

José Augusto Pereira

INTRODUÇÃO À ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA

Determinação da entalpia e da entropia padrão de emparelhamento de um oligonucleótido. O efeito da concentração de NaCl.

Introdução

Espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-Vis)

O espectro electromagnético

A radiação electromagnética é constituída por *quanta* de energia, os *fótons*, que apresentam comportamento ondulatório. Estas partículas elementares são as intermediárias da interacção e da força electromagnética e a sua energia pode ser calculada pela equação 1:

$$E = h \nu \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,62618 \times 10^{-34}$ J s) e ν é a frequência da radiação (s^{-1} , o mesmo que Hz).

O comprimento de onda fica definido pela frequência e pela velocidade da radiação através da equação 2:

$$\nu = c/\lambda \quad (2)$$

onde λ é o comprimento de onda (m) e c é a velocidade de propagação da onda ($2,9979 \times 10^8$ m s⁻¹ no vácuo). A energia da radiação electromagnética é portanto directamente proporcional à sua frequência e inversamente proporcional ao seu comprimento de onda.

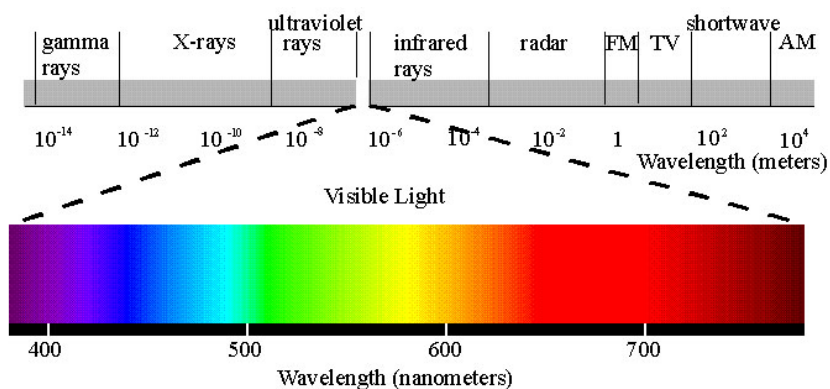


Figura 1 - Espectro de frequências para a radiação electromagnética. Um nanómetro (nm) é 10^{-9} m.

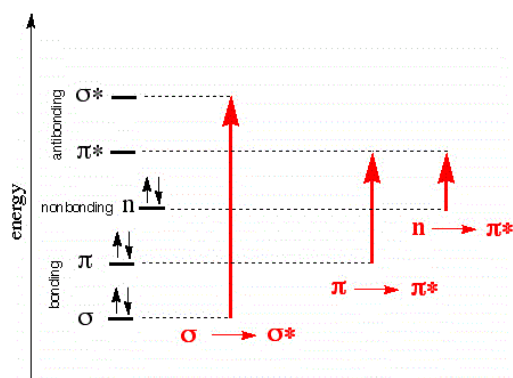


Figura 2 - Transições electrónicas entre orbitais moleculares (OM) de diversos tipos. Numa molécula estável, as orbitais ligantes σ e π , e as não-ligantes n , contêm electrões, enquanto que as OM anti-ligantes σ^* e π^* estão vazias. As transições que requerem maior energia, e portanto fótons de maior frequência, são as $\sigma \rightarrow \sigma^*$. As transições envolvendo OM tipo π só ocorrem quando a molécula contém ligações duplas ou triplas. As OM tipo n são na verdade orbitais atómicas, simples ou híbridas. Por normalmente terem maior energia potencial que as OM ligantes, as orbitais n estão na origem de algumas das transições electrónicas de menor energia.

O estudo de diversas fontes de radiação mostra que esta é constituída por fótons com diversos comprimentos de onda que habitualmente se classificam em intervalos cujo nome tem a ver com a sua utilização ou percepção humana (figura 1). Deve notar-se que a região visível é uma pequeníssima parte do espectro electromagnético, compreendendo radiações de comprimento de onda entre 400 nm (radiação violeta) e 800 nm (radiação vermelha), aproximadamente. Os comprimentos de onda da radiação electromagnética solar variam entre cerca de 10^4 m (ondas de rádio) a 10^{-16} m (raios γ).

Excitação electrónica

A radiação electromagnética interage de diversas formas com a matéria, dependendo da sua energia e do tipo de matéria. Uma destas interações dá-se ao nível das transições electrónicas entre orbitais atómicas ou moleculares quando a radiação possui comprimentos de onda nas regiões do ultravioleta e visível, entre 200 e 800 nm. Em moléculas, este fenómeno consiste na promoção de electrões de orbitais moleculares (OM) ligantes (tipo σ ou π) ou não-ligantes (tipo n) para OM anti-ligantes de maior energia, de onde deriva o nome “excitação electrónica”. Estas transições podem representar-se por: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (figura 2). As transições para OM anti-ligantes podem provocar a desagregação molecular designada por fotólise.

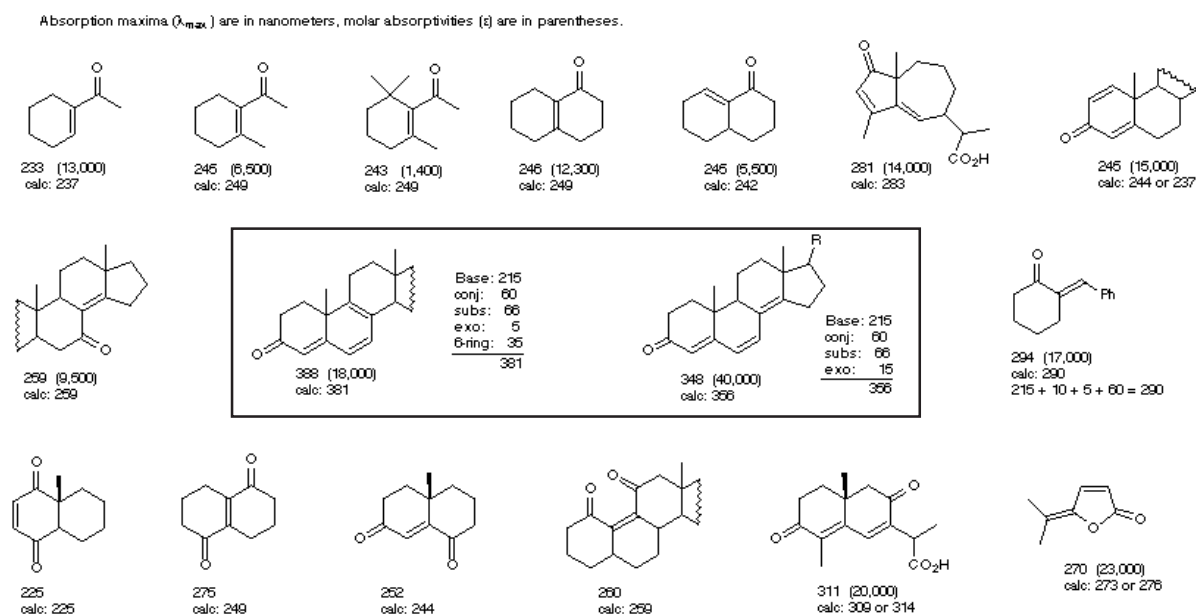
Os hidrocarbonetos saturados só apresentam transições do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$, que requerem uma energia muito alta, razão pela qual estes compostos absorvem radiação na região do ultravioleta longínquo ($\lambda < 150$ nm). A presença de ligações duplas faz com que apareçam máximos de absorvância a comprimentos de onda mais altos (tabela 1) correspondendo a energias de transição mais baixas.

A presença de outros átomos, como o oxigénio nos aldeídos e nas cetonas que possuem electrões em orbitais n e π (grupo C=O) provocam absorção de radiação entre 180 e 280 nm, devido às transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Compostos diferentes mas possuindo o mesmo tipo de grupos cromóforos (com absorção característica no ultravioleta ou visível), normalmente absorvem energia de comprimentos de onda dife-

Chromophore	Compound	Transition	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon_{\max}$	Solvent
C-H	CH ₄	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	122	strong	gas
C-C	CH ₃ -CH ₃	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	135	strong	gas
C=C	CH ₂ =CH ₂	$\pi \rightarrow \pi^*$	162	15000	heptane
	(CH ₃) ₂ C=C(CH ₃) ₂	$\pi \rightarrow \pi^*$	196	11500	heptane
C=C=C	CH ₂ =C=CH ₂		170	4000	
			227	630	
C≡C	HC≡CH		173	6000	gas
	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁ -C≡C-CH ₃		178	10000	hexane
			196	2000	
			222	160	
C-Cl	CH ₃ Cl	$n \rightarrow \sigma^*$	173	200	hexane
C-Br	<i>n</i> -C ₃ H ₇ Br	$n \rightarrow \sigma^*$	208	300	hexane

Tabela 1 - Comprimento de onda da radiação electromagnética absorvida por hidrocarbonetos simples e substituídos com halogéneos. A presença de ligações duplas e triplas e os pares de electrões não ligantes nos halogéneos provoca o aparecimento de transições a maiores comprimentos de onda.

Figura 3 - Máximos de absorvância para várias enonas. A presença do grupo carbonilo e a conjugação de ligações duplas está directamente relacionada com o aumento do comprimento de onda a que aparece o máximo de absorvância. As moléculas assinaladas, com um grupo carbonilo e quatro ligações duplas conjugadas têm máximos de absorvância já muito perto do visível (~ 400 nm).



rentes, tal como pode ser verificado na figura 3. Na realidade, a energia necessária para as transições electrónicas depende da estrutura global da molécula, sendo relevante a natureza dos grupos vizinhos do grupo cromóforo, ou a existência de conjugação de orbitais π entre vários átomos. Nesta última situação a molécula absorve energia de maior comprimento de onda, que pode inclusivamente chegar a ser radiação visível quando a conjugação π é extensa. Os compostos que absorvem radiação na região do visível são corados e as suas moléculas apresentam sistemas de electrões π extensos e conjugados. São exemplos de moléculas biológicas deste género os carotenos e as clorofilas (figura 4). Outra fonte de cor está nas transições presentes nos compostos de coordenação com cátions metálicos de transição, como ferro e cobre, por exemplo.

Espectrofotometria

Para obter espectros como os da figura 4 utiliza-se um espectrofotómetro. Este é um aparelho que emite um feixe de luz com um determinado comprimento de onda para uma amostra, segundo o esquema representado na figura 5, e mede a quantidade de luz absorvida. A quantidade de radiação que uma solução deixa passar ao ser atravessada por um feixe luminoso denomina-se transmitância (T), e corresponde ao rácio entre a intensidade da luz emergente da solução (I) e a intensidade da luz incidente (I_0):

$$T = I / I_0 \quad (3)$$

A transmitância está relacionada com outra grandeza, a absorvância (A), pela expressão:

$$A = \log (1/T) = \log (I_0/I) \quad (4)$$

A análise quantitativa (ou doseamento) de compostos que se encontram em solução, pode ser feita através da espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-Vis), utilizando a lei empírica de Beer-Lambert. Esta lei relaciona a concentração de um composto em solução, c (mol dm^{-3}), com a sua absorvância A :

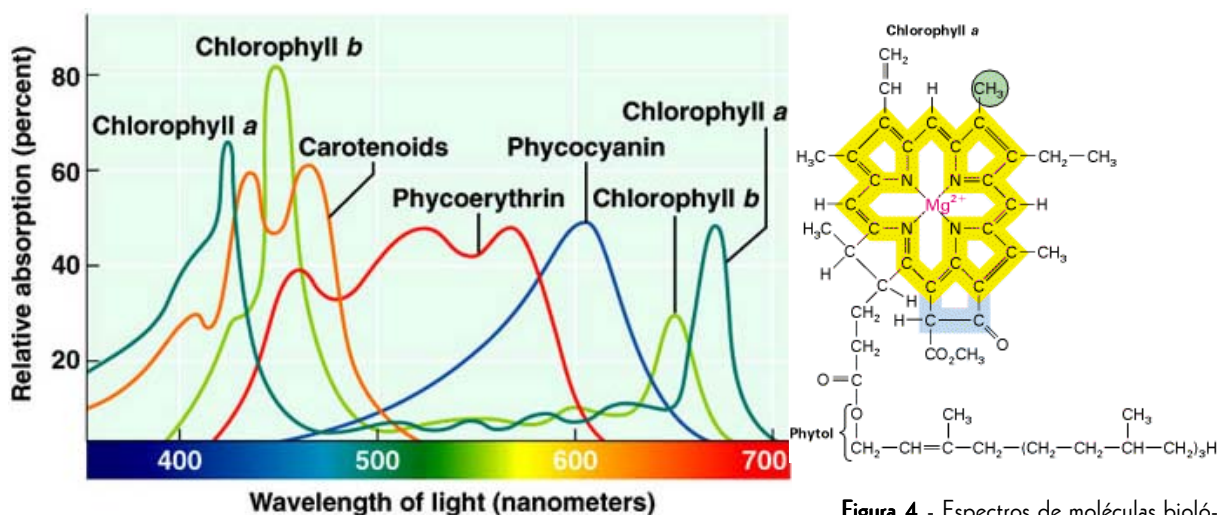
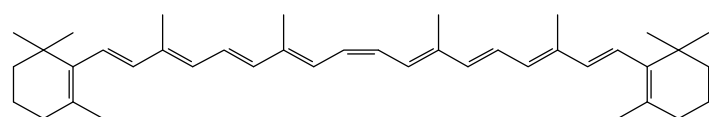


Figura 4 - Espectros de moléculas biológicas com grande extensão de conjugação π , salientada na estrutura da clorofila *a*. Apresentam vários máximos de absorvância no visível, para além de absorvância no UV, não mostrada.



$$A = \epsilon \ell c \quad (5)$$

onde ℓ é a distância percorrida pelo feixe de luz na solução (cm) e ϵ é uma constante chamada “absortividade molar” ($\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$), uma vez que tem um valor numérico igual ao da absorvância quando a concentração de soluto é 1 mol dm^{-3} , para uma espessura de 1 cm de solução.

O valor de absorvância de uma solução é a soma das absorvâncias de todos os seus componentes, solvente e solutos, e também do recipiente em que se encontra. Para determinar a absorvância devida a um único soluto, a determinado comprimento de onda, é necessário medir a absorvância da solução com e sem esse soluto e subtrair os dois valores. A solução que contém tudo menos o soluto de interesse designa-se “branco”.

É importante que as amostras sejam soluções verdadeiras, límpidas, para que a medição do espectrofotómetro seja puramente um resultado de absorção electrónica. Suspensões, colóides ou outras misturas não homogéneas translúcidas contêm partículas que para além de absorverem radiação também a dispersam por reflexão na sua superfície. Essa luz não foi absorvida mas é contabilizada como tal pelo espectrofotómetro. Mesmo a luz que é absorvida não o é nas condições supostas de diluição do soluto, uma vez que este está agregado em partículas em que muitas moléculas interagem só entre si e não com o solvente.

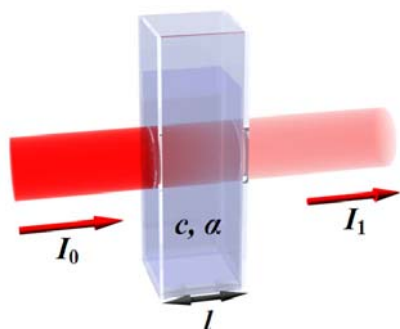


Figura 5 - Para medições espectrofotométricas de soluções é usado um tubo de secção quadrada chamado “cuvete”, transparente às radiações ultravioleta (UV) e visível, ou só à radiação visível. É medida a relação entre a quantidade de luz que entra e que sai da amostra para determinar a sua absorvância. Esta, segundo a lei de Beer-Lambert, é proporcional à espessura e à concentração c da amostra.

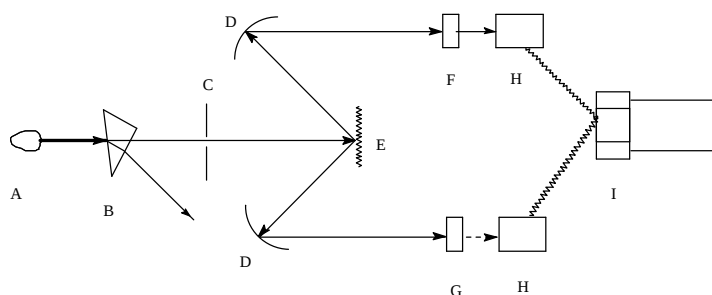


Figura 6 - Esquema de um espectrofotômetro.

- A - Fonte de Radiação
- B - Prisma
- C - Fenda
- D - Espelhos
- E - Espelho divisor da radiação
- F - Recipiente do "Branco"
- G - Recipiente da Amostra
- H - Detectores
- I - Registrador ou Computador

Instrumentação espectrofotométrica

Os espectrofotômetros de UV-Vis são constituídos pelas unidades básicas representadas na figura 6. A fonte emissora de luz pode ser uma lâmpada de tungsténio que emite radiação em todo o intervalo de comprimentos de onda visível ($325 \text{ nm} < \lambda < 1000 \text{ nm}$), ou uma lâmpada de deutério ($200 \text{ nm} < \lambda < 360 \text{ nm}$) para a região do ultravioleta. O selector de comprimento de onda, ou monocromador, inclui normalmente um dispositivo difractor ou refractor de radiação, para separar a radiação da lâmpada por comprimentos de onda, uma fenda para seleccionar a radiação de comprimento de onda desejado e ainda filtros para cortar radiações interferentes. A luz incide na amostra e no "branco", que se encontram em tubos especiais chamados cuvetes (figura 5). Estes tubos são de secção conhecida, construídos em quartzo ou plástico para medições na região UV e visível, ou em vidro se a observação pretendida for só na região do visível. O detector é uma célula fotoelétrica que transforma a quantidade de luz emergente da amostra e do "branco" numa corrente eléctrica proporcional.

O esquema apresentado na figura 6 refere-se aos designados "espectrofotômetros de feixe duplo" em que o feixe original é dividido em dois por um espelho rotativo ou por um prisma, passando um desses feixes pela amostra e o outro pelo "branco". A diferença entre os espectros da amostra e do "branco" é feita automaticamente e em tempo real pelo espectrofotómetro. Consegue-se assim a possibilidade de fazer varrimentos de comprimentos de onda sem ter necessidade de trocar cuvetes entre a amostra e o "branco" para cada novo comprimento de onda. No entanto, muitos espectrofotómetros são de feixe simples por que são mais baratos e se adequam a análises quantitativas a um só comprimento de onda, em vez de análises qualitativas espectrais. Nesse caso, antes de ser feita qualquer leitura de amostras coloca-se a cuvette do "branco" no espectrofotómetro, selecciona-se o comprimento de onda desejado e define-se manualmente a absorvância do "branco" como zero. Nas leituras subsequentes de amostras, o espectrofotómetro desconta automaticamente a absorvância do "branco" e apresenta absorvâncias que se referem apenas às substâncias que se encontram nas amostras e que não se encontravam no "branco".

Os espectrofotómetros de feixe simples com capacidade digital também podem ser usados para a obtenção de espectros. O processo implica adquirir e guardar o espectro do "branco" dentro de um intervalo de comprimentos de onda. Esse espectro pode depois ser subtraído ao da amostra, para o mesmo intervalo de comprimentos de onda, obtendo-se como resultado apenas o espectro do soluto de interesse.

Os espectros de absorção UV-Vis como os da figura 4 são em geral gráficos que relacionam a absorvância com o comprimento de onda. Deve ser notado, no entanto, que de acordo com a equação 5 a variação de absorvância observada num rastreio de comprimentos de onda corresponde de facto à variação da absorvidade molar do soluto analisado em função do comprimento de onda, uma vez que a concentração c e o comprimento ℓ são constantes durante o rastreio.

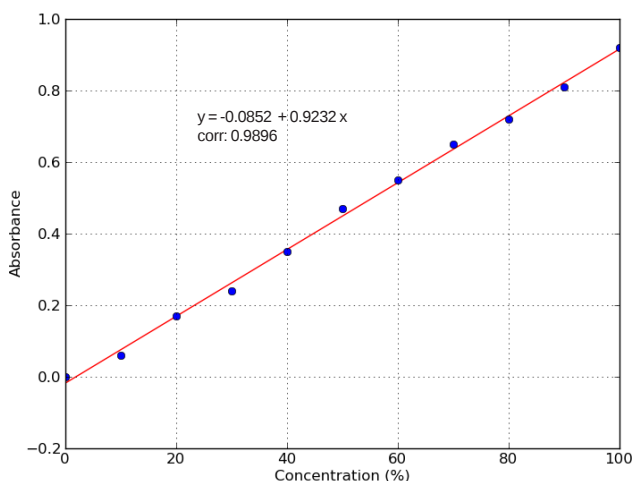


Figura 7 - Recta de calibração. Os pontos representam as leituras de absorvância para soluções de concentração conhecida, os padrões. A recta é obtida por regressão e deve passar muito perto do ponto (0,0), conforme $A = \epsilon \ell c$, se o branco for correctamente ajustado para absorvância zero. O declive da recta de regressão é uma determinação experimental de $\epsilon \ell$. Estas rectas são válidas apenas para o comprimento de onda usado nas determinações e para o intervalo de concentrações definido pelos padrões. A relação $A = \epsilon \ell c$ aplica-se tanto melhor aos dados experimentais quanto menor for a concentração c das soluções. O coeficiente de correlação da regressão linear é uma medida da precisão experimental.

Análise qualitativa

Muitos compostos biológicos absorvem luz no ultravioleta ou no visível. Estes compostos originam espectros de absorção característicos para um dado conjunto de condições. Cada espectro fornece informações não só respeitantes às ligações em que ocorre a promoção de electrões mas também relativamente à estrutura global do composto. No entanto, a baixa resolução destes espectros faz com que não sejam muito úteis para a análise estrutural de compostos complexos.

Análise quantitativa

Em Química, Bioquímica, Biologia Molecular e outras áreas científicas utiliza-se frequentemente a espectrofotometria no doseamento de vários tipos de compostos biológicos, usando a já referida lei de Beer-Lambert e recorrendo normalmente ao uso de uma recta padrão. Para tal prepara-se uma série de soluções de concentrações conhecidas da substância em análise e lêem-se as respectivas absorvâncias no espectrofotómetro ao comprimento de onda a que essa substância apresenta maior absorvidade molar. A partir destes valores é construída a recta padrão, como se exemplifica na figura 7. Esta prática permite assegurar que a linearidade esperada se observa de facto para o intervalo de concentrações pretendido. Tem ainda a vantagem de reduzir drasticamente os erros de extrapolação. Como as soluções padrão e as leituras de absorvância têm sempre erros experimentais inevitáveis, o uso de um único padrão, por exemplo, iria introduzir erros de extrapolação intoleráveis para amostras com absorvância diferente da do padrão (figura 8).

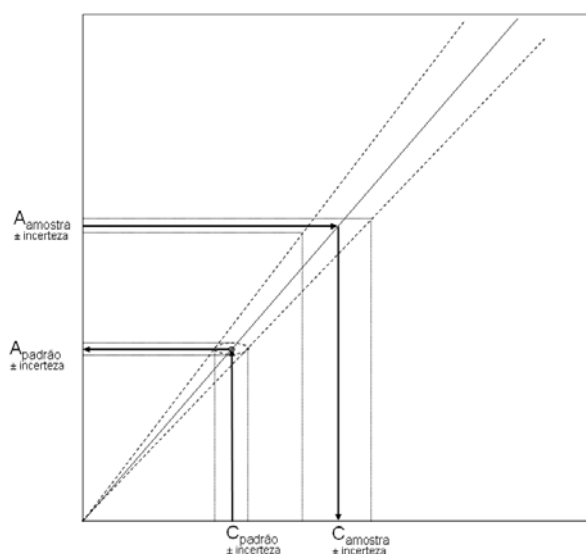
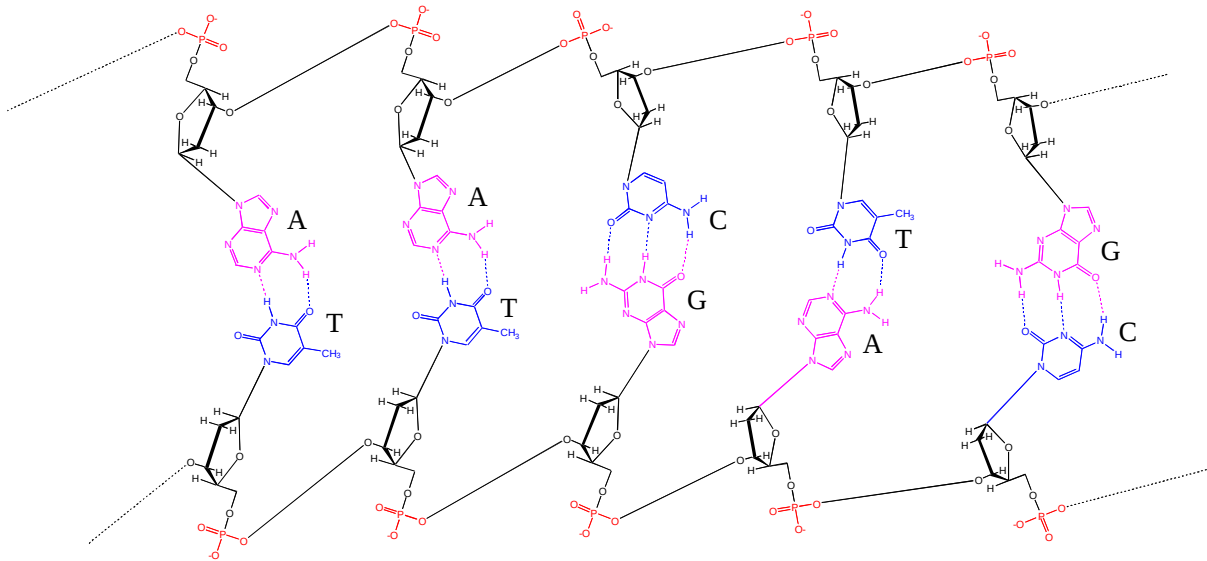


Figura 8 - Erros de extrapolação. Esta simulação mostra como a incerteza associada a um padrão se propaga e aumenta com o afastamento entre a concentração do padrão e da amostra. Assume-se que o ponto (0,0) não tem incerteza o que na prática não é verdade uma vez que o “branco” também é experimental e tem uma incerteza associada. Neste caso, o erro de extrapolação pode diminuir mas o erro de interpolação entre 0 e $C_{\text{padrão}}$ aumenta.

Figura 9 - Representação da cadeia dupla anti-paralela do DNA biológico. Esta conformação, bem como os comprimentos de ligação, não são realistas, apenas servem para ilustrar a forma mais vulgar de interacção entre os nucleótidos num ácido nucleico de cadeia dupla.



Para se saber qual é o comprimento de onda para o qual a substância a quantificar tem maior absorvidade molar pode fazer-se um varrimento ou rastreio (*scan*) da solução num intervalo de comprimentos de onda e escolher aquele que apresentar maior valor de absorvância. É necessário ter em conta que a lei de Beer-Lambert só é válida para um intervalo de valores de concentração, variável de composto para composto, e por isso apenas deve ser utilizada no intervalo em que se verifica a linearidade.

Estrutura do DNA

O DNA biológico é constituído por duas cadeias lineares de desoxirribonucleótidos ligados covalentemente (figura 9). As duas cadeias estão extensamente associadas por conjuntos estereoespecíficos de pontes de hidrogénio entre as bases. A molécula adopta uma conformação helicoidal em água devido ao facto das bases azotadas que fazem parte dos nucleótidos serem fundamentalmente hidrofóbicas. A conformação helicoidal mantém a parte hidrofílica da molécula, desoxirribose e fosfato, no exterior, em extensa interacção com a água, enquanto que a parte hidrofóbica, formada pelas bases, fica afastada da água (figura 10). As bases empilham no interior da hélice devido ao efeito hidrofóbico e a alguma interacção entre si do tipo van der Waals. Nos eucariotas, a cadeia dupla espiral de DNA espiraliza-se em torno de proteínas chamadas histonas e superespiraliza para formar os cromossomas.

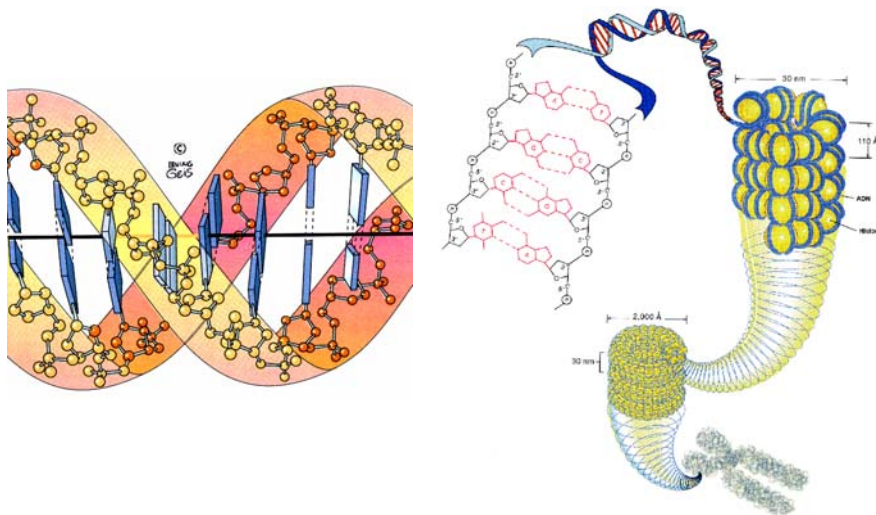
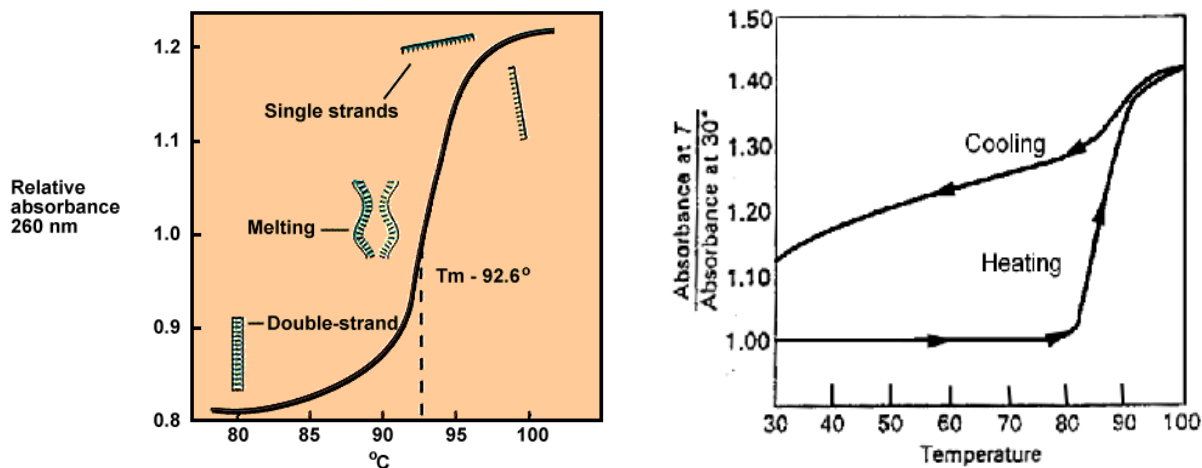


Figura 10 - Representações dos aspectos fundamentais da conformação nativa do DNA nas células. A espiralização (em cima) é a conformação que, em água, faz com que as bases hidrofóbicas interactuem entre si por empilhamento e não estejam tão expostas à água. A organização em cromossomas (ao lado) depende da presença das proteínas histonas (esferas amarelas) e é exclusiva das células eucarióticas.

Figura 11 - A variação da absorvância de soluções de DNA com a temperatura dá-se entre um mínimo, em que todos os nucleótidos estão emparelhados, e um máximo, em que todos estão desemparelhados. À temperatura de fusão, T_m , metade dos nucleótidos estão desemparelhados (esquerda). Se após a desnaturação por aquecimento de uma solução de DNA a deixarmos arrefecer, a absorvância diminui devido à reassociação das cadeias (direita). Quando se trata de cadeias de DNA natural com milhares de nucleótidos, a renaturação não é completa, por improbabilidade de reassociação de todos os pares de bases, e a absorvância não volta ao valor que tinha antes da desnaturação. A este fenómeno chama-se “histerese de reassociação”.



Aplicações da espectrofotometria de UV ao estudo de soluções de DNA

Todos os ácidos nucleicos exibem um máximo de absorvidade molar a 260 nm, o que permite fazer estudos quantitativos ou semi-quantitativos específicos. Um exemplo tem a ver com a determinação da contaminação de uma solução de DNA com proteínas. As proteínas têm absorvidades máximas a 230 nm e 280 nm e o rácio A_{260} / A_{280} de uma solução pura de DNA é de cerca de 1,9. Qualquer valor inferior a este indica uma possível contaminação da solução de DNA com proteínas pois estas vão contribuir para a absorvância a 280 nm e não a 260 nm. A absorvância a 260 nm é usada para quantificar a concentração em DNA, mediante a construção de uma recta padrão baseada na lei de Beer-Lambert (equação 5). A região linear da relação entre absorvância e concentração para os ácidos nucleicos situa-se abaixo do valor 1 para a absorvância.

A absorvância dos ácidos nucleicos em cadeia dupla aumenta quando se desfazem as ligações por ponte de hidrogénio entre cadeias. Este aumento de absorvidade a 260 nm é designado por “efeito hiperocrómico” e tem origem numa alteração da configuração das orbitais moleculares quando as pontes de hidrogénio não existem. O efeito hiperocrómico exprime-se normalmente em percentagem usando a equação 6.

$$\% \text{ efeito hiperocrómico do DNA} = 100 \times (A_{260}(\text{desnaturado}) - A_{260}(\text{nativo})) / A_{260}(\text{nativo}) \quad (6)$$

Estudo da desnaturação do DNA por UV

A desorganização da cadeia dupla do DNA pode ser alcançada de várias formas, entre as quais se conta o aquecimento. O aquecimento não é mais do que uma transferência de energia de natureza tal que o sistema receptor o armazena nos seus modos rotacionais, vibracionais e translacionais moleculares. Como alguns destes modos de maior energia são incompatíveis com as conformações moleculares presentes antes do aquecimento, algumas moléculas mudam de conformação e um novo equilíbrio entre estados conformacionais é atingido.

Uma forma de seguir as alterações conformacionais na molécula de DNA, nomeadamente a desassociação das cadeias, é usar o efeito hiperocrómico a 260 nm. A figura 11 mostra gráficos exemplificativos do aumento da absorvância de uma solução de DNA com o aumento da temperatura. A temperatura para a qual metade dos nucleótidos estão desemparelhados é chamada a “temperatura de fusão”, T_m , do DNA e depende do seu

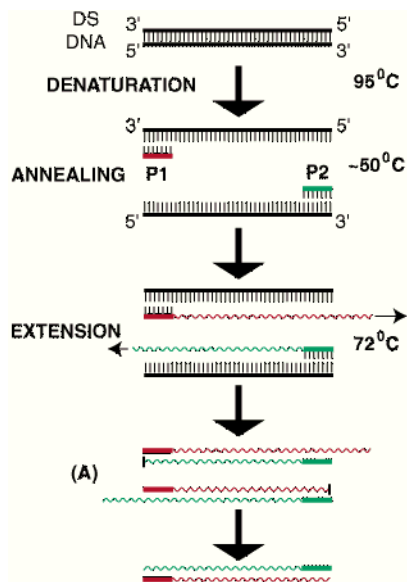
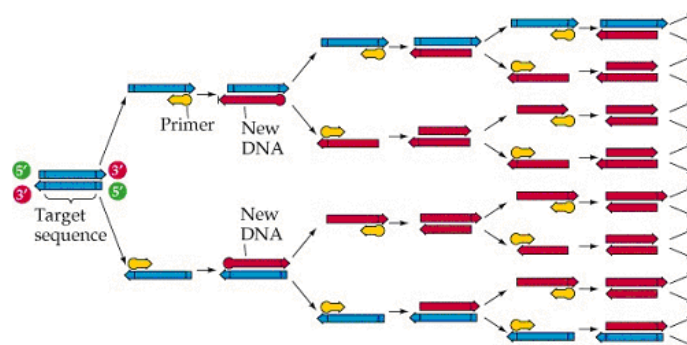


Figura 12 - Alternância entre cadeias duplas e simples necessária à replicação in vitro do DNA. Esta alternância é provocada pela alternância da temperatura da solução. Por cada alteração da temperatura a quantidade de DNA replicado duplica. Isto implica uma amplificação de 2^n em que n é o número de variações de temperatura.



tamanho e do seu conteúdo em nucleótidos. Maior tamanho implica mais pontes de hidrogénio e portanto maior quantidade de energia para as quebrar e logo maior temperatura de fusão. Já a dependência entre a temperatura de fusão e o conteúdo em nucleótidos prende-se com o facto dos pares GC formarem três pontes de hidrogénio enquanto que os pares AT formam apenas dois. Um conteúdo maior em pares GC implica assim mais pontes de hidrogénio por par de nucleótido e logo uma temperatura de fusão maior.

Há outros factores, para além do tamanho e do conteúdo em pares GC, que intervêm na temperatura de fusão do DNA. No protocolo laboratorial apresentado mais à frente estão previstas experiências que permitem observar o efeito da concentração de NaCl na desnaturação do DNA. A presença de cationes na solução de DNA estabiliza a sua conformação em cadeia dupla, por neutralizar algumas das cargas negativas existentes nos grupos fosfato, que são ácidos (figura 9). As amostras de DNA nas soluções mais concentradas em NaCl devem apresentar maior temperatura de fusão, por ser esperada maior estabilidade da conformação em cadeia dupla.

PCR e “primers”

Os oligómeros, ou oligonucleótidos, são pequenas cadeias de DNA com algumas unidades ou poucas dezenas de pares de nucleótidos. Estes ácidos nucleicos são importantes para a técnica conhecida como “*polymerase chain reaction*” (PCR) porque são um requisito indispensável à associação da enzima DNA polimerase ao DNA de onde se pretende replicar um determinado gene. Estes oligómeros, também chamados “*primers*”, são sintetizados com uma determinada sequência para que se associem ao DNA em locais específicos para a promoção da replicação de certos genes. Esta replicação é catalisada pela DNA polimerase, que só se associa ao DNA nas zonas onde os *primers* estão ligados (figura 12). A PCR baseia-se na alternância de temperatura da solução entre temperatura baixa, para a associação do “*primer*” e da DNA polimerase ao DNA, e temperatura alta, para a desassociação das cadeias recém-formadas. Para que a PCR seja eficaz é portanto importante conhecer certos parâmetros do *primer*, como a sua temperatura de fusão e as suas características de associação.

Equilíbrio de auto-associação de um oligómero auto-complementar seguido por UV

No Procedimento experimental é descrito um método que permite caracterizar o comportamento com a temperatura de um oligonucleótido auto-complementar. Para isso é registada a absorvância de uma solução micromolar do oligonucleótido a várias temperaturas. O modelo mais simples que pode descrever este fenómeno baseia-se no

princípio de que só há duas possibilidades para cada duas cadeias de oligonucleótidos: completamente emparelhadas ou completamente desemparelhadas. Este modelo de “tudo-ou-nada” não é válido para cadeias macromoleculares de DNA mas é válido para oligonucleótidos pequenos para os quais não se verifica a histerese de reassociação. A reacção que traduz este modelo é a equação 7:



onde C simboliza uma cadeia desemparelhada de oligonucleótido e C_2 uma cadeia dupla. A constante de equilíbrio e o balanço material para a reacção 7 são definidos pelas equações 8 e 9:

$$K = [C_2]_{eq} / [C]_{eq}^2 \quad (8)$$

$$[C]_{total} = 2[C_2]_{eq} + [C]_{eq} \quad (9)$$

onde $[C]_{total}$ é a concentração total, conhecida, em cadeias de oligómero, emparelhadas ou não. É possível também escrever uma expressão para absorvância observada, uma vez que esta é a média pesada das absorvâncias das cadeias emparelhadas, A_{min} , e desemparelhadas, A_{max} :

$$A = (2 A_{min} [C_2]_{eq} + A_{max} [C]_{eq}) / [C]_{total} \quad (10)$$

Através de algumas substituições entre as equações 8, 9 e 10 é possível deduzir uma expressão para a constante de equilíbrio em função das absorvâncias:

$$K = \frac{(A - A_{max}) / (A_{min} - A_{max})}{2 [C]_{total} ((A - A_{min}) / (A_{max} - A_{min}))^2} \quad (11)$$

Para se obter uma expressão que relaciona a absorvância com a temperatura é agora necessário utilizar as expressões que relacionam K com a temperatura, dadas pela Termodinâmica:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 = -RT \ln K \quad (12)$$

Manipulando o segundo e terceiro membro da equação 12 obtém-se a expressão

$$T = \Delta H^0 / (-R \ln K + \Delta S^0) \quad (13)$$

Substituindo a expressão 11 em 13 obtém-se uma função em que as variáveis relacionadas são a temperatura e a absorvância, como se pretendia:

$$T = \Delta H^0 / (-R \ln \frac{(A - A_{max}) / (A_{min} - A_{max})}{2 [C]_{total} ((A - A_{min}) / (A_{max} - A_{min}))^2} + \Delta S^0) \quad (14)$$

Esta função 14 é a expressão quantitativa do modelo químico e termodinâmico que se pretende que descreva os dados experimentais na forma temperatura/absorvância, e a sua aplicação é válida se se verificarem na

prática todas as hipóteses que foram postas para a sua dedução, nomeadamente, que cada molécula de oligonucleótido ou está completamente livre ou completamente associada a outra. Esta é a hipótese tudo-ou-nada na base da equação 7. É assumido também que os valores de ΔH^0 e de ΔS^0 não variam significativamente dentro do intervalo de temperaturas dos dados experimentais.

A função 14 tem sempre uma forma gráfica sigmoidal (semelhante à letra “S”), dado o modo como relaciona algebricamente as variáveis absorvância A e temperatura T , mas o tamanho e a localização gráfica do sigmoide será diferente conforme os valores das constantes ΔH^0 , ΔS^0 , $A_{\max}$, $A_{\min}$ e $[C]_{\text{total}}$. Estas constantes, chamadas parâmetros, são características do composto cuja associação se está a estudar. Cada oligonucleótido, por exemplo, dependendo do seu tamanho, sequência e conteúdo em nucleótidos tem os seus valores específicos dos parâmetros termodinâmicos ΔH^0 e ΔS^0 , e dos parâmetros espectrofotométricos $A_{\max}$ e $A_{\min}$. Todos estes parâmetros são também uma função da força iónica. O valor do parâmetro concentração, $[C]_{\text{total}}$, é normalmente conhecido à partida.

Uma outra forma da função 12 é

$$\ln K = (-\Delta H^0/R) (1/T) + \Delta S^0/R \quad (15)$$

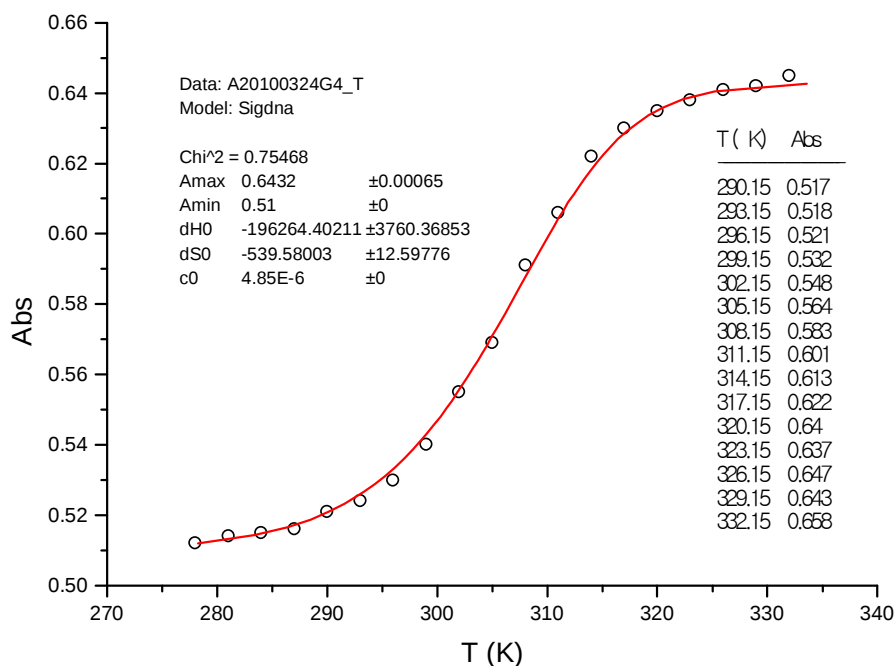
Esta função tem a vantagem, relativamente à função 14, de ser linear para as variáveis $\ln K$ e $1/T$. No entanto exige que sejam pré-determinados os valores de $A_{\max}$ e $A_{\min}$, em experiências nos limites de alta e de baixa temperatura, respectivamente. Estes parâmetros, juntamente com a variável A , permitem calcular K pelo que a expressão 15 fica apenas com dois parâmetros a determinar: ΔH^0 e ΔS^0 .

O modo de determinar os valores dos parâmetros de uma função modelo é obter valores experimentais para as suas variáveis e depois encontrar, usando, por exemplo, aproximações sucessivas, os valores dos parâmetros que melhor permitem ajustar os valores da função a esses valores experimentais. Esta técnica é conhecida como regressão. O exemplo mais vulgar de regressão é a regressão linear, onde a função a ajustar às variáveis experimentais descreve graficamente uma recta. A expressão geral da relação linear entre variáveis é $y = a + bx$, onde x e y são as variáveis e a e b são parâmetros. Os exemplos de funções modelo lineares são inúmeros, como a lei de Beer-Lambert (equação 5) onde A e c são as variáveis e ϵ e ℓ são os parâmetros. A equação 15 é outro exemplo, já discutido acima. O método de determinação dos parâmetros varia consoante a função modelo é linear ou não mas o critério de ajuste é normalmente o dos mínimos quadrados. Para uma função modelo geral $y = f(x, a, b, c, \dots)$, onde x e y são as variáveis e a, b, c , etc, são os parâmetros, procuram-se os valores destes que minimizam a função soma S do quadrado das diferenças entre os valores da função modelo $y_i = f(x_i, a, b, c, \dots)$ e os valores $y_{i,\text{exp}}$ obtidos experimentalmente (variável dependente), para os mesmos valores x_i (variável independente):

$$S = \sum_i (y_i - y_{i,\text{exp}})^2 \quad (16)$$

Um exemplo concreto do resultado do ajuste da função 14 a valores experimentais é apresentado na figura 12. As unidades de ΔH^0 e de ΔS^0 são derivadas das unidades usadas para a constante R . Na prática laboratorial a temperatura é a variável independente (aquela que se escolhe) e a absorvância será a variável dependente (aquela que se mede). Para efeito do método de regressão, no entanto, é irrelevante que a equação 14 não esteja resolvida em ordem à variável experimentalmente dependente, A , algo que até não é fácil de conseguir. Como para todas as regressões, também é irrelevante a ordem pela qual se obtêm experimentalmente os pares de valores (T, A) . É de notar que estes pares não correspondem a nenhum processo em particular mas sim a estados de equilíbrio independentes e isso mesmo está explícito na dedução da equação 14. Esta equação foi

Figura 13 - Exemplo do resultado da regressão da função 14 sobre os valores experimentais da tabela incluída à direita no gráfico, obtida por um grupo de alunos. A função 14 (linha a vermelho) que melhor se ajusta aos pontos experimentais (circunferências a preto) é a que contém os valores de parâmetros que estão na tabela do lado esquerdo do gráfico. Verifica-se que a função se ajusta bem à globalidade dos pontos, embora se afaste um pouco em duas zonas. Como os erros aleatórios são pequenos, isto pode ser interpretado como resultado de um erro experimental sistemático ou como resultado da não completa verificação material das hipóteses postas para a dedução da função modelo.



deduzida com base na equação química 7 e por isso os parâmetros obtidos por regressão da equação 14 correspondem à equação química 7, exactamente no sentido em que está expressa, independentemente da ordem e do método pelos quais foram obtidos os valores experimentais (T, A).

Considerando o modelo tudo-ou-nada da equação 7, define-se temperatura de fusão, T_m , como a temperatura à qual metade das cadeias simples estão emparelhadas, o que se pode exprimir algebricamente pela igualdade

$$2[C_2]_{eq} = [C]_{eq} \quad (17)$$

A partir das equações 8, 9, 13 e 17 é trivial deduzir uma expressão para T_m em função de ΔH^0 , ΔS^0 e $[C]_{total}$, expressão essa que não é mais do que um caso particular da equação 14 quando se verifica a equação 17.

Protocolo laboratorial

Material

- Placa para agitação
- Espectrofotómetro UV
- Sensor de temperatura ou termómetro
- Cuvete UV descartável com tampa
- Parafilm
- Flutuador para cuvete
- Pipeta automática 1 ml

Papel absorvente
Banho de água a ferver
Gelo

Reagentes

Solução aprox. $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ($5 \mu\text{M}$) de um oligonucleótido autocomplementar de DNA com a sequência 5'-ATATCGATAT-3' (Stabvida) em tampão PBS com concentração de NaCl 0,100 M ou 0,154 M

Solução tampão PBS (0,154 M em NaCl, 0,01 M em fosfato de sódio, pH 7,4) ou

Solução tampão PBS (0,100 M em NaCl, 0,01 M em fosfato de sódio, pH 7,4)

Procedimento

- 1 - a) Encaixe um tipo na pipeta automática e meça 1 ml da solução tampão PBS para uma cuvete UV descartável. Anote a concentração de NaCl da sua solução PBS.
b) Informe-se junto do docente sobre qual o espectrofotómetro que deve utilizar e se está ajustado para leituras a 260 nm.
c) Limpe bem a cuvete com um papel macio (elimine dedadas). Informe-se junto do docente sobre a orientação correcta da cuvete e introduza-a no local apropriado no espectrofotómetro até bater no fundo. Feche a tampa. A leitura aparece automaticamente no mostrador.
d) **ANTES DE CARREGAR EM QUALQUER BOTÃO DO ESPECTROFOTÓMETRO** informe-se junto do docente sobre se já alguém o ajustou a zero de absorvância. Se não, ajuste a absorvância a zero com a solução de PBS que introduziu no espectrofotómetro. Se sim, simplesmente anote a absorvância da sua solução de PBS (o valor obtido pode ser negativo porque depende da cuvete). Este valor deverá ser subtraído posteriormente às leituras obtidas da amostra com oligonucleótido.
- 2 - Peça ao docente que lhe forneça um microtubo contendo solução de oligonucleótido. Informe-se sobre a sua concentração exacta em oligonucleótido e verifique que a concentração de NaCl desta solução é a mesma da solução tampão PBS que usou no passo 1.
- 3 - Esvazie a cuvete da solução de PBS, escorra-a bem e transfira para o seu interior, com pipeta automática, a totalidade (1 ml) de solução de oligonucleótido. Tape a cuvete com um pequeno quadrado de Parafilm e encaixe uma tampa por cima. Fixe a tampa rodeando-a com mais Parafilm.
- 4 - Leia a absorvância da amostra à temperatura ambiente.
- 5 - Encha até meio a bacia de plástico com água fria da torneira e mergulhe o agitador magnético. Pouse a bacia sobre o centro da placa e ligue a agitação, ajustando para uma velocidade moderada. Mergulhe na água a ponta da sonda de temperatura.
- 6 - Insira a cuvete no flutuador até meio e pouse-o sobre a água dentro da bacia. Encoste-o à sonda de temperatura para que não rode.
- 7 - Adicione gelo **LENTAMENTE** (para dar tempo a que o equilíbrio se vá ajustando) com a ajuda da caneca de plástico até que a temperatura se situe entre os 4 e os 5 °C.
- 8 - Aguarde 10 minutos mantendo a temperatura do banho estabilizada num valor à escolha entre 4 e 5 °C.

9 - Anote a temperatura do banho e, **RAPIDAMENTE**, ...

- a) Retire a cuvete do flutuador e leve-a para junto do espectrofotómetro.
- b) Seque com papel absorvente, em duas passagens, as faces por onde deve passar o feixe de luz.
- c) Introduza imediatamente a cuvete no espectrofotómetro e feche a tampa.
- d) Leia o primeiro valor de absorvância apresentado logo após fechar a tampa.
- e) Se a solução estiver abaixo dos 15 °C repita rapidamente as alíneas b), c) e d) várias vezes e aproveite a leitura mais baixa de todas.

NOTA: as repetições são necessárias dado que enquanto o banho estiver a menos de 15 °C a cuvete irá embaciar, o que compromete a leitura. À temperatura ambiente e a temperaturas superiores não é necessário fazer várias leituras. A temperaturas altas a rapidez de leitura é essencial e a primeira leitura, se forem feitas várias, deve dar o valor mais alto, que é o pretendido.

10 - Reinsira a cuvete no flutuador e mergulhe-a na bacia. Com a caneca de plástico, adicione lentamente água quente à bacia (retire-a de um banho com água a ferver) de modo a que a temperatura suba cerca de 3 °C. Conserve a nova temperatura durante 5 minutos juntando gelo, água fria ou água quente conforme necessário. **NOTA:** se a bacia contiver demasiada água retire alguma usando a caneca.

11 - Repita os passos 9 e 10 até atingir uma temperatura entre 58 e 60 °C.

12 - Quando terminar informe-se junto do docente sobre como proceder relativamente à limpeza e arrumação da bancada e do material.

Tratamento e apresentação de resultados

NOTA: respeite as regras relacionadas com algarismos significativos.

1 - Peça ajuda ao docente para introduzir os seus dados experimentais no programa de computador onde vai ser feita a regressão não-linear com base na função 14 da Introdução. Posteriormente, junte ao relatório o gráfico e os resultados da regressão fornecidos pelo programa.

2 - Determine a expressão analítica que permite calcular a temperatura de fusão T_m do oligómero. Calcule essa temperatura para os parâmetros obtidos no ponto 1.

3 - Anote os resultados obtidos pelos outros grupos da sua turma.

4 - Comente os resultados do seu grupo relativamente aos resultados obtidos pela turma, nomeadamente, para cada concentração de NaCl, a temperatura de fusão, os erros dos parâmetros, as médias de ΔH^0 e de ΔS^0 e seus desvios padrão, os sinais de ΔH^0 e de ΔS^0 , os seus valores de ΔH^0 e de ΔS^0 relativamente à média, os valores de qui-quadrado para as regressões e as diferenças $Abs_{max} - Abs_{min}$ observadas para o conjunto de resultados. Discuta o efeito da concentração de NaCl sobre os valores obtidos.

NOTA: os parâmetros cujo valor se manteve fixo durante a regressão aparecem com um erro " ± 0 " nos resultados. Isso é natural para a concentração de oligonucleótido, que é conhecida. Por vezes, para facilitar a convergência da regressão quando o conjunto de dados tem alguma falha, o docente pode bloquear o ajuste dos parâmetros A_{min} ou A_{max} durante a regressão, ajustando-os manualmente, pelo que podem aparecer também assinalados com um erro " ± 0 ".