

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA(RENORBIO)
DISCIPLINA – BIOINFORMÁTICA

Infravermelho

DISCIPLINA – BIOINFORMÁTICA

ALUNAS: ANDRÉIA FONSECA

SILVANIA LANES

A solid orange horizontal bar spanning the width of the slide at the bottom.



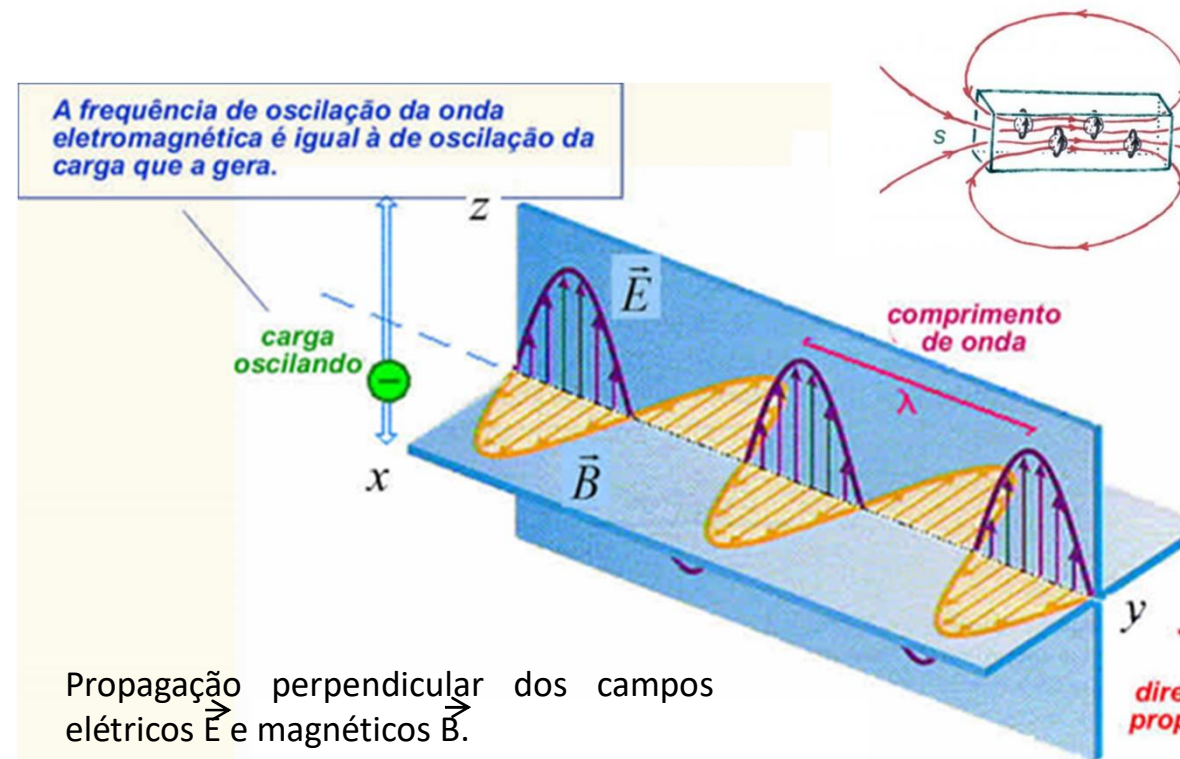
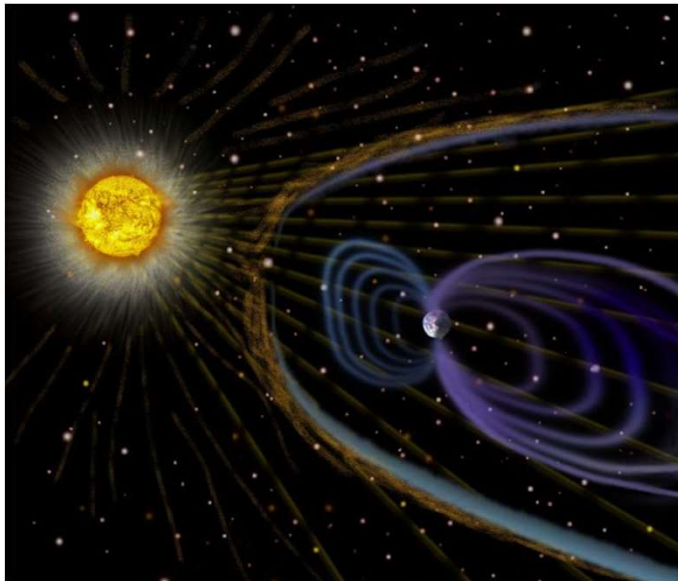
Introdução

Ondas Eletromagnéticas: Transportam simultaneamente energia elétrica e energia magnética.

Propagam-se no vácuo.

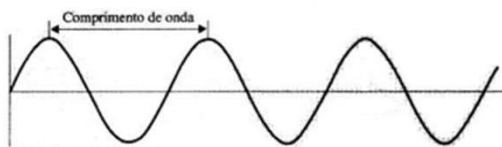
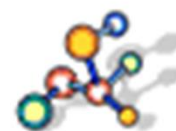
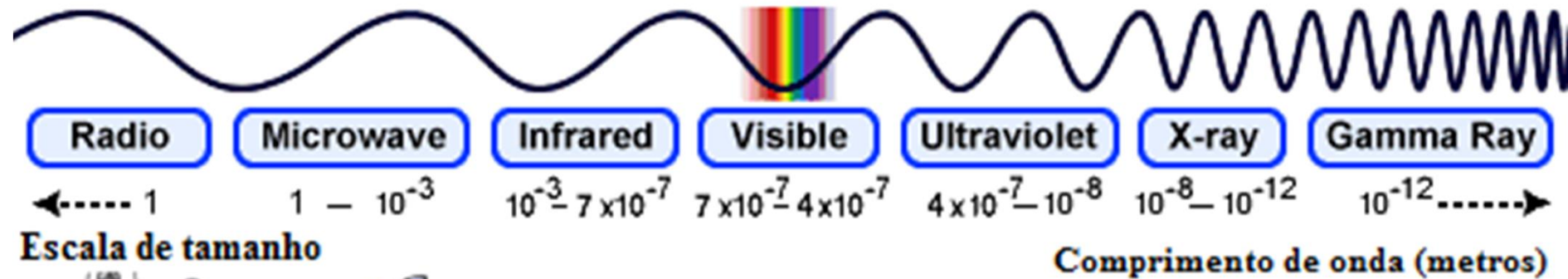
Velocidade: 300.000 Km/s

Contribuição de James Maxwell.



Introdução

O espectro eletromagnético é composto por diferentes tipos de radiações:

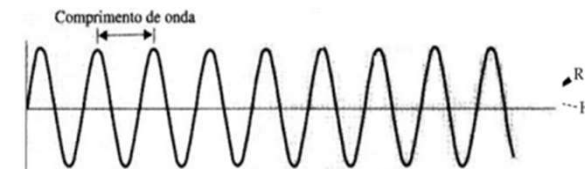


$\downarrow E \quad \uparrow \lambda$

$$C = \lambda \cdot f$$

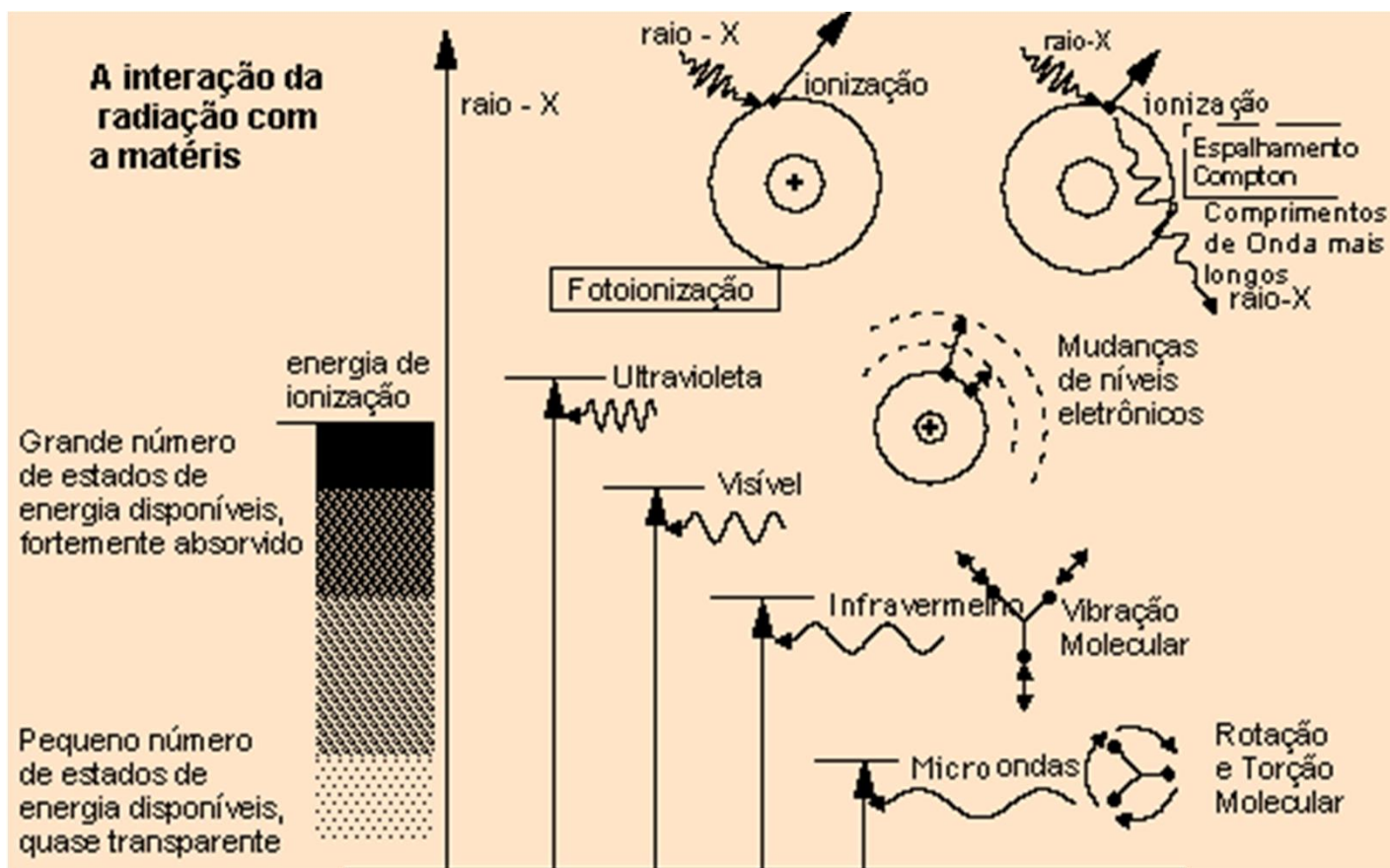
Nº Ciclos/seg(Hertz)

Comprimento de onda(m)



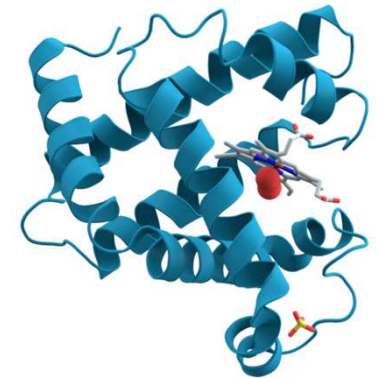
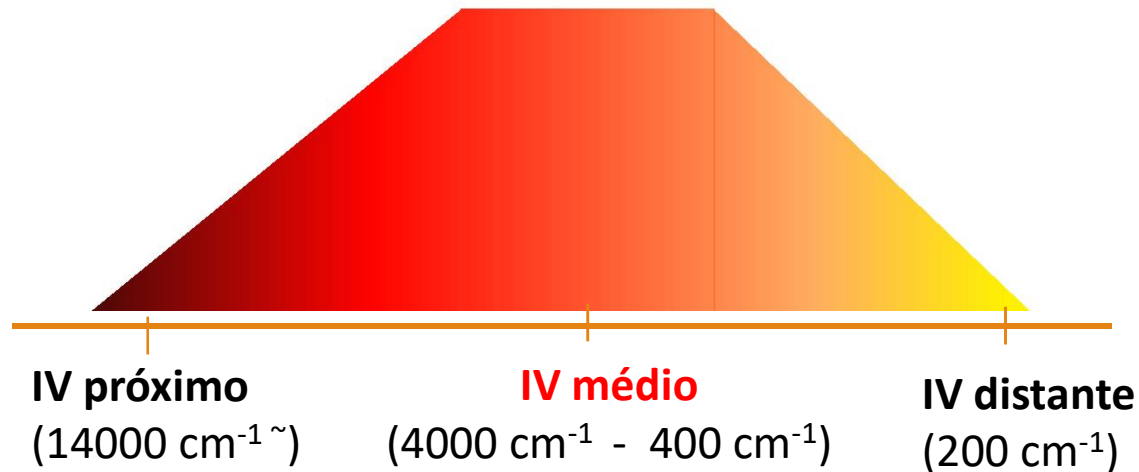
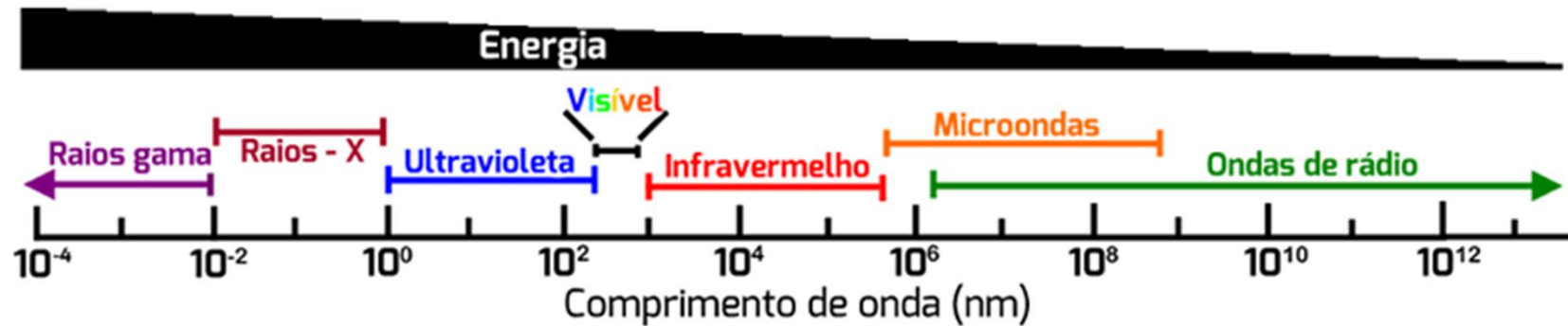
$\uparrow E \quad \downarrow \lambda$

A interação da radiação com a matéria



Introdução

A região do Infravermelho(IV) no espectro eletromagnético:

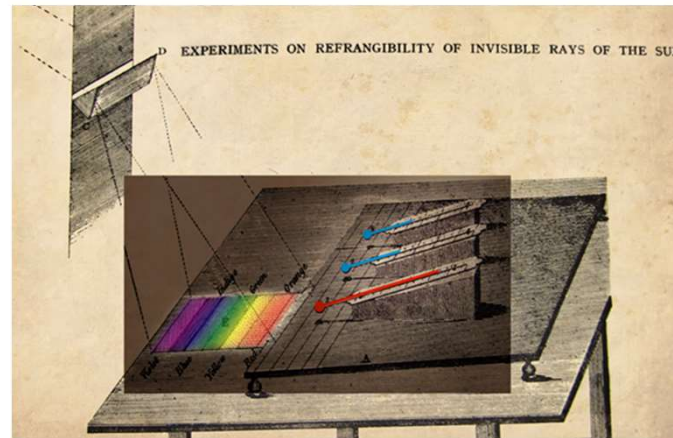
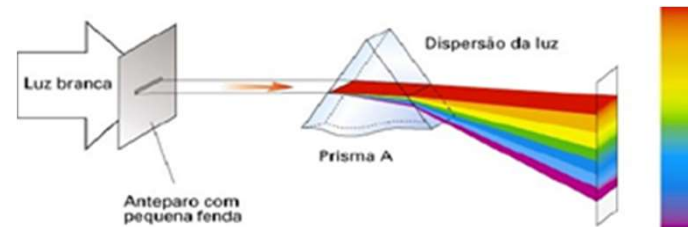
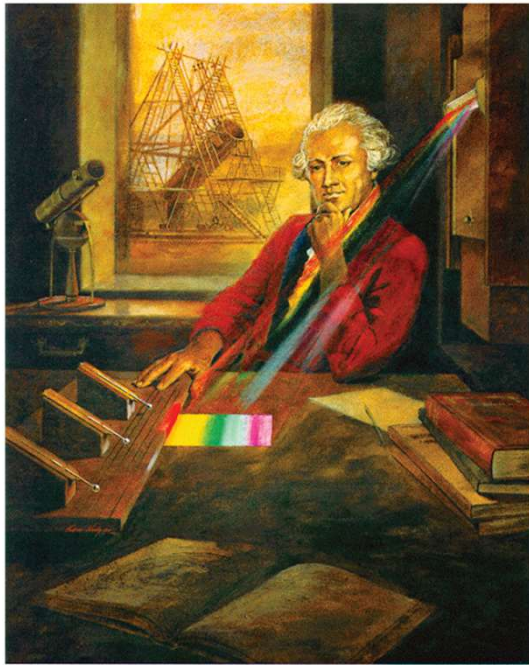


Determinação de Estrutura Secundária de proteínas

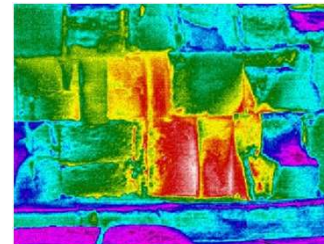
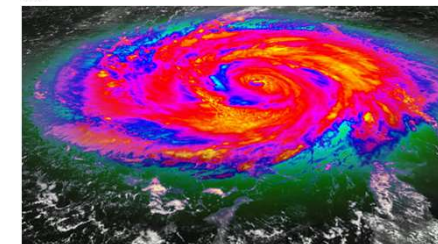
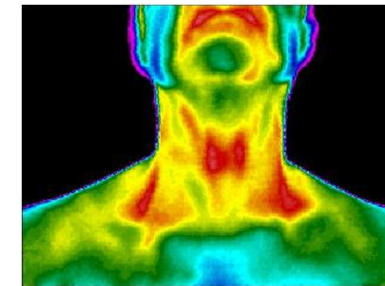
Introdução

Infravermelho (infra= abaixo) - é uma parte do espectro eletromagnético.

Radiação invisível, caracterizada por suas propriedades térmicas.



Aplicações



Frederick William Herschel (1800)- Medir a quantidade de calor de cada espectro.

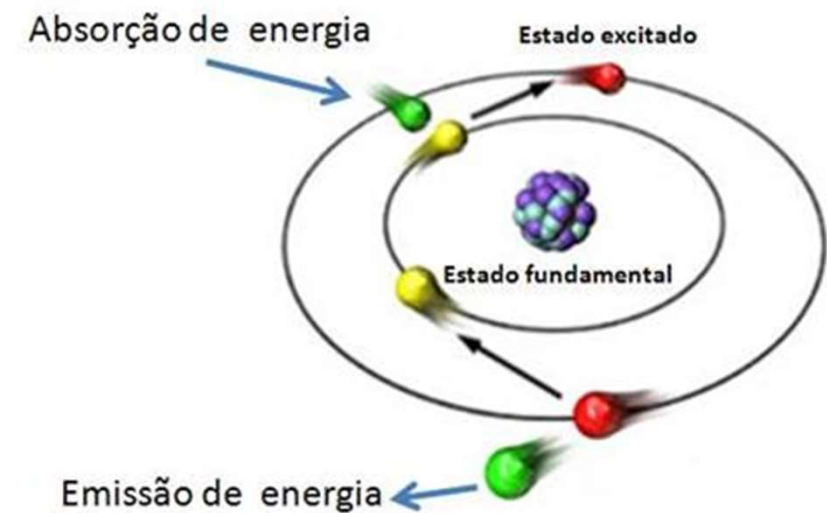
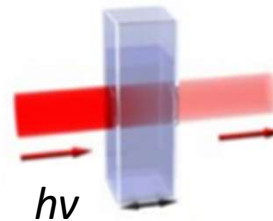
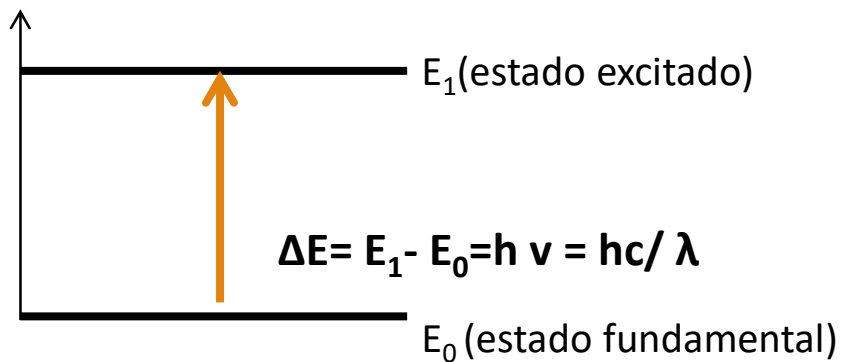
Introdução

- **Emprego do Infravermelho no estudo de biomoléculas:**
- Utilizado há décadas na análise e caracterização de pequenos compostos orgânicos.
- **Aplicações mais recentes:**
 - Estudo de **biomacromoléculas**.
 - Princípio é o mesmo, se diferencia em ordem de grandeza no número de átomos.

Introdução

- Transferência de energia do espectro para a matéria

- Quando uma radiação é incidida sobre a amostra, ocorre absorção.
- Após o desligamento da fonte de luz, os elétrons retornam a E_0 liberando a energia absorvida.



Introdução

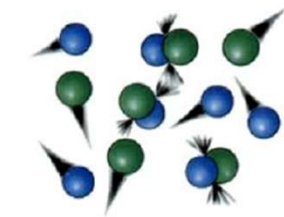
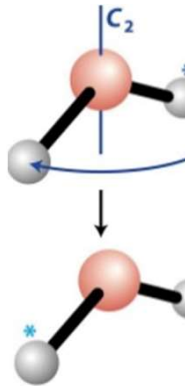
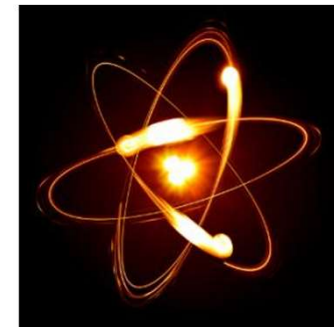
- A absorção de energia radiante não envolve somente transições eletrônicas, mas a energia total da molécula (E_{total}).

$$(E_{\text{total}}) = E_R + E_V + E_E$$

E_R : Rotação da molécula na solução

E_V : Movimento dos átomos dentro da molécula

E_E : Movimento dos elétrons ao redor do núcleo



↑ Concentração

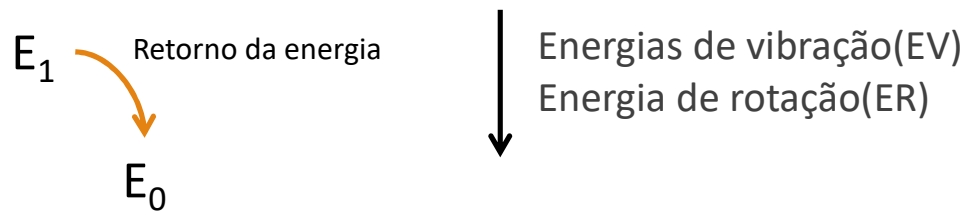


↑ Col

Introdução

- Dependendo do nível de energia da radiação incidente:

Molécula:

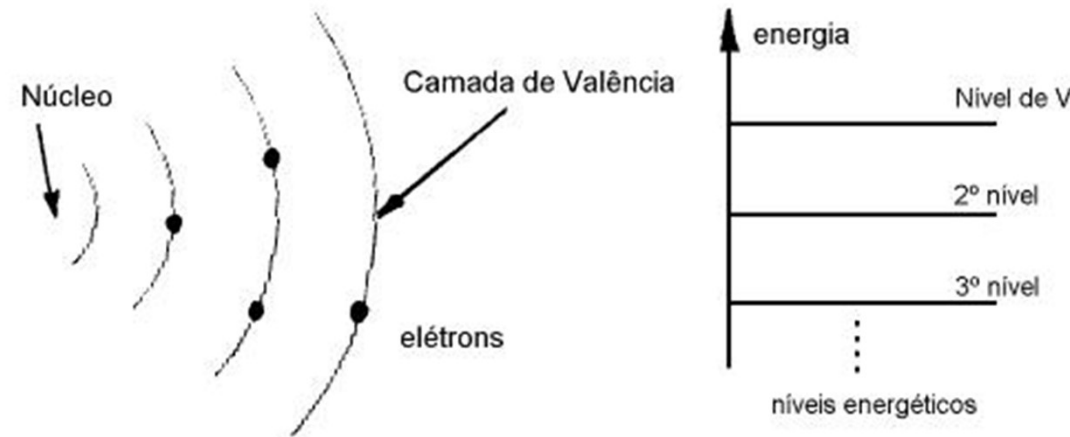


❖ Comprimentos de onda na região do IV médio

$E(\text{suficiente}) \xrightarrow{\text{Modificações}} \text{EV e ER}$

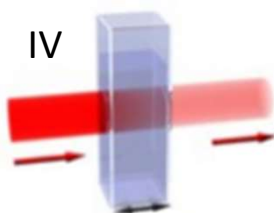
Isso ocorre quando:

Luz no IV = Energia necessária $\longrightarrow$ Vibração molecular



Introdução

- Análise na região do IV permite:



- Possível caracterizar as mudanças no comportamento molecular a partir de diferentes modos de vibração e rotação de uma molécula.

- Descrever o arranjo espacial dos átomos nas moléculas do composto(estrutura química).
- Informações sobre comprimento e a força de ligações químicas.
- Fornecem evidências para o comportamento químico ou físico relativo(estado redox, catalise enzimática e fosforilação, dentre outras).
- Análise qualitativa e quantitativa de uma determinada molécula.

Introdução

O espectro de IV

Informações sobre arranjo molecular de um determinado composto e sua interação com o ambiente

Definir a frequência de vibração de um oscilador diatômico

Fórmula da frequência de vibração

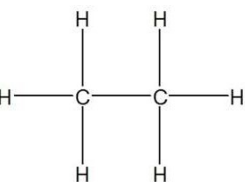
$$\nu = (k/m_r)^{0,5} / 2\pi$$



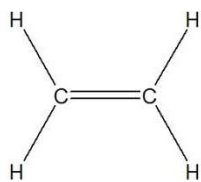
Onde ν = frequência

K é a constante de força entre dois átomos.

m_r é a massa reduzida ($m_1 + m_2$)



simples ligação



dupla ligação



tripla ligação



Frequência de vibração



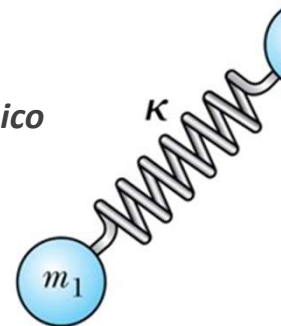
Força de interação entre os átomos

Massa dos átomos



Força de Ligação

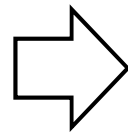
Oscilador diatômico



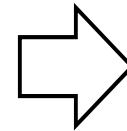
Introdução

- Qualquer fator inter ou intramolecular que altere a densidade eletrônica irá afetar o espectro vibracional obtido por IV.
- Apesar de ambas terem ligações simples entre elas:

O-H *+ Polar*



Força de interação diferente
entre os átomos



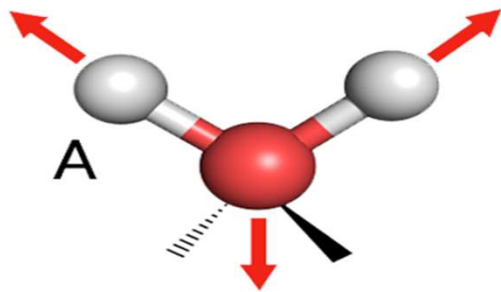
≠ Vibração molecular

N-H

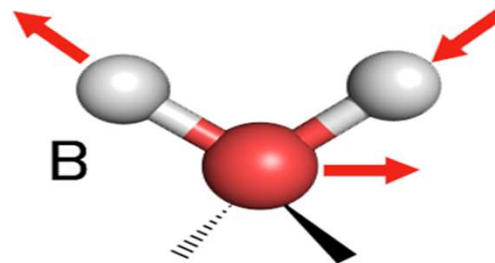
Introdução

Com absorção da luz no IV as ligações vibram, promovendo deformações:

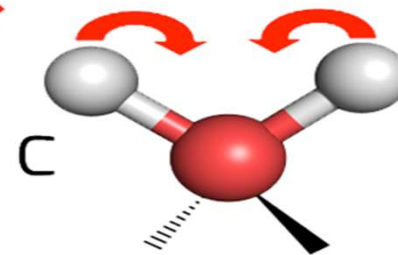
- Axiais(estiramentos)- Alongamentos da ligação química
- Angulares(dobras)- Simétricas(deformações em tesoura); Assimétricas(vibrações em balanço ou rotação).



Simétricos



Assimétricos

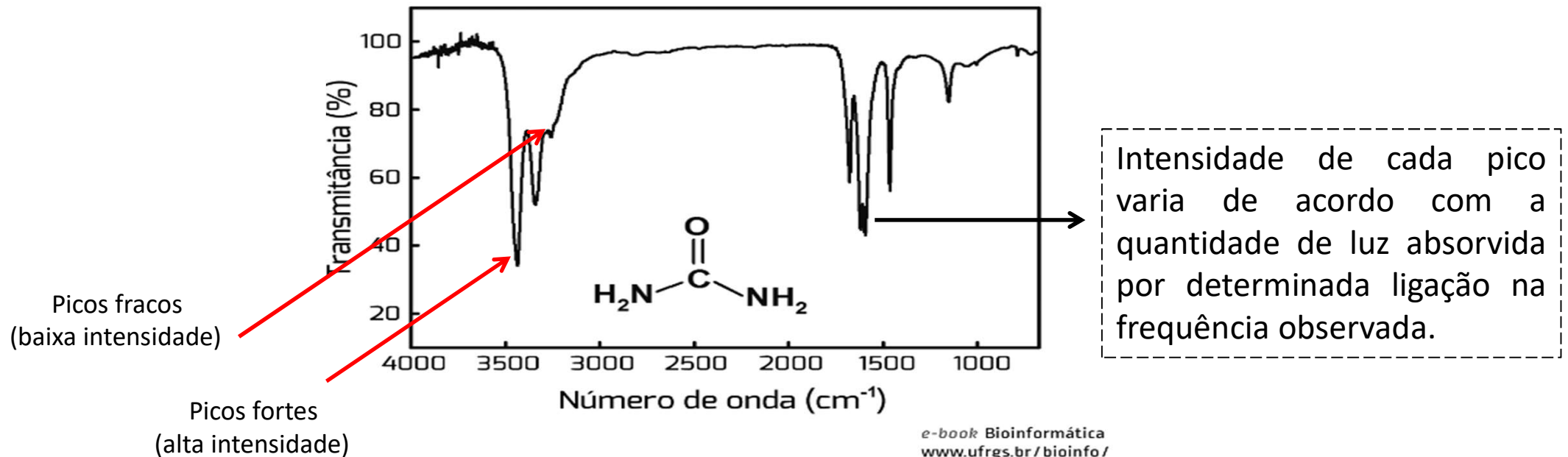


Deformação em tesoura

Introdução

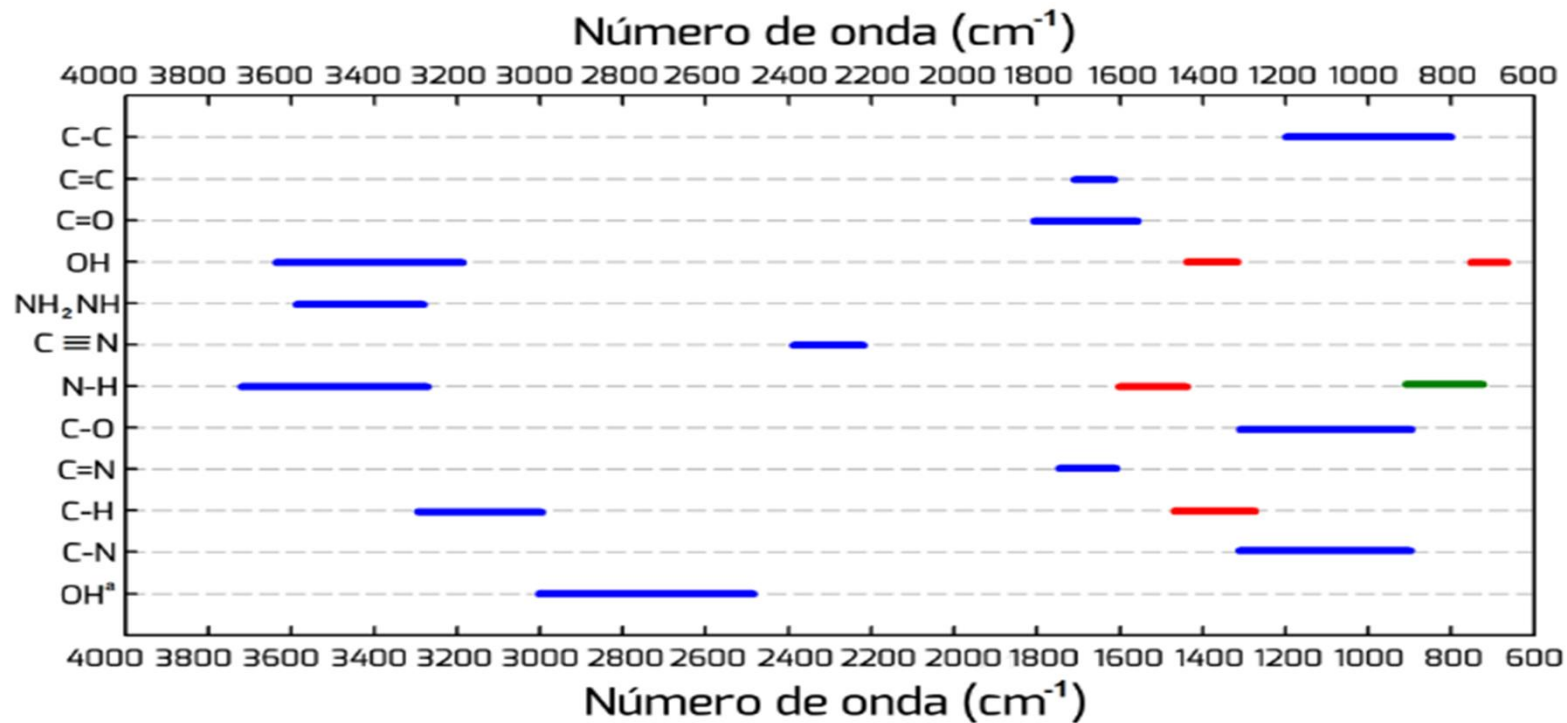
- Espectros de IV podem ser extremamente complexos (quantidade de estiramentos e deformações angulares que podem estar presentes numa molécula).

Uréia- Três tipos de ligações químicas diferentes (C=O, N-H e C-N) → Apresenta + de 7 picos.



Introdução

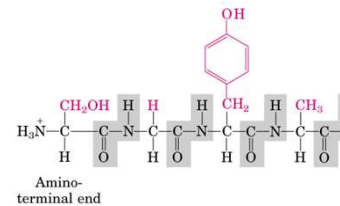
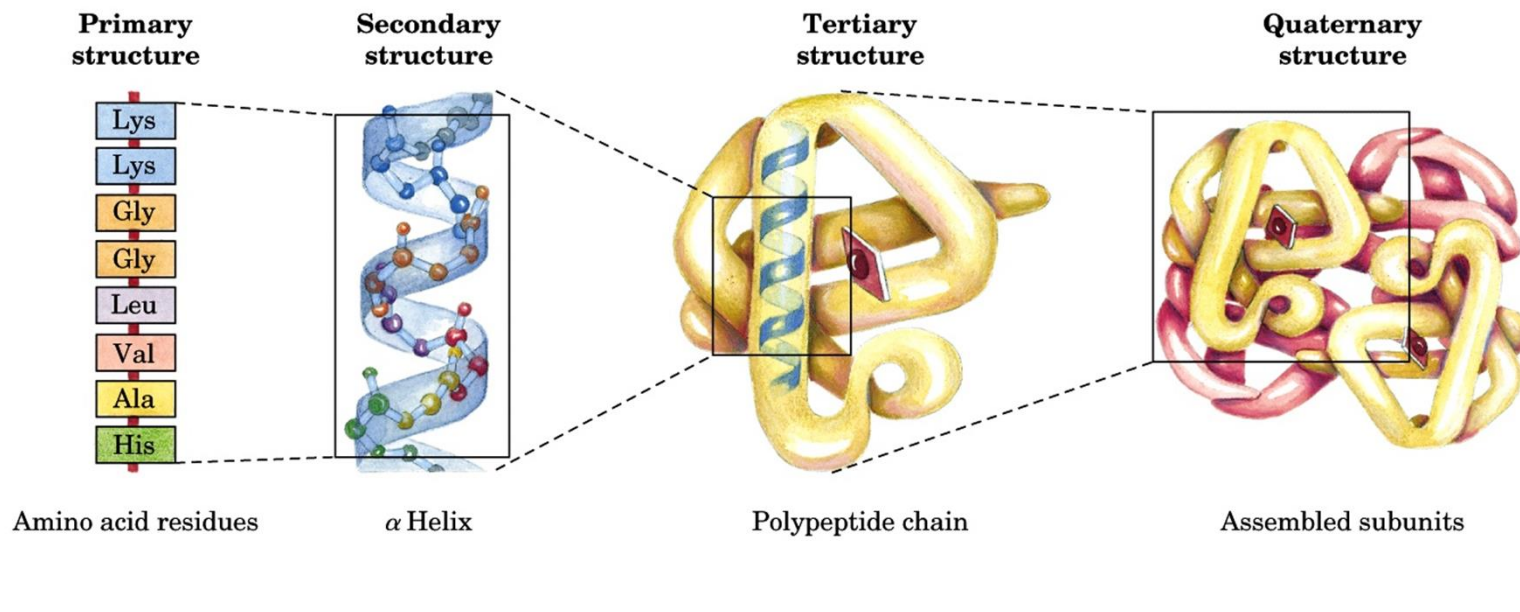
- Frequências vibracionais de ligações químicas nas proteínas estão presentes em diversas regiões do espectro
- Dessa forma, pode fornecer informações sobre o arranjo espacial dos átomos envolvidos



Introdução

Devido a grande sobreposição de frequências vibracionais, não é possível determinar a estrutura molecular de uma proteína por IV.

Podemos obter informações sobre a estrutura 2^{ária} e seu grau de enovelamento.

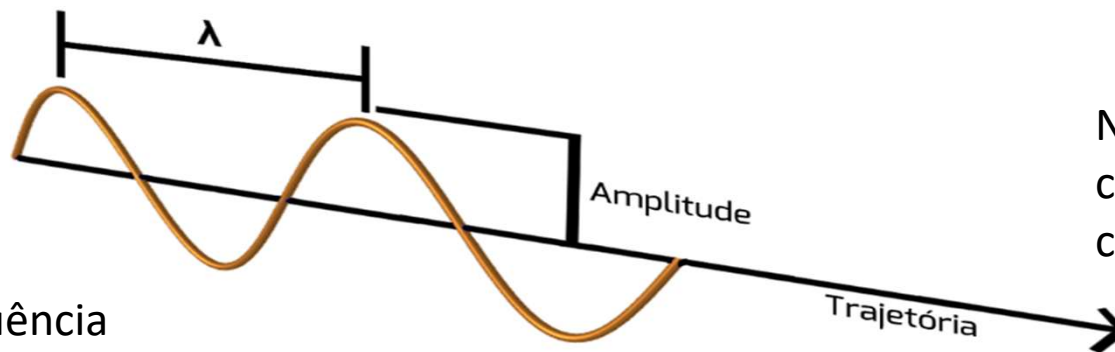


Instrumentação

Análise do IV

Números de onda(cm^{-1})

- Diretamente proporcional à energia de radiação eletromagnética.
- Inversamente proporcional ao comprimento de onda.



Nº de onda: nº de ondas que são comportados dentro do espaço de 1 cm.

Instrumentação

A energia de radiação eletromagnética é definida por:

$$E = h\nu = hc / \lambda$$

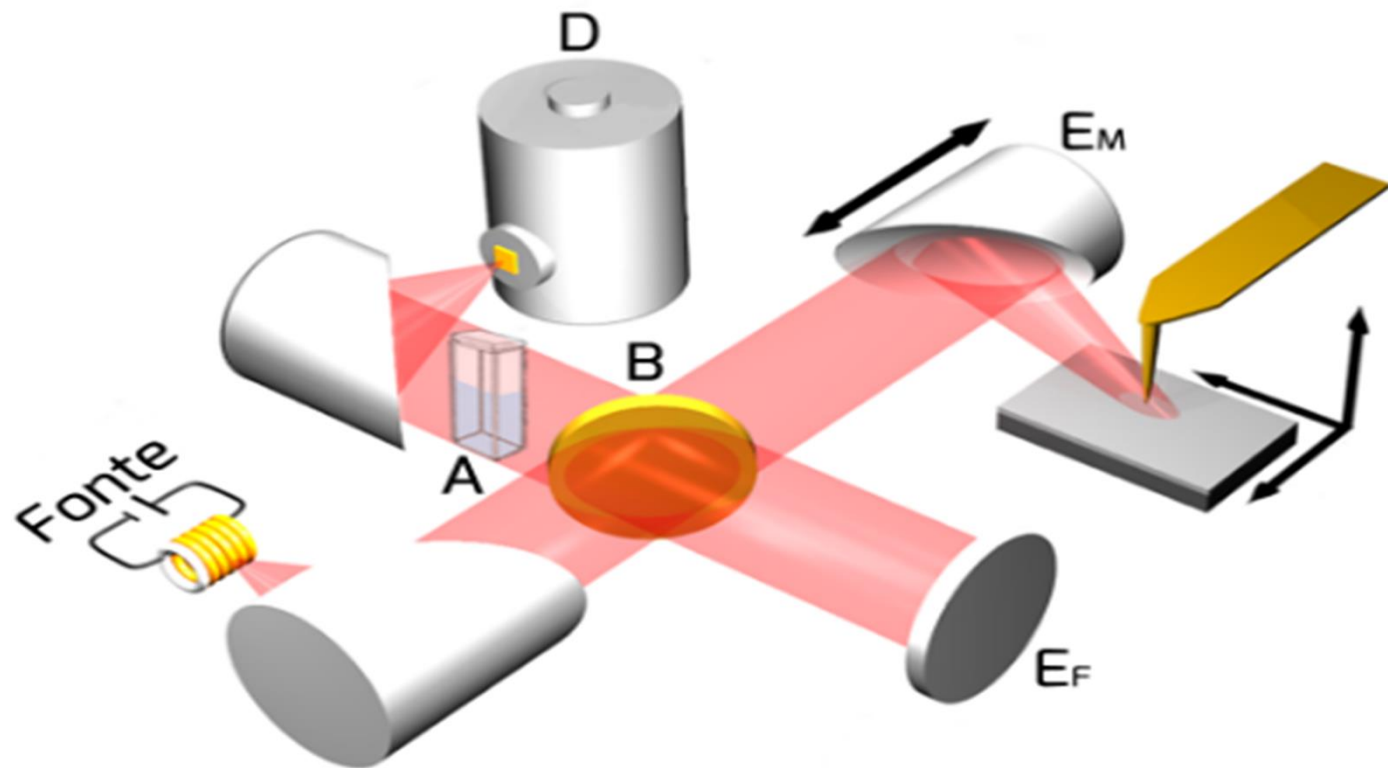
Onde h é a constante de Planck ($6,6261 \times 10^{-34}$)

c é a velocidade da luz no vácuo, e ν é a frequência da radiação (dada por $\nu = hc / \lambda$).

Comprimento de onda (nm) $1\text{cm} = 10.000.000\text{nm} (10^7)$

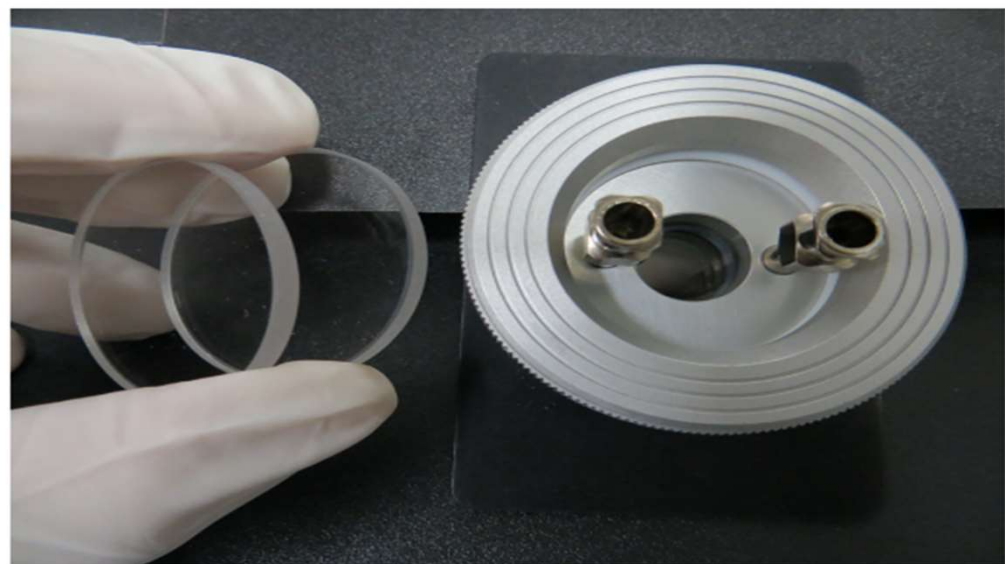
Nº de onda = $1 / \lambda \cdot 10^7$

Interferômetro



Realizando medidas de IV

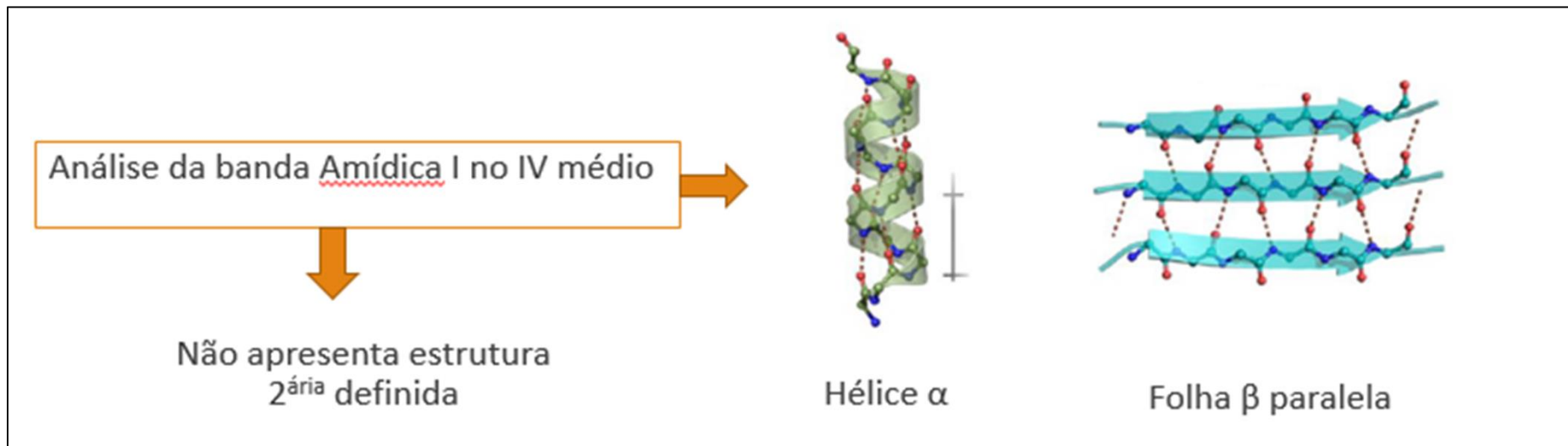
- Reduzir o conteúdo de água- Liofilização
- Trocar o 1H por 2H
- Aplicar amostras entre duas janelas
- Amostra seca em pastilha de KBr



Porta amostras

11.5. Espectros de IV de proteínas

- 1980 - Análise de estruturas 2^{ária} de proteínas a partir do espectro vibracional



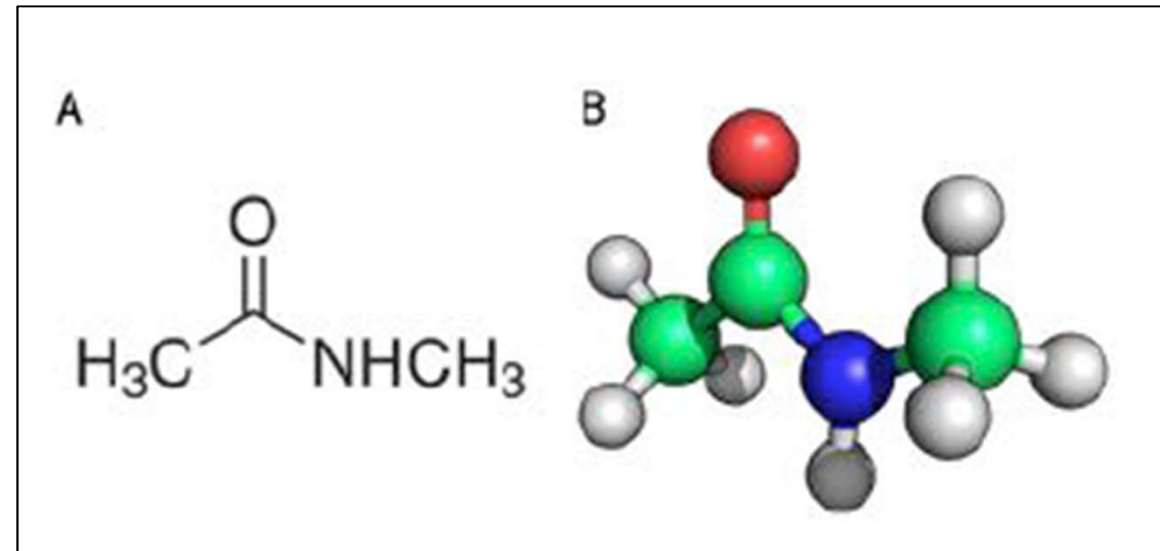
- Redes de ligação de H definem a estrutura 2^{ária} – afeta a frequência vibracional que aparece do IV

11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas

Composto modelo para definição de componentes vibracionais em proteínas

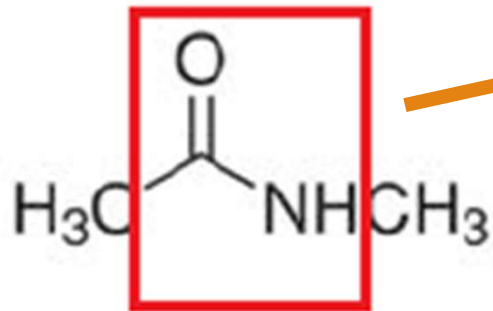
Menor estrutura que contém um grupamento peptídico em trans (ocorre em quase todas as proteínas)



N-metil acetamida - NMA

11.5. Espectros de IV de proteínas

A

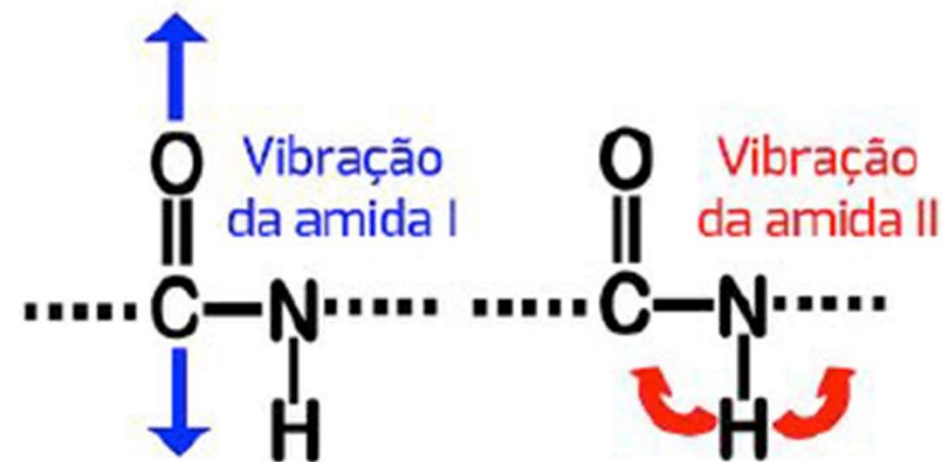


Ligação amídica ou peptídica

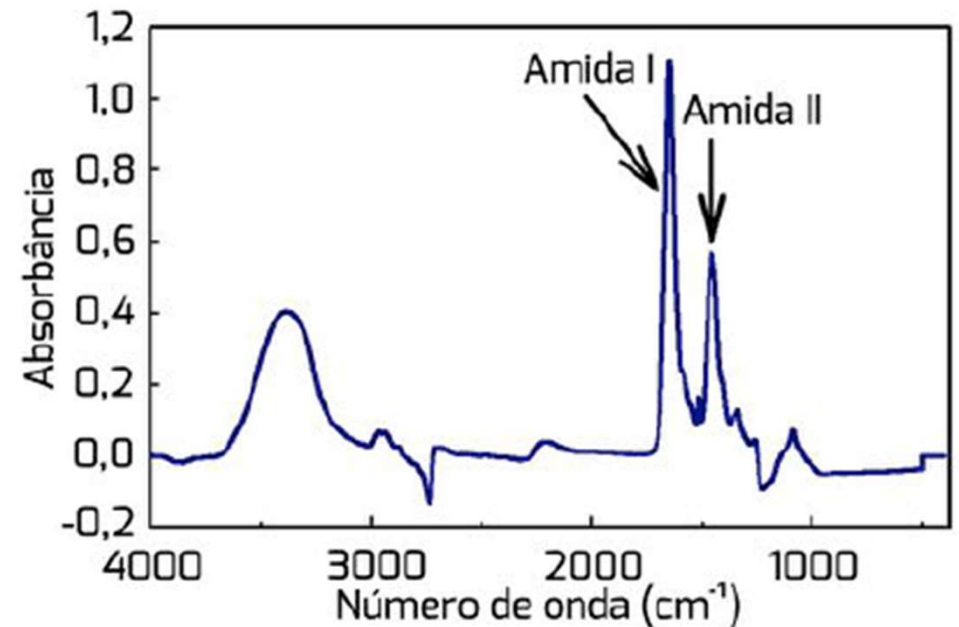
As regiões vibracionais são chamadas de bandas amídicas ou amidas

11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas



Interação com moléculas do solvente e com H da própria proteína pode alterar a vibração



- Amida I – 1700 a 1600 cm⁻¹
- Amida II – 1600 a 1450 cm⁻¹

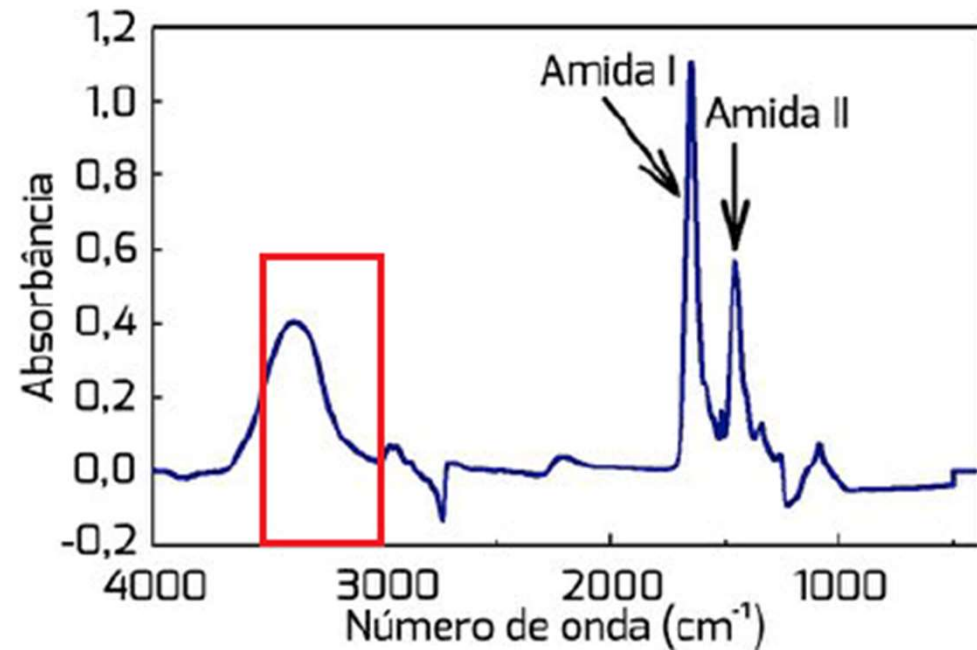
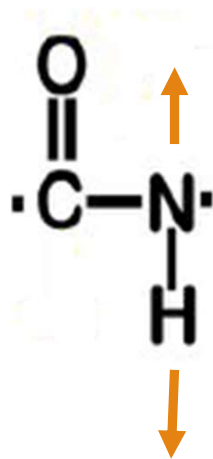
11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas – Principais

Amidas A e B

Estiramento da ligação N-H

Faixa 3300^{-1} e 3170^{-1}



11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas – Principais

Amida I

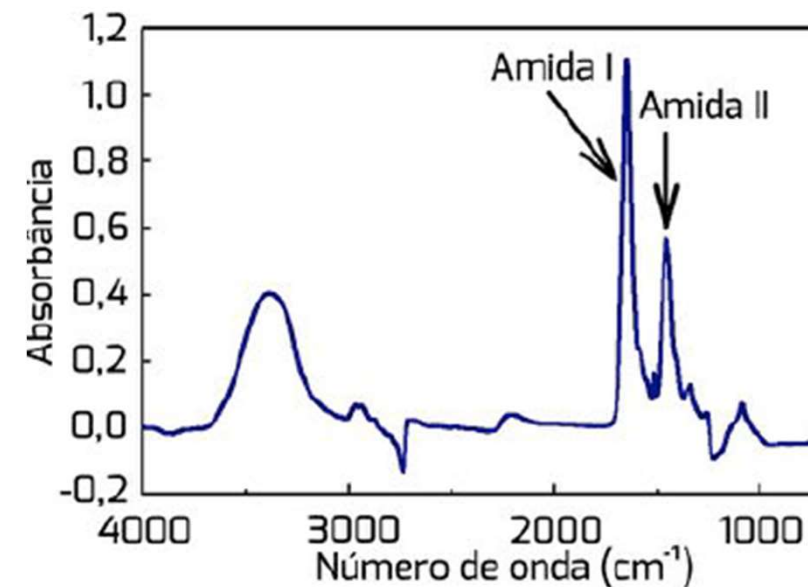
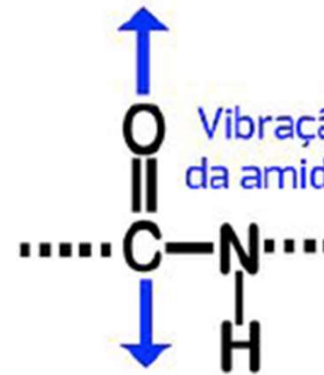
Principal banda vibracional – fornece informações sobre ESP

Frequência média – 1650 cm^{-1}

Estiramento simétrico da carbonila

Pequenas contribuições C-N, C-C-N e torção N-H

Muito pouco afetada pelas cadeias laterais



11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas – Principais

Amida II

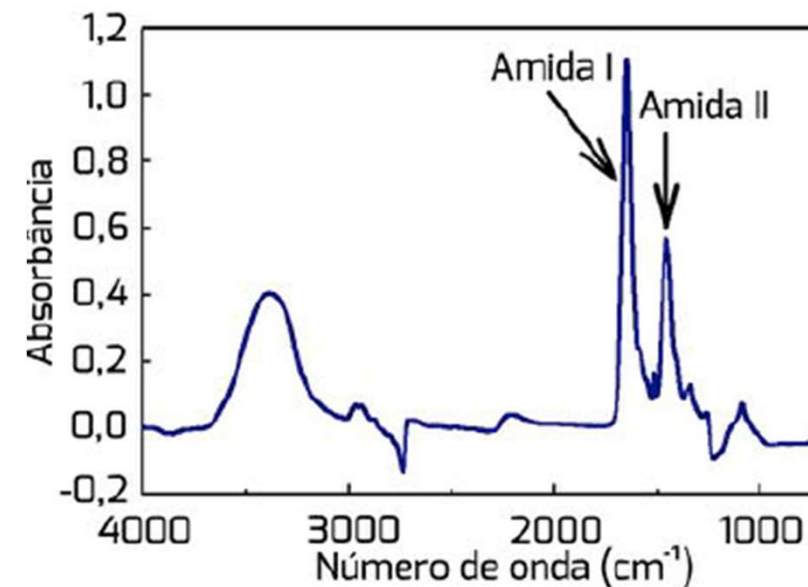
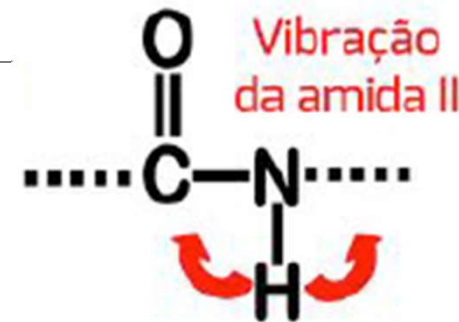
Frequência média – 1550 cm^{-1} em H_2O

Combinação fora de fase da torção N-H

Contribuição das ligações ao redor

Pouco afetada pelas cadeias laterais

Absorve em 1450 cm^{-1} em $^2\text{H}_2\text{O}$, fornecendo informações a respeito do enovelamento e dinâmica conformacional.



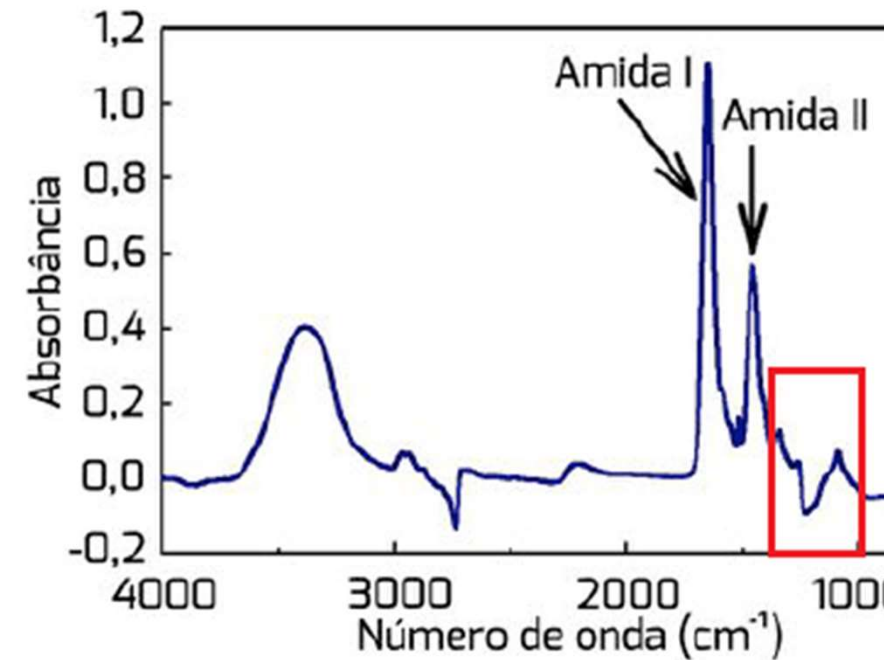
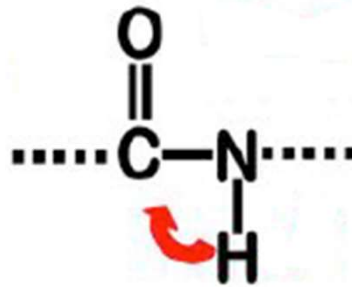
11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas – Principais

Banda de Amida III

Várias bandas em 1400 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} .

Dobra da ligação N-H e estiramento C-N.



11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas – Principais

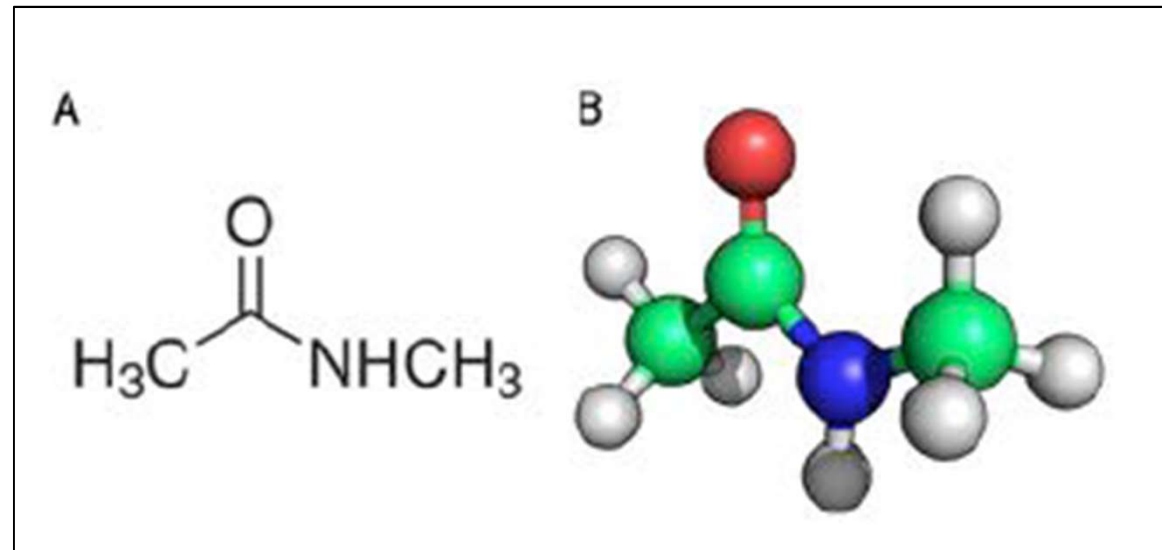
Vibração do esqueleto peptídico

Ocorre entre -1200 cm^{-1} a 880 cm^{-1} .

Estiramento das três ligações do esqueleto

> Ligação N-C – 1096 cm^{-1}

> Mista – 881 cm^{-1}



11.5. Espectros de IV de proteínas

Regiões Vibracionais de Proteínas – Principais

Vibração das cadeias laterais

Identificação de resíduos específicos dificultada pela sobreposição das frequências vibracionais. Os mais comuns são:

- Grupamento Sulfidrila das cisteínas – 2550 e 2600 cm^{-1}
- Grupamentos Carboxílicos protonados – 1710 a 1790 cm^{-1}

Asp protonados – 1550 e 1580 cm^{-1}

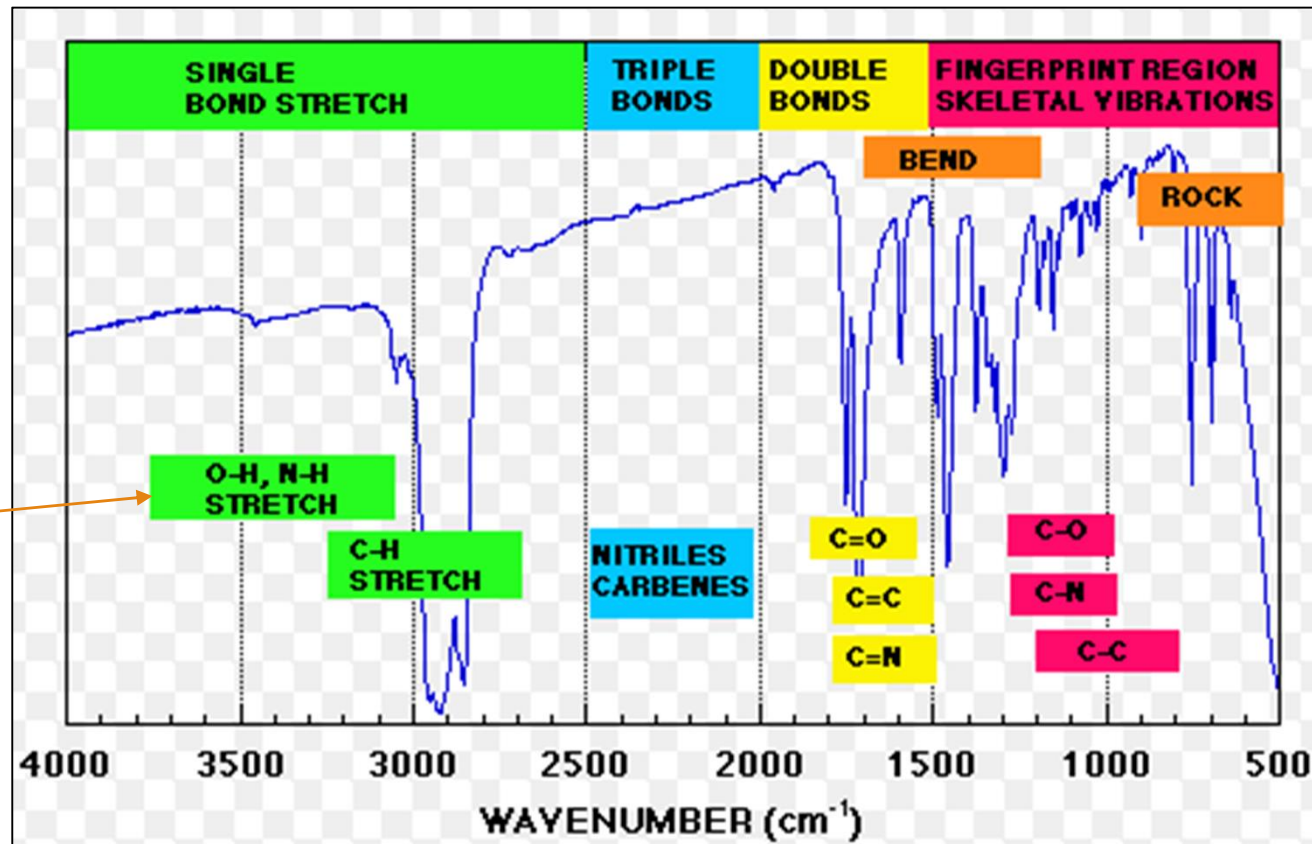
Glu protonados – 1400 cm^{-1}

Quando na presença de quelantes (como cálcio) - as bandas são deslocadas



Útil para estudo
de proteínas que
ligam ao cálcio

11.5. Espectros de IV de proteínas



H ligado a
heteroátomo

11.6. IV e estruturas secundárias

A banda da Amida I é que fornece informações sobre a ES destas macromoléculas

A frequência exata da primeira vibração (estiramento carboxila) depende:

- natureza das ligações H do grupamento amídico, o que é determinado pela estrutura secundária da proteína
- Orientação e distância dos dipolos que interagem, o que fornece informações sobre o arranjo geométrico dos grupamentos.

11.6. IV e estruturas secundárias

A aplicação de Espectroscopia IV por Transformada de Fourier para determinação da estrutura secundária de proteínas é um método validado por outros como difração de raio X, dicroísmo circular e cristalografia.

Mas a limitação atual é que não existe um método para descrever as características conformacionais de proteínas de forma absoluta.

Dificuldades de reproduzir as condições do meio onde as proteínas exerce suas funções: tampão, pH, íons, moduladores e etc.

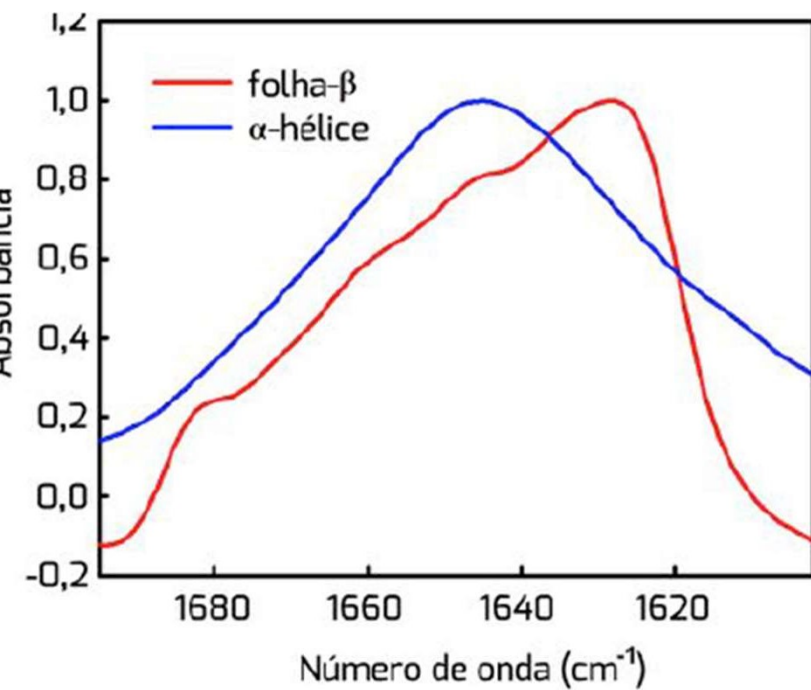
11.6. IV e estruturas secundárias

As frequências vibracionais na amida I dependerão do solvente

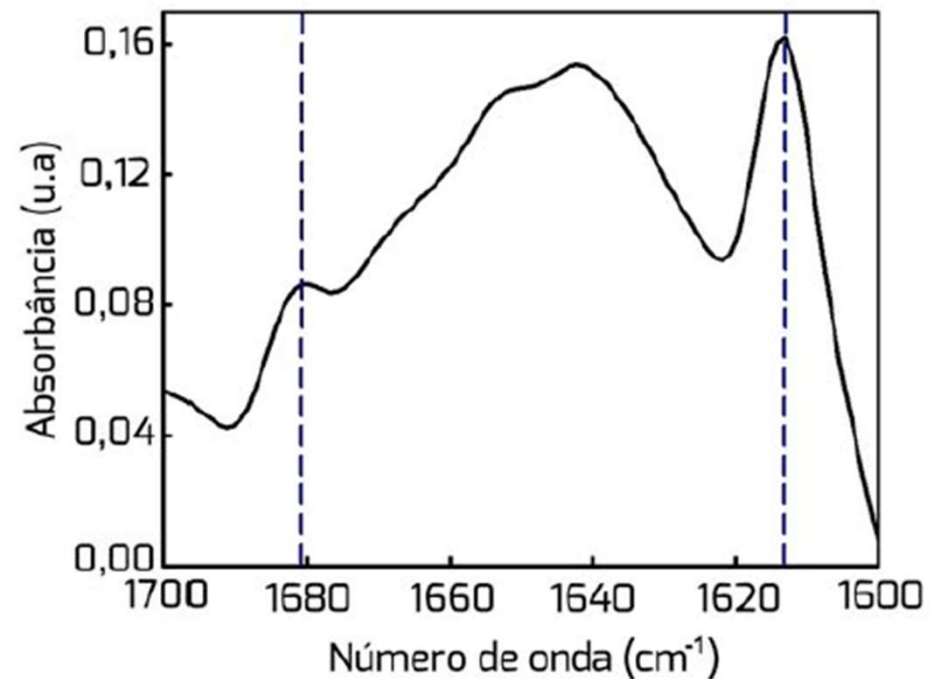
Estrutura 2 ^{ária}	Posição do pico na presença de ¹ H ₂ O (cm ⁻¹)		Posição do pico na presença de ² H ₂ O (cm ⁻¹)	
	Média	Variação	Média	Variação
α	1654	1648 a 1657	1652	1642 a 1660
β (baixa frequência)	1633	1623 a 1641	1630	1615 a 1639
β (alta frequência)	1684	1674 a 1695	1675	1671 a 1694
γ	1672	1662 a 1686	1671	1660 a 1694
estruturas desordenadas	1654	1642 a 1657	1645	1639 a 1654

Sobrepos
de band
necessida
cálculo
matemát

11.6. IV e estruturas secundárias



Espectros representativos de proteínas – diluída em água



Proteína rica em folha β pregueada – agregada a temperatura ambiente – folhas β antiparalelas intra e intermolecular quando agregadas.

11.7. Informações quantitativas

obreposição de componentes vibracionais ao longo da amida I

Quantificar – cálculo aproximado de porcentagem dos componentes de estrutura secundária deve-se fazer um processamento do espectro original.

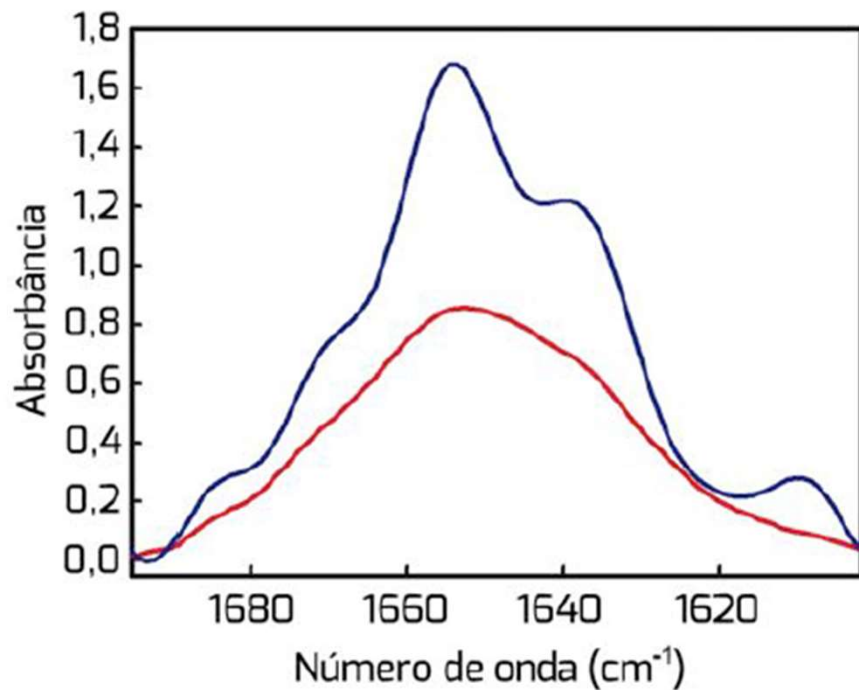


Figura 14-11: Espectro de IV (região amida I) não processado (vermelho) e após processamento matemático (FSD) da proteína lisozima em $^2\text{H}_2\text{O}$.

FSD – Fourier Self-deconvolution (Auto-deconvolução) – fórmula matemática aplicada para reduzir a largura das bandas do espectro e facilitar a visualização)

11.7. Informações quantitativas

obreposição de componentes vibracionais ao longo da amida I

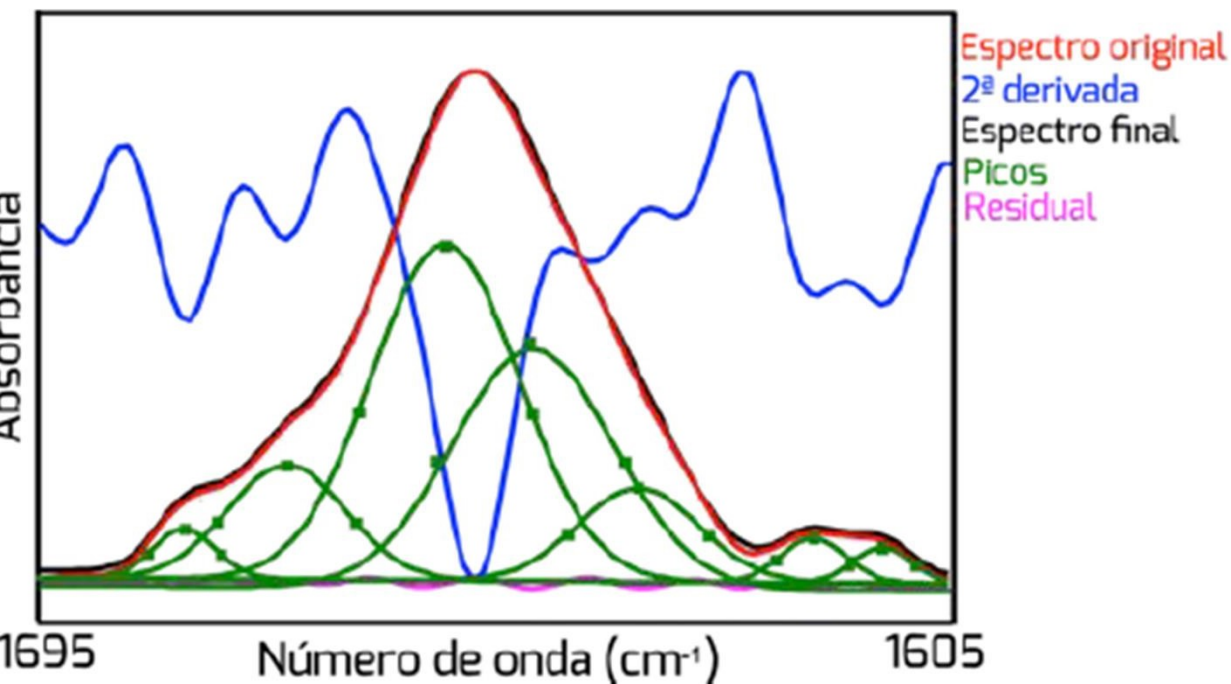


Figura 15-11: Espectro na região da amida I de uma proteína em solução ($^2\text{H}_2\text{O}$) (vermelho). Em azul está representada a segunda derivada do espectro original e, em preto, o espectro resultante do somatório de diferentes componentes (verde) deduzidos a partir da segunda derivada.

11.7. Informações quantitativas

separação dos componentes pode ser feita empregando:

Cálculo da segunda derivada do espectro – ajuste do sinal (as bandas obtidas são menores que as originais e isto resolve as bandas sobrepostas).

FSD - Transformada de Fourier – auto-deconvolução – reduz a largura das bandas do espectro usando função exponencial e as bandas aparecem mais definidas

Terceira abordagem é um incremento de fina estrutura (*Fine-structure*) em que uma versão do espectro original é multiplicada por um fator um pouco menor que 1 e em seguida subtraída do espectro original.

11.7. Informações quantitativas

Conclusões rápidas:

- não há um único espectro de IV para um tipo de estrutura secundária
- Absorção das cadeias laterais na região da amida I – estima-se que seja de 10 a 30% de interferência
- Usando algumas das abordagens anteriores é possível identificar e calcular a fração de cada componente de estrutura secundária

11.8. Desvio de ^1H para ^2H

A troca de ^1H para ^2H leva a pequenos desvios nos componentes da amida I (interfere na dobra N-H).

- 15 cm^{-1} para folhas β (baixa frequência) e voltas
- 10 cm^{-1} para estruturas desordenadas



Dependerá da contribuição da ligação N-H para a amida I
Troca incompleta do ^1H para ^2H
Conhecimento do solvente utilizado

11.9. Vantagens e limitações

Vantagens

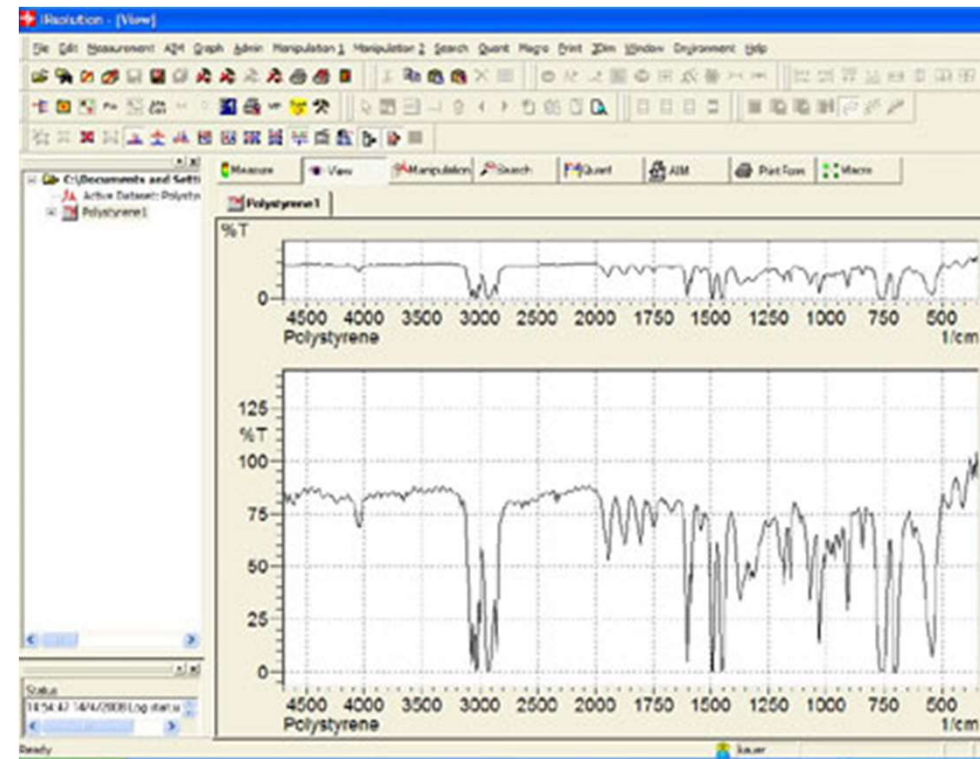
- Medidas em FTIR podem ser realizadas rapidamente
- elevada resolução mesmo com sinal baixo
- amostras em soluções ou secas
- amostras insolúveis, o que não pode em outras técnicas geralmente.
- meios turvos podem ser utilizados (amplia o estudo da macromolécula).
- permite avaliação da estrutura da proteína inserida em membranas
- Grande qtd de informação obtida
- Técnica não destrutiva (amostra pode ser recuperada)

11.9. Vantagens e limitações

Limitações e Cuidados

- Quantidade de proteína para estudo é elevada (1 a 4%)
- Troca de H_2O por $^2\text{H}_2\text{O}$ requer liofilização
- Avaliação quantitativa limitada
- Deconvolução nem sempre representa a estrutura correta final
- Exige manipulação matemática extensa dos dados obtidos
- Sofre interferência dos contaminantes que absorvem no IV médio

Equipamentos FTIR



Software - IRsolution

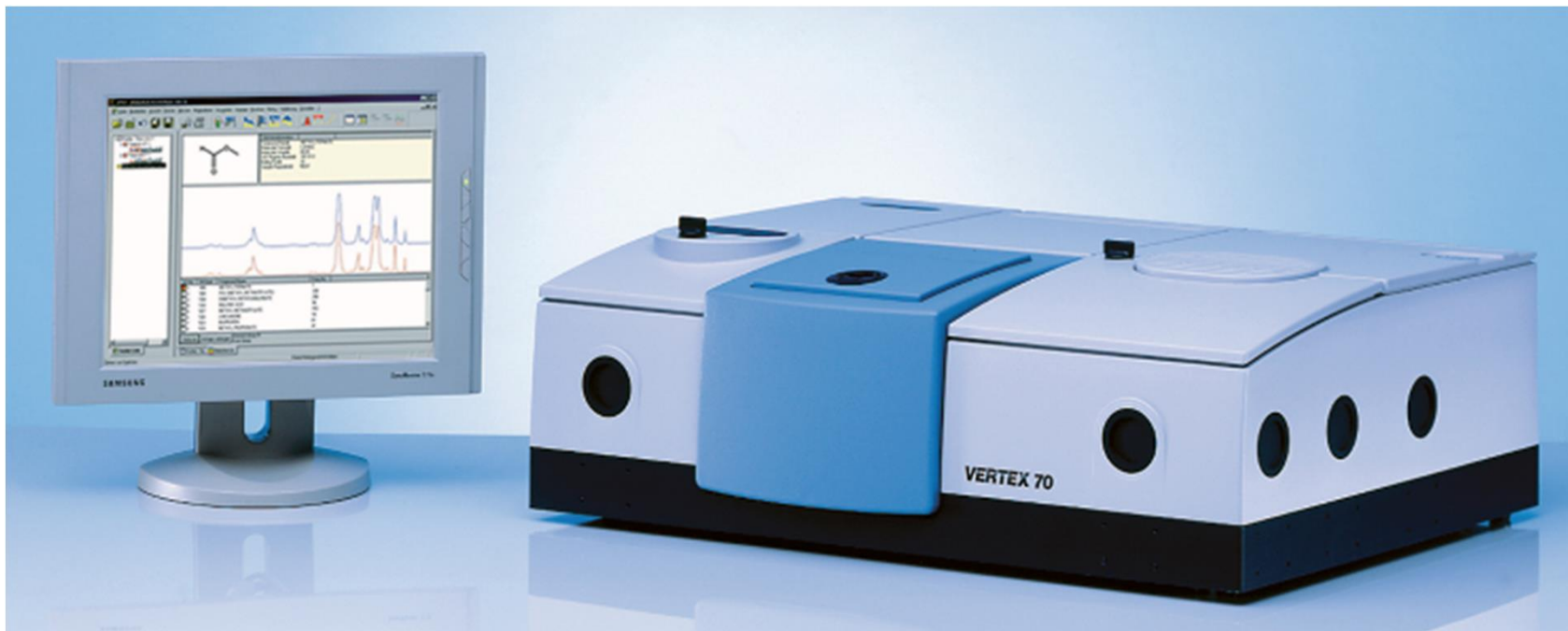
Equipamentos FTIR



ThermoFisher
SCIENTIFIC

Nicolet™ iS™ 50 FT-IR
Spectrometer and Software

Equipamentos FTIR



VERTEX 70

Comparação com bancos de dados

Pesquisa de Dados de espécies por valor de energia vibracional

<http://webbook.nist.gov/chemistry/vib-ser.html.pt>

link NIST – National Institute Standards and Technology

Cálculos em plataforma MATLAB – artigo de 1996

Aplicações

Análises de contaminantes em matérias primas – indústria farmacêutica

Pesquisas científicas – Estudos das estruturas secundárias das proteínas

Estudo dos mecanismos moleculares das proteínas

Estudo da atividade enzimática



Aplicações

Langmuir **1998**, *14*, 4559–4565

Characterization of Polyelectrolyte–Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Fourier Transform Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy

Frank Caruso,^{*,†,‡} D. Neil Furlong,[†] Katsuhiko Ariga,^{§,||} Izumi Ichinose,[⊥] and Toyoki Kunitake[⊥]

CSIRO, Molecular Science, Private Bag 10, Clayton South MDC, Victoria 3169, Australia, Supermolecules Project, JRDC, Kurume Research Park, Kurume 839, Japan, and Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

Produção de
biossensores