

A estabilidade da molécula de proteína entre os estados N e D está associada a uma constante de equilíbrio (K_N^D), de acordo com a seguinte equação [33]:

$$K_N^D = \frac{[D]}{[N]} \quad (1.1)$$

A variação de energia livre de Gibbs entre os estados nativo e desnaturado, $\Delta_N^D G$, pode ser escrita em função da constante de equilíbrio e da energia padrão de desnaturação $\Delta_N^D G_0$ [34]:

$$\Delta_N^D G = \Delta_N^D G_0 + RT \ln K_N^D \quad (1.2)$$

em que R (8,314J/K.mol ou 1,987cal/K.mol) é a constante universal dos gases e T, a temperatura absoluta, em Kelvin.

A variação de energia livre de Gibbs, $\Delta_N^D G$, é nula em condições de equilíbrio. Sendo assim, a equação (1.2) pode ser escrita como [34,35]:

$$\Delta_N^D G_0 = -RT \ln K_N^D \quad (1.3)$$

A variação de energia $\Delta_N^D G_0$ pode ser positiva, negativa ou nula, dependendo da concentração de microestados [N] e [D]. Em equilíbrio têm-se três situações, analisadas com as equações (1.1) e (1.2) [35,36]:

- 1) $N > D$, implica $\Delta_N^D G$ positivo, nesta situação a transição $N \rightarrow D$ não é espontânea e necessita de energia para a mudança de estado;
- 2) $N = D$, resulta em $\Delta_N^D G$ nulo, portanto não há transição espontânea entre os dois estados sob condições padrões;
- 3) $N < D$, $\Delta_N^D G$ negativa, a transição $N \rightarrow D$ ocorre de maneira espontânea sem o fornecimento de energia.

Considerando a proteína em solução aquosa, esta situação de equilíbrio deve considerar a formação e quebra de interações não-covalentes como pontes de hidrogênio, hidrofóbicas e iônicas [35].

A variação infinitesimal de energia livre Gibbs, dG , pode ser escrita em função da variação infinitesimal da entropia e da entalpia. Considerando um processo isobárico e não isotérmico a equação dG será:

$$dG = dH - TdS - SdT \quad (1.4)$$

Na qual $dH=dQ$ e $dS=dQ/T$. Assim, para um processo não isotérmico tem-se:

$$dG = -SdT \quad (1.5)$$

Os mecanismos envolvidos no processo de desnaturação térmica da proteína são complexos, ocorrendo mudanças em sua estrutura e em seu estado biológico. A complexidade está relacionada com a estrutura da proteína. Nas proteínas de multi-domínios, cada domínio pode atuar de forma independente e as interações entre eles podem influenciar o desenovelamento total [29].

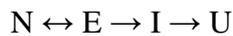
A literatura traz diversos esquemas para descrição do processo de desnaturação, principalmente para a albumina que é a proteína mais abundante no sangue, sendo assim uma das mais estudadas. Um modelo geral de desnaturação térmica foi descrito por Eyring e Lumry, o qual consiste no seguinte processo [37]:

Nativo \leftrightarrow reversível \rightarrow irreversível

O modelo consiste em duas fases. Na primeira, denominada de reversível, a proteína se desnatura, mas volta ao estado nativo após resfriamento. Já na segunda, denominada de irreversível, mesmo após o resfriamento ela permanece com sua estrutura desenovelada.

A maneira mais simples de representar a desnaturação consiste em um esquema que contenha apenas dois estados bem definidos, nativo (N) e desnaturado (D). Este esquema descreve muito bem proteínas que apresentam apenas um domínio, como por exemplo, a mioglobina.

Proteínas mais complexas que apresentam mais de um domínio e subdomínios possuem um esquema de desnaturação com estados intermediários. Estudos com técnicas de fluorescência, realizados na albumina, mostraram que para um aumento de temperatura de cerca de 50°C há uma separação reversível dos domínios I e II. Em temperaturas acima de 50°, porém menor que 70°C, ocorre o desenovelamento irreversível do domínio II, enquanto o aumento de temperatura acima de 70 °C ou mais resulta no estado de desenovelamento irreversível para o domínio I [38]. Estes resultados mostram que em uma proteína com multi-domínios, como é o caso da albumina, a desnaturação ocorre separadamente por domínios, evidenciando existência de estados intermediários. Este processo tem três etapas e é representado pelo seguinte esquema [38]:



Estado nativo (N) \leftrightarrow estendido (E) \rightarrow intermediário (I) \rightarrow desnaturado (U). Este modelo difere do anterior por apresentar uma etapa intermediária. No estado estendido ocorre a separação dos domínios, o que constituiu em um processo reversível. No estado intermediário ocorre a desnaturação de um dos domínios enquanto que o outro permanece intacto. No último estado desnaturado, o domínio que estava intacto começa a desnaturar logo após a desnaturação completa do primeiro domínio, tornando-se um processo irreversível. Mesmo no estado desnaturado ainda pode haver algumas moléculas com desnaturação reversível. A explicação provável consiste na formação de ligações S-S e SH-livre que dão forma dentro dos vários domínios, e/ou a presença de alguma cooperação intramolecular na desnaturação térmica que atua para manter algum grau de estrutura [38].

A desnaturação de uma proteína globular está geralmente relacionada com uma mudança na sua estrutura secundária [29]. Por exemplo, os estudos do comportamento e do desenovelamento da HSA realizados com o método de dicroísmo circular (DC) indicam que o índice de estruturas α -hélice dessas proteínas diminui devido ao aumento de temperatura, sendo que em temperaturas abaixo de 50°C a perda da estrutura α -hélice (entre 40 e 45 °C) é de 3% [40], enquanto que nas regiões de temperatura acima de 75°C, não há uma recuperação integral das estruturas desenroladas após refrigeração subsequente [29,39]. Esta diminuição de estruturas α -hélice também é observada em amostras de hemoglobina [1]. Assim, para

proteínas com multi-domínios, as temperaturas de cada fase de desenvolvimento, reversível e irreversível, podem variar para cada domínio.

1.2 Mecanismos de permeação e a fotoestabilidade de formulações de uso tópico

A pele constitui uma proteção natural contra a desidratação e agressões externas, possuindo alta resistência à permeação. É constituída por duas camadas: a epiderme, correspondente à mais externa, e a derme, a interna, que repousa sobre a camada subcutânea (ou hipoderme), conforme ilustra a Figura 1.11 [41].

A epiderme, avascular, é formada pelo epitélio estratificado cujas células se denominam queratinócitos. Pode ser dividida em duas partes: camada mais interna na qual as células proliferam, sofrem alterações morfológicas, e que dá origem às células mortas do estrado córneo, a parte mais superficial, de grande importância para o estudo da permeação cutânea, pois é a principal barreira à difusão de substâncias na pele [41].

A derme, logo abaixo da epiderme, é formada por uma rede de fibras de colágeno e elastina, que são responsáveis pelas propriedades de resistência e elasticidade da pele, respectivamente. A derme contém vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e os apêndices cutâneos, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas [41].

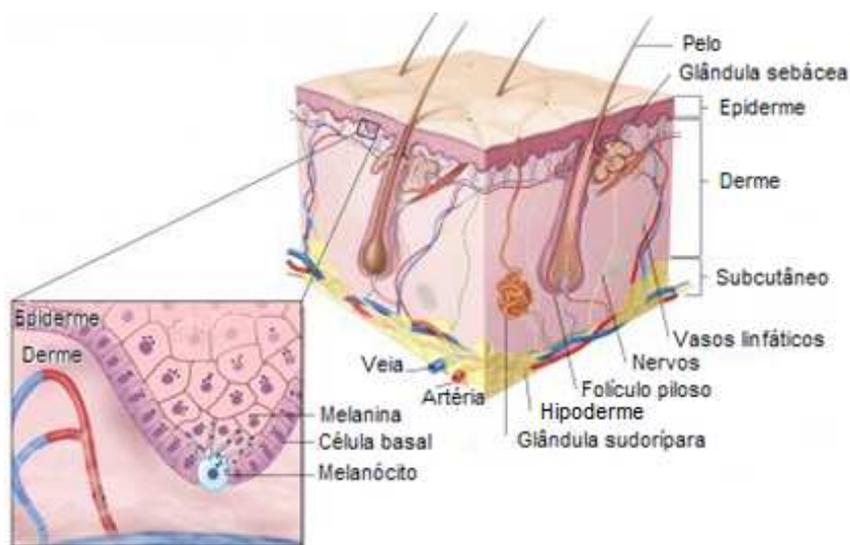


Figura 1. 11. Estrutura da pele, em detalhe o melanócito [42].

A permeação de formulações através das camadas da pele ocorre por difusão por duas vias: via transepidérmica, que compreende a penetração transcelular e a penetração intercelular conforme ilustra a Figura 1.12, e a via transanexal (através dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas). O estrato córneo é constituído pelas lamínulas formadas por queratinócitos mortos e cornificados e por um material lipídico localizado entre as lamínulas. A permeação através do estrato ou camada córnea consiste no mecanismo mais importante por se tratar de tecidos não vascularizados, demandando a adoção de estratégias específicas para cada funcionalidade pretendida [43,44].

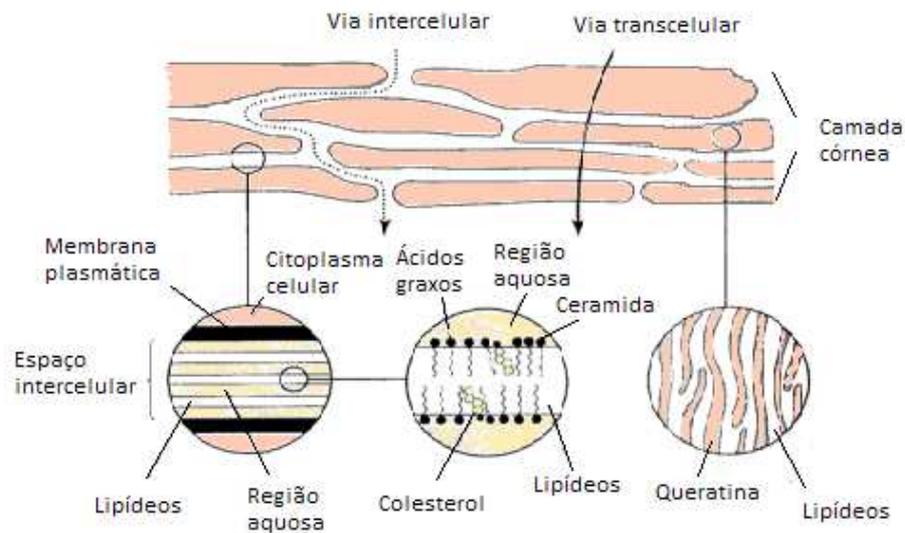


Figura 1.12 Diagrama simplificado do estrato córneo com duas rotas de penetração [43].

O estudo de permeação de formulações farmacológicas na pele é de grande importância na eficácia da elaboração de fármacos e de protetores solares. Entre as dificuldades para se fazer um perfil da distribuição destas formulações na pele está a heterogeneidade da estrutura, as diferenças de indivíduo para indivíduo, o grau de hidratação, entre outras.

A Espectroscopia Fotoacústica talvez venha sendo o método mais eficiente para se executar esta tarefa. Em estudo realizado anteriormente [16], demonstramos que é mais vantajoso medir o espectro de absorção da formulação sobre a pele do que realizar a medida em um único comprimento de onda. Para a realização dos espectros de absorção *in vivo* foi utilizada a célula fotoacústica aberta, conforme ilustra a Figura 1.13. A formulação de protetor solar foi aplicada no antebraço dos voluntários para se avaliar a permeação cutânea.

Os experimentos foram realizados em intervalos de tempo de aproximadamente 15 min., durante 3h.

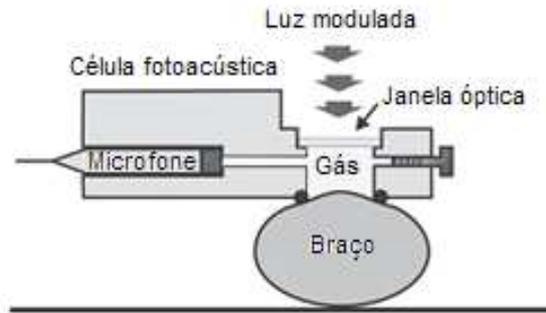


Figura 1.13 Detalhe da célula fotoacústica aberta.

A Figura 1.14 mostra os espectros de absorção *in vivo* para o produto aplicado sobre o antebraço, imediatamente após sua aplicação sobre a pele, na curva em preto. A curva vermelha foi determinada 130 minutos após a aplicação do mesmo produto. Vê-se que após duas horas de aplicação tem-se uma diminuição significativa na intensidade da banda de absorção da formulação, na região em torno de 370 nm, indicando a permeação da substância para o interior da pele. Para comparação, a curva azul na parte superior da figura mostra o espectro do protetor sobre uma lamínula de vidro.

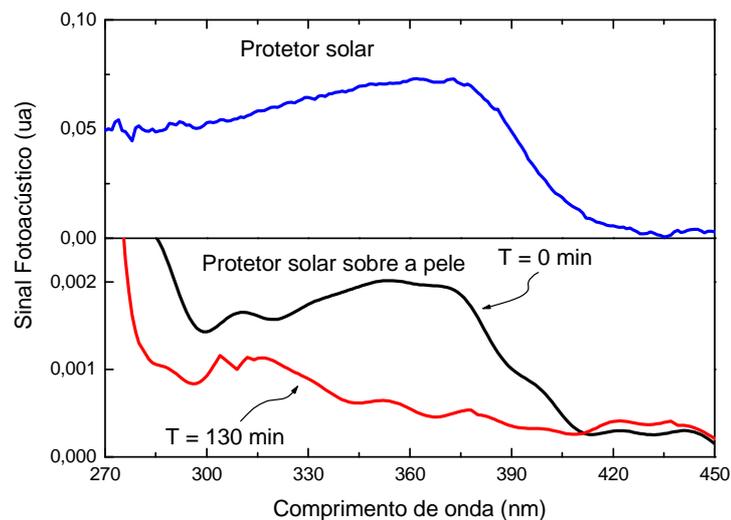


Figura 1.14 Superior: espectro de absorção do protetor solar sobre a lâmina de vidro. Inferior: curva em preto: espectro de absorção da formulação determinado imediatamente (tempo 0) após a aplicação do produto sobre a pele e curva em vermelho: espectro de absorção determinado 130 minutos após a aplicação do produto sobre a pele [16].

Este resultado demonstra que embora as formulações sejam projetadas para se manterem na superfície da pele, a permeação ocorre. Em outros estudos realizados em nosso grupo [45,46], incluindo aquele realizado na minha dissertação de mestrado [18], foi demonstrado que ao se propagarem através da pele, estas formulações atingem a região da derme, em especial dos melanócitos. Isto aponta para a necessidade de se avaliar a fotoestabilidade destas formulações, porque ao penetrarem na pele até as camadas mais internas, poderão ser estimuladas via absorção das radiações que podem atingir estas regiões.

A pele é praticamente transparente desde a região do UVA (entre 320 e 400 nm) até o infravermelho próximo [47]. Como os protetores solares comerciais para a região do UVA (320-400nm) em geral são produzidos com derivados de benzofenonas e antranilato de metila, ao absorverem a radiação ultravioleta energizam o oxigênio do meio, provocando uma ação lesiva colateral. Este processo de interação entre a substância protetora, a pele e a radiação solar ainda é controverso e demanda novos estudos. Entre os efeitos da interação da luz com os protetores e a pele está a formação de radicais livres, que recombina rapidamente caracterizando uma reação fotoquímica que pode ser prejudicial à pele [48].

Assim, rente à demonstração em trabalhos anteriores de que estas formulações se propagam até as camadas mais internas da pele, torna-se importante avaliar a fotoestabilidade das formulações de modo a se verificar se estimulam reações fotoquímicas. Como se trata de materiais na forma de pó ou cremes, estes estudos são difíceis de ser realizados com as técnicas espectroscópicas convencionais. Portanto, a Espectroscopia Fotoacústica parece ser um método adequado para este tipo de estudo.

Capítulo 2 - Técnicas Fototérmicas

2.1 Introdução

As técnicas fototérmicas constituem um grupo de métodos sensíveis de detecção da absorção óptica e caracterização térmica da amostra. O efeito fototérmico consiste na mudança do estado térmico da amostra induzido por uma radiação eletromagnética incidente. Isto ocorre quando a energia luminosa incidente pode ser parcialmente ou totalmente absorvida e convertida em calor. O calor gerado geralmente é resultado de processos de desexcitação dos níveis de energia atômicos e moleculares via relaxação não radioativa. O aquecimento na amostra provoca então mudança de temperatura seguida de variações nos parâmetros termodinâmicos como volume e pressão. Consequentemente, haverá variação do índice de refração (dn/dT) e da densidade (ρ) [49,50].

O conjunto de técnicas fototérmicas é classificado como um grupo de métodos indiretos de análise da absorção óptica. No método indireto, não se mede o coeficiente de transmissão da luz, mas sim o efeito causado pela absorção óptica na amostra, já que o aquecimento resulta da energia absorvida [51]. O aquecimento causado na amostra depende da quantidade de radiação eletromagnética absorvida, não havendo contribuição das perdas por espalhamento e reflexão.

A geração do sinal fototérmico envolve alguns processos básicos, como mostra a Figura 2.1. A fonte de radiação óptica pode ser dada por um laser, por exemplo. Parte da energia incidida é absorvida e gera um aumento da energia interna. Após a desexcitação há um aumento da temperatura e consequentemente mudança na densidade da amostra. Se a mudança de temperatura ocorrer em um intervalo de tempo menor que o mínimo exigido para a amostra expandir ou contrair, a mudança na temperatura resultará na variação de pressão, formando assim ondas acústicas [49]. A mudança da densidade é responsável pela mudança do índice de refração na amostra e pode ser monitorada usando-se um laser de prova.

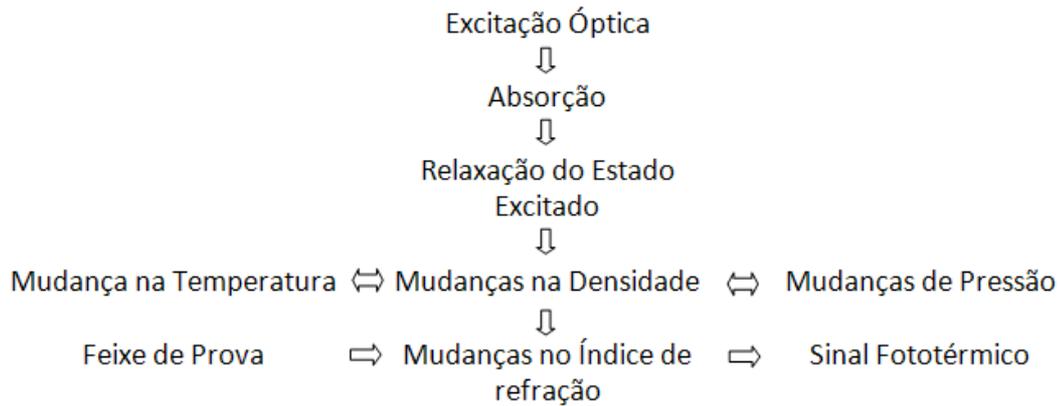


Figura 2.1 Processos envolvidos na espectroscopia fototérmica [49].

O sinal fototérmico pode ser obtido por diferentes técnicas. A medida da variação da temperatura pode ser obtida pelas técnicas de calorimetria, emissão infravermelha e radiometria fototérmica. A variação de pressão pode ser detectada pela espectroscopia fotoacústica e as medidas de variação na densidade são obtidas pela espectroscopia de lente térmica, difração fototérmica e deflexão superficial.

Nos próximos itens deste capítulo serão discutidas as técnicas utilizadas para o desenvolvimento da presente pesquisa, como a ELT, interferometria óptica e a PAS.

2.2 Espectroscopia de lente térmica (ELT)

O efeito de lente térmica foi observado pela primeira vez em 1964 [52]. Entre os pesquisadores envolvidos estavam os brasileiros RCC Leite e SPS Porto. Ao introduzir corante no interior da cavidade de um laser de He-Ne para estudar o efeito Raman, eles observaram mudança na intensidade do centro do feixe e associaram o referido efeito a uma lente térmica gerada pelo aquecimento da região excitada. Posteriormente, o mesmo efeito foi observado com a amostra posicionada fora da cavidade laser depois de ser submetida à excitação por um feixe laser de perfil gaussiano [53].

O efeito de lente térmica (LT) pode ser entendido da seguinte forma: quando um laser de perfil de intensidade gaussiano incide sobre uma amostra parcialmente transparente e a energia absorvida é total ou parcialmente convertida em calor, haverá uma variação radial de temperatura na região excitada. Como consequência, haverá um gradiente de índice de refração com simetria radial ao longo do cilindro de calor que se formará na direção de

propagação do feixe, ou seja, ao longo da espessura da amostra. Este efeito é semelhante a uma lente por que tem a propriedade de convergir ou divergir o feixe laser que passa por esta região. Este efeito de LT está relacionado com parâmetros térmicos e ópticos da amostra em análise como: coeficiente de absorção óptica, coeficiente térmico do índice de refração, coeficientes de temperatura da polarizabilidade eletrônico e da expansão térmica, além da condutividade e da difusividade térmica. Trata-se de uma medida local, porque a região excitada pelo laser em geral é muito pequena em relação ao volume total da amostra.

Embora a espectroscopia de lente térmica possa ser realizada utilizando-se um único feixe laser para gerar e para provar a lente térmica, é mais comum o uso de dois feixes [54]. Neste caso, um feixe laser é usado para a excitação da amostra e a geração da LT e o outro para detectá-la, denominado de feixe de prova. Entre as vantagens de se usar dois feixes está a maior simplicidade para o alinhamento, além de maior sensibilidade e maior flexibilidade para a realização de estudos espectroscópicos. A configuração utilizada para este trabalho é denominada de modo descasado, ilustrada na Figura 2.2. Neste arranjo, os raios dos feixes de prova (em vermelho) e de excitação (em verde) na amostra são diferentes.

Considerando o eixo de propagação dos lasers em z , a amostra é posicionada na cintura do feixe de excitação em z_1 e fora da cintura do laser de prova em $z = 0$. O detector fica localizado a uma distância de z_1+z_2 , que é da ordem de 5m. A cintura do feixe de prova é definida como ω_{op} , os raios dos feixes de prova e de excitação na amostra são ω_{1p} e ω_{oe} , respectivamente.

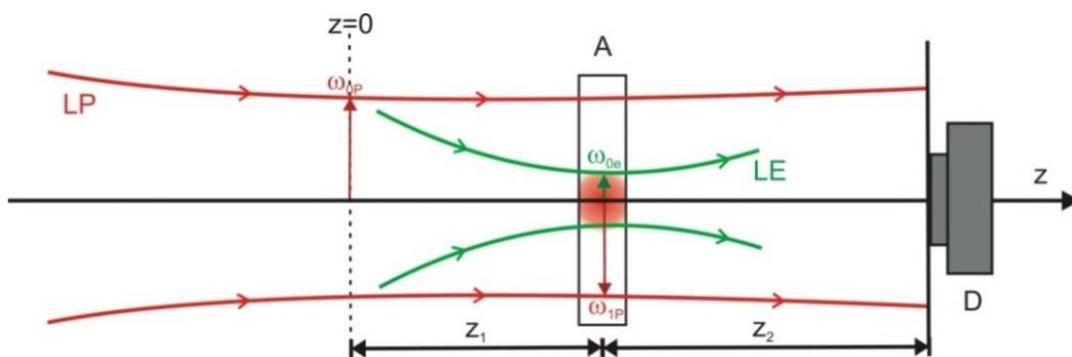


Figura 2.2 Representação do experimento de LT com feixe duplo no modo descasado. A é a amostra; LP é o feixe de prova; LE é o feixe de excitação; z_1 é a distância confocal do feixe de prova; z_2 é a distância entre o centro da amostra e o detector (D). A origem do eixo está localizada na cintura do feixe de prova.

O modelo teórico para o modo descasado foi desenvolvido em 1992 por Shen e colaboradores [54,55]. Neste modelo considerou-se que ambos os feixes têm perfil de intensidade gaussiano. São três os passos principais para o desenvolvimento do referido modelo: (1) determinar o aumento local de temperatura induzido pela absorção do feixe de excitação $\Delta T(r,t)$; (2) determinar a variação do índice de refração dn/dT , induzida pela variação de temperatura $\Delta T(r,t)$ na amostra; e, por último, (3) determinar a intensidade do campo elétrico do laser de prova na posição do detector $I(t)$, o que é realizado utilizando-se a teoria de difração de Fresnel.

A variação de temperatura local induzida na amostra é obtida resolvendo-se a equação de difusão do calor induzido na amostra pela absorção parcial do laser de excitação. A solução detalhada está descrita em trabalhos anteriores [11,54,55], obtendo-se:

$$\Delta T(r,t) = \frac{2P_e A_e}{\pi \rho C_p \omega_e^2} \int_0^t \left(\frac{1}{1 + (2t'/t_c)} \right) \exp\left(-\frac{2r^2 / \omega_e^2}{1 + 2t'/t_c} \right) dt' \quad (2.1)$$

em que:

$$t_c = \frac{\omega_{0e}^2}{4D} \quad \text{e} \quad D = \frac{K}{\rho C_p} \quad (2.2)$$

t_c é definido como o tempo característico de formação da lente térmica, D é a difusividade térmica, P_e é a potência do laser de excitação, A_e é o coeficiente de absorção óptica no comprimento de onda do laser de excitação., ρ é a densidade, k é a condutividade térmica e C_p é calor específico da amostra.

Quando o laser de prova passa pela lente térmica ocorre uma pequena distorção na sua frente de onda. Esta distorção é descrita como uma diferença de fase que está relacionada com a mudança do caminho óptico em relação ao eixo. Conforme descrito em trabalhos anteriores [11], esta diferença de fase é dada por:

$$\Phi = \frac{\theta}{t_c} \int_0^t \frac{1}{1+2t'/t_c} \left[1 - \exp\left(\frac{-2r^2 / \omega_{0e}^2}{1+2t'/t_c}\right) \right] dt' \quad (2.3)$$

com:

$$\theta = -\frac{P_e A_e L_0}{K \lambda_p} \left(\frac{dn}{dT} \right) \quad (2.4)$$

em que, L_0 é a espessura da amostra, λ_p é o comprimento de onda do laser de prova e dn/dT é a mudança do índice de refração com a temperatura, no comprimento de onda do laser de prova.

A mudança no índice de refração de uma amostra com a temperatura pode ser resultado de dois processos:

- 1- Aumento no volume molar, V , devido a um aumento no espaço inter-atômico das moléculas, o que resulta em diminuição do índice de refração;
- 2- Aumento na polarizabilidade eletrônica, P , com a estrutura tendendo a um estado mais dissociado, causando assim aumento no índice de refração.

Sendo assim, a variação do índice de refração em relação à temperatura pode ser escrita como uma combinação desses dois processos da seguinte maneira [57]:

$$\frac{dn}{dT} = \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 1)}{6n} (\varphi - \beta) \quad (2.5)$$

Sendo:

$$\beta = \frac{1}{V} \left(\frac{dV}{dT} \right) \quad \text{e} \quad \varphi = \frac{1}{P} \left(\frac{dP}{dT} \right) \quad (2.6)$$

Como último procedimento do desenvolvimento teórico da lente térmica, tem-se a determinação da propagação do feixe de prova. Assumindo que a potência do feixe de prova absorvida pela amostra seja desprezível em comparação com a do laser de excitação e que o feixe emergente da amostra que se propaga até o detector possa ser tratado via teoria de difração de Fresnel, o resultado da intensidade pode ser dado como $I(t) = |U_P(z_1 + z_2, t)|^2$,

em que U_p é a amplitude complexa do campo elétrico do laser de prova no detector, após ter atravessado a região da lente térmica [11]:

$$U_p(z_1 + z_2, t) = C \int_0^{\infty} (1 - j\Phi) \exp[-(1 + jV)g] dg \quad (2.7)$$

em que $g = \left(\frac{r}{\omega_{1P}}\right)^2$, C é uma constante e $V = \frac{z_1}{z_c}$, no qual z_c é a distância confocal do feixe

de prova. Substituindo a equação (2.7) em $I(t) = |U_p(z_1 + z_2, t)|^2$, teremos:

$$I(t) = I(0) \left\{ 1 - \frac{\theta}{2} \arctan \left[\frac{2mV}{\left[\frac{(1+2m)^2 + V^2}{2t} \right] t_c + 1 + 2m + V^2} \right] \right\}^2 \quad (2.8)$$

em que $m = \left(\frac{\omega_{1P}}{\omega_{0e}}\right)^2$ e $I(0)$ é o valor de $I(t)$ quando o tempo t é zero ou θ é zero.

A equação (2.8) é a equação de trabalho que pode ser utilizada para ajustar os transientes experimentais, fornecendo os parâmetros θ e D, que são utilizados para se determinar as propriedades ópticas e térmicas da amostra. Os parâmetros m e V são determinados com o auxílio de um medidor de feixe e são específicos para cada montagem utilizada. Quando os experimentos são realizados variando-se a temperatura da amostra, com um sistema de aquecimento, os parâmetros θ e D são determinados em função da temperatura, ou seja, $\theta(T)$ e $D(T)$.

2.3 Interferometria óptica (IO)

A representação da configuração da interferometria óptica está ilustrada na Figura 2.3 [56]. Nesta configuração, temos que S é um feixe de luz monocromático e n e n' são os índices de refração da placa e da vizinhança, respectivamente, sendo L a espessura da placa e θ e θ' os ângulos de incidência e refração em relação à normal, N.

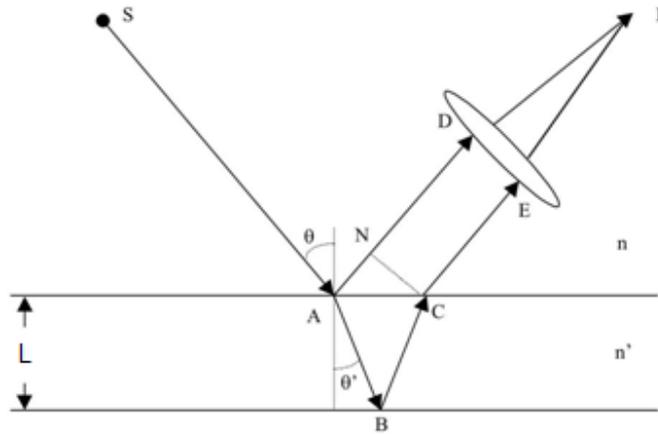


Figura 2.3 Representação da interferometria óptica.

A diferença de caminho óptico (ΔS) entre dois feixes refletidos na primeira (A) e na segunda (B) superfícies da amostra é expressa por:

$$\Delta S = 2nL \cos \theta' = m\lambda \quad (2.9)$$

Quando o ângulo de incidência é pequeno, podemos escrever:

$$\Delta S = 2nL = \lambda m \text{ ou } S = nL = \frac{\lambda}{2} m \quad (2.10)$$

Ou seja, os máximos de interferência são obtidos quando esta diferença de caminho óptico é igual a um número inteiro de comprimentos de onda, e os mínimos quando é igual a um número semi-inteiro de comprimentos de onda.

Uma vez obtida a formação de franjas, o que se pode fazer é variar a temperatura da amostra com o auxílio de um forno resistivo. Assim, haverá mudança no caminho óptico da amostra e, como consequência, deslocamento das franjas de interferência. Estes deslocamentos podem ser medidos com o auxílio de um fotodiodo posicionado de modo a se detectar o feixe que passa pela amostra sob aquecimento. O fotodiodo deve ter uma área muito menor do que o espaçamento entre as franjas. Assim, o deslocamento dos máximos e mínimos pode ser medido. Portanto, diferenciando-se a equação (2.10) em relação à temperatura e dividindo o resultado por L, temos:

$$\frac{1}{L} \left(\frac{dS}{dT} \right) = \left(\frac{dn}{dT} \right) + n\alpha = \frac{\lambda}{2L} \left(\frac{dm}{dT} \right) \quad (2.11)$$

Em (2.11) $\alpha = \frac{1}{L} \left(\frac{dL}{dT} \right)$ é o coeficiente linear da expansão térmica, na direção do feixe de laser incidente.

Definindo $\frac{1}{L} \left(\frac{dS}{dT} \right) = \left(\frac{ds}{dT} \right)$, temos:

$$\left(\frac{ds}{dT} \right) = \left(\frac{dn}{dT} \right) + n\alpha = \frac{\lambda}{2L} \left(\frac{dm}{dT} \right) \quad (2.12)$$

As amostras líquidas, como as utilizadas nas medidas realizadas neste trabalho, as mesmas são colocadas em uma cubeta de quartzo, cujo coeficiente de expansão térmica é muito pequeno ($6 \cdot 10^{-7} \text{ K}^{-1}$) se comparado ao coeficiente térmico do índice de refração da amostra ($\approx 10^{-4} \text{ K}^{-1}$). Podemos, então, desprezar a expansão na direção de propagação do feixe, e assim escrever [56,57]:

$$\left(\frac{ds}{dT} \right) \approx \left(\frac{dn}{dT} \right) = \frac{\lambda}{2L} \left(\frac{dm}{dT} \right) \quad (2.13)$$

em que λ é o comprimento de onda do laser utilizado, L é a espessura da amostra e dm é o número de franjas que passa pelo detector no intervalo de temperatura dT . Esta é a equação de ajuste dos dados experimentais. Uma descrição mais detalhada deste experimento e das considerações teóricas pode ser encontrada na referência [57].

A Figura 2.4 traz um exemplo de uma medida de interferometria para a amostra de hemoglobina. Notam-se as franjas de interferência com os máximos e mínimos.

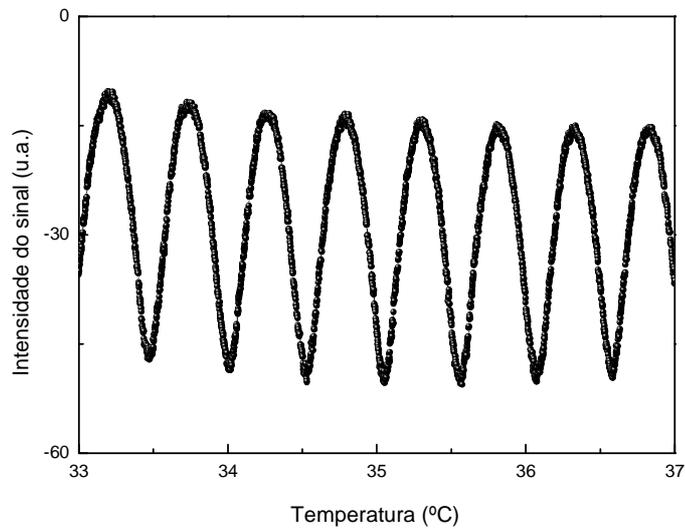


Figura 2.4 Interferograma de uma amostra de hemoglobina diluída em água com concentração 3%.

Um fato importante a ser mencionado é que, embora as intensidades se apresentem de maneiras diferentes, por exemplo, em feixes de intensidades iguais, diferentes ou com múltiplos feixes, a posição dos máximos e mínimos com relação à fase é constante, conforme mostra a Figura 2.5. A medida de (dn/dT) é dependente deste fato, uma vez que as medidas de (ds/dT) dependem da posição dos máximos e mínimos em relação à temperatura.

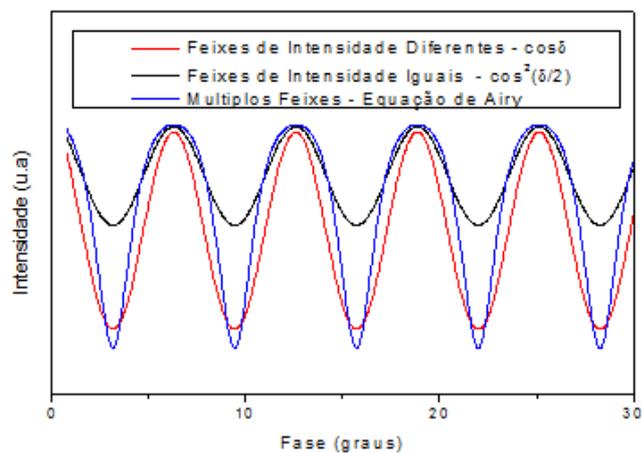


Figura 2.5 Variação da intensidade com a diferença de fase – Interferência de dois feixes de intensidades diferentes, iguais e para múltiplos feixes.

2.4 Espectroscopia fotoacústica (PAS)

A Espectroscopia Fotoacústica é uma técnica espectroscópica baseada no efeito fotoacústico. Este fenômeno foi observado pela primeira vez em 1880 por Alexandre Graham Bell, quando ele trabalhava em seu fonômetro [58]. Bell observou que a incidência de luz solar modulada em um sólido, dentro de uma câmara fechada, produzia efeitos sonoros que podiam ser ouvidos por meio de um tubo ligado a esta câmara.

Motivados pela descoberta de Bell, Tyndall [59] e Röntgen [60] descobriram que o sinal acústico podia ser produzido quando um gás dentro de uma câmara fechada é iluminado por uma luz modulada. A intensidade deste efeito sonoro dependia da intensidade de luz solar absorvida e da natureza da amostra. Como o sistema de detecção usado nas experiências era o próprio ouvido, não foi possível para eles obterem dados quantitativos, e assim os experimentos envolvendo o efeito fotoacústico foram abandonados à época.

Em 1881, Bell interpretou o efeito fotoacústico, realizado em sólidos porosos como o carbono preto, como sendo um ciclo de expulsão e reabsorção do ar nos poros da amostra [61]. Isto estava de acordo com a teoria de Rayleigh [62], a qual também previa que o efeito era gerado pelo movimento mecânico do próprio sólido. Ao contrário, Preece [63] sugeriu que o sólido não realizava movimentos mecânicos, mas sim o efeito de contração e expansão do ar dentro da célula. Já Mercadier [64] concluiu que o aquecimento periódico fazia vibrar a camada de ar em contato com a amostra devido à radiação que estava sendo absorvida.

Cinquenta anos mais tarde, com o desenvolvimento de microfones mais sensíveis, o estudo do efeito fotoacústico foi retomado com as medidas sendo realizadas em gases [65]. Neste caso, o gás absorve os fótons incidentes resultando em aumento na energia cinética das suas moléculas, causando assim uma flutuação na pressão dentro da câmara.

Em 1973, a espectroscopia fotoacústica torna-se uma técnica analítica para a determinação das propriedades ópticas e térmicas de materiais não gasosos, particularmente de materiais opacos ou espalhadores de luz. Isto ocorreu porque os Profs. Allan Rosencwaig e Allen Gersho [66] desenvolveram o primeiro modelo teórico que permitia a utilização de equações analíticas para descrever o comportamento do sinal fotoacústico, tanto em termos da potência de luz incidente, como da frequência de modulação do feixe de excitação. Este modelo aliado aos experimentos em sólidos foi imediatamente aplicado para o estudo de propriedades térmicas e ópticas de materiais. Isto fez com que a fotoacústica fosse

considerada como um método de grande valia para o estudo de sólidos, e entre suas características, talvez a que mais atraiu a atenção dos pesquisadores foi a possibilidade da técnica permitir a realização de estudos de perfil de profundidade dos entes absorvedores ao longo da amostra teste.

2.4.1 Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico consiste na geração de uma onda acústica, e pode ser observado quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula fechada contendo gás (podendo ser o próprio ar), acoplada a um microfone. A luz é absorvida e transformada em energia térmica por um processo de desexcitação não radioativa. O aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com a mesma. Essa variação de pressão do gás é detectada pelo microfone que resulta no Sinal Fotoacústico, e a intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente.

A configuração da célula fotoacústica está representada na Figura 2.6; ela consiste de uma amostra sólida colocada dentro de uma célula, a uma distância da janela de vedação transparente, em contato de um lado pelo gás (ar) e do outro pelo suporte metálico, considera-se que nem o ar nem o suporte absorvem a radiação incidente. Um microfone capacitivo é acoplado na parede lateral da célula em contato com o gás, o qual capta as variações de pressão do ar.

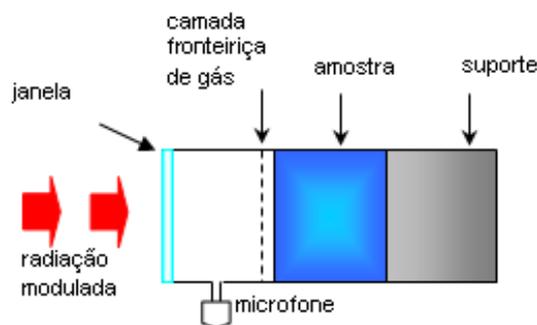


Figura 2.6 Representação da célula Fotoacústica.

A fração de luz, incidente na amostra, que for absorvida pelas moléculas pode ser convertida em calor. Este calor gerado pode chegar até a superfície da amostra e contribuir

para o sinal fotoacústico, dependendo da profundidade do ponto de geração e da frequência de modulação da luz utilizada. O comprimento de difusão térmica, μ_s , é definido como a profundidade na qual a onda de calor gerada pode se propagar até a superfície e contribuir para a geração do sinal fotoacústico. Esse comprimento é definido pela seguinte expressão:

$$\mu_s = \left(\frac{D}{\pi f} \right)^{1/2} \quad (2.14)$$

em que D é a difusividade térmica (cm^2/s) e f é a frequência de modulação (Hz) do feixe de luz que vai iluminar a amostra sob teste. Portanto, mudando-se a frequência de modulação, o comprimento de difusão térmica pode ser alterado de tal forma que um perfil de profundidade possa ser obtido. Assim, quando se aplica uma substância sobre a pele e ela penetra através de sua superfície, o sinal fotoacústico revelará a sua profundidade por meio da dependência com a frequência. Esse procedimento tanto pode ser realizado com apenas um comprimento de onda, na banda de absorção da substância, quanto em toda a faixa espectral disponível, analisando-se o sinal em cada comprimento de onda.

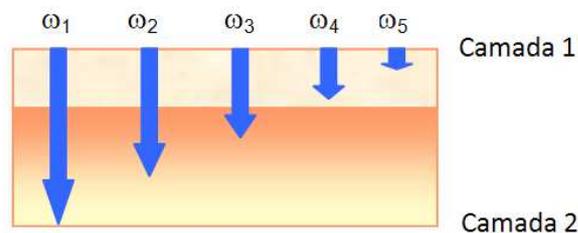


Figura 2.7 Esquema do perfil de profundidade na geração do sinal fotoacústico, aqui $\omega=2\pi f$.

A Figura 2.7 mostra um esboço do perfil de penetração numa amostra, ilustrando o que ocorre se a frequência de modulação da luz (ω) é modificada, ou seja, a informação necessária é extraída da amostra analisada em diferentes profundidades. Quanto menor a frequência de modulação da luz maior será a profundidade de geração do sinal fotoacústico. As flechas representam as profundidades até onde o sinal PA é gerado, para a respectiva frequência de modulação. Nesta figura, a frequência cresce a partir de ω_1 até ω_5 .

É importante citar que a PAS é uma técnica que permite a avaliar *in vivo*, *ex-vivo* ou *in vitro* a propagação e distribuição de medicamentos ou cosméticos através da pele e da unha [67]. Com esta técnica, pode-se realizar separação espectral das contribuições dos diferentes

constituintes das formulações que contribuirão para a absorção óptica descrita pelo espectro total do sistema.

Outra vantagem da PAS é que, por ser uma técnica muito sensível, ela permite detectar a presença de baixas concentrações dos componentes absorvedores na amostra. Além disso, o método é não destrutivo porque permite que a amostra testada possa ser reutilizada para outros ensaios.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Amostra

3.1.1 Proteínas

Nesta etapa do trabalho, foram utilizadas quatro amostras:

- 1) Albumina bovina em forma de cristal (*Bovin Serum Albumin* – BSA);
- 2) Hemoglobina bovina em forma de cristal;
- 3) Plasma humano;
- 4) Soro humano.

O soro e o plasma foram obtidos no Hemocentro do Hospital Universitário da UEM em Maringá. Metade do sangue coletado foi colocada em tubos contendo anticoagulante EDTA, a fim de se obter o plasma, e a outra metade para obtenção do soro.

Para a separação (sedimentação) do plasma e do soro dos elementos figurados, as amostras de sangue passaram por processo de centrifugação e foram submetidas ao repouso. Devido à gravidade, os elementos figurados, por serem mais pesados, se precipitam no fundo do tubo, e o plasma ou soro, por serem mais leves, ficam como sobrenadantes, conforme podemos observar na Figura 3.1. As quantidades de plasma e soro obtidos do sangue foram de aproximadamente 55% e 45% , respectivamente, e 1% de plaquetas. Em seguida, as amostras de plasma e de soro foram coletadas por pipetas e armazenadas em tubos com tampas e devidamente identificados e mantidos sob refrigeração.

As amostras de soro de albumina bovina e de hemoglobina bovina, na forma de cristal, foram adquiridas da *Sigma-Aldrich*. Para a realização dos experimentos, elas foram diluídas em água milli-Q nas seguintes proporções:

- * Albumina: 40mg/ml;
- * Hemoglobina: 3,9mg/ml.

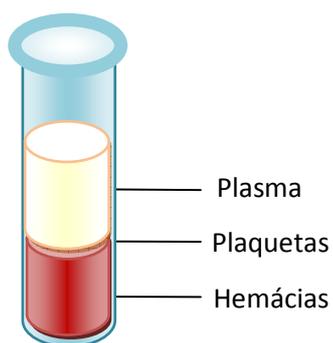


Figura 3.1 Ilustração do plasma sobrenadante e dos elementos figurados após centrifugação e repouso.

As quatro amostras, hemoglobina, plasma, albumina e soro, podem ser observadas na Figura 3.2.



Figura 3.2 Amostras de hemoglobina diluída, plasma, albumina diluída e soro.

3.1.2 Protetor solar

O protetor solar (comercial) analisado continha benzofenona como princípio ativo. As amostras estudadas foram:

- * Princípio ativo
- * Base (oleosa)
- * Filtro solar completo

3.2 Arranjo Experimental

3.2.1 Lente Térmica

A Figura 3.3 mostra o esquema do arranjo experimental para a lente térmica utilizado neste trabalho. O laser de Argônio *Coherent* modelo *Innova 90 Plus* com 6W de potência nominal e comprimento de onda de 541,5nm foi utilizado como feixe de excitação (LE); o laser e He-Ne, *JDS Uniphase* com 1mW de potência nominal, no comprimento de onda de 632,8nm, foi empregado como feixe de prova (LP). Os fotodiodos (F1 e F2) possuem resposta linear para a variação de intensidade da luz, e com tempo de resposta na escala de microsegundos.

As lentes convergentes (L1 e L2) foram dispostas sobre transladares XY para permitir um perfeito alinhamento dos dois feixes. A incidência do laser de excitação na amostra foi controlada por um obturador de luz da marca *Melles Griot*, acionado por sinais digitais provenientes da porta de comunicação paralela do microcomputador.

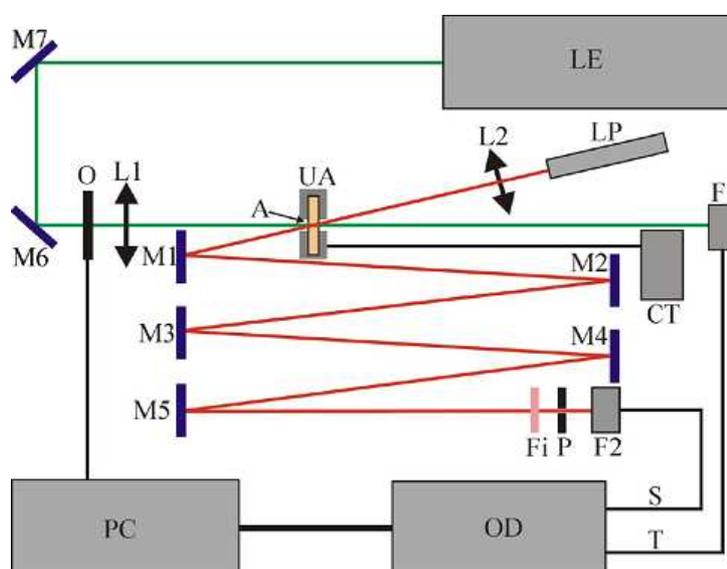


Figura 3.3 Configuração experimental de LT no modo descasado. UA: unidade de aquecimento, M_i : espelhos planos, L_i : lentes convergentes, LP: laser de prova, LE: laser de excitação, CT: controlador de temperatura, A: amostra, Fi: filtro, F1 e F2: fotodiodos, O: obturador, P: diafragma, PC: computador para aquisição, OD: osciloscópio.

As amostras foram colocadas em uma cubeta de quartzo de 3mm de espessura e aquecidas na unidade de aquecimento elétrico (UA) utilizando resistores, com uma rampa de aquecimento de ambiente até 50 ou 70 °C, em taxas de aquecimento de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,5 °C/min. O esquema da unidade de aquecimento está representado na Figura 3.4.

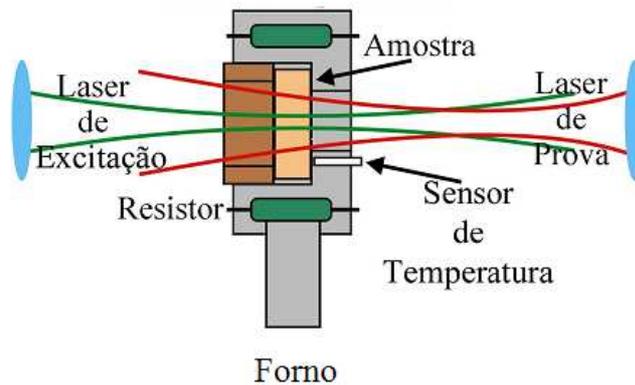


Figura 3.4 Corte transversal da unidade de aquecimento (UA).

A temperatura da unidade de aquecimento foi controlada e monitorada por um controlador de temperatura *LakeShore 340*, por meio de um sensor PT 100. A abertura no centro da unidade de aquecimento permite a passagem dos dois feixes laser de modo que ambos estejam centralizados na amostra.

O laser de prova, após passar pela amostra, é desviado pelos espelhos M1 a M5, chegando até o fotodiodo (F2) que está conectado ao sistema de aquisição de dados. Um diafragma (P), com abertura de **2mm**, foi colocado na frente e junto ao fotodiodo, possibilitando analisar somente o centro do feixe laser. O ângulo de inclinação do laser de prova na amostra é menor do que 2°, em relação ao feixe de excitação. Para impedir que a luz ambiente ou do laser de argônio contribuísse para o sinal, um filtro (Fi) com banda passante em **632,8 nm**, foi posicionado na frente do fotodiodo (F2).

A amostra foi posicionada na cintura do feixe do laser de excitação, e a aproximadamente **10cm** da cintura do feixe do laser de prova. Em seguida, por meio dos espelhos M1 a M5, foi feito o alinhamento de modo que o centro do feixe do laser de prova passasse pelo diafragma, que se encontra na abertura do fotodiodo (F2), maximizando-se o sinal no detector. A distância de aproximadamente 5m entre a amostra e o fotodiodo (F2), tem

por objetivo aumentar o diâmetro do feixe de prova, permitindo assim que apenas o centro do feixe seja detectado.

Durante este processo, o feixe do laser de excitação fica interrompido por um obturador (O) posicionado depois do espelho M6. O próximo passo a ser seguido é fazer com que o feixe do laser de excitação passe através da amostra. Para que se obtenha um perfeito alinhamento, a lente L1 é ajustada de modo que o feixe do laser de excitação passe pelo centro do feixe do laser de prova. Nesta fase, duas situações podem ocorrer: se a amostra apresentar um dn/dT negativo, o laser de prova torna-se mais divergente ao passar pela lente térmica da amostra e, portanto, o sinal no fotodiodo F2 diminui; caso contrário, ou seja, para dn/dT positivo, o feixe torna-se mais convergente, aumentando o sinal no detector. O processo de alinhamento consiste sempre em minimizar o sinal do laser de prova após passar pela lente térmica quando dn/dT for negativo, ou maximizá-lo, se dn/dT for positivo.

Uma vez obtida a curva experimental para o transiente de lente térmica, a equação (2.8) pode ser utilizada para o ajuste teórico a fim de se determinar os parâmetros θ e t_c que são correlacionados com as propriedades ópticas e térmicas da amostra.

3.2.2 Interferometria óptica

O esquema do arranjo experimental para interferometria óptica está representado na Figura 3.5. Nesta montagem, utilizou-se um laser de He-Ne ($\lambda= 632,8\text{nm}$), como fonte de luz. O feixe do laser é expandido por uma lente convergente (lente 1), de foco de 10 cm, colocada a 15 cm do laser, incidindo na amostra que está na cavidade de um forno resistivo, a uma distância de aproximadamente 30cm da lente 1. O feixe incide quase que perpendicularmente à amostra ($q\approx 0,8^\circ$ em relação à normal à superfície da amostra), de modo que a reflexão da primeira superfície da amostra venha a interferir com a reflexão da segunda superfície. As duas reflexões ainda são expandidas em uma segunda lente convergente (lente 2), de foco de 3cm, até atingirem o fotodiodo, que tem um diâmetro de 3mm e está a uma distância de 20 cm da lente 2. Desta forma, o espaçamento entre as franjas no fotodiodo é de aproximadamente 5mm, de modo que as intensidade entre máximos e mínimos sejam bem definidas.

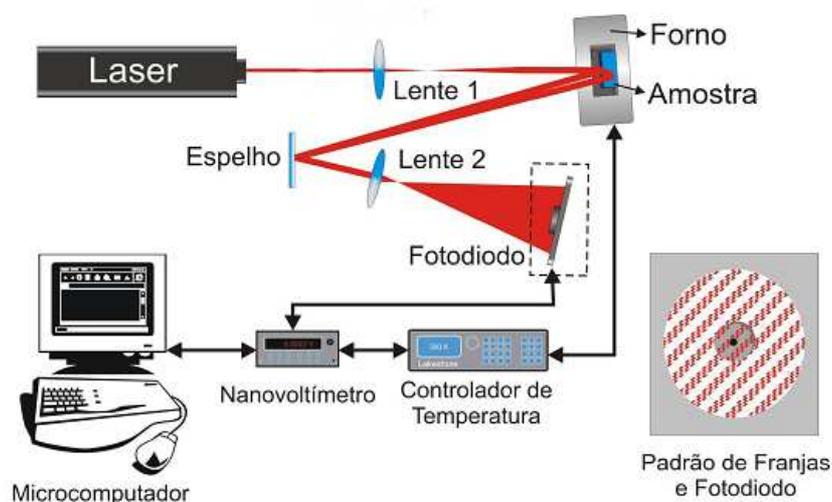


Figura 3.5 Configuração da interferometria óptica - No detalhe: Padrão das franjas de interferência no fotodiodo.

As amostras que utilizamos foram colocadas em uma cubeta de quartzo de 5mm de espessura e depois posicionadas dentro do forno resistivo, neste caso as franjas de interferência resultam da superposição das ondas refletidas nas paredes internas da cubeta.

A variação de temperatura do forno resistivo é controlada por um controlador de temperatura (*Lakeshore Cryonics Inc. - mod. 340*), utilizando um sensor PT 100. Os experimentos foram realizados com a temperatura variando desde temperatura ambiente (em torno de 25°C) até 65°C, em taxas de 0,1, 0,2 e 0,5°C/min. A variação da temperatura na amostra provoca o deslocamento dos máximos e mínimos de intensidade das franjas de interferência, que é detectado pelo fotodiodo. A aquisição do sinal do fotodiodo é feita por um nanovoltímetro (*Keithley- mod. 2182*), e enviado ao microcomputador por meio do programa em linguagem *Microsoft Quick Basic V 4.5*.

3.2.3 Espectrômetro Fotoacústico

O arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica utilizado para a realização dos experimentos está mostrado na Figura 3.6. Neste arranjo mediu-se a transmitância das amostras de proteína em função da temperatura.

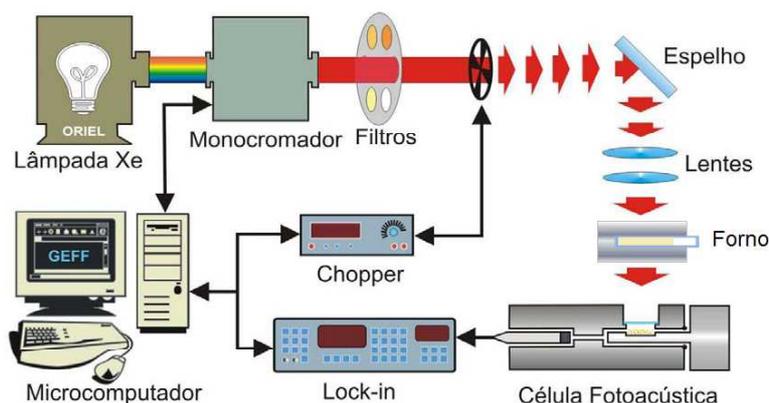


Figura 3.6 Espectrômetro fotoacústico convencional, com um forno posicionado entre as lentes e a célula fotoacústica.

Para a análise de absorvância das proteínas, as mesmas são inseridas em uma cubeta posicionada antes da célula fotoacústica. Um sistema de aquecimento, o mesmo usado na LT, foi montado entre as lentes e a célula fotoacústica com o objetivo da realização da medida por transmitância em função da temperatura. Sendo assim, no interior da célula utilizou-se carvão para normalizar o sinal em relação à medida sem a presença da amostra.

Foram realizados os seguintes experimentos usando a configuração descrita para as proteínas:

- 1) Rampa de 0,5°C/min nas quatro amostras com o comprimento de onda fixo em 300nm;
- 2) Espectros nas temperaturas em ambiente (aproximadamente 25 °C), 36, 40, 44, 50 e 60°C;
- 3) Transmitância com temperaturas fixas em ambiente, 40, 44, 50 e 60°C, em 300 nm;

Para a realização dos experimentos com o objetivo de detectar o efeito fotoquímico, além do feixe de luz modulada da lâmpada de xenônio, um feixe laser contínuo é incidido sobre a amostra, tomando-se o cuidado para que atinja exatamente na mesma região de incidência da luz da lâmpada (Figura 3. 7). O procedimento experimental consiste em duas fases:

- * Primeira: obterem-se os espectros de absorção para as amostras na região entre 200 e 800 nm com a luz modulada, com 700W de potência. Posteriormente, os espectros são obtidos enquanto a luz laser contínua incide na amostra.

- * Segunda: absorvância em função do tempo foi obtida fixando-se um comprimento de onda da luz modulada. Nesta fase, o tempo total de absorvância é dividido em três etapas de intervalos de tempo iguais: na primeira, mede-se somente a absorção com a luz modulada; na segunda, incide-se o feixe de luz contínua, o qual é interrompido na terceira etapa. O procedimento é realizado com o comprimento de onda do feixe laser em 350nm.

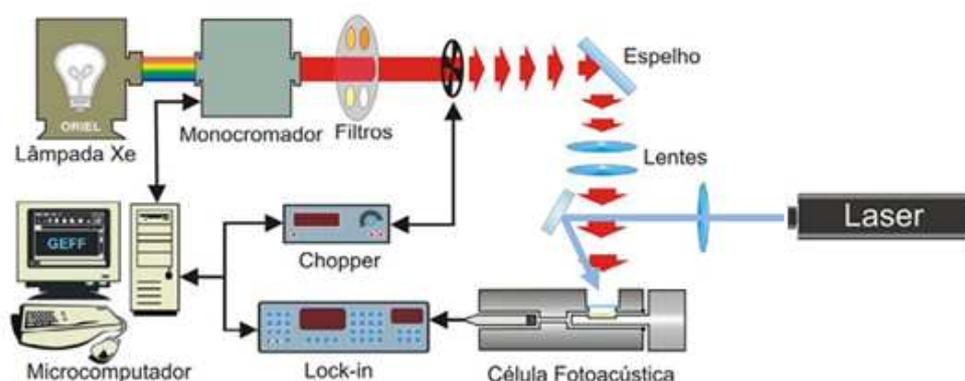


Figura 3. 7 Espectrômetro fotoacústico com feixe modulado convencional e feixe laser contínuo.

3.3 Técnicas convencionais

3.3.1 Espectrômetro infravermelho de transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IR) foram obtidos com o Espectrômetro Infravermelho de Transformada de Fourier (FTIR) da *Varian*, modelo *Série 7000*, intervalo espectral 10000 até 50 cm^{-1} . Esse experimento foi realizado na parte externa no microscópio *UMA 600* por refletância total atenuada (ATR), com o uso de um cristal de germânio. Assim, foi possível montar um sistema de aquecimento posicionado entre o peltier e o suporte da amostra. Para a leitura de temperatura na amostra utilizou-se um sensor termopar em contato com ela, conforme Figura 3.8.

O experimento foi realizado variando-se a temperatura de aproximadamente 0,5°C da temperatura ambiente até o máximo permitido pelo sistema peltier em torno de 55°C. Os espectros de transmitância foram obtidos na região de 4.000 a 400 cm^{-1} . Podem-se observar flutuações nas temperaturas durante o aquecimento, devido à dissipação de calor entre a

amostra e o cristal, por esse motivo antes da obtenção do espectro foi esperado um determinado intervalo de tempo para a estabilização da temperatura.

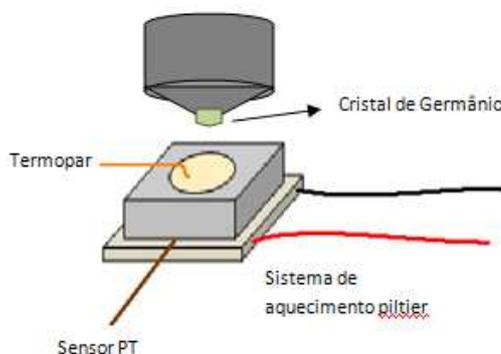


Figura 3.8 Sistema de aquecimento peltier.

3.3.2 Calorimetria diferencial de varredura

Os experimentos com a calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizados em um sistema de análise térmica (SAT) comercial da *Netzsch*, modelo *STA 409 PG/4/G Luxx*.

As varreduras foram realizadas com rampa de 2°C/min, utilizando fluxo de argônio (gás inerte), temperatura inicial foi 20°C e o cadinho de referência vazio. Esse procedimento foi adotado para todas as amostras.

3.3.3 Densímetro

As medidas de densidade foram realizadas pelo densímetro digital comercial modelo *DMA 5000*. O intervalo de temperatura usado foi de 20 até 70 °C, com um passo de 0,05°C.

3.3.4 pHmetro

Para ter um controle do pH da amostra, garantindo que o processo de desnaturação não seja pela alteração do pH, mas sim pelo aquecimento térmico, realizou-se a medida do pH das amostras antes e depois do aquecimento, em um pH-metro de bancada modelo *Q400A*.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Primeiramente apresentaremos, os resultados e discussão das medidas realizadas nas proteínas e em seguida o estudo do efeito fotoquímico no protetor solar.

4.1 Proteínas

Os resultados das medidas nas proteínas serão apresentados na sequência: albumina, hemoglobina e, por fim, plasma e soro. Para cada amostra, foram realizados experimentos com as técnicas: espectroscopia de lente térmica, interferometria óptica, espectroscopia fotoacústica, FTIR, DSC/TG e medida de densidade de massa.

4.1.1 Albumina

4.1.1.1 Lente térmica e interferometria óptica

A Figura 4.1 mostra um transiente de lente térmica da albumina diluída em água milli-Q (40mg/ml) à temperatura de 59,2°C. O ajuste teórico, curva vermelha, foi realizado com a equação (2.8). Os valores dos parâmetros ajustáveis foram $\theta = 0,14 \pm 0,02$ e $t_c = (0,0047 \pm 0,002)$ s. Assim, o valor da difusividade térmica foi calculado a partir da equação (2.2):

$$D = \omega_{\theta_e}^2 / 4t_c, \text{ obtendo-se } D = (1,54 \pm 0,01) \text{ cm}^2/\text{s}.$$

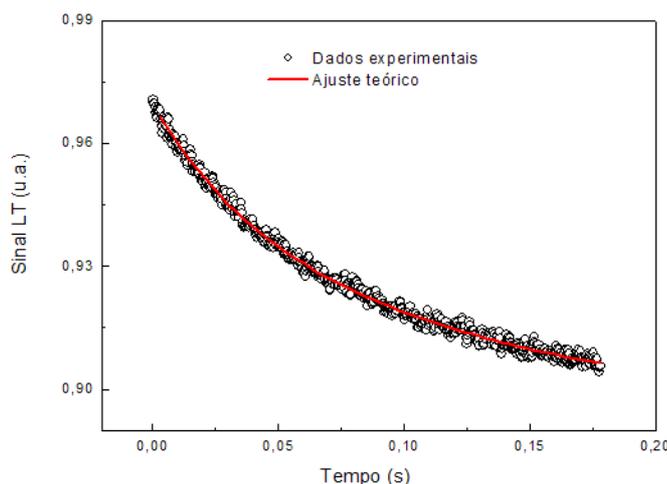


Figura 4.1 Transiente do sinal de lente térmica para a amostra de albumina diluída na temperatura de 40,2°C. Potência do laser de excitação: 30mW.

Como descrito no capítulo 3, as rampas foram realizadas com diferentes taxas de aquecimento: 0,1, 0,2, 0,3 e 0,5 °C/min. A mais lenta mostrou ser a mais adequada para se observar mudanças de tendência dos parâmetros com a temperatura. Sendo assim, os resultados serão apresentados para a taxa de aquecimento de 0,1°C/min.

O tempo de duração de cada transiente foi de 0,19s com intervalo entre medidas de 25s. Isto implica que quando a taxa de aquecimento foi de 0,1°C/min, foram obtidos 24 transientes para cada intervalo de temperatura de 1°C. O intervalo de tempo adotado entre cada transiente deve garantir que a lente térmica esteja completamente dissipada quando um novo disparo do laser de excitação é realizado. Em geral, isto ocorre após transcorrer um intervalo de tempo de aproximadamente 1000 t_c depois da interrupção do feixe de excitação. Assim, para um t_c da ordem de 4 a 5 ms para as amostras em estudo, o intervalo de 25s entre cada medida consecutiva garante que o novo disparo seja realizado com a amostra já em equilíbrio térmico com o suporte e o forno. Estas condições garantem que todas as medidas sejam realizadas sem a presença de lente térmica residual.

Repetiu-se o procedimento acima para ajustar todos os transientes determinados em função da temperatura da amostra. Assim, foram determinados os valores da difusividade térmica e do parâmetro θ em função da temperatura, que denominamos de $D(T)$ e $\theta(T)$. É conveniente normalizar $\theta(T)$ pela potência do laser de excitação, resultando em $\theta/P(T)$. A Figura 4.2 (A) mostra $\theta/P(T)$ para a água milli-Q e para a albumina. Os círculos em preto são

os dados experimentais da albumina, a curva em vermelho representa um ajuste qualitativo para ilustrar melhor o comportamento dos dados. Os quadrados em preto são os dados experimentais da água purificada, mostrados para efeito de comparação. As variações de $\theta/P(T)$ da água na região de 40°C foram observadas anteriormente por Pedreira [11] e associadas ao comportamento anômalo de suas propriedades nesta região de temperatura, em especial do coeficiente de expansão térmica. Em especial, nota-se mudança do comportamento monotônico dos dados da albumina nas regiões em torno de 36 e 41°C, sugerindo a ocorrência de transformações na amostra. Analisaremos este comportamento mais adiante porque se trata do intervalo de temperatura no qual se espera que as proteínas apresentem mudanças conformacionais da fase nativa, em torno de 36°C, para a perturbação inicial reversível, que pode ocorrer até aproximadamente 42°C. Entre 42 até 50 °C $\theta/P(T)$ continua aumentando, para em seguida diminuir, apresentando aí dispersão nos valores. De fato, acima de 50°C não foi possível realizar a medida e obter os parâmetros de forma precisa porque a amostra apresentou alto índice de espalhamento e/ou absorção de luz em razão da mudança de cor para translúcida, com a formação de agregados.

A Figura 4.2 (B) mostra que a difusividade térmica também apresenta comportamento diferenciado nas temperaturas entre 35,5 e 42 °C, onde se observa um aumento médio da ordem de 17%. Os valores de $D(T)$ da água pura são mostrados para efeito de comparação, e não evidenciaram mudanças. É relevante notar a ocorrência de um mínimo da difusão de calor em 35.5 °C e um máximo em torno de 42°C, o que mais uma vez, como observado para $\theta/P(T)$, revela haver um comportamento diferente dos dados neste intervalo de temperatura em relação ao que ocorre fora dela. Tem-se então uma região bem localizada onde o sistema parece minimizar a difusão de calor, em torno de 35,5°C, e outra, em 42°C, onde a difusão é quase duas vezes maior. Após 47°C, há uma leve diminuição dos valores de $D(T)$. A curva em verde representa o ajuste linear realizado para funcionar como um guia visual de que para todo intervalo da medida, na média, há um pequeno aumento dos valores deste parâmetro com a temperatura.

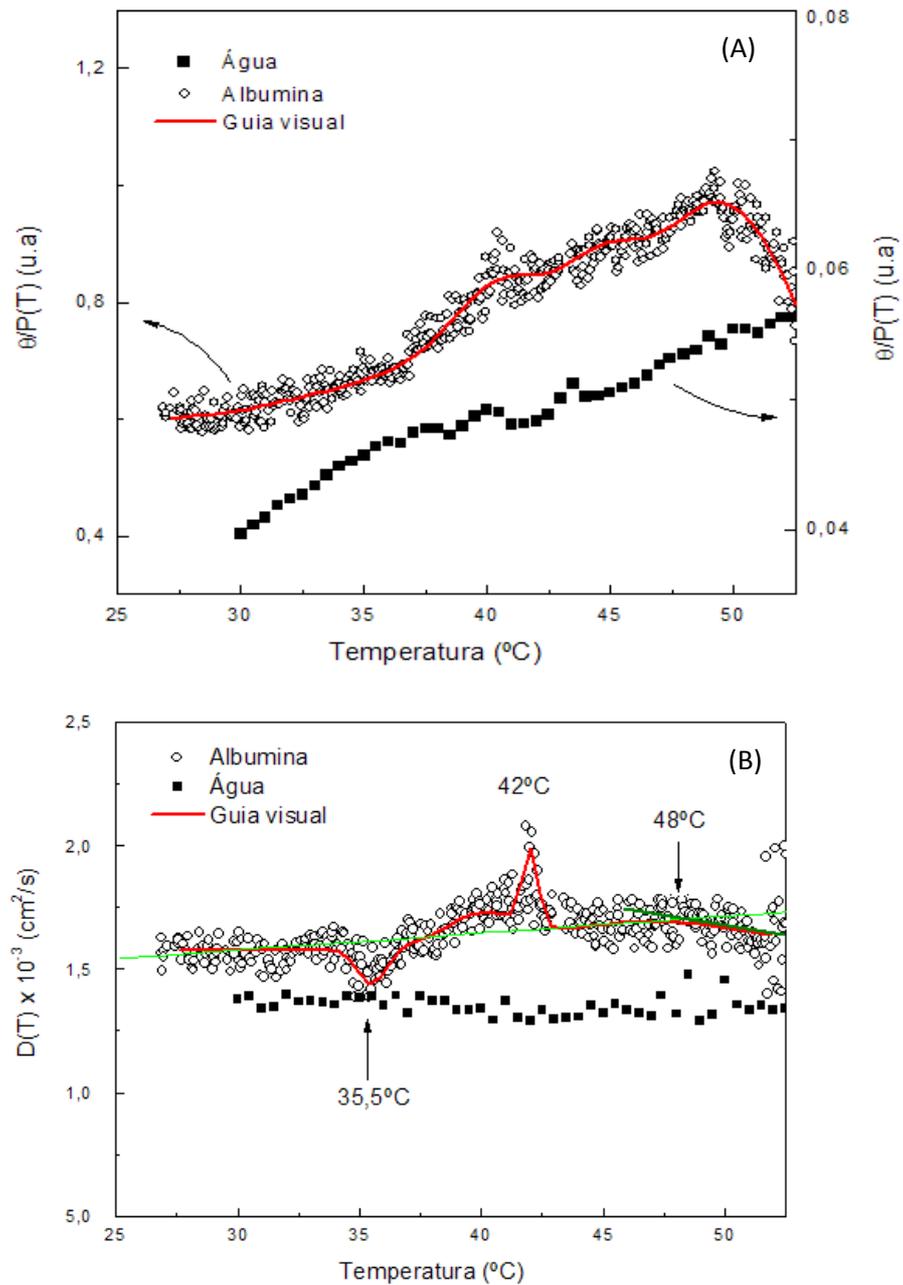


Figura 4.2 Em (A) valores de $\theta/P(T)$ e (B) valores de $D(T)$ para a albumina diluída em água, 40mg/ml e para a água milli-Q. Taxa de aquecimento: 0,1 °C/min.

Para tentar compreender o comportamento de $D(T)$ é necessário correlacionar o significado físico desta quantidade física, a difusividade térmica, com a estrutura molecular das amostras e com o que pode ocorrer durante o aquecimento das mesmas. Ela tem a velocidade do calor no meio como princípio básico, sua unidade é cm²/s.

O primeiro passo é considerar que a difusividade térmica está relacionada com a condutividade térmica (k), calor específico (C_p) e com a densidade de massa (ρ) da amostra, conforme prevê a equação (2.2): $D = k / \rho C_p$. Assim, se a difusividade térmica aumenta deve-se avaliar o comportamento de (k), (ρ) e de (C_p) com a temperatura.

A Figura 4.3 mostra o comportamento da densidade de massa $\rho(T)$ da albumina diluída que foi determinada no mesmo intervalo de temperatura. Ao contrário do obtido para a medida de $D(T)$, nota-se ausência de regiões com variações acentuadas de seus valores, havendo apenas um decréscimo não linear com a temperatura. É importante ressaltar que nesta medida utiliza-se um densímetro que, embora seja de alta resolução, exige que a temperatura da amostra seja estabilizada para assim se realizar o experimento. Isto significa que a taxa de aquecimento não pode ser na forma de rampa e em geral é bem mais lenta do que aquela de $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$, utilizada na lente térmica para se obter $D(T)$. Assim, é provável que a taxa de aquecimento tenha sido responsável pela não detecção de possíveis mudanças localizadas nos dados de $\rho(T)$ que evidenciassem transformações, conforme mostrado por $D(T)$. Nem mesmo a derivada de $\rho(T)$ em relação à temperatura, que é o coeficiente de expansão térmica da amostra, $\beta(T)$, mostrou mudanças nesta região, como apresentada na Figura 4.4. Só se observam mudanças em torno de 53 e de $66,5^\circ\text{C}$, regiões em que os dados de LT não foram obtidos com precisão, conforme mencionado anteriormente.

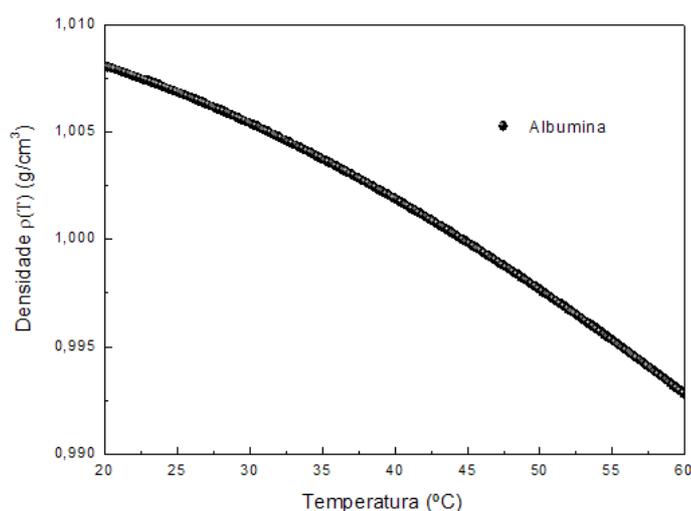


Figura 4. 3 Densidade $\rho(T)$ da amostra de albumina.

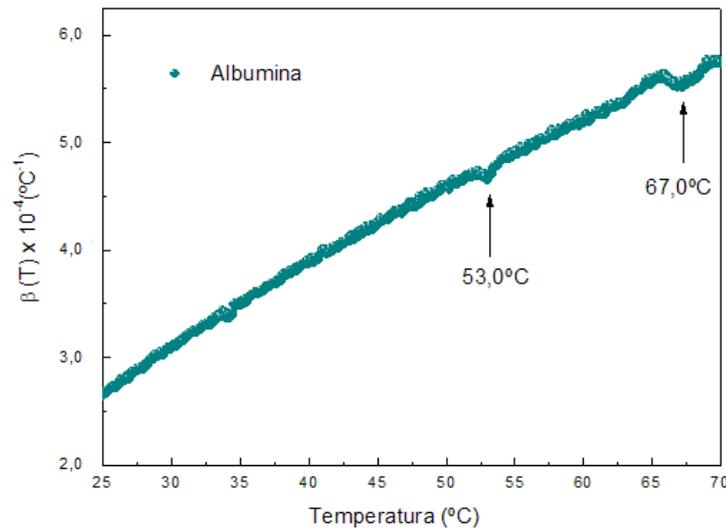


Figura 4.4 Coeficiente de expansão térmica volumétrica da albumina 40 mg/ml .

A mesma dificuldade para se realizar o aquecimento na forma de rampa na medida da densidade também ocorre quando se pretende medir $C_p(T)$ e $k(T)$, em especial quando se trata de amostras na forma líquida. Assim, a análise será focada sobre o comportamento da difusividade térmica.

Nossa primeira hipótese para tentar compreender estes resultados de $D(T)$ foi adotar que em primeira aproximação o modelo de Debye para sólidos cristalinos poderia ser empregado para descrever a difusividade térmica de fluídos isotrópicos (como é o caso de nossas amostras) em termos do livre caminho médio dos fônons (τ) e da velocidade do som no meio (v_s), conforme segue:

$$D = 1/3(v_s\tau) \quad (4.1)$$

Ou seja, o comportamento da difusividade térmica em função da temperatura dependeria de $v_s(T)$ e de $\tau(T)$.

Sob esta hipótese, em altas temperaturas o livre caminho médio pode coincidir com a distância média entre dois átomos ou arranjos moleculares vizinhos, enquanto que a velocidade do som é proporcional a $(K_e/m_e)^{1/2}$, em que K_e é a constante elástica das forças ligantes entre os dois átomos ou arranjos moleculares vizinhos, com massa efetiva m_e . Assim, pode haver duas situações:

1) para que $D(T)$ seja governado apenas pelo livre caminho médio dos fônons, seria necessário um decréscimo em seus valores, na escala log-log, com a dependência T^{-1} [68,69].

Deve-se lembrar que esta condição só é válida nas regiões de temperatura fora das transições, ou seja, desconsiderando-se os máximos e mínimos localizados. Na Figura 4.2 nota-se que a única região em que $D(T)$ diminui é aquela nas temperaturas acima de 43 °C, subsequente ao máximo ocorrido em torno de 42 °C. Nas temperaturas mais baixas, tem-se $D(T)$ constante até o primeiro mínimo e um acréscimo não linear entre 35.9 e 42 °C.

2) para que $D(T)$ aumente via variação da velocidade do som, $v_s(T)$, é necessário que haja mudança conformacional das moléculas com redução da massa efetiva e/ou aumento da constante elástica, o que espera-se que ocorra haja vista as mudanças observadas nos dados acima.

Assim, o comportamento de $D(T)$ parece ter sido governado de acordo com a seguinte sequência de eventos:

- * a ocorrência do mínimo em $D(T)$ poderia indicar a região de entrada da fase na qual esta proteína está no estado nativo, na forma conformacional de menor energia, e, como dissemos anteriormente, teria a característica de minimizar a difusão do calor;
- * o aumento não linear entre 35.9 e 42 °C é uma indicação da ocorrência de mudança conformacional da fase nativa com possível diminuição do tamanho molecular, ou seja, diminuição de massa efetiva e/ou aumento da constante elástica, de modo que a razão $(K_e/m_e)^{1/2}$ aumente com a temperatura. Esta é a região de desnaturação reversível onde há significativa taxa de proteínas que apresentam quebra das pontes de hidrogênio e consequente desenrolamento da fase α -hélice para a β -folha. Estudos recentes [1] sugerem, por exemplo, que nesta região de temperatura a célula vermelha reduz de tamanho em razão da perda da água livre com a formação de agregados de hemoglobina. É provável que o processo de desenrolamento da albumina, acompanhado da perda da água livre, também possa modificar sua massa efetiva de modo a aumentar a difusão do calor, ou seja, a difusividade térmica;
- * a queda de $D(T)$ acima de 48°C é uma indicação de quebra molecular em que o sistema passa a ter constante elástica menor, o que resultaria em maior fluidez e/ou menor viscosidade. Nesta região já pode ocorrer desnaturação irreversível e início de agregação entre os radicais não-polares e, conseqüentemente, aumento da massa efetiva;

* finalmente, para a região acima de 50°C, os valores da difusividade térmica não são confiáveis porque a amostra inicia o processo de mudança brusca de cor para translúcida, espalhando a luz do laser, o que inviabiliza a medida de D(T).

Concluída a discussão sobre D(T), retomaremos a análise de $\theta/P(T)$. Substituindo-se a condutividade térmica, $k = D\rho C_p$, na equação (2.4), repetida aqui para conveniência do leitor, tem-se:

$$\theta = -\frac{P_e A_e L_0}{K \lambda_p} \left(\frac{dn}{dT} \right)_p = \left(\frac{P_e A_e L_0}{\lambda_p D} \right) \left(-\frac{dn}{\rho c dT} \right)_p$$

Com a definição $Q = \rho C_p T$ pode-se escrever:

$$\left(-\frac{dn}{\rho c dT} \right)_p = -\frac{dn}{dQ}, \text{ obtendo-se:}$$

$$\left(-\frac{dn}{dQ} \right)_p = \frac{\theta D \lambda_p}{P_e L_0 A_e}$$

Que pode ainda ser escrita em função da temperatura como:

$$\left(-\frac{dn}{dQ}(T) \right)_p = \frac{\lambda_p \theta(T) D(T)}{P_e L_0 A_e(T)} \quad (4.2)$$

Em que $(-dn/dQ)_p$ é a mudança do índice de refração no comprimento de onda do laser de prova induzida pelo calor depositado (durante a formação da lente térmica) por unidade de volume [10].

O coeficiente de absorção óptica $A_e(T)$, embora deva ser medido no comprimento de onda do laser de excitação, por conveniência da medida e por não haver banda de absorção óptica da amostra no visível, determinamos seus valores por meio da medida dos valores de I_0 do laser de prova e denominamos de $A(T)$. Os resultados estão mostrados na Figura 4.5. Nota-se mudança significativa em torno de 52°C que ocorre porque a amostra muda de transparente para translúcida. A foto (A) da figura 4.6 é a amostra da albumina diluída antes de ser aquecida e a (B) após ser aquecida até 55°C.

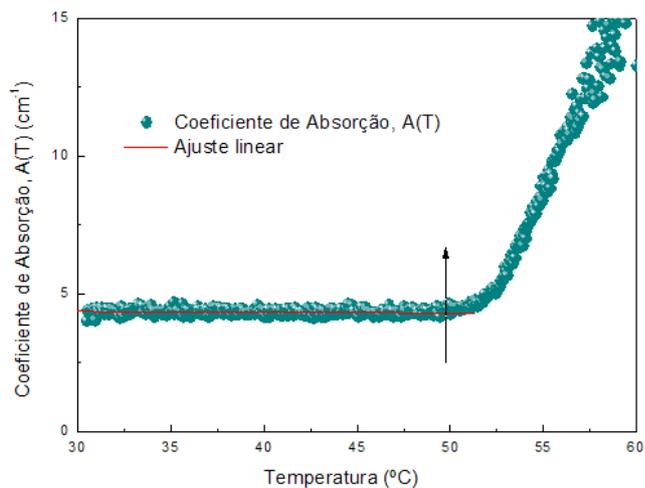


Figura 4.5 Valores de $A(T)$ para a amostra de albumina determinados via medida de transmitância.

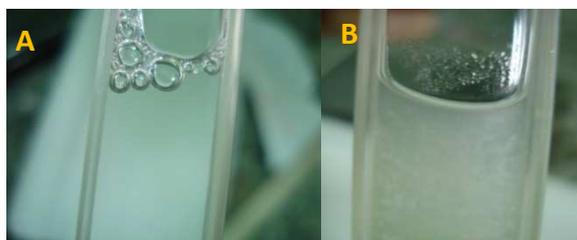


Figura 4.6 Foto da amostra de albumina diluída na cubeta; (A) antes de aquecer, (B) após aquecimento até 55 °C.

Com os resultados de $\theta/P(T)$, $D(T)$ e $A(T)$, foram calculados os valores de $(dn/dQ)_p(T)$ via equação (4.2). Os resultados estão mostrados na Figura 4.7.

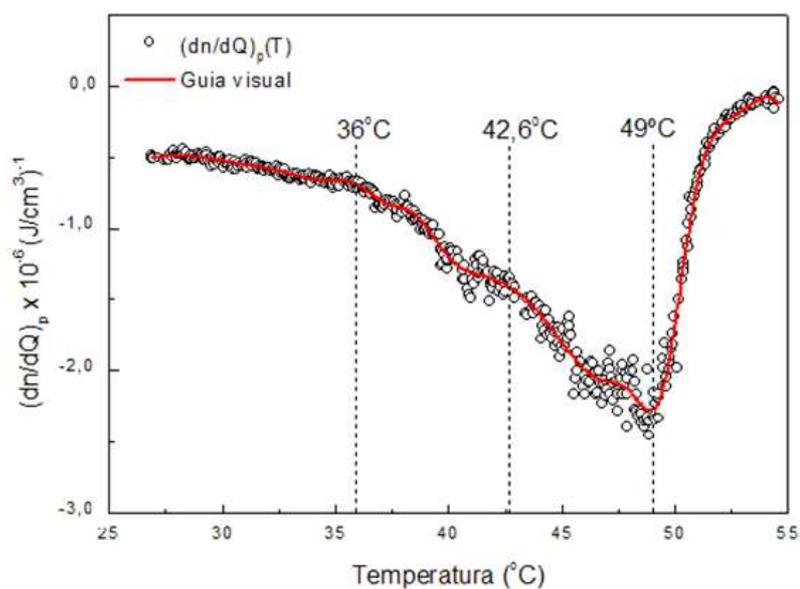


Figura 4.7 Valores de $(dn/dQ)_p(T)$ para a amostra de albumina.

O comportamento deste parâmetro é semelhante ao que se obtém na medida de DSC/TG, Figura 4.8 e Figura 4. 9, e revela as regiões de temperatura em que o sistema apresenta processos endotérmicos e/ou exotérmicos, ou seja, com absorção ou liberação de energia. Após decrescer linearmente até aproximadamente 36°C, nota-se uma mudança de tendência em torno de 35,5°C. É importante lembrar, mais uma vez, que esta é a região da fase nativa das proteínas. Em seguida, ocorre um decréscimo mais acentuado deste parâmetro, com um mínimo local em torno de 40,3°C. Como dissemos anteriormente, sabe-se da literatura que neste intervalo de temperatura entre 35,5 e 42 °C, o sistema pode apresentar desnaturação reversível. Acima de 42°C, até em torno de 48°C, a diminuição de $dn/dQ(T)$ continua com inclinação acentuada. Nesta região, sabe-se da ocorrência de desnaturação reversível e parcialmente irreversível, conforme observado em hemácias [1]. O mínimo em 48°C mostra uma inversão na tendência da curva, indicando que o sistema tende para um mínimo de variação no valor de $dn/dQ(T)$, intervalo de temperatura no qual as transformações na amostra já podem ocorrer de forma espontânea, ou seja, irreversível. Como dissemos anteriormente, os valores acima de 50°C não são precisos.

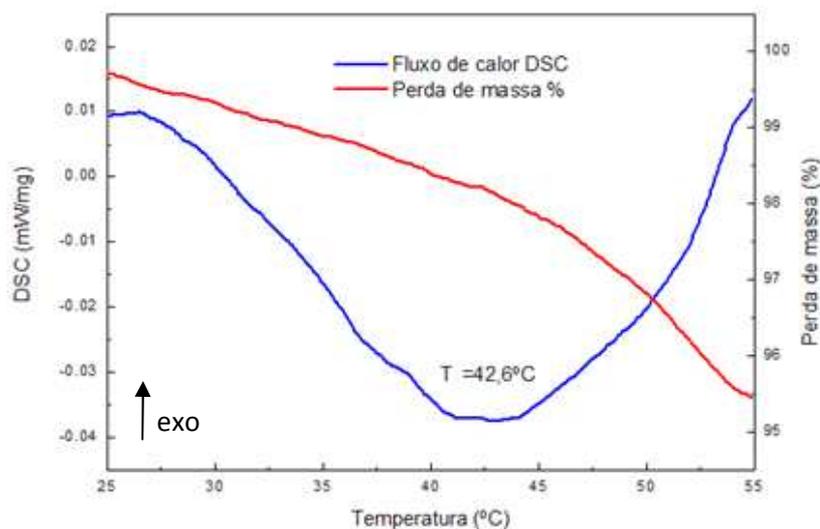


Figura 4.8 Termograma da albumina com rampa de 2°C/min. Curva em azul é o fluxo de calor e a em vermelho perda de massa.

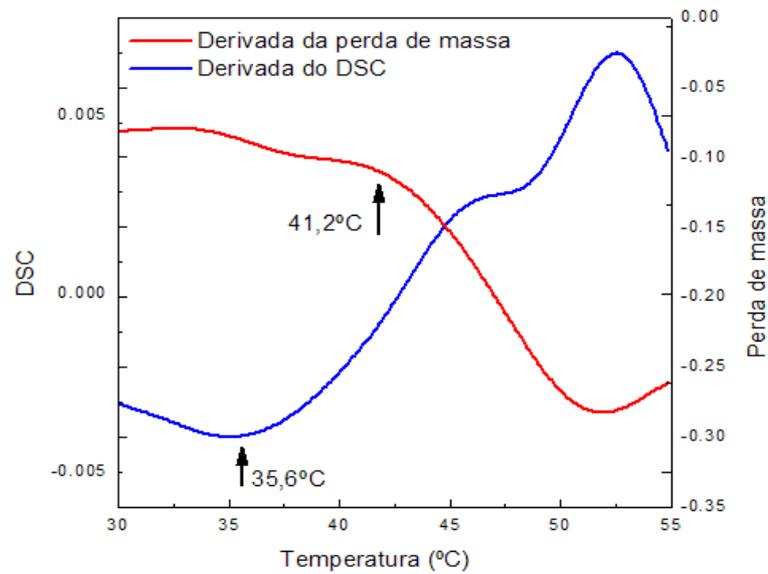


Figura 4. 9 Derivadas da perda de massa e do fluxo de calor DSC.

Embora a medida de DSC tenha sido realizada na fase sólida, o que pode dificultar uma comparação direta com os dados de LT obtidos na fase líquida, nota-se que há um mínimo na derivada do fluxo de calor em 35,6°C, na mesma região da mudança de tendência de $dn/dQ(T)$ da amostra líquida. Nas temperaturas mais altas, a medida de TG mostra a ocorrência de perda de massa. Isto inviabiliza comparações das medidas de DSC/TG desta região com os respectivos dados de LT. É importante mencionar que medidas como as realizadas com a LT são difíceis de serem feitas com a calorimetria diferencial porque nesta técnica a amostra deve ser pequena, e assim a evaporação durante o aquecimento inviabiliza a obtenção dos resultados. Além disso, a taxa de aquecimento nas medidas de DSC/TG deve ser alta, em geral não permitindo a detecção de transições como aquelas observadas nos dados de LT.

Estes resultados sugerem que os dados de LT revelam os processos de absorção e liberação de energia que ocorrem nestas regiões em que as proteínas passam da fase nativa para as de desnaturação.

Nosso próximo passo foi utilizar a equação (4.2) para reescrever a variação da energia livre de Gibbs do sistema de modo a tentar correlacionar seu comportamento em função da temperatura com os dados de LT. Para um processo de aquecimento não-isotérmico, definido pela equação (1.5), repetida aqui para facilitar a leitura, temos:

$$dG = dH - TdS - SdT$$

Sendo $dG = -SdT$, em que $dS = \frac{dQ}{T}$ para um processo não isotérmico e isobárico.

Assim, reescrevendo, primeiramente a equação da entropia substituindo-se a equação (4.2) para $dn/dQ(T)$ com a dependência em T dos parâmetros da LT, teremos:

$$S = S_0 - \int_0^T \left(\frac{A_e(T)}{\theta(T)D(T)T} \right) \left(\frac{P_e L_0}{\lambda_p} \right) dn \quad (4.3)$$

A variação do índice de refração pode ser escrita como: $dn = \frac{\partial n}{\partial T} dT$, assim a entropia pode ser escrita como:

$$S(T) = S_0 - \int_0^T \left(\frac{A_e(T)}{\theta(T)D(T)T} \right) \left(\frac{P_e L_0}{\lambda_p} \right) \frac{dn}{dT}(T) dT \quad (4.4)$$

A aproximação da derivada parcial em derivada total no índice de refração pode ser feita se considerarmos que em pequenos intervalos de temperatura a variação do índice de refração é linear, ou seja, dn/dT é constante. Esta condição é satisfeita neste trabalho porque a diferença de temperatura entre cada medida consecutiva é muito pequena.

Como os parâmetros $A_e(T)$, $\theta/P(T)$, $D(T)$ e $dn/dT(T)$ podem variar com a temperatura, os mesmos não podem ser postos em evidência, fora da integral. Assim, a entropia é obtida calculando-se a área da curva referente à multiplicação de todos os parâmetros no interior da integral. Com este procedimento obtém-se a variação da entropia em função da temperatura. Da mesma forma, utilizando-se a equação (4.4), pode-se calcular a variação da energia livre de Gibbs da equação (1.5) em termos dos parâmetros medidos $A_e(T)$, $\theta/P(T)$, $D(T)$ e de $dn/dT(T)$, ou seja:

$$G - G_0 = - \int_0^T S dT$$

$$G(T) = G_0 + \int_0^T \left[\int_0^T \left(\frac{A_e(T)}{\theta(T)D(T)T} \right) \left(\frac{P_e L_0}{\lambda_p} \right) \frac{\partial n}{\partial T} dT \right] dT \quad (4.5)$$

Da mesma forma como feito para a entropia, podemos considerar $\frac{\partial n}{\partial T} dT = \frac{dn}{dT}(T)$

Assim, o mesmo procedimento do cálculo da área utilizado para a variação da entropia pode ser aplicado para a determinação da variação da energia livre de Gibbs.

Temos até agora para a albumina as curvas em função da temperatura de $\theta(T)$, $D(T)$ e de $A(T)$. Assim, de todos os parâmetros nas equações 4.4 e 4.5 necessários para se determinar $S(T)-S_0$ e $G(T)-G_0$, só será preciso medir $dn/dT(T)$. Para sua determinação foi utilizada a técnica de interferometria óptica, conforme descrito anteriormente. Para poder realizar operações de cálculo entre as variáveis determinadas com as diferentes técnicas, esta medida foi feita com a mesma taxa de aquecimento, ou seja, de 0,1 °C/min.

A Figura 4. 10 mostra o padrão de franjas obtido pelo sinal detectado pelo fotodiodo em função da temperatura. As marcações em vermelho indicam os máximos e mínimos de intensidade (m), a partir dos quais se pode construir a curva m versus temperatura (T), como mostra Figura 4.11. A marcação de m ocorre a cada 0,5 franjas, podendo-se adotar o primeiro máximo ou mínimo como zero.

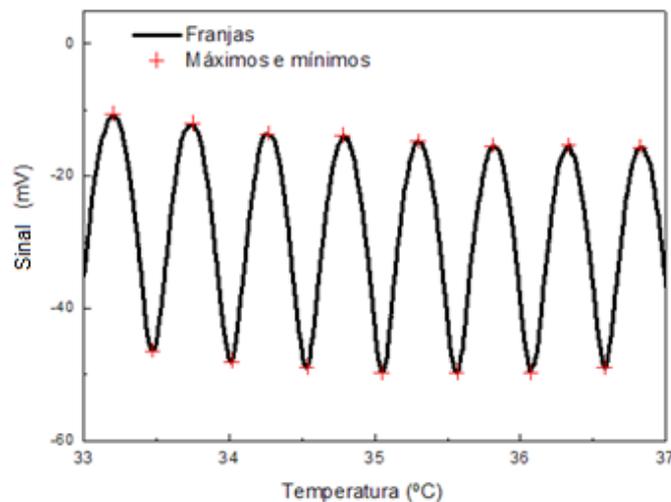


Figura 4. 10. Franjas de interferência na amostra de albumina. Taxa de aquecimento de 0,1°C/min.

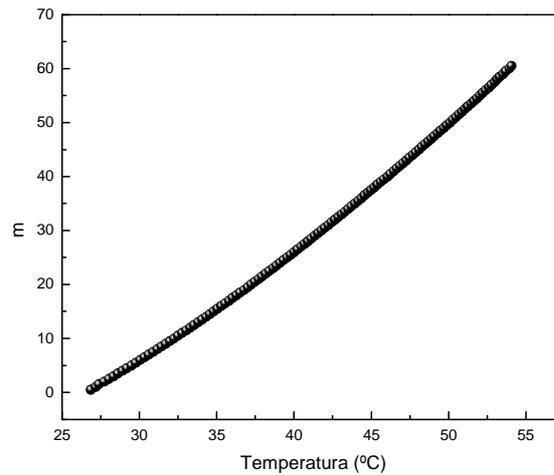


Figura 4. 11 Valores de m em função da temperatura para a amostra de albumina. Taxa de aquecimento de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Para se obter o valor de $dn/dT(T)$ precisamos agora calcular a derivada numérica de dm/dT e aplicar na equação (2.13), sabendo-se que o comprimento de onda do laser é $\lambda=632,8\text{nm}$, ou seja:

$$\frac{dn}{dT} = \frac{\lambda}{2L} \frac{dm}{dT}$$

A Figura 4.12 mostra $dn/dT(T)$ da albumina. Para comparação, incluímos os valores medidos, curva em azul, para a água milli-Q.

Pode-se observar uma diminuição monotônica de $dn/dT(T)$ da água e da albumina até aproximadamente 34°C , com significativas diferenças para as temperaturas mais altas. Os dados para a albumina na região entre 35 e 41°C parecem ter inclinação levemente diferente daqueles para temperaturas menores, com o aparecimento de maior nível de ruído ou instabilidades da amostra. Em especial, há uma variação brusca nos valores entre 41 e $43,2^{\circ}\text{C}$. A partir de 45°C as franjas ficam distorcidas não sendo possível determinar corretamente os máximos e mínimos, resultando em flutuação dos dados. Vê-se mais uma vez que as mudanças ocorrem nas mesmas regiões de temperatura das variações observadas nos dados de LT, por exemplo, o pico máximo na difusividade térmica foi observado em torno de 42°C . Optamos por deixar a análise mais detalhada do comportamento deste parâmetro para mais adiante porque demandará discussão dos aspectos microscópicos que esta grandeza $dn/dT(T)$

pode fornecer. Assim, utilizaremos aqui os valores da Figura 4.12 para a realização dos cálculos das variações com a temperatura da entropia e da energia livre de Gibbs, conforme prevêm as equações 4.4 e 4.5.

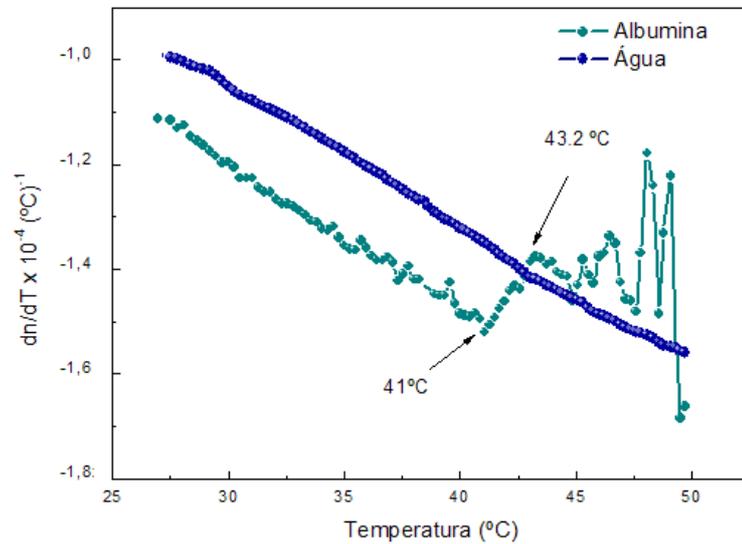


Figura 4. 12 $dn/dT(T)$ em função da temperatura para: água milli-Q e albumina diluída na água milli-Q. Taxa de aquecimento de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

A Figura 4.13 mostra a variação da entropia, $dS(T)$, obtida pela equação (4.4) e a correspondente derivada em relação à temperatura. Podemos observar um acréscimo não-linear na entropia com o aumento da temperatura e a derivada dS mostrando pequenas variações na região de piroxia, entre 35 e 42 °C e próximo de 50°C. Vimos, anteriormente, na ilustração do diagrama termodinâmico, Figura 1.9, que a entropia aumenta no sentido em que as proteínas desnaturam-se, isto é, a desorganização de sua estrutura resulta em um aumento na entropia e assim o reenovelamento dessas moléculas para a forma nativa torna-se um processo entropicamente não favorável.

Para analisar o comportamento da entropia é necessário levar em conta a interação da proteína com as moléculas de água circundantes. Quando a proteína encontra-se no estado nativo uma camada de hidratação é formada em sua volta. Com o aumento da temperatura essa camada de hidratação diminui [70] até a proteína desnaturar. A energia livre de Gibbs, como veremos a seguir, é proporcional à camada de hidratação circundante. Assim, com o aumento da temperatura a energia livre de Gibbs diminui e, conseqüentemente, a entropia aumenta. Isto poderia ainda explicar a maior variação da inclinação ou comportamento não

linear de $S(T)-S_0$ entre o início da região de perturbação inicial até em torno de 42°C que pode ser observado no $dS(T)$.

A Figura 4.14 mostra a distribuição das moléculas apolares (hidrofóbicas) e das polares (água). Na forma nativa pode-se observar que as moléculas hidrofóbicas encontram-se muito próximas uma das outras e afastadas das moléculas de água. Na forma desenrolada essas moléculas hidrofóbicas ficam mais expostas ao solvente. A interação hidrofóbica é estabilizada pela tendência à maior desordem do solvente [71]. Há ainda a formação de aglomerados de moléculas hidrofóbicas após temperaturas mais elevadas levando a um aumento na entropia do sistema. Este aumento na entropia faz com que o processo se torne espontâneo com a formação de aglomerados de moléculas hidrofóbicas em solventes polares, como a água [24,35].

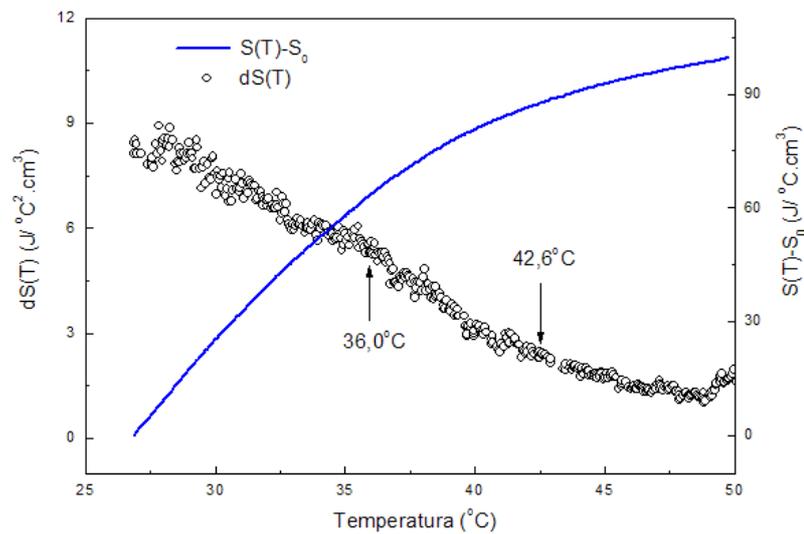


Figura 4.13 Variação da entropia e sua respectiva derivada em função da temperatura para a albumina em solução aquosa.

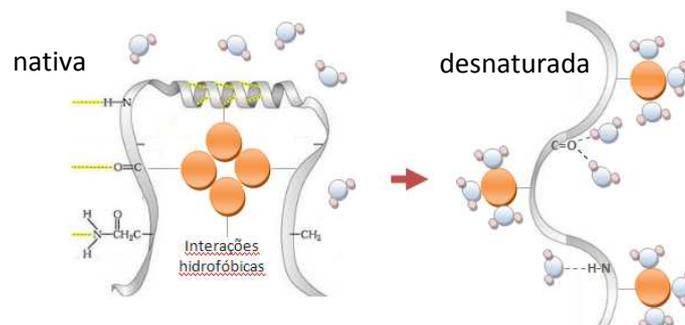


Figura 4.14 Representação ilustrativa da interação hidrofóbica na fase nativa e desnaturada (adaptado de [35]).

A variação da energia livre de Gibbs em função da temperatura é obtida pela equação (4.5), conforme mostra a Figura 4.15. Pode-se observar que há diminuição, não linear, de $G(T)-G_0$ (curva em verde) com o aumento da temperatura. Nesta observação deve-se salientar que os valores de $G(T)-G_0$ correspondem à superposição das energias mínimas de Gibbs dos dois estados principais, nativo e desnaturado, e provavelmente um terceiro estado intermediário, mas em menor quantidade. Assim, dependendo do intervalo de temperatura podem estar presentes os três estados.

Para um melhor entendimento vamos considerar apenas os dois estados principais, nativo e desnaturado, conforme mostra a Figura 4.16. Nesta simulação temos os valores de $G(T)-G_0$ obtidos separadamente para os estados nativo e desnaturado, representados pelas curvas em verde e em azul, respectivamente. Assim é possível obter a variação da energia livre de Gibbs entre os estados [N] e [D], conforme pode ser visto na figura. Ou seja, a curva em vermelho seria a representação da combinação de $G(T)-G_0$ dos dois estados. Nesse caso, não é possível obter $\Delta_N^D G(T)$, mas pode-se avaliar o comportamento de $G(T)-G_0$ em função do aumento de temperatura.

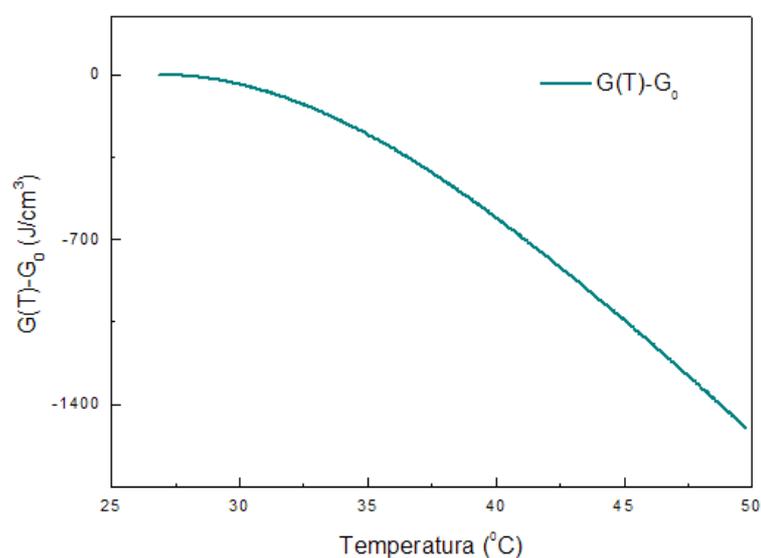


Figura 4. 15 Variação da energia livre de Gibbs $G(T)-G_0$ em função da temperatura para a albumina.

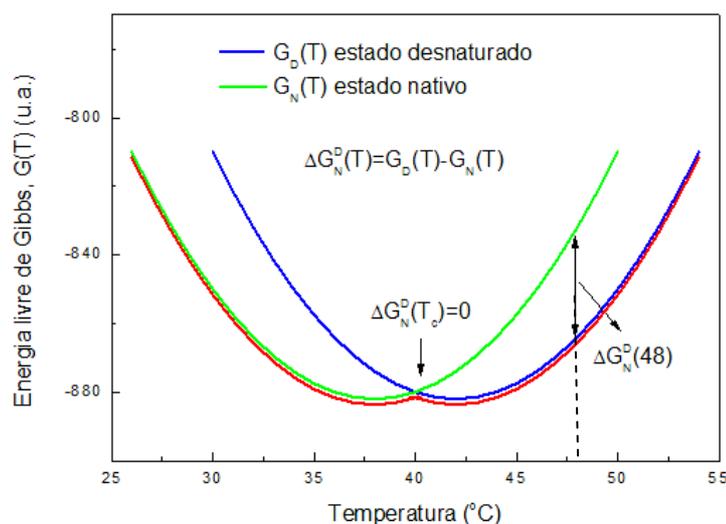


Figura 4.16 Simulação da energia livre de Gibbs para dois estados, nativo e desnaturado.

A energia livre de Gibbs pode ser definida como o trabalho necessário para que a estrutura da proteína possa ser rompida e também pode ser considerada como a medida da estabilidade estrutural dos domínios. Quanto mais estável o processo, menor a quantidade de energia livre. Para um processo com temperatura e pressão constantes, considerando as discussões realizadas anteriormente sobre o diagrama em forma de funil, vimos que a maior estabilidade conformacional consiste na conformação nativa correspondendo à menor quantidade de energia livre. Para uma mudança de temperatura à pressão constante, a função $G(T)-G_0$ diminui com o aumento da temperatura, pois neste caso temos $dG = -SdT$. Assim, podemos destacar duas situações distintas:

- (1) proteína cuja conformação nativa tem conteúdo energético menor do que a forma desenrolada; o polipeptídico se desenovelará muito rápido e espontaneamente se a barreira de energia de ativação for baixa. proteínas com menor energia livre no estado N do que em D [22];
- (2) proteína cuja forma desnaturada tem um conteúdo mais baixo do que a forma nativa. Neste caso, a forma nativa é estável em condições biológicas devido à barreira de energia de ativação alta para o desenovelamento, que é ultrapassada somente pelo aquecimento e outros processos [22].

Rompida a barreira de energia do potencial de ativação (ΔV), as proteínas desnaturam-se espontaneamente, sem a necessidade de fornecimento de energia [22]. A Figura 4. 17

ilustra a energia livre entre os dois estados para a situação (1) e (2) a qual pode ser correlacionada com os nossos resultados.

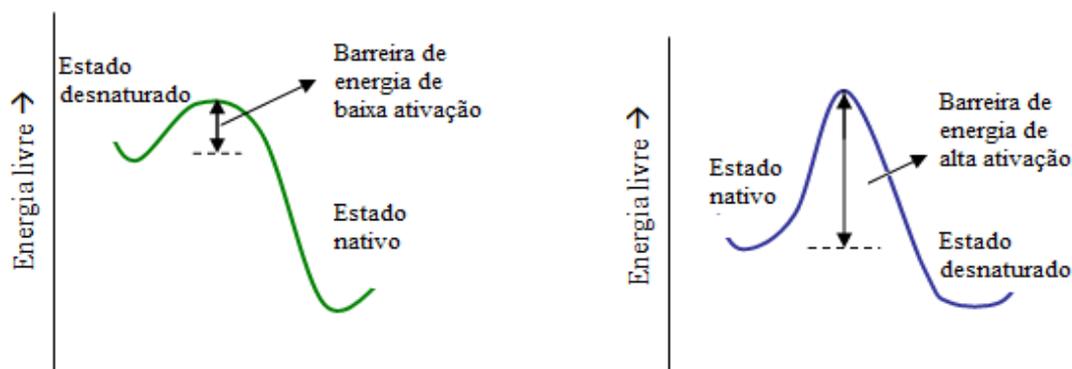


Figura 4. 17 Representação gráfica da energia livre e o potencial de ativação ΔV no processo de desnaturação [22].

Para o caso da albumina diluída vemos que a função $G(T)-G_0$ diminui com o aumento da temperatura. Como a entropia apresenta um aumento, devida às interações hidrofóbicas, a energia livre tende a diminuir na mesma proporção do aumento da entropia. Sendo assim, pode-se dizer que a proteína apresenta menor quantidade de energia livre na forma desenovelada e assim necessita de uma energia maior para a transição entre o estado nativo e desnaturado, o qual ocorre de forma não espontânea. Quando o número de partículas presentes no estado [D] for maior do que no estado [N] a transição entre os dois estados passa a ser espontânea e não há mais necessidade de calor para que as proteínas se desnaturem. O processo de desnaturação passa então a ser cooperativo.

Esta análise termodinâmica é baseada em princípios macroscópicos e a nosso ver está consistente com o esperado do ponto de vista termodinâmico e de acordo com estudos anteriores sobre os processos de desnaturação de proteínas [32,33].

Como dissemos anteriormente, uma análise microscópica pode ser feita a partir do comportamento de $dn/dT(T)$. Este parâmetro está relacionado com o coeficiente de temperatura da polarizabilidade eletrônica, denominado ϕ , e com o coeficiente de expansão térmica volumétrico, denominado β , de acordo com a equação (2.5), reescrita aqui por conveniência:

$$\frac{dn}{dT} = \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 1)}{6n}(\varphi - \beta)$$

Em que n é o índice de refração na temperatura inicial do intervalo de variação considerado.

O parâmetro φ pode ser interpretado como uma medida da mudança com o aquecimento da distorção dos orbitais das ligações químicas que formam as moléculas ou complexos, ou seja, implica que ao ser combinado com o comportamento do coeficiente de expansão térmica pode permitir que os dados de $dn/dT(T)$ possam revelar as mudanças estruturais das amostras com o processo de aquecimento.

Verifica-se que dn/dT pode apresentar duas situações bem distintas, ou seja:

$$\text{se } \varphi > \beta \Rightarrow \frac{dn}{dT} > 0$$

$$\text{se } \varphi < \beta \Rightarrow \frac{dn}{dT} < 0$$

Para as amostras em estudo, embora $dn/dT(T)$ varie com a mudança de temperatura, ele é sempre negativo. Isto ocorre porque o parâmetro β de amostras líquidas é sempre maior, em módulo, do que φ .

Conhecido $\beta(T)$, $dn/dT(T)$ e o índice de refração (n), que de nossas amostras é muito próximo ao da água, $n=1,33$, a contribuição do coeficiente térmico da polarizabilidade eletrônica, $\varphi(T)$, pode ser calculada a partir da equação (2.5). Possíveis mudanças em $n(T)$ não interferem nos resultados porque a fração multiplicativa de $(\varphi - \beta)$ na referida equação não se altera significativamente com a variação de n . Os resultados estão mostrados na Figura 4.18. Como descrito anteriormente, nota-se uma diminuição nos valores com o aquecimento, seguida de uma mudança brusca em torno de 41°C.

Para a análise é conveniente especificar que o coeficiente de polarizabilidade está relacionado com a polarizabilidade P de acordo com a equação (2.6):

$$\varphi = \frac{1}{P} \left(\frac{dP}{dT} \right)$$

A interação intramolecular entre os agrupamentos polares e apolares, presentes nas proteínas em solução aquosa, dependerá do momento de dipolo e da polarizabilidade entre as moléculas. Na forma nativa há uma maior interação intramolecular e conseqüentemente uma maior polarizabilidade, já na forma desnaturada a interação intramolecular é menor, e conseqüentemente a polarizabilidade também diminui.

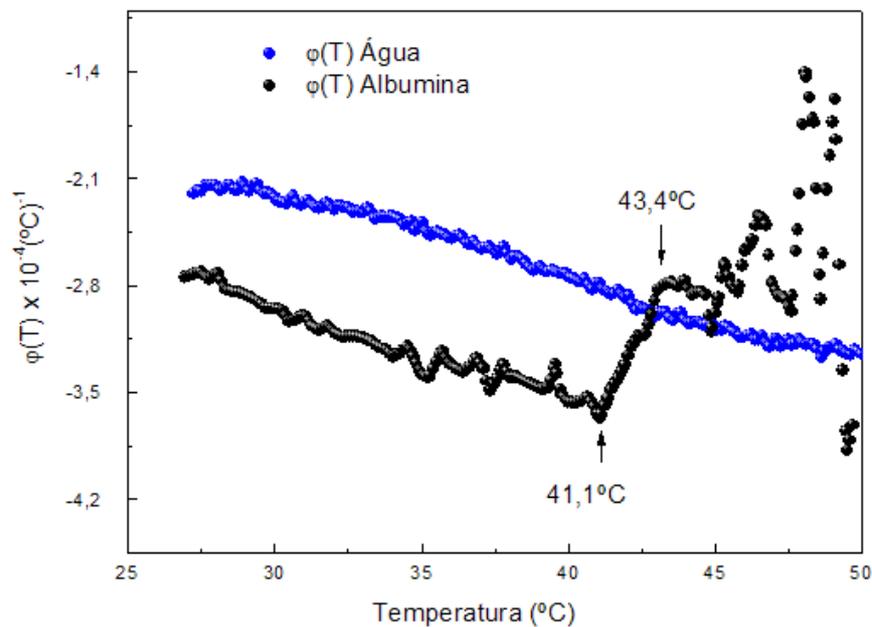


Figura 4.18 Polarizabilidade eletrônica em função da temperatura da albumina diluída. Taxa de aquecimento de 0,1°C/min.

A diminuição de $\varphi(T)$ para valores mais negativos na região até 41°C sugere haver diminuição da polarizabilidade com o aumento da temperatura em razão do menor interação do número de moléculas.

Na região entre 41 e 43 °C, $\varphi(T)$ apresenta variação abrupta para valores menos negativos. Nesta região as moléculas continuam se afastando uma das outras e a proteína vai se desenovelando parcialmente perdendo grande parte de sua estrutura secundária e conseqüentemente uma grande diminuição das pontes de hidrogênio. Como a proteína na forma desnaturada apresenta-se como um novelo de lã desenrolado, a área de contato das moléculas de água circundantes aumenta, aumentando assim o número de dipolos induzidos

por estas moléculas de água, variando também tanto a distância entre as cargas como a carga efetiva dos novos dipolos. Ou seja, os dados indicam que neste intervalo restrito de temperatura deve haver um significativo rearranjo de cargas, o que é compatível com as transformações conformacionais que podem ocorrer na estrutura da albumina. Embora não muito evidente, a leve atenuação da variação de $\phi(T)$ na região entre 35 e 42°C poderia ser também devida a estes processos de mudança conformacionais envolvendo as quebras nas pontes de hidrogênio.

4.1.1.2 Resultados com a técnica PAS

A maioria das proteínas apresenta absorção no UV em torno de 280 nm devido à presença dos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina, que são aminoácidos aromáticos. A BSA apresenta 27 resíduos de fenilalanina, 20 de tirosina e 2 de triptofano. A Figura 4.19 mostra a absorção dos resíduos triptofano e tirosina obtidos da literatura [6], os quais apresentam maior intensidade de absorção no UV do que a fenilalanina. Embora a albumina tenha pequena quantidade de resíduos aromáticos, eles podem ser facilmente detectados via medida da absorção óptica [72].

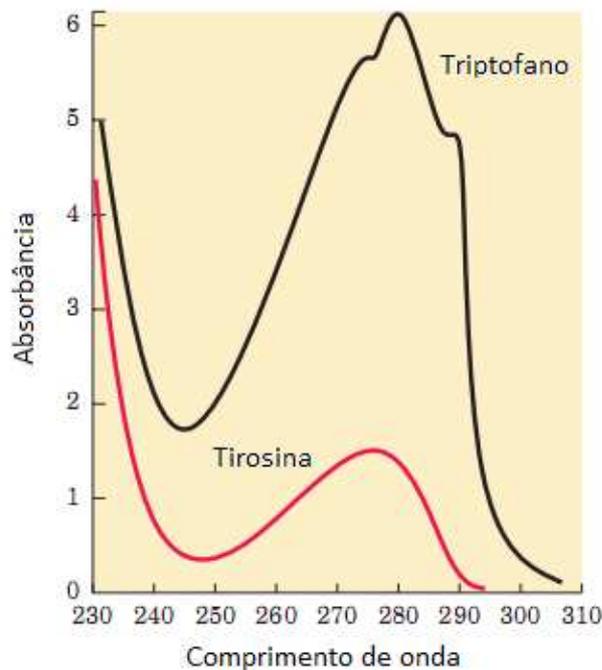


Figura 4.19 Absorbância dos aminoácidos triptofano e tirosina [6].

Sendo assim, foram realizados experimentos de absorbância na região do UV (230-400nm), conforme descrito no capítulo materiais e métodos. A Figura 4.20 mostra os espectros obtidos pode-se observar uma aumento na absorção, conforme a temperatura foi aumentada de ambiente até 50°C. Os resíduos aromáticos são moléculas apolares e em solução aquosa são hidrofóbicos. Como a proteína no estado nativo encontra-se totalmente enrolada os resíduos apolares permanecem no interior da molécula. Quando esta proteína apresenta desnaturação ela passa a se desenrolar e os radicais apolares ficam mais expostos, resultando em um aumento da banda de absorção atribuída aos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina. É conhecido da literatura que a emissão dos resíduos de triptofano em 345nm, com excitação em 295nm, diminui em até 60% entre as temperatura de 20 a 60°C [38]. Esta diminuição na emissão de energia do triptofano pode estar relacionado com o aumento de absorção.

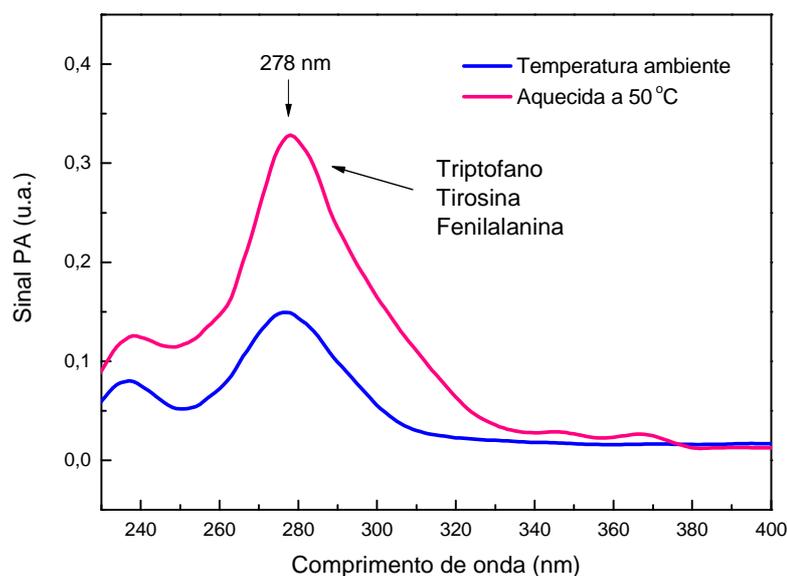


Figura 4.20 Espectros de absorbância obtidos na região do UV para a BSA na temperatura ambiente e em 50°C.

Em outras palavras, os espectros mostram aumento nas intensidades das bandas atribuídas aos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina.

A Figura 4.21 mostra a absorvância da albumina em função da temperatura para uma rampa de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e no comprimento de onda fixo em 300nm . Após 50°C há um aumento acentuado na absorvância, mesmo efeito observado no comportamento $\theta/P(T)$. Ampliando a região em torno de 40°C não se observa nenhuma variação significativa. A temperatura de 50°C já corresponde à desnaturação inicial irreversível. Além de desenrolada, a proteína apresenta a formação de agregados e fibras, que corresponde a aglomerados de moléculas, que no caso irreversível, não se enovelam novamente. Estes fatores podem estar contribuindo para o aumento da absorvância a partir de 50°C . O fator responsável pela diminuição na emissão de energia do triptofano, pode também estar contribuindo para o aumento da absorção.

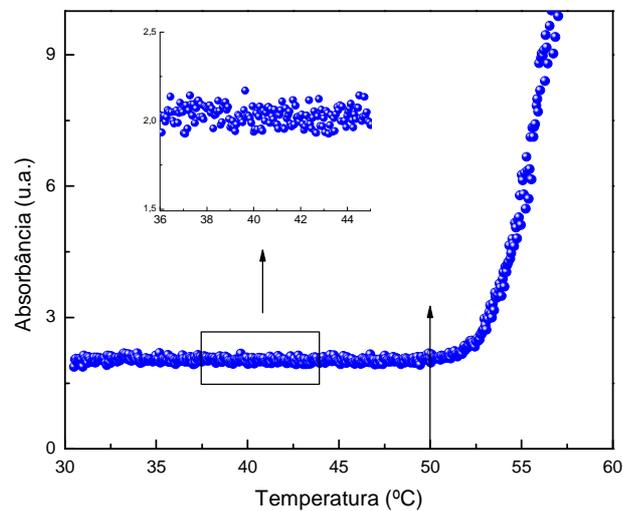


Figura 4.21 Absorvância da albumina, em 300nm , em função da temperatura. Rampa de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Ao se analisarem os dados em temperaturas maiores, como em 50°C , a absorvância aumenta exponencialmente até uma determinada estabilização, como mostra a Figura 4.22. Neste caso a temperatura de aquecimento foi mantida fixa durante 13 minutos, tempo suficiente para a estabilização da absorção máxima. Isto mostra a dinâmica de instabilidade da molécula de proteína, obtendo-se um tempo característico de desnaturação, para 50°C , da ordem de 3,6 minutos.

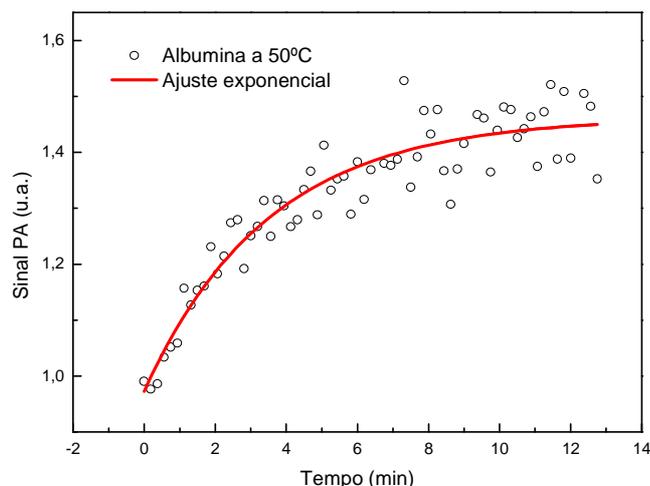


Figura 4.22 Absorbância da albumina em função do tempo para a temperatura de 50°C e 300nm.

4.1.1.3 Resultados com a técnica FTIR

A técnica de infravermelho com transformada de Fourier tem sido utilizada para quantificar os tipos de estruturas secundárias de proteínas. A maioria das informações de FTIR sobre as estruturas secundárias α -hélice, β -folha, β -volta e aleatórias (randômicas) é obtida da análise da banda de absorção óptica de amina I na região de 1700-1600 cm^{-1} . Essa banda é atribuída ao estiramento da ligação C=O da ligação peptídica, e é sensível às diferentes conformações dessas estruturas secundárias. Além da amina I, a amina II também fornece informações sobre a estrutura secundária. Sua banda de absorção ocorre em 1548 cm^{-1} e é atribuída ao modo de flexão C-H sobre as ligações C-N. A amina III apresenta banda de absorção entre 1200 e 1350 cm^{-1} , atribuída à combinação entre o estiramento vibracional das ligações C-N e as flexões das moléculas N-H [72-76]. Estas são as principais ligações químicas presentes na proteína, conforme ilustra a Figura 4. 23.

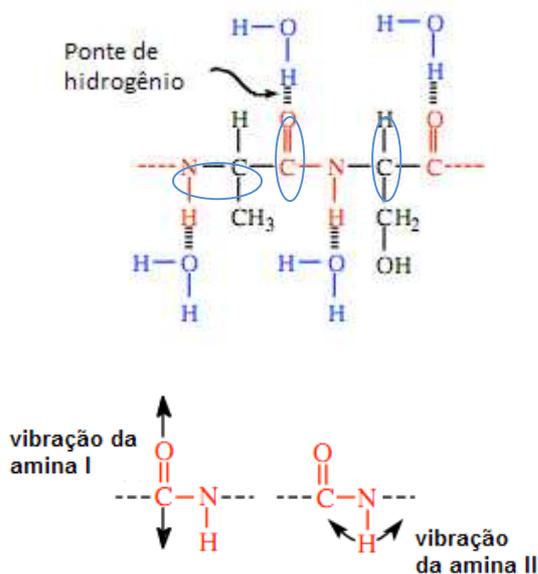


Figura 4. 23 Principais ligações químicas e vibrações moleculares presentes na amina I e II [73].

A Figura 4.24 mostra os espectros de absorbância IR obtidos em função da temperatura. Podem-se observar as mudanças na intensidade da absorção das aminas I, II e III para diferentes temperaturas. O pico maior representa a banda da amina I, que é observado em 1650cm^{-1} e o pico menor, localizado em 1550cm^{-1} , representa a banda da amina II. A banda de absorção da amina III é observada em torno de 1300cm^{-1} . Apesar da concentração de albumina utilizada ser considerada alta ($>30\text{mg/ml}$) a absorção da água pode interferir na região da amina I, pois ela apresenta uma banda em 1640cm^{-1} , o que pode dificultar a análise da banda da amina I [75,76]. Assim, apresentaremos apenas a análise da banda da amina II por exibir menor interferência da banda de absorção OH.

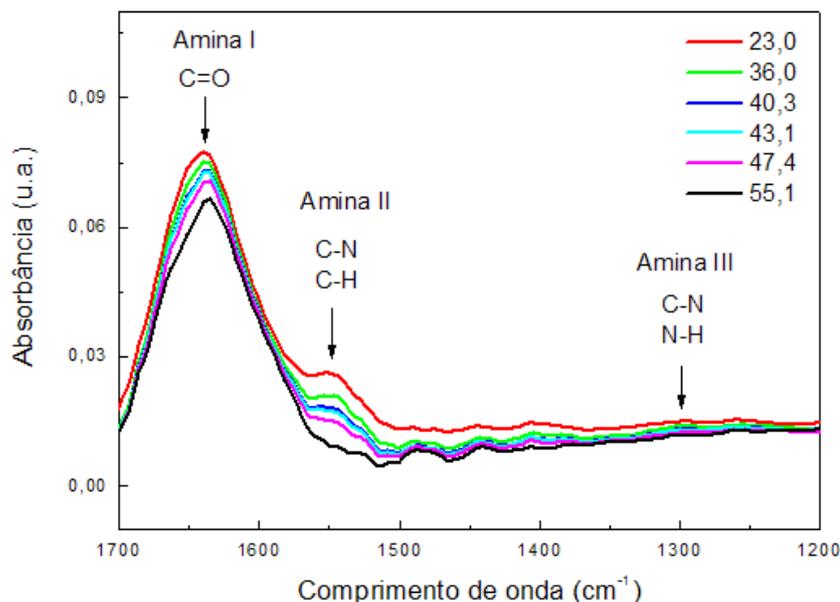


Figura 4.24 Espectros de absorção FTIR da BSA nas regiões de absorção das aminas I, II e III em função da temperatura.

Para verificar essa diminuição na absorbância, foi traçada uma linha de base na região da amina II e assim a banda foi ajustada com uma função gaussiana. Deste ajuste, foram determinados os valores das áreas sob as gaussianas em função da temperatura assim como os centros das mesmas. A Figura 4.25 apresenta a área da gaussiana relacionada à amina II em função da temperatura, os círculos em preto são as áreas obtidas para cada temperatura na qual foram obtidos os espectros de absorção e a curva em vermelho representa um ajuste realizado com uma função sigmoidal de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Área}(T) = A_D + \frac{A_N - A_D}{1 + e^{(T-T_C)/dT}} \quad (4.6)$$

Em (4.6), A_D e A_N são por nós definidos como sendo a representação da área das proteínas no estado desnaturado e nativo, respectivamente, T_C é o ponto de maior variação do processo de desnaturação e corresponde à temperatura de desnaturação e dT é a taxa de temperatura em que ocorre a variação entre os processos nativo e desnaturado.

A diminuição na absorbância está relacionada aos modos de flexão C-H sobre as ligações C-N, que são as principais ligações presentes na amina II, alterando assim, a conformação da estrutura secundária. A temperatura correspondente à máxima variação da área de absorção, denominada de T_C , foi de 51,8°C. Ela corresponde à região em que o número de moléculas proteicas está desnaturando irreversivelmente, ou no caso de proteínas

com multidomínios, a temperatura em que um domínio se desnatura irreversivelmente. Na literatura, a temperatura de desnaturação térmica encontrada para o soro de albumina bovina e soro de albumina humana possui valores de 56,8 e 59,6°C, respectivamente, para um pH de 7.4. As amostras de albumina medidas apresentaram um pH menor, em torno de $6,9 \pm 0,1$. A temperatura de desnaturação está associada também ao pH da proteína sendo que para pH mais ácido a temperatura de desnaturação diminui. Pode ser observado ainda que a área da amina II começa a apresentar uma diminuição após a temperatura de 43°C, o que se deve provavelmente à diminuição de estruturas secundárias caracterizando o processo de desnaturação. Segundo consta na literatura [71,75], a diminuição das intensidades dos picos de absorbância da amina II está associada ao decréscimo das estruturas secundárias α -hélice e ao aumento das β -folha, respectivamente, conforme mencionando anteriormente [76].

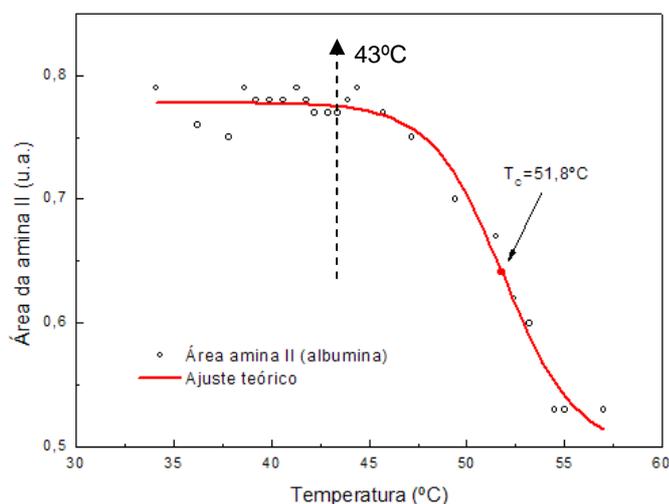


Figura 4.25 Áreas referentes as absorções da amina II em função da temperatura.

O centro da banda da amina II, determinado pelo centro da gaussiana em função da temperatura, está apresentado na Figura 4.26. Podemos observar inicialmente um pequeno deslocamento para comprimento de onda menor, e após 45°C um deslocamento para comprimentos de onda maiores, variando de 1554,5 para 1558 cm^{-1} , conforme mostra a Figura 4.26. Há uma variação inicial mais intensa em torno de 40,0°C, o que, provavelmente, poderia ser caracterizado como uma perturbação inicial na estrutura da proteína. Este deslocamento do centro da banda pode estar associado às mudanças ocorridas nas estruturas secundárias da proteína.

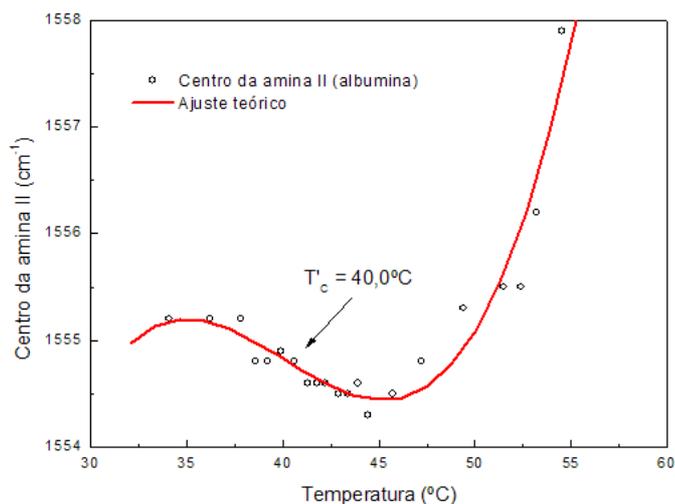


Figura 4.26 Centros da amina II em função da temperatura.

A avaliação da estrutura secundária pode também ser obtida a partir do experimento de dicroísmo circular (CD), o qual fornece a elipticidade da molécula de proteína. De acordo com o estudo de CD realizado por de Sinha e colaboradores [29], como mostra a Figura 4.27, a porcentagem de estrutura α -hélice na proteína, indicada pelos picos negativos em 208 e 222nm, é 65% no estado nativo em 25°C, 62% em 50°C e 46% em 75°C. Isto mostra que a proteína perde uma considerável proporção de estruturas secundárias durante o intervalo de temperatura de 25 a 50°C, como também demonstraram nossos dados.

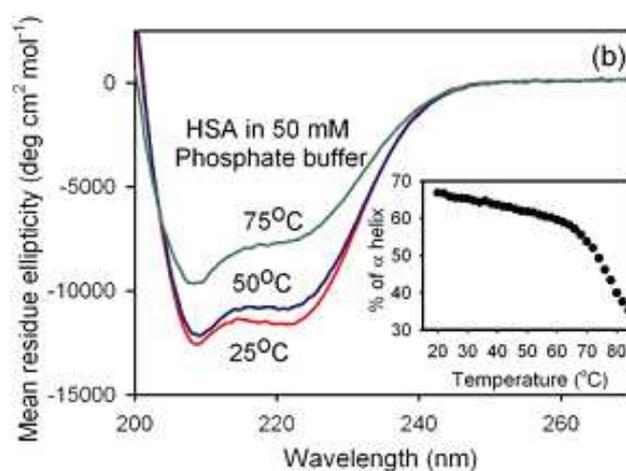


Figura 4.27 Mudança da elipticidade média da proteína nas temperaturas de 25, 50 e 75°C, respectivamente, obtida pela técnica de dicroísmo circular[29].

Portanto, os resultados de FTIR mostram que as mudanças estruturais detectadas nas medidas de lente térmica e de interferometria óptica podem estar relacionadas com aquelas

das estruturas secundárias, que desempenham papel importante no processo de desenovelamento das proteínas [77].

4.1.2 Hemoglobina

4.1.2.1 Lente térmica e a interferometria óptica

Para a análise da lente térmica, as amostras de hemoglobina foram diluídas na concentração de 3% (3,9mg/ml) da concentração de hemoglobinas existente no sangue humano, que é 0,13g/ml. A concentração teve que ser muito baixa porque a hemoglobina é muito absorvedora e/ou espalhadora de luz, o que impossibilitou a medida em razão da baixa transmitância de luz da amostra, mesmo quando se utilizou uma cubeta com espessura de 20 μ m.

A Figura 4.28 mostra a difusividade térmica da hemoglobina em função da temperatura para uma rampa de aquecimento de 0,1°C/min. O valor na temperatura ambiente é muito próximo ao da água, que é da ordem de 0,014cm²/s. Os círculos em pretos representam os valores experimentais D(T) a curva em vermelho é um guia para melhor visualização do comportamento da difusividade térmica. Nota-se uma leve tendência de aumento da difusividade, a não ser na região entre 35,8 a 43,9°C, na qual pode ser observada uma diminuição com um mínimo em 40,5°C. O aumento em seus valores entre 40,5 e 57,5 °C é da ordem de 10%. Trabalhos anteriores mostram que as hemácias passam por uma transição crítica, denominada T_C, na qual ocorrem mudanças iniciais na estrutura da hemoglobina. Esta temperatura para a espécie *homo sapiens* é em (36,4 \pm 0,8) °C, que se aproxima da temperatura do corpo, de (36,2 \pm 0,2) [1,78-80]. Neste mesmo, trabalho o autor divide o processo de desnaturação térmica da hemoglobina humana em duas etapas, sendo a primeira subdividida em duas sub-etapas [1]. Adotamos o mesmo modelo na Figura 4.28. A primeira sub-etapa consiste na perturbação estrutural inicial representada pelo retângulo em cinza, compreendendo as temperaturas entre 30 e 43,9°C. A segunda sub-etapa consiste na desnaturação térmica inicial, representada pelo retângulo em alaranjado, entre as temperaturas de 43,9 a 57,5°C. A segunda etapa consiste na desnaturação térmica irreversível, processo em

que as proteínas não retornam para sua estrutura nativa, a partir de 57,5°C, retângulo em verde.

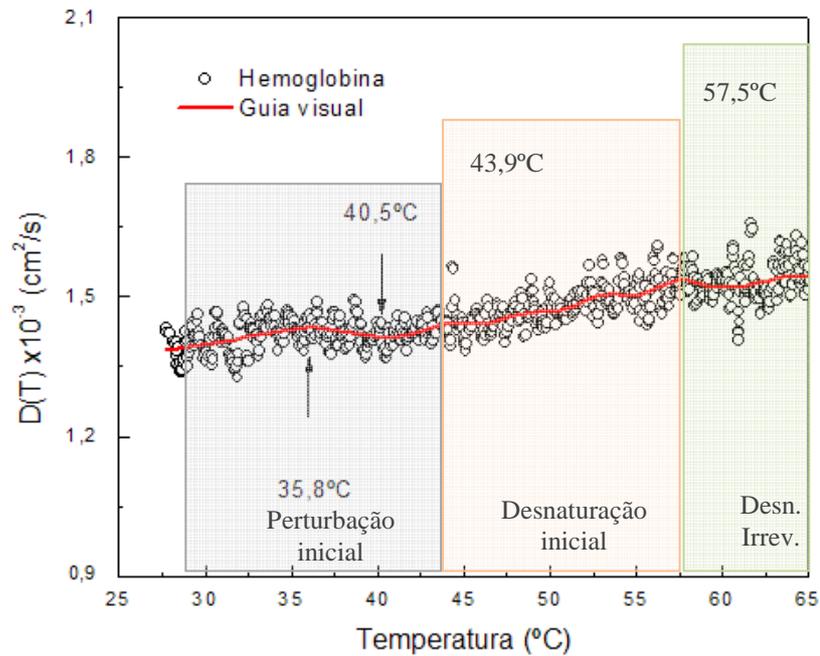


Figura 4.28 Difusividade térmica da hemoglobina (3,9mg/m) para uma rampa de 0,1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Conforme vimos, a difusividade térmica está relacionada com a condutividade térmica, o calor específico e a densidade. A Figura 4.29 mostra o comportamento da densidade de massa $\rho(T)$ da hemoglobina diluída a 3%, que foi determinada no mesmo intervalo de temperatura. Podemos observar um decréscimo não linear, com ausência de regiões com variações de seus valores, conforme observado para a amostra de albumina. A figura 4.30 mostra $\beta(T)$ que apresenta transição para temperaturas em torno de 53,4°C, também semelhante ao encontrada para a albumina.

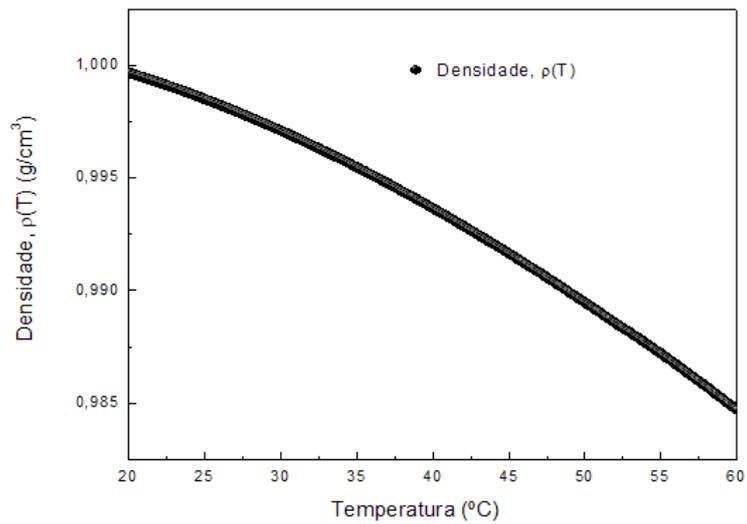


Figura 4. 29 Densidade $\rho(T)$ da amostra de hemoglobina.

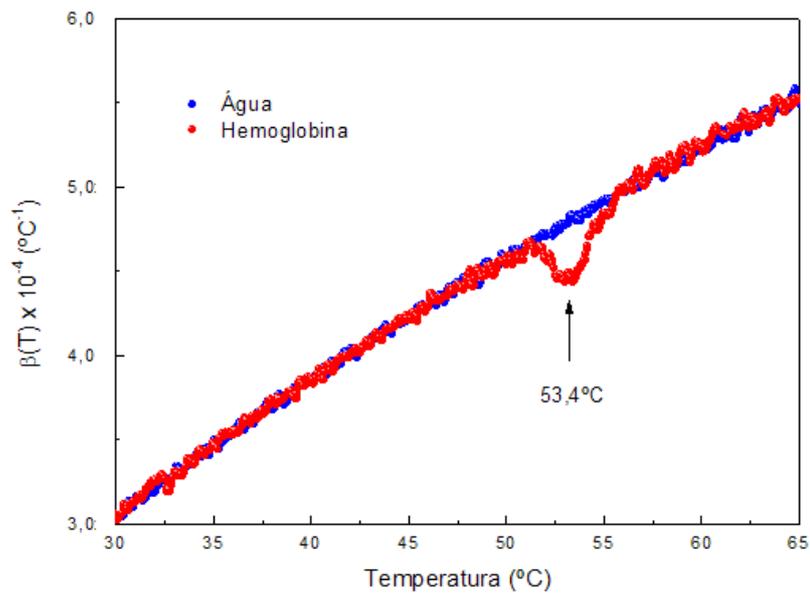


Figura 4.30 Coeficiente de expansão térmica volumétrica em função da temperatura. Curva em azul água milli-Q e curva em vermelho hemoglobina diluída em água milli-Q.

Analisando o comportamento de $\theta/P(T)$, mostrado na Figura 4.32, nota-se a grande mudança de comportamento em torno de 53°C. Após esta temperatura a amostra não volta mais ao estado nativo, sendo esta a temperatura referente à desnaturação térmica irreversível.

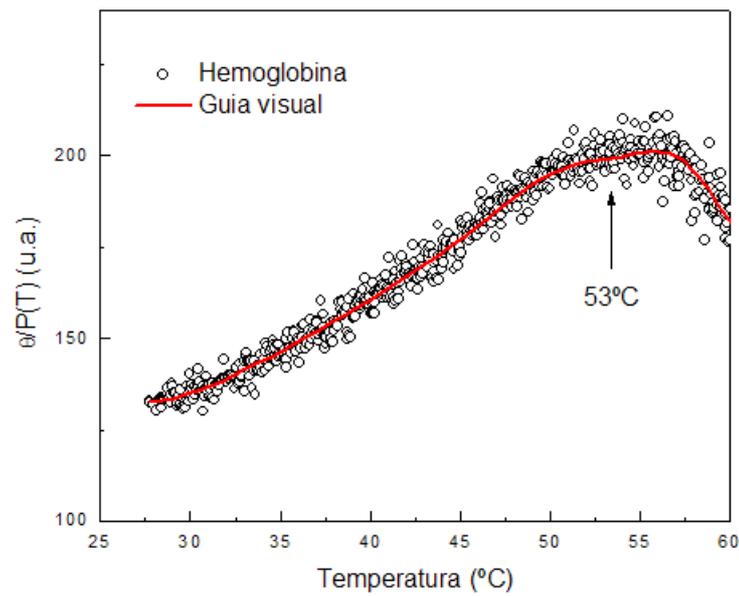


Figura 4.31 Comportamento de $\theta/P(T)$ da amostra de hemoglobina. Rampa de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

A Figura 4.32 mostra o coeficiente de absorção óptica $A(T)$ no comprimento de onda de $632,8\text{nm}$. Nota-se um aumento não linear com a temperatura.

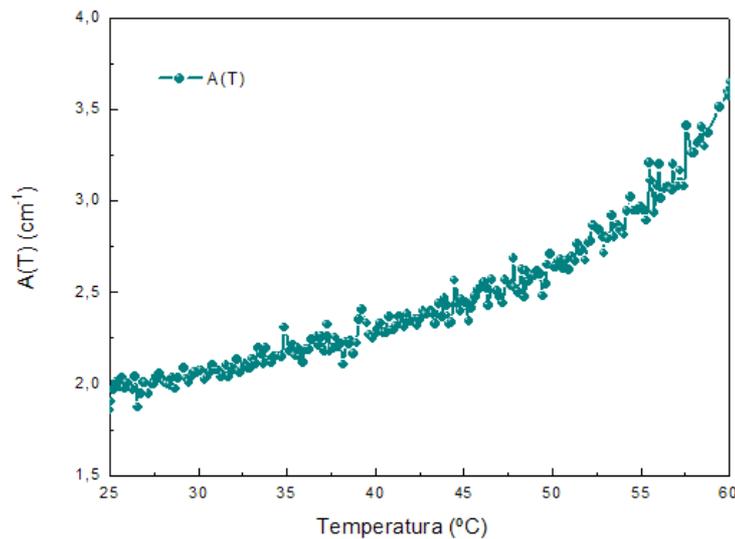


Figura 4.32 Coeficiente de absorção $A(T)$, $\lambda=632,8\text{nm}$. Amostra hemoglobina 3%.

Os resultados de $dn/dT(T)$ foram obtidos via interferometria óptica utilizando-se o mesmo procedimento adotado para a amostra de albumina. As dificuldades encontradas foram as mesmas da medida com a LT.

A Figura 4.33 mostra as curvas de $dn/dT(T)$ para as amostras de hemoglobina em água milli-Q, na rampa de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e da água pura. Nota-se que são semelhantes, possivelmente em razão da baixa concentração utilizada.

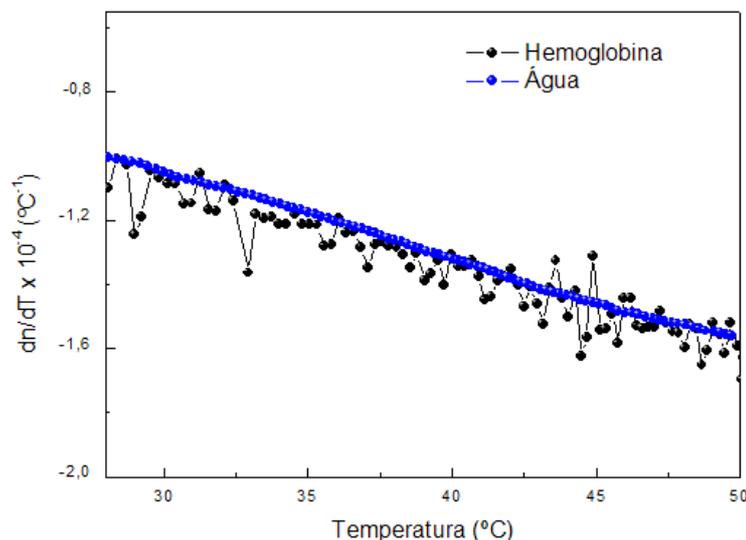


Figura 4.33 $dn/dT(T)$ em função da temperatura para a amostra de hemoglobina e da água milli-Q., Taxa de aquecimento de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

A Figura 4.34 mostra o comportamento de $(dn/dQ)_p(T)$ obtidos a partir dos dados de $D(T)$, $\theta/P(T)$, $dn/dT(T)$ e $A(T)$. Os círculos em preto são os valores obtidos pela equação (4.2) e a curva em vermelho é apenas um ajuste teórico de caráter ilustrativo. Apesar da concentração de hemoglobina ser de apenas 3%, é possível observar uma diminuição no $(dn/dQ)_p(T)$, conforme verificado para a amostra da albumina. Fazendo-se uma comparação com os dados obtidos por DSC/TG, como pode ser observado na Figura 4.35, nota-se que também é observado um pico endotérmico na região entre 25 a 50°C . Lembrando que esses dados foram obtidos com a amostra na fase sólida. Inicialmente, observamos um aumento, aparentemente linear, de retenção de calor. Entre as temperaturas de $35,5$ a $42,6^{\circ}\text{C}$ a taxa de retenção de calor aumenta mais, e um mínimo na derivada de $(dn/dQ)_p(T)$ pode ser observado em $42,6^{\circ}\text{C}$. Neste intervalo de temperatura ocorre a perturbação inicial, conforme apresentamos anteriormente. A retenção de calor continua aumentando até aproximadamente 53°C . Após essa temperatura, o processo passa a ser menos endotérmico, o que caracteriza um processo espontâneo de desnaturação.

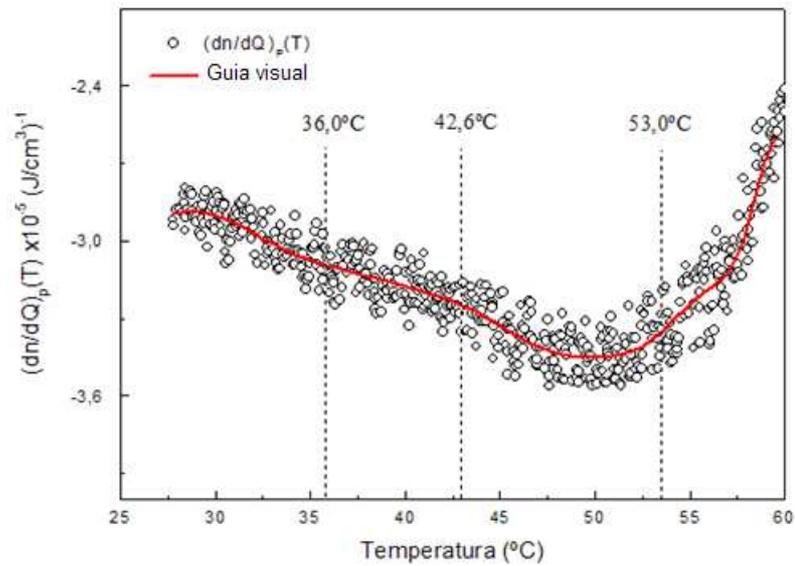


Figura 4.34 Valores de $(dn/dQ)_p(T)$ para a amostra de hemoglobina.

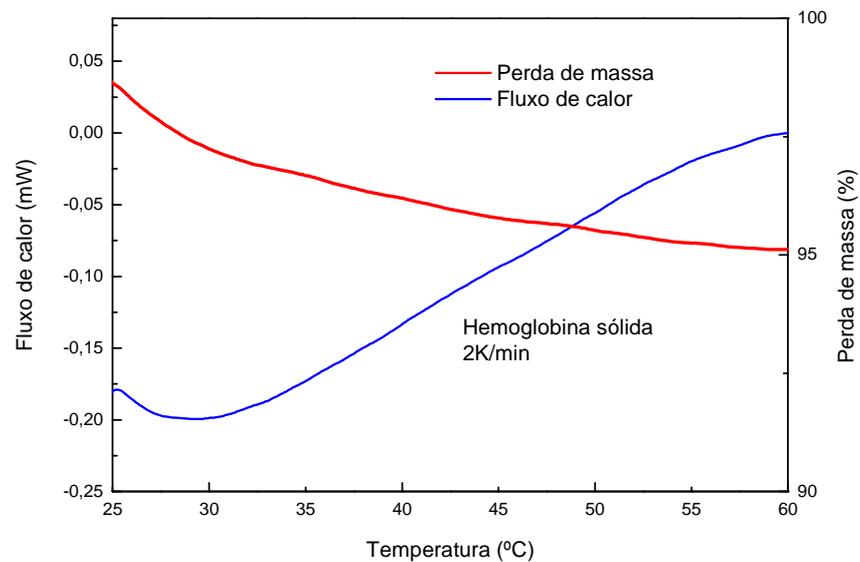


Figura 4.35 Termograma da hemoglobina no estado sólido realizado com rampa de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Curva em vermelho representa a perda de massa e a em azul fluxo de calor.

A molécula de hemoglobina na maioria das espécies é formada em média por 77% de estruturas secundárias α -hélice [1]. Vimos que estas estruturas secundárias são formadas por ligações não-covalentes como pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica devida à presença

das moléculas de água e forças de van der Waals, entre outras. Estas interações são responsáveis por manter a estrutura secundária da proteína, e podem ser quebradas na presença de calor. A retenção de calor pode provocar quebra de ligações não-covalentes e conseqüentemente a perda das estruturas secundárias, evidenciando, como na albumina, a desnaturação térmica inicialmente reversível.

Seguindo o mesmo procedimento adotado para a albumina, apresentaremos os resultados da variação de entropia $S(T)-S_0$ e da energia livre de Gibbs $G(T)-G_0$. Utilizando a equação (4.4) obtemos os dados da entropia e os de sua derivada para a hemoglobina 3%, conforme apresenta a Figura 4.36. Não observamos aparentemente nenhuma transição de primeira ordem na entropia, conforme mostra a curva de $dS(T)$. A entropia apresenta um aumento não linear em função da temperatura, conforme observado para a albumina. A entropia do sistema e de sua vizinhança apresenta assim um aumento total maior em função do aquecimento, tendendo para um processo de desnaturação espontânea.

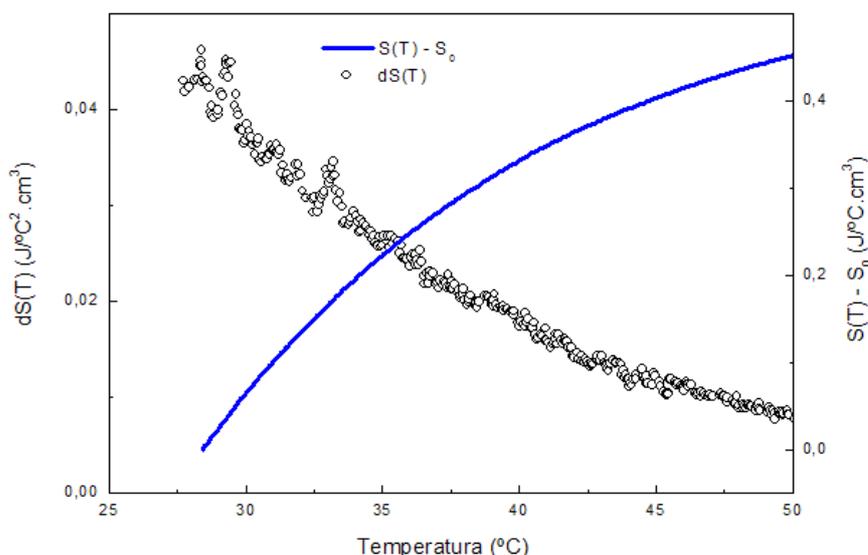


Figura 4.36 Variação da entropia $S(T) - S_0$ e sua respectiva derivada $dS(T)$ em função da temperatura para a hemoglobina diluída.

A Figura 4.37 mostra os dados de $G(T)-G_0$ obtidos pela equação (4.5). Vemos uma diminuição não linear da variação da energia livre com o aumento da temperatura. Este valor da energia mínima de Gibbs depende da energia de conformação, da energia de interação entre as diferentes moléculas da cadeia e da energia da interação entre a cadeia e as moléculas

do solvente vizinho, no caso as moléculas de água. A energia livre total é a soma da energia livre do sistema (moléculas proteicas) mais a energia livre da vizinhança (solvente, no caso a água), a qual diminui com o aumento da temperatura, conforme podemos observar na Figura 4.37. Apesar de os dados de $G(T)$ apresentarem uma variação não linear com a temperatura não foi possível verificar nenhuma região de transição de primeira e nem de segunda ordem.

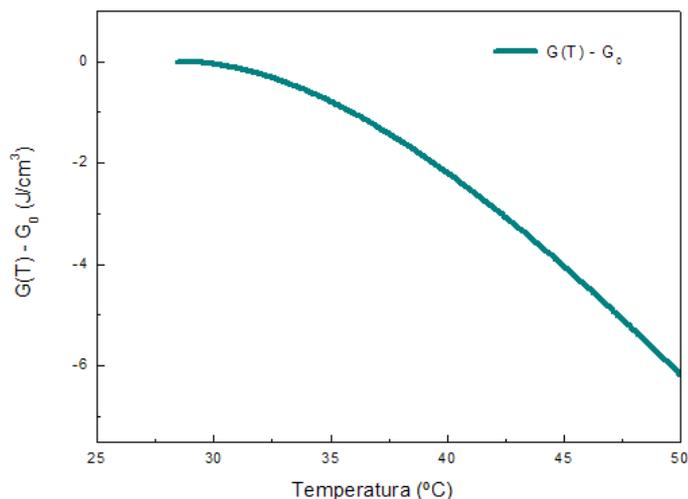


Figura 4.37 Variação da energia livre de Gibbs, $G(T) - G_0$ em função da temperatura para a hemoglobina.

Como vimos anteriormente, o comportamento de $dn/dT(T)$ está relacionado com o coeficiente de expansão térmica volumétrica e com o coeficiente de polarizabilidade eletrônica da amostra, ou seja, comportamento térmico e óptico, respectivamente. Conhecido $\beta(T)$ e $dn/dT(T)$ das Figuras 4.30 e 4.33 e o índice de refração da água, $n = 1,33$, é possível obter em boa aproximação a contribuição de $\phi(T)$ a partir da equação (2.5), conforme mostra a Figura 4.38. Não foi verificada transição como observado na albumina, apenas a diminuição aparentemente linear de $\phi(T)$ com o aumento da temperatura. Como o número de moléculas por unidade de volume N pode estar diminuindo, conforme observado no aumento do $\beta(T)$, a polarizabilidade pode estar diminuindo de forma linear com a temperatura. Em razão da baixa concentração de hemoglobina na água, os prováveis efeitos nos parâmetros ópticos e térmicos não puderam ser observados.

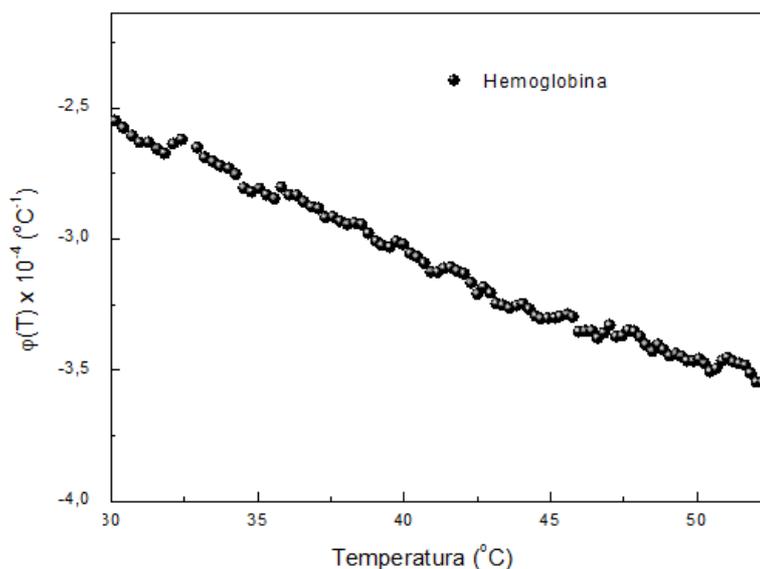


Figura 4.38 Coeficiente de polarizabilidade eletrônica em função da temperatura da amostra de hemoglobina.

4.1.2.2 Resultados com a técnica FTIR

Para a obtenção dos espectros vibracionais de FTIR a amostra foi aquecida conforme o procedimento adotado na medida da albumina. Com o aquecimento da hemoglobina pode-se observar apenas uma pequena diminuição de intensidade das bandas de absorção óptica das aminas I e II, mostrado na Figura 4.39. Devido à contribuição da absorção da água e pela pequena concentração de hemoglobina utilizada (6mg/ml), a análise da amina II pode ser também influenciada pela absorção da água. Assim, os dados de FTIR não permitem avaliar as mudanças ocorridas, conforme realizado para a albumina.

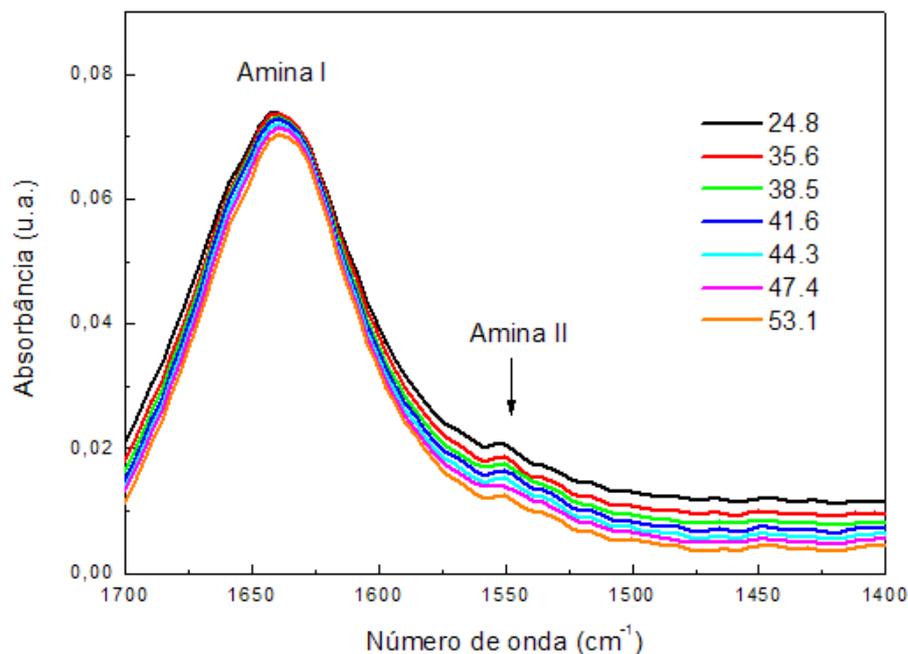


Figura 4.39 Espectros de absorvância em função da temperatura para a amostra de hemoglobina 3%.

4.1.3 Plasma e soro

4.1.3.1 Lente térmica e interferometria óptica

As amostras de plasma e soro serão analisadas conjuntamente para facilitar a comparação entre elas.

Os valores da difusividade térmica das amostras de plasma e de soro na temperatura de 36°C foram $(1,50 \pm 0,05) \times 10^{-3}$ e $(1,43 \pm 0,05) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectivamente. A Figura 4.40 mostra $D(T)$ do plasma em função da temperatura. Embora não tenha ocorrido um mínimo e um máximo evidentes nas regiões de 35 e 42 °C, respectivamente, como mostrado para a albumina, nota-se uma tendência de aumento da difusividade térmica no referido intervalo de temperatura. Este aumento também ocorreu para a albumina e por comparação, deve estar associado ao processo de desnaturação reversível previsto de ocorrer nesta região. Acima de 46°C houve a formação de agregados e o conseqüente espalhamento da luz do laser, inviabilizando a medida.

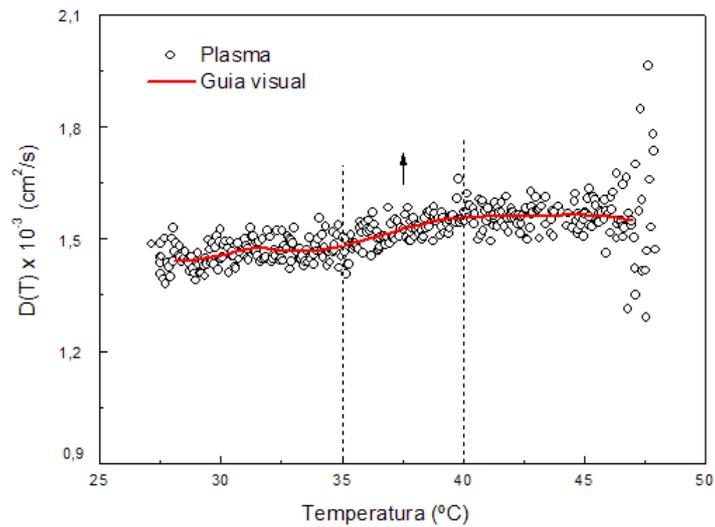


Figura 4.40 Difusividade térmica em função da temperatura da amostra de plasma. Rampa $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

O parâmetro $\theta/P(T)$, mostrado na Figura 4.41 mostra três regiões distintas em função da temperatura. Na região inicial entre 35 e 40 $^{\circ}\text{C}$, o aumento é quase linear, ao passo que entre 40 e 45 $^{\circ}\text{C}$, onde alguns domínios podem apresentar desnaturação observam-se mudança de tendência e oscilações nos valores. Após 46 $^{\circ}\text{C}$, há uma grande diminuição nos valores que ocorrem num intervalo de temperatura da ordem de 2 $^{\circ}\text{C}$. Para tentar explicar este resultado, rerepresentamos aqui a curva de $\theta/P(T)$ da albumina. Observa-se que o máximo na região de 40 $^{\circ}\text{C}$ da amostra de plasma é semelhante ao da albumina, o que indica que este pico é governado pelo desenovelamento inicial desta proteína no plasma.

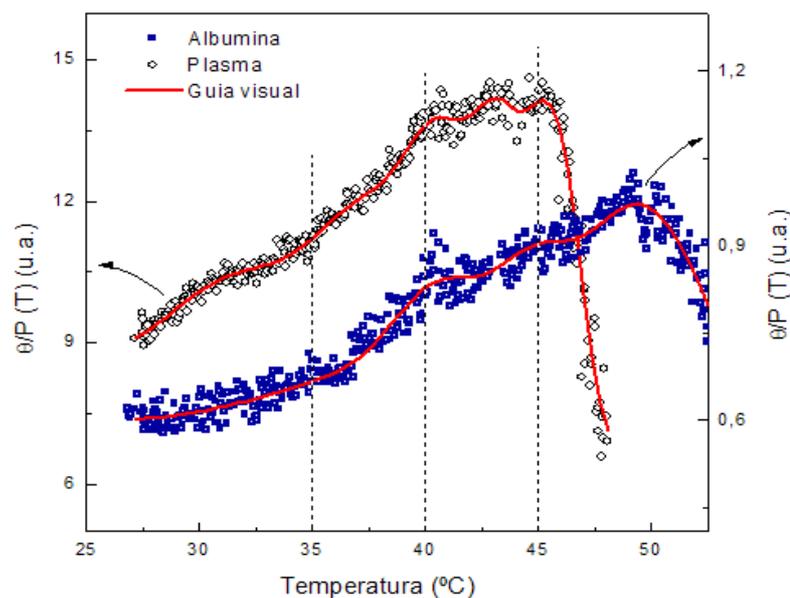


Figura 4.41 Comportamento de $\theta/P(T)$ em função da temperatura da amostra de plasma.

No entanto, para as temperaturas maiores os comportamentos são muito diferentes. É importante lembrar que para se obter o plasma é necessário utilizar anticoagulantes como o EDTA, o que implica, ao contrário do que ocorre com o soro, em se manter os fibrinogênios na amostra. Esta proteína é encontrada no sangue na concentração de 1,5 a 4,0 mg/ml [82] e é responsável pela formação do coagulo, ou seja, só está presente no plasma e não no soro. Ela é formada por domínios D e E e principalmente por estruturas secundárias α -hélice, conforme pode ser observado na Figura 4. 42. Medidas anteriores de calor específico em função da temperatura de amostras de fibrinogênio, realizadas por Procyk e colaboradores [83], conforme mostra a Figura 4.43, mostraram haver fusão desta proteína em 45,5 °C, ou seja, nas mesmas temperaturas da mudança abrupta de $\theta/P(T)$ do plasma. Esta transição em baixa temperatura tem sido relacionada à fusão dos domínios hidrofóbicos D.

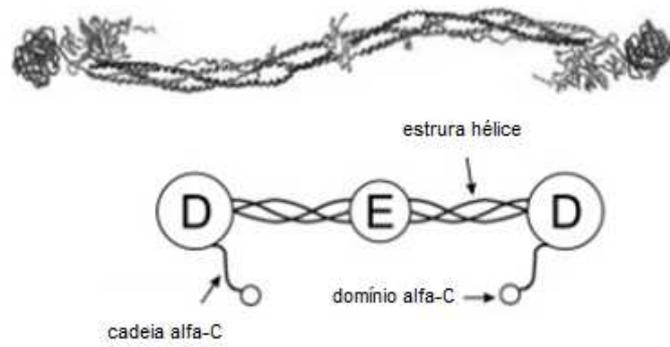


Figura 4. 42 Diagrama esquemático do fibrinogênio mostrando os domínios D e E e as estruturas secundárias [82,83].

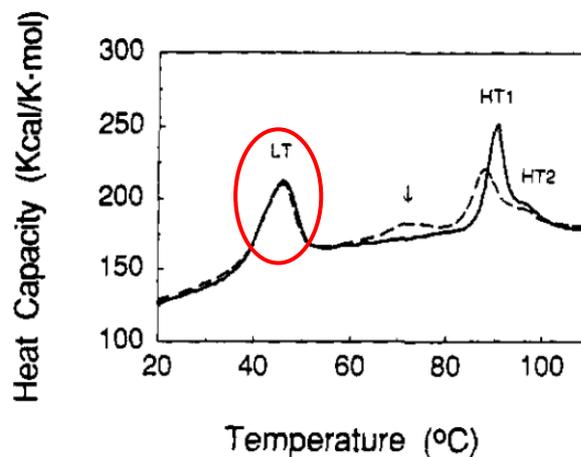


Figura 4.43 Calor específico do fibrinogênio em função da temperatura. Resultados obtidos por Procyk e colaboradores [83].

Portanto, nossos resultados sugerem fortemente que a medida de LT, via $\theta/P(T)$, detectou a fusão dos domínios D do fibrinogênio presentes no plasma. Com esta informação torna-se possível também inferir que a grande variação da difusividade térmica acima de 46°C deve ter ocorrido em razão dessa fusão. Finalmente, como os comportamentos de $D(T)$ nos diferentes intervalos de temperatura abaixo de 45°C são semelhantes para as duas amostras, a interpretação física do que deve ocorrer com $D(T)$ do plasma parece ser a mesma realizada para a albumina. Ou seja, este parâmetro é governado pelas mudanças na velocidade do som e no livre caminho médio induzidas pelo processo de desnaturação da albumina presente no plasma.

A Figura 4.44 mostra os dados de $D(T)$ da amostra de soro. Neste caso, há um evidente pico em torno de $42,6^{\circ}\text{C}$, com um aumento de $\sim 14\%$, que provavelmente deve estar associado com mudanças na conformação da proteína correspondendo a uma pré-transição do processo de desnaturação, como ocorreu para a albumina. Neste caso, diferentemente dos dados para a albumina, não há evidência da detecção de um mínimo em torno de 35°C . No entanto, o comportamento de aumentar os valores entre 35 e 42°C , como mostrado para a albumina e para o plasma, também parece ter ocorrido para esta amostra de soro. Mais uma vez, a nosso ver, $D(T)$ parece revelar a região de desenovelamento via mudanças na velocidade do som e do livre caminho médio com a temperatura.

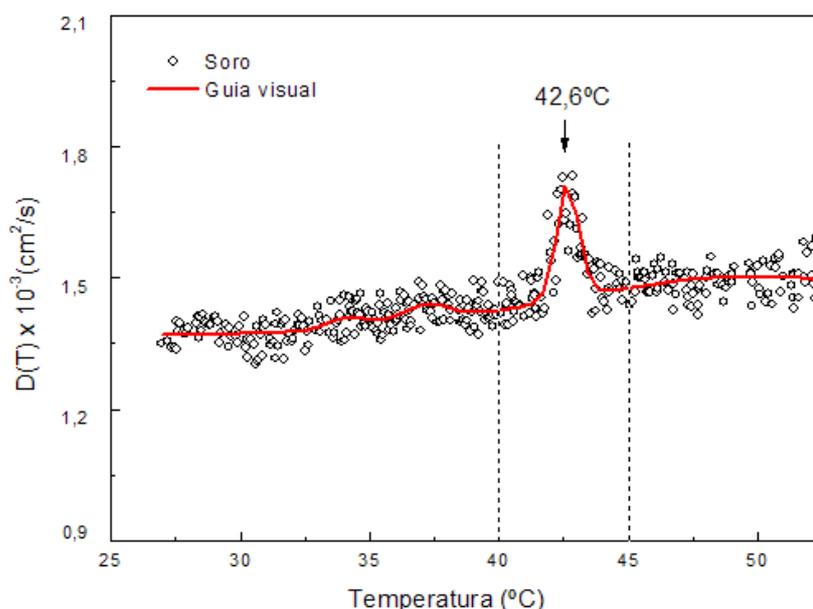


Figura 4.44 Difusividade em função da temperatura para a amostra de soro. Rampa $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Os resultados de $\theta/P(T)$ mostrados na Figura 4.45 também evidenciam três regiões com comportamentos diferentes. Até 40°C seus valores aumentam quase que linearmente, entre 40 e 45°C há um leve pico e após 45°C continua aumentando de forma praticamente linear. Reapresentamos mais uma vez na figura os resultados da albumina. Nota-se que o comportamento do soro é muito semelhante, com a diferença de que o pico está deslocado de 40 para 42,6°C. É importante mencionar que no soro não há a presença de fibrinogênio, removido durante o processo de coagulação. Assim, é provável que este pico esteja relacionado com a desnaturação da albumina. O deslocamento para 42,6°C é mais realista em termos do que é conhecido sobre a temperatura real de desnaturação das proteínas no sangue e ainda contribui para reforçar nossa hipótese de que a brusca variação em $\theta/P(T)$ em 45°C na amostra de plasma seja devida à fusão do fibrinogênio e não da albumina. Vale ressaltar que transições térmicas entre diferentes estados ocorrem em pequenos intervalos de temperaturas e são difíceis de serem detectadas. Trata-se portanto de um resultado relevante obtido com a técnica de LT, que sugere ser possível monitorar em tempo real as regiões de desnaturação térmica das proteínas.

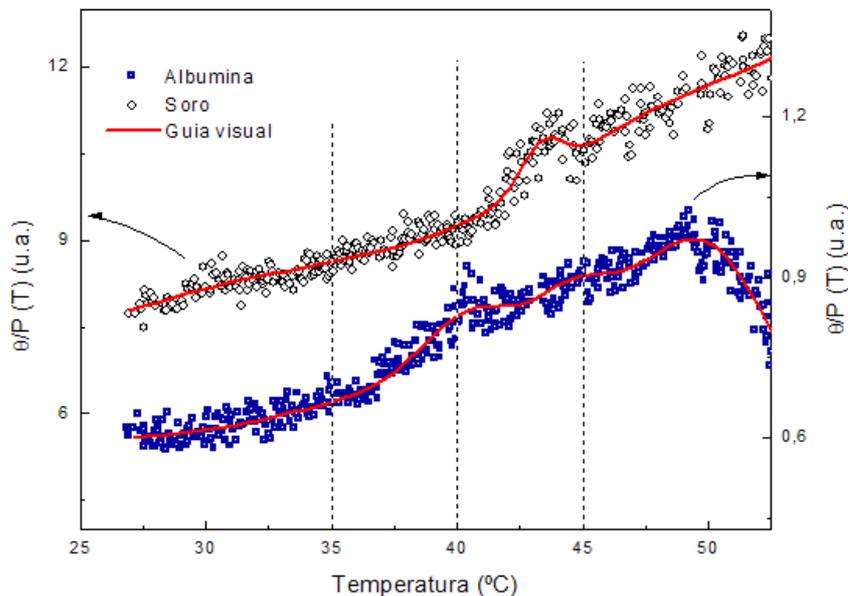


Figura 4.45 Comportamento de $\theta/P(T)$ em função da temperatura. (A) plasma e (B) soro. Taxa de aquecimento de 0,1°C/min.

Os comportamentos dos valores da densidade em função da temperatura das amostras de plasma e de soro foram semelhantes aos obtidos para as amostras de albumina e hemoglobina. Isto é, apresentam apenas uma diminuição não linear de $\rho(T)$, conforme mostra

a Figura 4.46. Ao comparar as densidades das duas amostras vemos que a do plasma é maior em todo intervalo de temperatura.

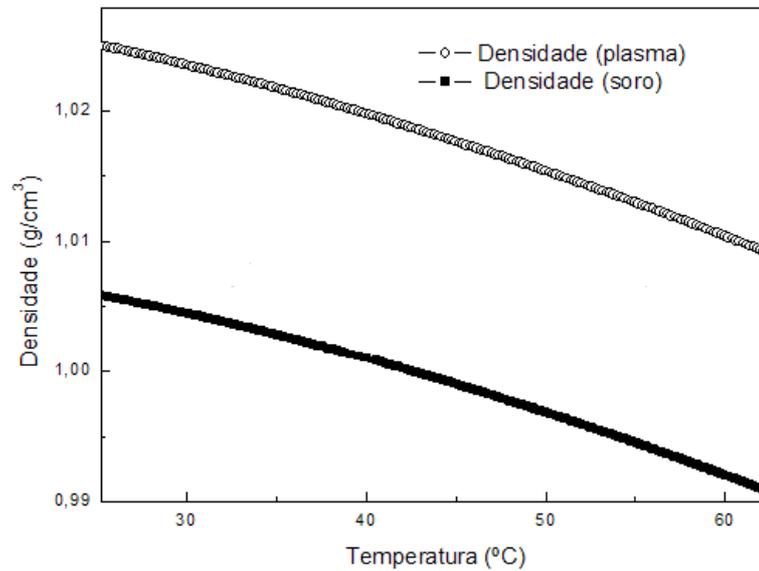


Figura 4. 46 Densidade $\rho(T)$ para as amostras de plasma e de soro. Passo 0,05.

A Figura 4.47 mostra o coeficiente de expansão térmica da amostra de plasma e soro. Nota-se que a fusão acima de 46°C foi também observada para a amostra de plasma.

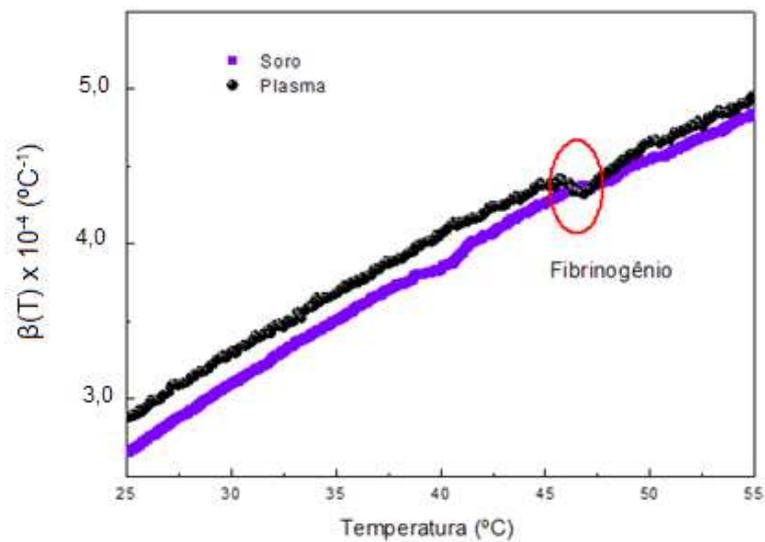


Figura 4. 47 Coeficiente de expansão térmica da amostra de plasma e do soro.

A Figura 4.48 mostra o coeficiente de absorção óptica $A(T)$ das amostras de plasma e de soro. O aumento até 45°C é da ordem de 20% mais acentuado para o soro, com inclinação de 0,05. Isto sugere que o plasma deve ser mais estável à oxidação do que o soro. A mudança brusca para o plasma acima de 45°C também parecer ser devida à fusão do fibrinogênio.

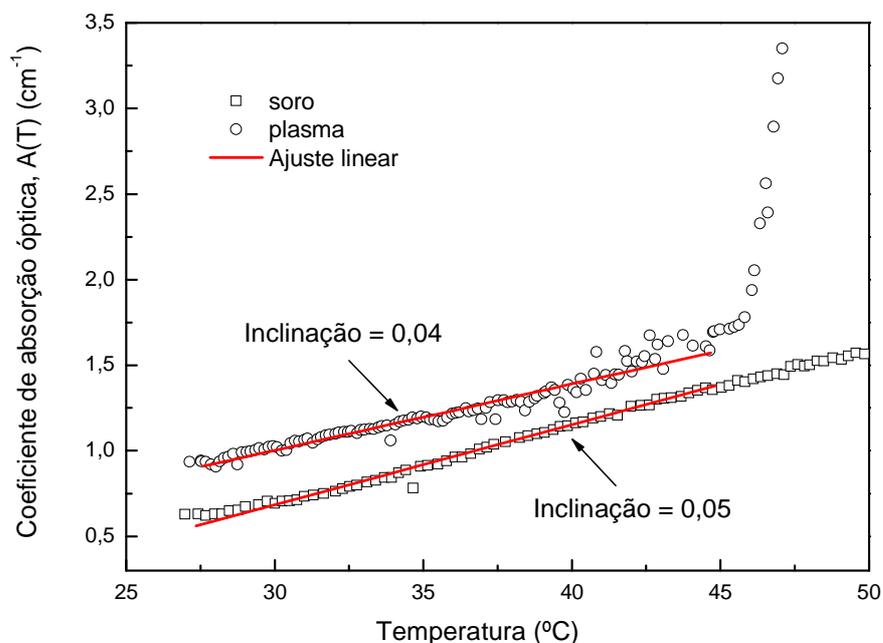


Figura 4.48 Coeficiente de absorção para as amostra de soro e de plasma. Rampa $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ com $\lambda=632,8\text{nm}$.

A Figura 4.49 mostra os resultados de $dn/dT(T)$ obtidos via interferometria óptica. Com exceção do valor absoluto, até aproximadamente 36°C as amostras de plasma e de soro apresentaram comportamentos semelhantes ao da água. Entre 36 e 41°C há mudança de tendência para ambas as amostras, com $dn/dT(T)$ diminuindo a inclinação. Nos dados da amostra de plasma pode-se observar uma variação significativa para valores menos negativos na região acima de 41°C . A partir de 44°C foi difícil realizar as medidas nas amostras de plasma, o que mais uma vez deve ser devido à fusão dos subdomínios D do fibrinogênio que impede a obtenção do padrão das franjas de interferência. No caso do soro, notam-se mudanças nesta região para valores mais negativos e com pré-transições provavelmente associadas à passagem da região de desnaturação reversível para a parcialmente irreversível em temperaturas próximas a 50°C , com a ocorrência significativa de quebra molecular.

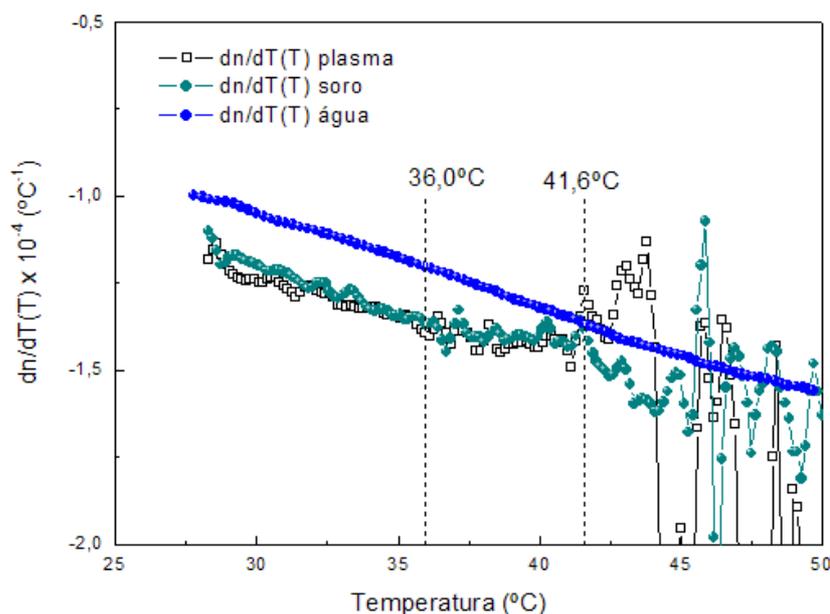


Figura 4. 49 $dn/dT(T)$ para as amostras de plasma e soro. Taxa de aquecimento de $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$.

Aqui também fizemos os cálculos de $(dn/dQ)_p(T)$ e das variações da energia livre de Gibbs e da entropia. A Figura 4.50, A e B, mostra uma diminuição linear de $(dn/dQ)_p(T)$ na região inicial de temperatura. Há uma mudança de tendência, para as duas amostras, no intervalo de desnaturação reversível entre 36 e 42 °C. O mesmo comportamento foi observado para a amostra de albumina, sugerindo assim que a interpretação desses resultados possa ser feita em termos do aumento da retenção de calor à medida que a temperatura atinge a região de desenovelamento reversível. Os dados da amostra de plasma acima de 45°C são devidos ao processo de fusão do fibrinogênio, ou seja, $(dn/dQ)_p(T)$ atinge um mínimo semelhante ao que poderia se obter em medidas de DSC quando há processo de fusão. O mínimo evidente em torno de 42,6°C para a amostra de soro, que parece também ocorrer para o plasma, mas com muito menor intensidade, pode referir-se à desnaturação inicial irreversível, como ocorre com as proteínas que apresentam cadeias peptídicas longas e se subdividem em domínios e subdomínios, os quais podem se desnaturar, como é o caso da albumina. Vale lembrar mais uma vez que as amostras de plasma e soro possuem aproximadamente 40mg/ml de albumina.

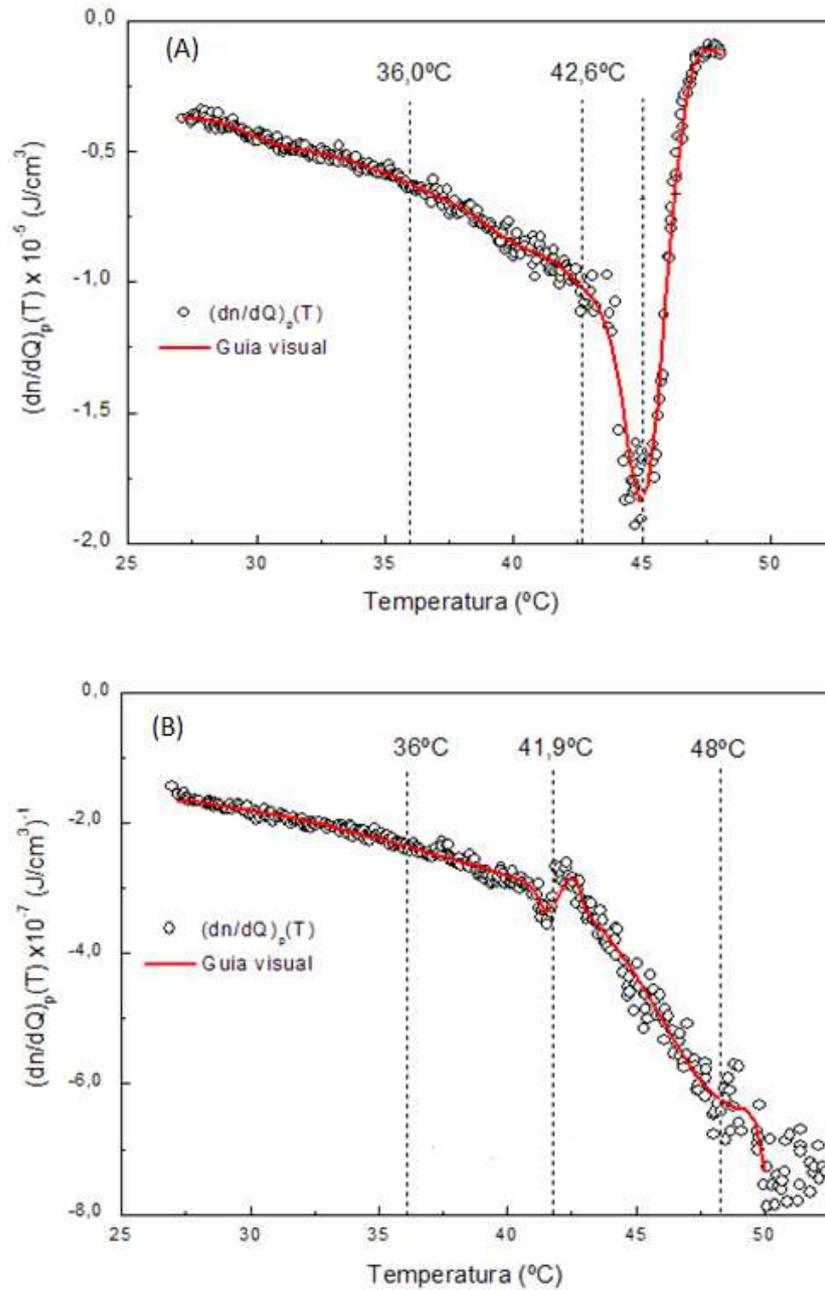


Figura 4.50. Comportamento de $(dn/dQ)_p(T)$: (A) plasma e (B) soro.

As Figuras 4.51 (A) e (B) mostram os comportamentos das variações das entropias das duas amostras, plasma e soro. Os comportamentos até 45,5°C são semelhantes aos obtidos para a albumina. No entanto, como o esperado, para o plasma, o pico na variação de entropia acima de 45,5°C é a confirmação da ocorrência de fusão na amostra, que por comparação com a albumina e o soro pode ser atribuído à fusão dos subdomínios D do fibrinogênio.

Conforme discutido anteriormente para a albumina, a entropia aumenta no sentido em que as proteínas desnaturam-se, isto é, a desorganização de sua estrutura resulta em um

aumento na entropia e assim o reenovelamento dessas moléculas para a forma nativa torna-se um processo entropicamente não favorável. Como as amostras de soro e plasma contêm aproximadamente a mesma quantidade de albumina pode-se supor que a diminuição da camada de hidratação com o aumento da temperatura observado na albumina também ocorra nas proteínas presentes no soro e no plasma. Sendo assim, o aumento na entropia também está relacionado com a camada de hidratação e as interações hidrofóbica devida à presença de radicais não polares. Assim, a interpretação do aumento da entropia no plasma e no soro pode ser a mesma que para a amostra de albumina.

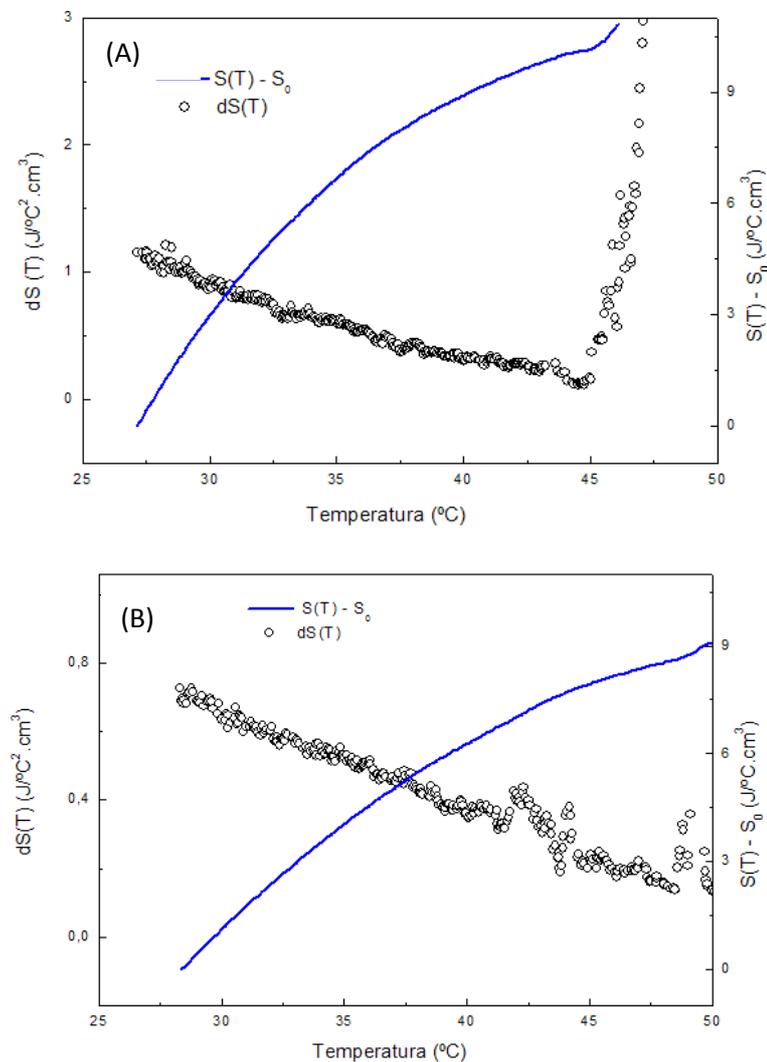


Figura 4. 51 Variação da entropia e sua respectiva derivada em função da temperatura; (A) Plasma e (B) Soro.

A Figura 4.52 mostra a variação da energia livre de Gibbs das amostras, e como discutido anteriormente para a albumina, seus valores ficam mais negativos em razão do processo de desnaturação.

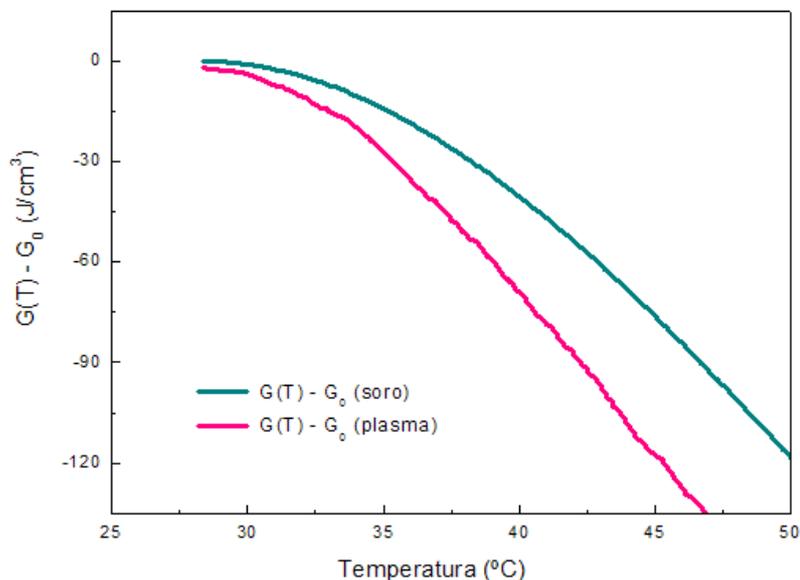


Figura 4.52 Variação da energia livre de Gibbs em função da temperatura, $G(T)$, para as amostras de soro (curva verde) e de plasma (curva rosa).

Novamente, fazendo a análise como no caso da albumina, e considerando que a maior estabilidade ocorre na conformação nativa correspondendo à menor quantidade de energia livre, para uma mudança de temperatura à pressão constante a função $G(T) - G_0$ diminui com o aumento da temperatura, pois neste caso temos $dG = -SdT$. Assim, pode-se classificar as duas situações de proteínas com menor energia livre no estado N do que em D e aquelas com maior energia livre no estado N do que em D. Do fato de a energia livre diminuir na mesma proporção do aumento da entropia, pode-se concluir que o plasma e o soro apresentam menor quantidade de energia livre quando suas proteínas estão na forma desenovelada e assim necessitam de uma energia maior para a transição entre o estado nativo e desnaturado, o qual ocorre de forma não espontânea. Desta forma, nossos resultados sugerem que nestes dois sistemas, quando o número de partículas presentes no estado [D] for maior do que no estado [N], a transição entre os dois estados pode ser espontânea sem a necessidade de calor para que as proteínas envolvidas se desnaturem. O processo de desnaturação passa então a ser cooperativo.

A Figura 4.51 mostra o cálculo do coeficiente de polarizabilidade eletrônica em função da temperatura das amostras de plasma e de soro. Os valores para a água pura também são mostrados.

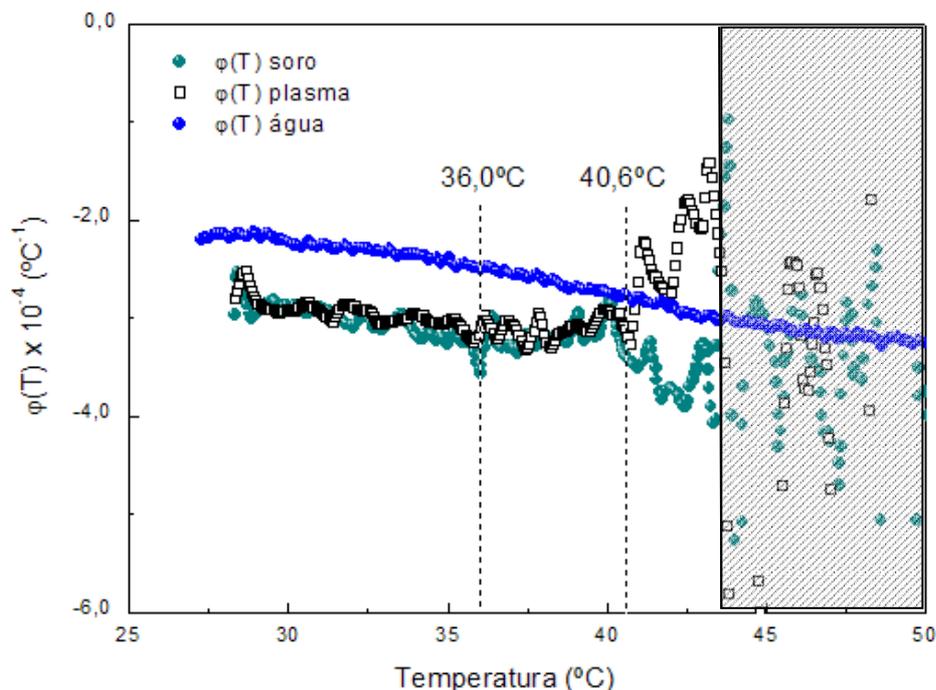


Figura 4. 53 . Comportamento de $\varphi(T)$ para as amostras de plasma, soro e da água pura.
Taxa de aquecimento de $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{Min}$.

Como discutido no caso albumina, a diminuição de $\varphi(T)$ para valores mais negativos até 41°C pode ser atribuída à diminuição das interações intramoleculares devida ao aumento da temperatura, em função do menor número de moléculas por unidade de volume e/ou da diminuição da carga efetiva dos dipolos em consequência de possível enfraquecimento das ligações químicas à medida que ocorre o desenovelamento. Assim como na albumina, parece haver mudança de tendência no intervalo de desnaturação reversível, entre 36 e 41°C .

Na região entre 41 e 43°C , $\varphi(T)$ apresenta variação abrupta tendendo a valores menos negativos para o plasma e mais negativos para o soro. Embora os resultados anteriores mostrem com maior evidência a ocorrência das modificações dos parâmetros nesta região, atribuídas essencialmente à albumina e à fusão do fibrinogênio, no caso do plasma uma análise dos aspectos microscópicos que podem estar contribuindo para estes comportamentos invertidos de $\varphi(T)$ talvez não possa ser realizada com segurança em função da complexidade estrutural das amostras. No entanto, é provável que a área de contato das moléculas de água

circundantes na proteína aumente, aumentando assim o número de dipolos induzidos, variando também tanto a distância entre as cargas como a carga efetiva dos novos dipolos. A combinação destes fatores que resulta nos dois comportamentos talvez não possa ser feita mediante os dados disponíveis. Ou seja, só se pode inferir que os dados indicam que neste intervalo restrito de temperatura deve haver um significativo rearranjo de cargas, o que é compatível com as transformações esperadas.

4.1.3.2 Resultados com a técnica PAS

Primeiramente será analisada a curva de absorção óptica em função da temperatura, obtida com uma rampa de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e no comprimento de onda de 308nm . A Figura 4.54 mostra os resultados para a amostra de plasma. Pode-se observar um aumento brusco na absorção acima de $52,7^{\circ}\text{C}$. Este aumento é observado também na região do visível, em $632,8\text{nm}$, mas na temperatura de $45,5^{\circ}\text{C}$, conforme mostrado na Figura 4.54.

Além da rampa, foram obtidos espectros de absorbância na região do UV em algumas temperaturas, conforme mostra a Figura 4.55. Na temperatura ambiente o plasma possui uma absorção maior que nas temperaturas entre 36 a 49°C , em 55°C , como já era esperado, a absorção aumenta e inclusive passa a ocorrer em comprimentos de onda maiores, alargando o pico de absorção.

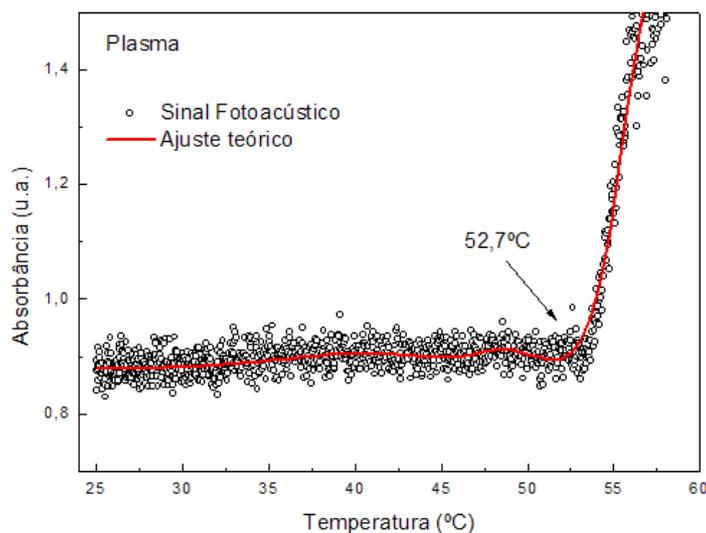


Figura 4.54 Absorbância para o comprimento de onda fixo em 308nm , rampa $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para a amostra de plasma.

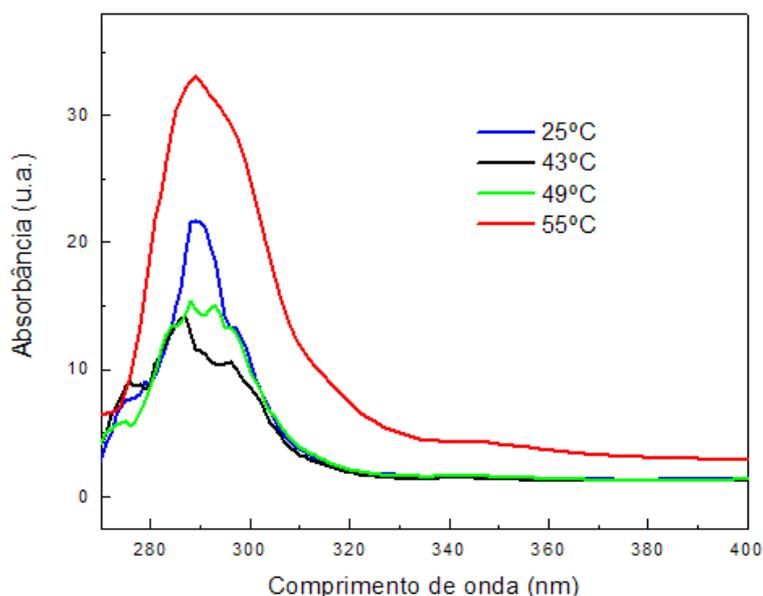


Figura 4.55 Espectros de absorbância para as temperaturas de 25, 43, 49 e 55°C. Amostra plasma.

No caso da rampa para a amostra de soro, Figura 4.56, não se observou o mesmo comportamento em relação ao plasma, havendo uma mudança significativa nos valores em torno de 44°C. Acima de 64°C há um aumento rápido com a temperatura.

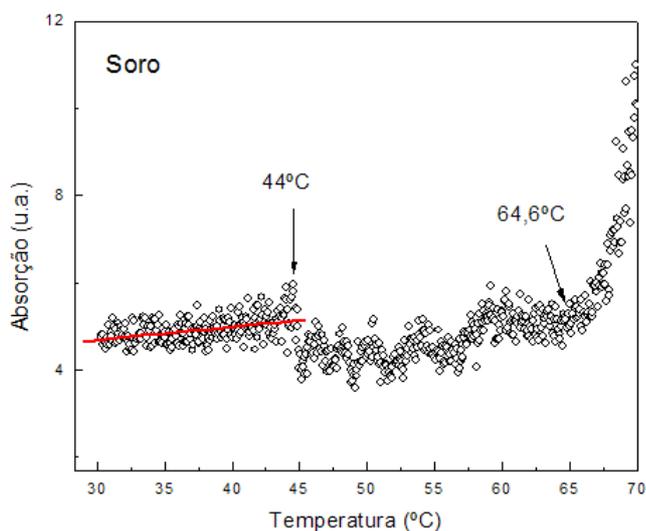


Figura 4.56 Coeficiente de absorção da amostra de soro para o comprimento de onda fixo em 308nm, rampa 0,5°C/min.

A Figura 4.57 mostra os espectros de absorção da amostra de soro para diferentes temperaturas. Como observado na amostra de plasma para a temperatura ambiente de 23°C, a absorção é maior do que para temperaturas mais elevadas. A absorbância aumenta na região

de 290 nm entre 36 e 43 °C, com crescimento da absorção na região de 300 nm para as temperaturas de 65 °C, em especial para a de 70°C. Nota-se ainda que após o resfriamento até a temperatura ambiente, a amostra medida em 43°C diminui a absorção, mostrando ser este um processo reversível.

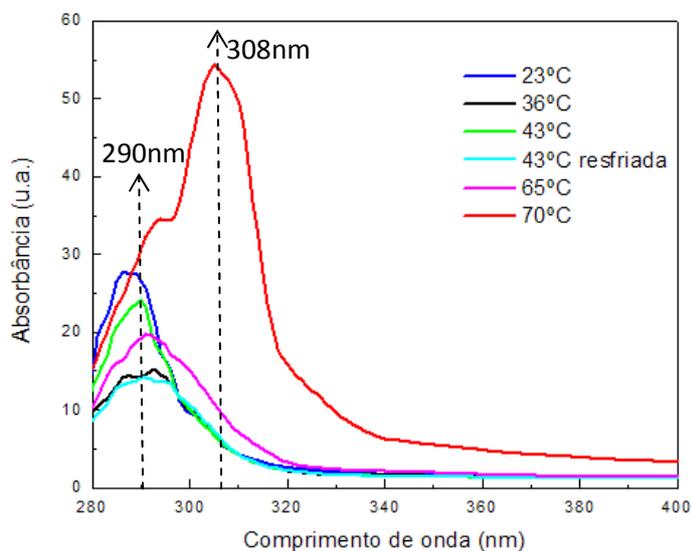


Figura 4.57 Espectros de absorção da amostra de soro para as temperaturas de 23, 36, 43, 43 resfriada, 49, 65, 70°C.

A variação da absorção em torno de 290nm para as duas amostras parece ser semelhante ao observado para a albumina, indicando que as medidas mostram, provavelmente, um aumento nas intensidades das bandas de absorção atribuídas aos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina. O deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda maiores é observado para a temperatura de 65 e 70 °C. A emissão do triptofano, conforme mencionado em estudos anteriores, diminui com o aumento da temperatura [38]. É conhecido da literatura [85] que o triptofano no estado desnaturado apresenta um deslocamento do centro da banda de emissão, quando excitado em 245nm, em relação à emissão no estado nativo. Os centros das bandas de emissão do triptofano no estado nativo e desnaturado são de 342 e 357 nm, respectivamente. Portanto, este deslocamento no pico de emissão do triptofano pode explicar o deslocamento da banda de absorção de 290 para 308 nm, observado em nossos resultados, uma vez que em 70°C provavelmente as proteínas encontram-se no estado de desnaturação total.

4.1.3.3 Resultados com a técnica FTIR

Como acabamos de ver, para a albumina a área da banda de absorção da amina II diminui com o aumento da temperatura. Isto também ocorre com as amostras de plasma e soro, sendo que ambas contêm a mesma concentração de albumina, aproximadamente 40mg/ml. Os espectros de absorbância na região IR, mais precisamente na região das aminas I, II e III no intervalo de número de onda de 1700 à 1300cm^{-1} , estão apresentados em função da temperatura na Figura 4.58. Pode-se observar a diminuição das áreas nas bandas de absorção na região das aminas. Na temperatura de 60°C há uma grande redução na absorção das aminas, em comparação com as demais temperaturas.

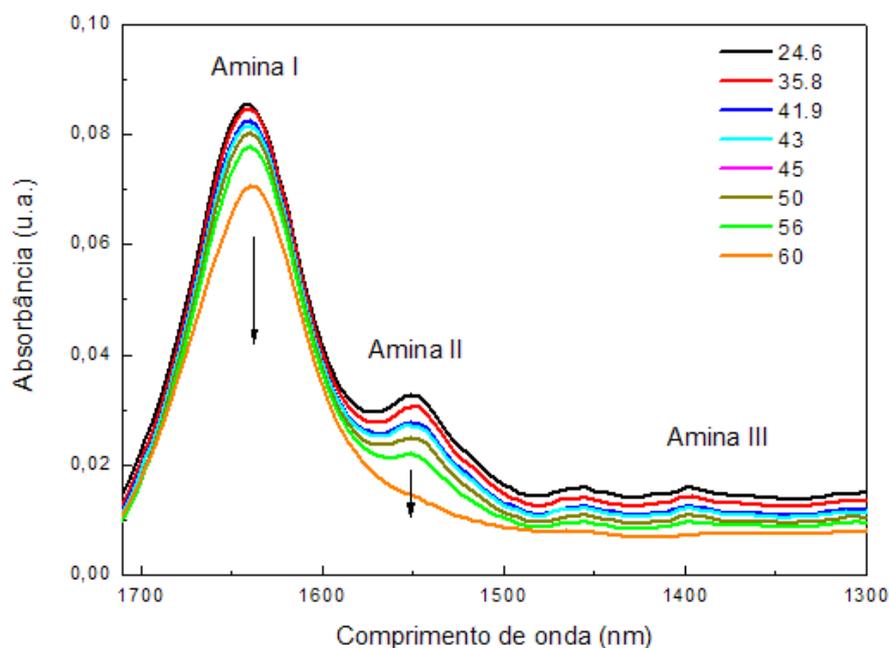


Figura 4.58 Espectros de absorção da amostra de soro mostrando as bandas das aminas I, II e III em função da temperatura

O mesmo experimento foi realizado com a amostra de plasma. Os resultados da amina II para as amostras de soro e plasma serão apresentados em conjunto. Realizando os ajustes com a função gaussiana para a amina II normalizada, observaram-se os valores das áreas e centros para cada temperatura. A Figura 4.59 apresenta as áreas calculadas para a amina II para cada temperatura medida. Os círculos em pretos representam a área da gaussiana e a

curva em vermelho o ajuste teórico realizado com a equação sigmoidal (4.6). A área da banda de absorção referente à amina II diminui para as duas amostras, mas o ajuste sigmoidal mostra temperaturas $T_C = 56,9$ e $51,2^\circ\text{C}$ para as amostras de soro e de plasma, respectivamente. Vimos nos dados experimentais de LT que a amostra de soro apresentou um pico em torno de $42,6^\circ\text{C}$, mas em temperaturas superiores até 50°C a amostra apresenta um comportamento sem transições. Já a amostra de plasma possui uma transição em $45,5^\circ\text{C}$ devida à fusão dos domínios D do fibrinogênio. Se observarmos o ajuste sigmoidal do plasma, vê-se que a partir de $42,5^\circ\text{C}$ a área da banda da amina II começa a diminuir, evidenciando a diminuição e/ou a transformação das estruturas secundárias, o que pode estar relacionado com a fusão do fibrinogênio.

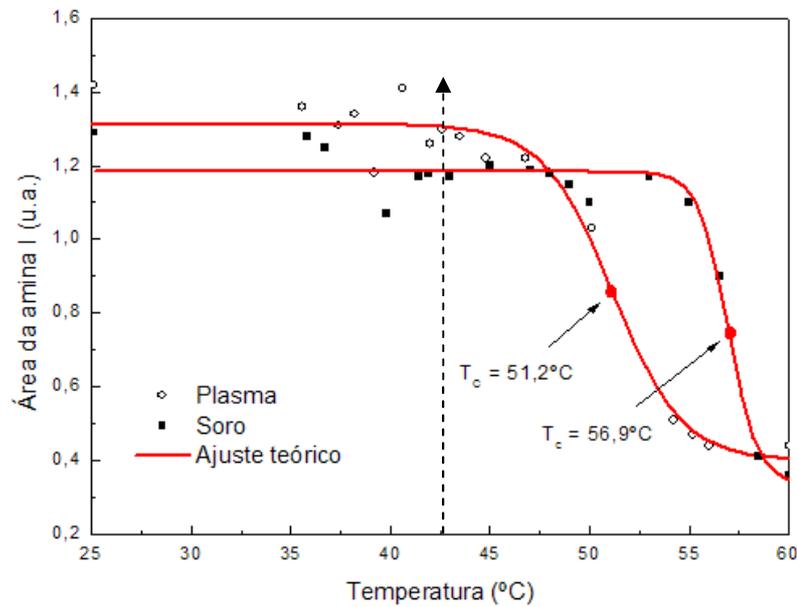


Figura 4.59 Área da amina II em função da temperatura para a amostra de soro. Pontos em pretos são as áreas das gaussianas referente à amina I e curva em vermelho ajuste teórico com uma função sigmoidal.

Da mesma forma o que observamos para a albumina, as amostras de soro e plasma também apresentaram um deslocamento dos centros das bandas das aminas II para números de onda maiores.

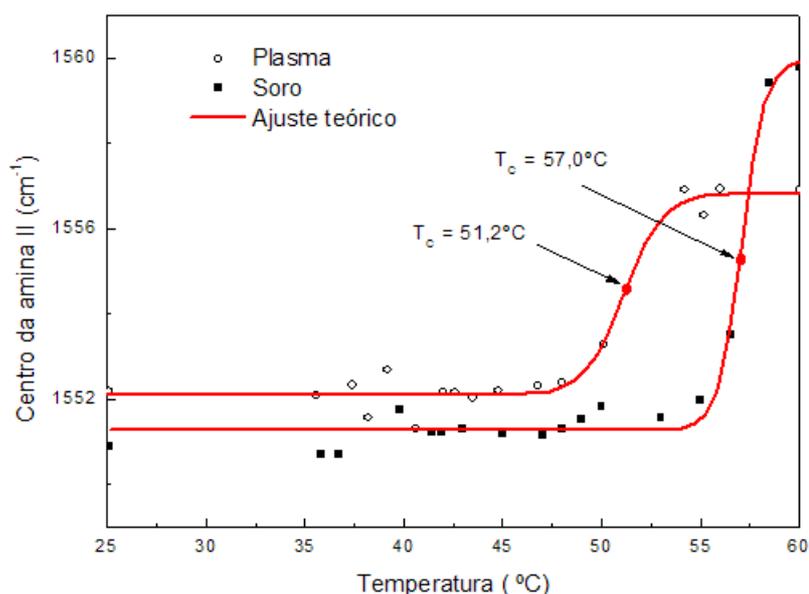


Figura 4.60 Centro de absorção da amina II em função da temperatura para as amostras de soro e de plasma. Curva em vermelho ajuste teórico com uma sigmoidal.

A partir das temperaturas T_C , as proteínas passam para o estado de desnaturação irreversível total que na literatura pode-se encontrar como temperatura de desnaturação ou fusão (*melting*). Para o soro de albumina humano este valor encontrado na literatura possui algumas variações em torno 59,6°C [33]. Como o soro e o plasma apresentam grande quantidade de albumina à temperatura de desnaturação térmica fica próxima do valor encontrado na literatura. No caso da amostra de plasma, o qual possui fibrinogênio, a temperatura T_C em torno de 51°C pode ter ocorrido em razão da contribuição da transição da albumina e do fibrinogênio.

É importante citar que o processo de desnaturação da estrutura secundária é produzido principalmente por agentes que quebram pontes de hidrogênio. Com o aumento da temperatura, a molécula proteica fica sujeita ao movimento de agitação, o que pode provocar o rompimento destas ligações e, conseqüentemente, a desnaturação térmica que consiste em uma espécie de fusão intramolecular. A transformação de estruturas secundárias organizadas em estruturas randômicas é um processo cooperativo, pois quando uma ponte de hidrogênio é rompida, fica mais fácil de romper as ligações vizinhas e assim por diante. A diminuição de estruturas regulares e formação de estruturas randômicas é característica do processo de desnaturação térmica. Isto talvez seja o que deve estar sendo observado na diminuição da área e o deslocamento do centro da banda da amina II.

Esta mudança na estrutura secundária deve estar relacionada com os comportamentos dos parâmetros termo-ópticos medidos com a LT e a interferometria óptica como $D(T)$, $\theta/P(T)$ e $dn/dT(T)$, embora estes também apresentem mudanças de comportamento em torno da zona de piroxenia, evidenciando não só possíveis mudanças na estrutura secundária, mas também possíveis perturbações nas ligações não covalentes.

4.2 Resultados do efeito fotoquímico no protetor solar

Para analisar a possível ocorrência do efeito fotoquímico no protetor solar, os espectros de absorção óptica foram realizados nos componentes utilizados em sua formulação: princípio ativo, responsável pela absorção da radiação no UV; base, responsável pela emulsão do princípio ativo; e por fim no protetor solar.

Os experimentos foram realizados com a espectroscopia fotoacústica utilizando-se a montagem modificada mostrada na Figura 3.6. O procedimento consiste em se realizar a medida com e sem a presença de um segundo feixe de luz que deve ser na forma contínua, ou seja, sem ser modulado, e incida na mesma posição onde o feixe modulado incide para gerar o sinal fotoacústico. Desta forma, o feixe contínuo tem a função de gerar reação fotoquímica, caso a amostra seja fotossensível.

A Figura 4.61 mostra os espectros de absorção óptica do princípio ativo. A curva em preto foi determinada utilizando-se somente o feixe modulado, enquanto que a azul foi medida com a incidência adicional da luz contínua proveniente do laser sintonizado em 350nm. O detalhe mostra a região em torno de 350nm, evidenciando a diferença de intensidade da absorbância quando se incidiu laser contínuo no princípio ativo. Nota-se que até a região de 400nm, a intensidade da absorção óptica diminui cerca de 3% em relação ao espectro obtido sem a presença do feixe contínuo. Ao contrário, nos comprimentos de onda acima de 400nm, o sinal fotoacústico aumenta com a incidência do laser.

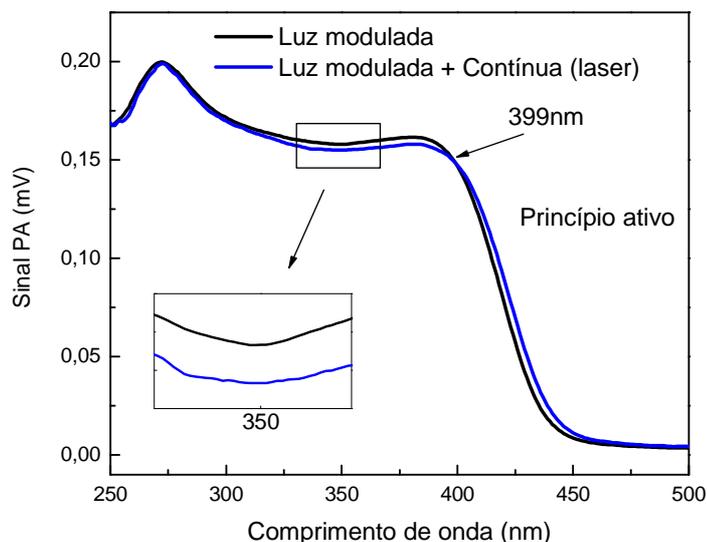


Figura 4.61 Espectros do princípio ativo: curvas em preto e em azul, espectros com e sem a incidência do feixe contínuo, em 350nm.

Após incidência da radiação eletromagnética a da energia absorvida pode ser convertida em calor, luminescência ou reação fotoquímica. O sinal fotoacústico é induzido via conversão da energia absorvida para calor, com conseqüente aumento de temperatura da amostra. No experimento, somente a luz modulada pode gerar sinal fotoacústico porque a forma de detecção é a partir da medida da componente AC do sinal, o que é feito com a utilização de um sincronizador síncrono, o *Lock-in*. Portanto, a mudança na amplitude do sinal com a incidência da luz contínua é uma indicação da ocorrência de efeito fotoquímico e/ou variação da luminescência.

Um segundo experimento foi realizado nesta amostra, mantendo-se o comprimento de onda do feixe modulado fixo, em 425nm, monitorando-se o sinal em função do tempo, sendo que: nos primeiros 400s usou-se apenas a luz modulada, de 400 a 800s a luz modulada mais o feixe contínuo em 350nm, e de 800 a 1200s novamente somente a luz modulada. A Figura 4.62 mostra os resultados. Confirma-se assim que o feixe contínuo faz com que o sinal aumente na região de 425nm.

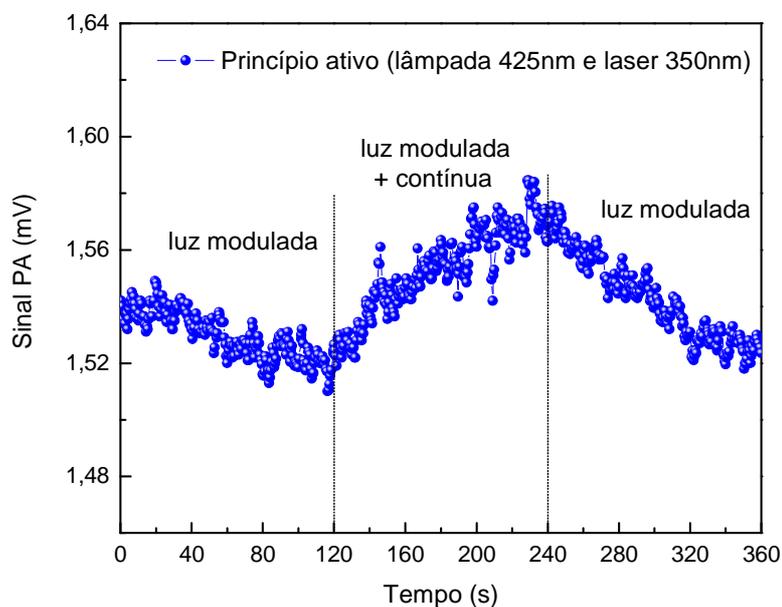


Figura 4.62 Sinal PA do princípio ativo obtido em três etapas: 1º luz da lâmpada em 425nm modulada (0 a 120s), 2º luz da lâmpada em 425nm modulada e feixe laser contínuo em 350nm (120 a 240s) e 3º novamente luz da lâmpada em 425nm modulada (240 a 360s).

Dos fenômenos que podem interferir na intensidade do sinal fotoacústico, a luminescência se ocorrer, só contribuiria para aumentar a amplitude do sinal, já que a luz contínua pode reduzir a luminescência da amostra. Portanto, este resultado sugere que o aumento do sinal no princípio ativo parece ser uma evidência da geração de reação fotoquímica na amostra. São substâncias com altos valores para o coeficiente de absorção óptica na região do UV, o que pode sugerir que estes processos podem envolver a geração de radicais livres, uma vez que os mecanismos de absorção nesta região espectral em geral são via processos de transferência de carga. Em outras palavras, parte da energia do feixe modulado é utilizada para induzir reação fotoquímica na amostra.

Repetindo-se o procedimento para a base, vê-se na Figura 4. 63 que a inversão do sinal de diminuir para aumentar com a incidência do feixe contínuo, ocorreu na região de 288nm, indicando que a base parece não ser fotosensível.

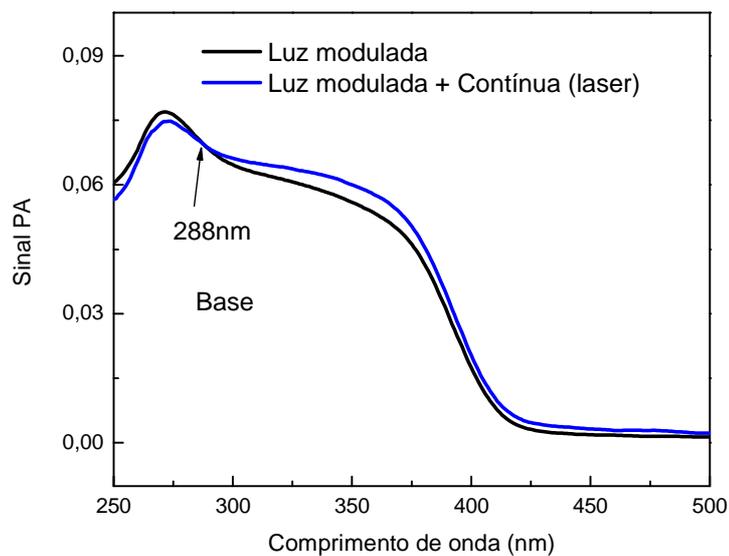


Figura 4. 63 Espectros da base: curva azul somente lâmpada e curva preta lâmpada mais laser em 350nm.

A mistura do princípio ativo com a base resulta no filtro solar. A Figura 4.64 mostra os espectros obtidos. Pode-se observar na curva em azul, espectro com a luz modulada mais o feixe laser contínuo, um aumento do sinal em quase toda a região espectral.

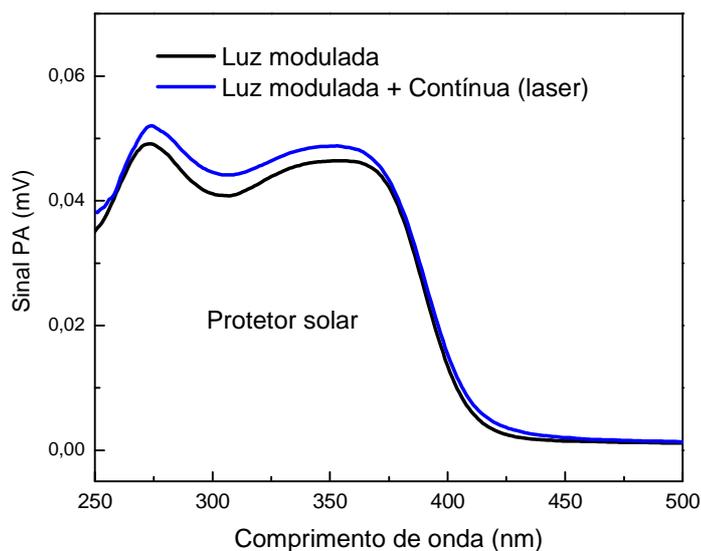


Figura 4. 64 Espectros do protetor solar: curvas em preto e em azul, com e sem o feixe contínuo, respectivamente.

A Figura 4.65 mostra os resultados em função do tempo, com os feixes modulado e contínuo sintonizados em 350nm. Nota-se que o aumento do sinal é significativo com a presença do feixe contínuo.

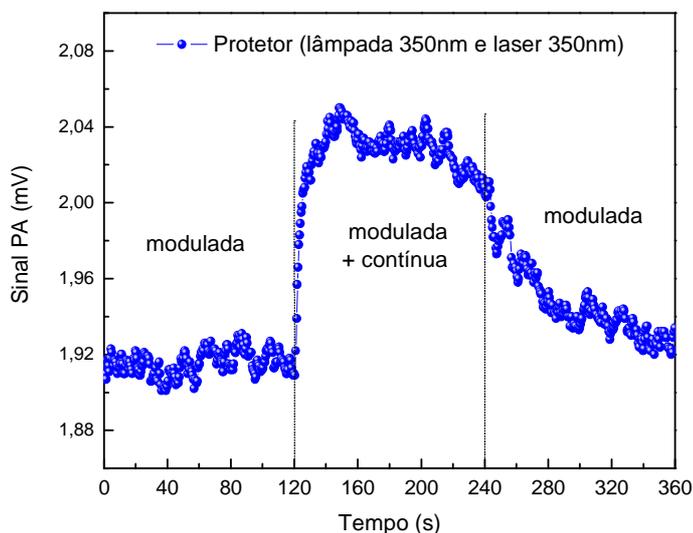


Figura 4.65 Sinal PA do protetor solar obtido em três etapas: 1º feixe modulado em 350nm (0 a 120s), 2º feixe modulado em 350nm + laser contínuo em 350nm (120 a 240s) e 3º novamente feixe modulado em 350nm (240 a 360s).

Repetimos estes experimentos em outras formulações, e os resultados foram semelhantes, o que sugere que o procedimento de se realizar a medida com e sem a presença do feixe contínuo e nos comprimentos de onda nas diferentes regiões espectrais de absorção da amostra, pode ser um método para se avaliar a fotoestabilidade das formulações utilizadas para proteção solar, contribuindo assim para o aumento da segurança destes produtos de aplicação tópica. Isto porque, como mencionado anteriormente, estas formulações sempre permeiam através da pele, e assim, se forem fotossensíveis poderão provocar danos na estrutura interna da epiderme e até na derme.

Conclusões

Em conclusão, no estudo do processo de desnaturação térmica das proteínas, as amostras de albumina, hemoglobina, soro e plasma apresentaram mudanças nas propriedades térmicas e ópticas em função da temperatura. Os parâmetros medidos evidenciaram a ocorrência de desnaturação e/ou desenovelamento dessas proteínas. A difusividade térmica em função da temperatura apresentou comportamentos diferentes para cada região do processo de desnaturação, que correlacionados com parâmetros como $(ds/dQ)_p$, dn/dT e medidas de DSC/TG permitiram uma avaliação das mudanças conformacionais das amostras. A fusão do subdomínio D do fibrinogênio do plasma foi detectada na medida de lente térmica, evidenciando o potencial deste método para se medir transformações induzidas pela temperatura, em especial para amostras na fase líquida.

Nas medidas de FTIR observamos diminuição da área da banda de absorção óptica da amina II sugerindo ter havido diminuição e/ou transformação das estruturas secundárias, permitindo assim identificar as temperaturas de desnaturação térmica (T_C) irreversível, as quais ocorreram em temperaturas próximas daquelas relatadas na literatura.

Os parâmetros medidos foram utilizados para calcular a variação com a temperatura da entropia e da energia livre de Gibbs. Os comportamentos destas duas quantidades físicas com o aquecimento das amostras foram correlacionados com os processos de desenovelamento das proteínas estudadas.

O coeficiente de polarizabilidade eletrônica medido com a interferometria óptica permitiu realizar uma análise microscópica das possíveis mudanças nas amostras.

Com relação ao experimento para a detecção da reação fotoquímica os resultados das medidas com a fotoacústica com um arranjo experimental modificado sugerem que o método proposto pode ser empregado para avaliar a fotoestabilidade da formulação do protetor solar.

Finalmente, este trabalho demonstrou que a espectroscopia de lente térmica, a espectroscopia fotoacústica e a interferometria óptica são novas ferramentas para o estudo dos processos de desnaturação de proteínas, indicando que o procedimento adotado poderá ser

estendido para a avaliação de outras proteínas animais e vegetais, com o intuito de se correlacionar a estabilidade térmica de cada uma delas com suas estruturas conformacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Artmann GM, Canaves LBJM, Temiz-Artmann A, Schmid-Schönbein GW, Maggakis-Kelemen SCC. Circular dichroism spectra of human hemoglobin reveal a reversible structural transition at body temperature. *Eur Biophys J*, 33, 490-496, (2004).
- [2] Swynghedauw B. Medical consequences of global warming. *Presse Medicale*, vol. 38, 4, 551-561, (2009).
- [3] Keim AS, Guisto JÁ, Sullivan JB. Environmental thermal stress. *Jr Review Articles AAEM Ann Agric Environ Med*. 9, 1–15, (2002).
- [4] Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Paris, (2007).
- [5] Wanga S, Linb SY, Lib MJ, Weib, YS e Hsieh, TF. Temperature effect on the structural stability, similarity, and reversibility of human serum albumin in different states. *Biophysical Chemistry* 114 205– 212 (2005).
- [6] Lehninger AL. *Princípios de bioquímica*. Editora Sarvier, 4ª Edição. (2006).
- [7] Henderson RA & Brewer WG. *Pele e Subcutâneo*, p. 2447-2462. In: Slatter D. 2a ed. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. Vol. 2, São Paulo, (1998).
- [8] Macedo MF, Bezerra MB, Vicente WRR. Uso da hipertermoquimioterapia em tumores intraperitoneais e sacomas de cães: revesão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.2, p.28-31, (2008).
- [9] Wang XY, Ostberg JR e Repasky EA. Effect of Fever-Like Whole-Body Hyperthermia on Lymphocyte Spectrin Distribution, Protein Kinase C Activity, and Uropod Formation. *The Journal of Immunology*, 162, 3378–3387, (1999).
- [10] Lima SM, Catunda T, Lebullenger R, Hernandez AC, Baesso ML, Bento AC, Miranda LCM. Temperature dependence of thermo-optical properties of fluoride glasses determined by thermal lens spectroscopy. *Physical Review B*, Vol. 60, 22, 15173- 15178, (1999).
- [11] Pedreira PRB. Desenvolvimento de um protótipo de lente térmica resolvido tempo para estudos de líquidos em condições transitórias em tempo real. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, (2005).
- [12] Rosencwaig A. *Photoacoustic and photoacoustic spectroscopy*. University of California. 57 (1980).

- [13] Giese K, Nicolaus A, Sennhenn B, et al. Photoacoustic in vivo study of the penetration of human skin. *Canadian Journal of Physics*, Vol. 64, 9, 1139-1141, (1986).
- [14] Pedrochi F. Aplicação de técnicas fototérmicas no estudo de biomateriais. Tese de doutorado apresentada na Universidade Estadual de Maringá. (2008).
- [15] Philippsen GS. Métodos fototérmicos aplicados ao estudo da penetração e da eficiência no processo de pigmentação de medicamentos para o tratamento do vitiligo. Dissertação de mestrado apresentada pela Universidade Estadual de Maringá (2006).
- [16] Sehn E, Silva KC, Retuci VS, Medina AN, Baesso ML. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into skin in vivo: A statistical treatment. *Review of Scientific Instruments*, 74, 758-760, (2003).
- [17] Sehn E, Hernandez L, Franco SL, Gonçalves CCM, Baesso ML. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Analytica Chimica Acta*. 635, 115-120, (2009).
- [18] Sehn E. Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação da propagação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos. Univ. Est. Maringá. (2006).
- [19] Marquezini MV. Aplicação da espectroscopia fotoacústica ao estudo "in vivo" da toxicidade metálica em plantas. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física "Gleb Wataghin" UNICAMP, (1990).
- [20] Mesquita RC, Mansanares AM, da Silva EC, Barja PR, Miranda LCM e Vargas H. Open photoacoustic cell: Applications in plant photosynthesis studies. *Inst. Sc. & Tec.* Vol. 34, 1-2, 33-58, (2006).
- [21] www.enq.ufsc.br/.../const_microorg/mol_img40.(30/08/09)
- [22] Lehninger AL. *Bioquímica*. Editora Edgard Blücher, Volume 1, Primeira Edição, (1976)
- [23] Stryer L. *Bioquímica*. Editora Guanabara Koogan S.A. 4ª edição, (1996).
- [24] Atkins PW, Paula J. *Físico-Química*. Editora LTC, Vol. 2, Rio de Janeiro, 7ª Edição (2004).
- [25] Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Fundamentos da biologia celular*. 2ª edição, (2006).
- [26] <http://fmc.unizar.es/people/fff/Jsancho1/helice.jpg>. 09/03/09.
- [27] Griffiths M. General characteristics of the circulatory system. *Introduction to human physiology*. 2nd Ed. New York, Macmillan Publishing Co., Inc., 108-116, (1981).

- [28] Dong L, Chen X e Hu Z. Study of the effect of cal-red on the secondary structure of human serum albumin by spectroscopic techniques. *Journal of Molecular Structure*. V. 846 (2007).
- [29] Sinha SS, Mitra RK, e Pal SK. Temperature-Dependent Simultaneous Ligand Binding in Human Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B* , 112, 4884-4891 (2008).
- [30] Philippe Rondeau A, Sergio Armenta A, Henri Caillens C, Serge Chesne A, Emmanuel Bourdon A. Assessment of temperature effects on b-aggregation of native and glycated albumin by FTIR spectroscopy and PAGE: Relations between structural changes and antioxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 141 – 150 460 (2007).
- [31] Dobson CM, Karplus M. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Current Opinion in structural biology*. 9, 92-101, (1999)
- [32] Privalov L. Thermodynamics of protein folding. *J. Chem. Thermodynamics*, 29, 447-474 (1997).
- [33] Pico GA. Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* 20,63-73, (1997).
- [34] Tanford C. *J. Am. Chem. Soc.* 1962, 84, 4240. Em: Fonseca LC, Corrêa NCR, Garrote-Filho MS, Cunha CC, Penha-Silva N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. *Quím. Nova* v.29 n.3 São Paulo, (2006).
- [35] Fonseca LC, Corrêa NCR, Garrote-Filho MS, Cunha CC, Penha-Silva N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. *Quím. Nova* v.29 n.3 São Paulo, (2006).
- [36] Kauzmann W. Some factors in the interpretation of protein denaturation *Adv. Prot. Chem.* , 14, 1-63, (1959).
- [37] Galisteo M, Mateo P e Sanchez-Ruiz J. Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 30 (1991).
- [38] Flora K, Brennan JD, Baker GA, Doody M A e Bright FV. Unfolding of acrylodan-labeled human serum albumin probed by steady-state and time-resolved fluorescence methods. *Biophys. J.* vol. 75, 1084-1086, (1998).
- [39] Maiti TK, Ghosh KS, Debnath J, Dasgupta S. Binding of all-trans retinoic acid to human serum albumin: Fluorescence, FT-IR and circular dichroism studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.38, 197–202, (2006).
- [40] Rezaei-Tavirani M, Moghaddamnia SH, Ranjbar B, Amani M e Marashi SA. Conformational Study of Human Serum Albumin in Pre-denaturation Temperatures by Differential Scanning Calorimetry, Circular Dichroism and UV Spectroscopy. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 39 (2006).

- [41] Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Editora Gaunabara Koogan, 8ª edição, (1995).
- [42] <http://www.cancer.umn.edu/cancerinfo/NCI/Media/CDR0000579033.jpg> (09/07/2009).
- [43] Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European J. Pharmaceutical Science*, vol.4, 101-114, (2001).
- [44] Blank IH. *Cutaneous Barriers*. *J. Invest. Dermatol.* v.4. (1965).
- [45] Truite CVR, Philippsen GS, Ueda-Nakamura T, et al. Percutaneous penetration, melanin activation and toxicity evaluation of a phytotherapeutic formulation for vitiligo therapeutic *Photochemistry and photobiology*, Vol 83, 1529-1536 (2007).
- [46] Pedrochi F, Sehn E, Medina AN, Bento AC, Baesso ML, Gesztesi JL. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin in vivo. *J. Phys. IV France* 125, 757-759, (2005).
- [47] Steiner D. *A cosmeceutica e a dermatologia*. *Cosmetics & Toiletries* (edição em português), V.7 (1996).
- [48] Chew S, de Leo AC, Harber HC. Longwave ultraviolet radiation (uva)-induced alteration of epidermal dna synthesis. vol. 47, 3, 383-389, (1988).
- [49] Bialkowski, SE, *Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical analysis*, John Wiley, New York, (1996).
- [50] Almond DP, Patel, PM. *Photothermal Science and Techniques*, Chapman & Hall, London, (1996).
- [51] Ingle JD, Crouch SR. *Spectrochemical Analysis*. Prentice Hall. New Jersey, (1988).
- [52] Gordon JP, Leite RCC, Moore RS, Porto SPS e Whinnery JR. *Bull. Am. Phys. Soc.* 9, 501 (1964).
- [53] Hu C, Whinnery JR. New thermo-optical measurement method and a comparison with other methods. *Applied optics*, vol. 12, 1, 72-79 (1973).
- [54] Shen J, Lowe RD, Snook RD. A model for cw laser induced mode-mismatched dual-beam thermal lens spectroscopy. *Chem Phys*, (1992).
- [55] Shen, J. Theoretical modeling of photothermal lens spectroscopy and its experimental applications. Tese de doutorado apresentada à Universidade de Manchester Inglaterra, (1993).
- [56] Sato F. Estudo da bebida do café utilizando a espectroscopia de lente térmica e a interferometria óptica Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Maringá. (2005).

- [57] Sakai O. Estudo das Propriedades Termo-Ópticas de materiais vítreos e monocristalinos em função da temperatura. Tese de doutorado apresentada a Universidade Estadual de Maringá, (2008).
- [58] Bell, AG. Upon the production of sound by radiant energy. *Am. J. Sci.* 20, 305 (1880).
- [59] Tyndall J. Action of an intermittent beam of radiant light upon gaseous matter. *Proc., R. Soc. London* 31, 307 (1881).
- [60] Rontgen, WC. *Philos. Mag.* 11, 308 (1881).
- [61] Bell, AG. *Philos Mag.* 11, 308 (1881).
- [62] Rayleigh, L. *Nature* 23, 274 (1881).
- [63] Preece WH. *Proc. R. Soc. London* 31, 506 (1881).
- [64] Mercandier, ME e Hebd, CR. *Serv. Acad. Science.* 92, 409 (1881).
- [65] Pfund, AH *Science* 90, 326, (1939).
- [66] Rosencwaig A e Gersho A. Theory of effect with solids. *J Appl. Phys.* 47, 64 (1976).
- [67] Nuglisch LER, Dias DT, Sehn E, Bento AC, Baesso ML, Santos STS, Fushimi MY. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail. *J. Phys. IV France* 125, 631-633, (2005).
- [68] Astrath, NGC. Determinação e análise de propriedades térmicas e ópticas de sólidos não cristalinos em altas e baixas temperaturas. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, (2006).
- [69] Ashcroft, NW e Mermin, ND. *Solid State Physics*, (Saunders College Publishing Philadelphia, 1976).
- [70] Mitra RK, Sinha SS, e Pal, SK; Hydration in Protein Folding: Thermal Unfolding/Refolding of Human Serum Albumin. *Langmuir*, 23, 10224-10229, (2007).
- [71] Farruggia B; Pico GA. Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin. *Int. J. Bio. Mac.*, 26, 317-323, (1999).
- [72] Rongxin S, Wei Q, Zhimin H, Yubin Z, Fengmin J. Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process. *Food Hydrocolloids*, 22, 995-1005, (2008).
- [73] Warren Gallagher. FTIR Analysis of Protein Structure. http://www.chem.uwec.edu/Chem455_S05/Pages/Manuals/FTIR_of_proteins.pdf (12/08/09).
- [74] Dong, A. Huang, P. e Caughey S., Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*, 29, (1990).

- [75] Oberg KA e Fink AL. A New Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy Method for the Study of Proteins in Solution. *Analytical biochemistry*, 256, 92–106 (1998).
- [76] Wang SL, et al. Temperature effect on the structural stability, similarity, and reversibility of human serum albumin in different states. *Biophysical Chemistry* 114 (2005).
- [77] Zerlin KF, Kasischke N, Digel I, Maggakis-Kelemen C, Temiz Artmann A, Porst D, Kayser P, Peter Linder P, Artmann GM. Structural transition temperature of hemoglobins correlates with species' body temperature. *Eur Biophys J* 37:1–10, (2007).
- [78] Dong L, Chen X e Hu Z. Study of the effect of cla-red on the secondary structure of human serum albumin by spectroscopic techniques. *J Mol Structure*, 846, (2007).
- [79] Saguer E, Alvarez P, Sedman J, Ramaswamy HS e Ismail AA. Heat-induced gel formation of plasma proteins: New insights by FTIR 2D correlation spectroscopy. *Food Hydrocolloids* 23, 874–879, (2009).
- [80] Digel I, Maggakis-Kelemen C, Zerlin KF, Linder P, Kasischke N, Kayser P, Porst D, Temiz Artmann A, Artmann GM. Body temperature-related structural transition of monotremal and human hemoglobin. *Biophys J* 91:1–8, (2006).
- [81] Brown JH, Volkmann N, Jun G, Henschen-Edman AH, Cohen C. The crystal structure of modified bovine fibrinogen *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97,85-90, (2000).
- [82] Desroches, MJ, Chaudhary, N, e Omanovic, S. PM-IRRAS Investigation of the Interaction of Serum Albumin and Fibrinogen with a Biomedical-Grade Stainless Steel 316LVM Surface. *Biomacromolecules*, 8, 2836-2844, (2007).
- [83] Procyk, R; Medved, L; Engelke, KJ; Kudryk, B e Blombackt, B.L. Nonclottable Fibrin Obtained from Partially Reduced Fibrinogen: Characterization and Tissue Plasminogen Activator Stimulation. *Biochemistry*, 31, 2273-2278, (1992).
- [84] Miyake-Stoner SJ, Miller AM, Hammill JT, Peeler JC, Hess KR, Mehl RA e Brewer SH; Probing Protein Folding Using Site-Specifically Encoded Unnatural Amino Acids as FRET Donors with Tryptophan. *Biochemistry*, 48, 5953–5962, (2009).