

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE FÍSICA

TESE DE DOUTORADO

**ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA DE VÁCUO EM
SOLUÇÕES AQUOSAS**

ÁDERSON MIRANDA DA SILVA

Brasília, 6 de maio de 2014

TESE DE DOUTORADO

**ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA DE VÁCUO EM
SOLUÇÕES AQUOSAS**

ÁDERSON MIRANDA DA SILVA

Orientador:

Arnaldo Naves de Brito

Co-orientadora:

Alexandra Mocellin

Brasília, 6 de maio de 2014

“Espectroscopia Eletrônica de Vácuo em Soluções Aquosas”

Por

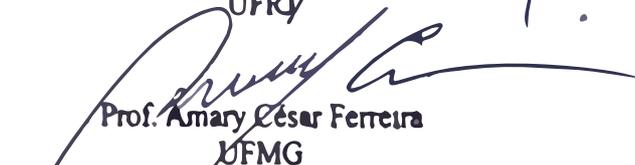
Áderson Miranda da Silva

Tese submetida ao Instituto de Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Física.

Aprovada por.


Prof. Amaldo Naves de Brito
UNICAMP


Prof. Eduardo Chaves Montenegro
UFRI


Prof. Amary César Ferreira
UFMG


Prof. Geraldo José da Silva
IF/UnB


Prof. Leticia Gonçalves Nunes Coelho
IF/UnB

Prof. Dr. Demétrio Antônio da Silva Filho
Coordenador de Pós-Graduação
Instituto de Física

“Não é raro, no mundo moderno, nos sentirmos derrotados. Mas a aventura da esperança nos leva além. Um dia eu encontrei escrito sob um calendário estas palavras: «O mundo é de quem o ama e sabe melhor dar prova disso». Quanto são verdadeiras estas palavras! No coração de cada pessoa existe uma infinita sede de amor e nós, com o amor que Deus infundiu nos nossos corações, podemos saciá-la”

François Xavier Nguyen van Thuân

AGRADECIMENTOS

“Deo omnis gloria” – “Totus tuus”

A minha família por todo o apoio e dedicação nestes quatro anos. Acredito que vocês torceram muito por mim, mais que eu mesmo. Aos estimados amigos que tanto me ajudaram nesta trajetória, não citarei nenhum nome para não correr o risco de ser injusto com ninguém.

Em física experimental é praticamente impossível realizar algo sozinho, esta tese é fruto do grande esforço de um enorme time. Agradeço de modo particular ao Prof. Dr. Arnaldo Naves de Brito e a Prof. Dra. Alexandra Mocellin pela dedicação em me orientar e pelas inúmeras discussões que foram extremamente produtivas durante o doutorado. Ao professor Ölle Bjornholm, pelo convite para participar de experimentos do laboratório Max-Lab em Lund, na Suécia, pelas conversas tão esclarecedoras com o Dr. Gunnar Öhrwall a respeito do espectrômetro Scienta e finalmente, ao Dr. Nicklas Ottoson pelas discussões sobre o livre caminho médio inelástico. Não posso deixar de citar o árduo trabalho do grupo do Departamento de Física da Universidade Federal da Bahia - UFBA, em especial, aos professores Ricardo Marinho e Aline Medina e ao doutorando Álvaro Nunes que foram grandes colaboradores do projeto. Recentemente, ao professor Fábio Zappa por ter se unido ao grupo como um novo colaborador.

Também me ajudaram os alunos de iniciação científica Gabriel Diniz e Carmem Gilardoni, seria injusto não dar créditos a ajuda deles. Agradeço a amizade e ajuda da Prof. Dra. Maria Suely Mundim nestes seis anos de convívio no laboratório.

Agradeço ao corpo docente da Universidade de Brasília, aos funcionários do IF e a todos os meus amigos e colegas no doutorado. Também a todos os funcionários do LNLS, de modo especial, ao Paulo de Tarso, ao Gustavo, ao Horácio, a Dayane e a Camili que se preocuparam tanto em nos fornecer o melhor ambiente e as melhores condições de trabalho possíveis.

Ao CNPq pela bolsa concedida em parte do doutorado. A FAP-DF, A FINEP e a FAPESP por substancial suporte financeiro para construção e compra de equipamentos utilizados nesta tese.

RESUMO

Nesta tese, descrevemos as propriedades a nível molecular da superfície (PNMS) de diferentes soluções aquosas, estudadas por espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), usando a técnica de micro-jato. Estes são os primeiros resultados obtidos pelo grupo de Espectroscopia Eletrônica da Universidade de Brasília (LEE-UnB), nesta área, em colaboração com outros pesquisadores. No corpo da tese encontramos quatro diferentes estudos: 1) Deslocamentos químicos no espectro de XPS para avaliar as formas iônicas em soluções aquosas com diferentes pH. 2) Utilizando-se da sensibilidade superficial da espectroscopia de XPS, estudamos a distribuição de solutos, próximos a interface da solução. 3) Observamos a razão não estequiométrica de uma solução para uma ampla faixa de energia de fótons. 4) Estudamos o comportamento de um composto muito usado como tampão em química e biologia, em função da sua concentração.

Estudamos, pela primeira vez, as PNMS dos dois únicos aminoácidos essenciais que contêm enxofre (Cisteína e Metionina). Obtivemos os deslocamentos químicos da energia de ligação e alargamento nas bordas do C1s, N1s e S2p na Cisteína (HSCH₂CH(NH₂)COOH)_{aq} e Metionina (CH₃SCH₂CH₂CH(NH₂)COOH)_{aq} aquosas em função da mudança do pH da solução. Mostramos que a Cisteína apresenta um padrão complexo de protonação mesmo se considerarmos apenas o corpo (*bulk*) da solução. A partir da análise do espectro de XPS da Cisteína aquosa observamos que o pH de uma solução aquosa contendo biomoléculas de interesse não varia entre o corpo da solução e a superfície, apesar de estudos anteriores em água pura apontarem para um pH mais ácido presente na superfície molecular do líquido. Apesar desta constatação isotrópica de pH, observamos uma mudança drástica na concentração de duas espécies protonadas entre o *bulk* e a superfície no pH 9,5. Explicamos o fenômeno com base em um modelo simples. Comparamos as bordas do S2p e do N1s e encontramos que as formas neutras dos grupos (SH e NH₂) são mais propensas a superfície da solução do que as formas carregadas (SH⁺ e NH₃⁺). Estes resultados são importantes e podem ter um grande impacto na compreensão das questões ambientais, como a química de superfície em aerossóis atmosféricos, química da membrana celular e aprisionamento de gases nocivos por soluções aquosas.

Realizamos estudos das intensidades do sinal do S2p da solução aquosa de Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) em função da energia dos fótons. Observamos que o espectro obtido se assemelha a um espectro de EXAFS, com oscilações que diminuem de amplitude na medida em que se aumenta a energia dos fótons. Concluímos que as oscilações observadas ocorrem devido à interferência dos fotoelétrons ejetados que podem ou não colidir com os átomos vizinhos, o que produz uma modulação na seção de choque de fotoionização, a qual precisa ser considerada na análise quantitativa dos espectros de XPS.

Analisamos o comportamento da borda P2p do íon dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-) em função da concentração das soluções aquosas de NaH_2PO_4 e observamos que a intensidade dos picos cresce linearmente na faixa de concentrações estudada.

Palavras-chave: PES, superfície líquida, interface líquido-gás, interface líquida, bulk líquido, cisteína, Metionina, fosfato monossódico, tiosulfato de sódio, PEXAFS, micro-jato, XPS, pH da interface líquida, seção de choque de fotoionização da solução, pH.

ABSTRACT

This thesis describes the properties at the molecular level of surfaces (PMLS) for different aqueous solutions. These properties are probed by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), using the micro-jet technique. These are the first results, for aqueous solutions, obtained by the group of Electron Spectroscopy at the University of Brasilia (LEE/UnB), in collaboration with other researches. We performed in this thesis four different studies. First, we explored the chemical shifts in the XPS spectra to probe the chemical states in aqueous solutions with different pHs. Second, we explored the surface sensitivity of the XPS spectroscopy to study the distribution of solutes near the solution surface. Third, we observed the nonstoichiometric intensities in a core photoelectron spectroscopy of a solution for a wide range of photon energies. Fourth, we studied a compound very used as buffer in chemistry and biology, to verify its behavior in function of solute concentration.

We studied, for the first time, the PMLS of two essential amino acids containing sulfur: Cysteine and Methionine. The XPS chemical shifts and line broadening of the C1s, N1s and S2p levels were obtained for the aqueous Cysteine (HSCH₂CH(NH₂)COOH)_{aq} and aqueous Methionine (CH₃SCH₂CH₂CH(NH₂)COOH)_{aq} as a function of the solution pH. Cysteine has a complex pattern of protonation even if only the bulk solution is considered. From the analysis of the XPS spectrum of the aqueous Cysteine, we reached to the conclusion that the pH of an aqueous solution containing biomolecules does not vary from bulk and surface regions. This was surprising since previous studies suggested that pure water is more acid at molecular surface. Despite the fact that the pH is isotropic in the solution, we observed a dramatic change in concentration of two protonated species between bulk and surface. We formulated a simple model to explain this change. By comparing the S2p and N1s levels we found that neutral fragment forms (SH and NH₂) show enhanced surface propensities than the charged forms (S⁺ and NH₃⁺). The results are important and can have a great impact on the understanding of environmental issues, such

as, surface chemistry in atmospheric aerosols, cell membrane chemistry and trapping of harmful gases by aqueous solutions.

We performed studies on the intensities of the S2p level of Sodium Thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) solution as a function of the photon energy. The spectrum obtained resembles EXAFS oscillations with decreasing amplitude as the photon energy increases. The observed oscillations are due to the interference of the ejected photoelectrons scattered, or not, by neighboring atoms. This interference produces a modulation in the photoionization cross section that should be considered in the quantitative analysis of the XPS spectra of a vast number of aqueous solutions.

We studied the behavior of the P2p level of dihydrogenphosphate ion ($\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$) as a function of the aqueous solutions concentration (NaH_2PO_4). We observed that the peak intensity increases linearly in the concentration range studied.

Keywords: *PES, liquid surface, liquid gas interface, liquid interface, liquid bulk, cysteine, methionine, sodium monophosphate, sodium thiosulfate, PEXAFS, micro-jet, XPS, pH liquid interface, photoionization cross section of solution, buffer, pH.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. CARACTERÍSTICAS DO SOLVENTE UNIVERSAL: A ÁGUA LÍQUIDA.....	04
2.1 A molécula de água (H ₂ O)	05
2.1.1 As ligações de hidrogênio e o dipolo elétrico na água líquida.....	06
2.1.2 Aminoácidos em meio aquoso	08
3. ASPECTOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS.....	11
3.1 Espectroscopia de Fotoelétrons.....	11
3.1.1 Fotoionização, fotoabsorção e processos de relaxação.....	12
3.1.2 Livre Caminho Médio Inelástico (IMFP) e Comprimento de Atenuação Efetiva (EAL).....	15
3.2 Aspectos da Técnica de Micro-Jato.....	20
3.3 Radiação Síncrotron, LNLS e Linha PGM.....	22
3.4 Analisador hemisférico de elétrons.....	26
3.5 Interpretação e ajuste dos espectros.....	29
3.6 Descrição do aparato experimental	30
3.7 Preparação das amostras	32
3.8 Alinhamento do micro-jato.....	33
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Deslocamentos químicos induzidos pela variação do pH na Metionina e Cisteína.....	37
4.1.1 Metionina.....	38
4.1.2 Cisteína.....	45

4.2 Assimetrias na distribuição das formas iônicas da Cisteína entre o <i>bulk</i> e a superfície da solução aquosa.....	55
4.3 - Distribuição não estequiométrica do sinal de fotoelétrons do nível S 2 <i>p</i> na solução aquosa de tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃).....	69
4.4 - Efeito da concentração do soluto na solução aquosa de fosfato monossódico (NaH ₂ PO ₄).....	75
5. CONCLUSÕES.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
Artigos.....	94

LISTA DE SIGLAS

E_b – *Binding Energy* – Energia de Ligação

E_c – Energia Cinética

EXAFS – *Extended X-ray Absorption Fine Structure*

FWHM – *Full Width at Half Maximum*

HPLC – *High-performance Liquid Chromatography*

IMFP – *Inelastic Mean Free Path* – livre caminho médio inelástico

EAL – *Elastic Attenuation Length* – comprimento de atenuação elástica

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K_a – Constante de acidez

k_b – Constante de Boltzmann

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

MCP – *Micro Channel Plates* – placas de multicanais

P.A. – Padrão Analítico

PCI – *Post-Collision Interaction* – interação pós-colisão

PES – *Photoelectron Spectroscopy* – espectroscopia de fotoelétrons

PEXAFS – *Photoelectron EXAFS*

PGM – *Planar Grating Monochromator* – monocromador de grade plana

pH – Potencial de hidrogeniônico

$\text{p}K_a$ – Logaritmo negativo da Constante de Acidez (K_a)

PNMS – Propriedades a Nível Molecular da Superfície

QM/MM – *Quantum Mechanics / Molecular Mechanics*

R_{espec} – Raio do espectrômetro

R_{jato} – Raio do micro-jato

SPANCF – *Curve Fitting Macro Package for Igor*

XAFS – *X-ray Absorption Fine Structure* – Estrutura fina de absorção de raios X

XPS – *X-ray Photoelectron Spectroscopy* – Espectroscopia de fotoelétrons de raios X

ΔE_{ond} – Incerteza do fóton

ΔE_{out} – Incerteza espectral devido a outras contribuições físicas

ΔE_{Sci} – Largura devido ao analisador

ΔE_t – Resolução total dos picos

ΔKS – Δ Kohn-Sham

SCF – Self Consistent Field – Campo auto-consistente

LEE – Laboratório de Espectroscopia Eletrônica

UnB – Universidade de Brasília

HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital*

LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

u.m.a – unidades de massa atômica

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Orbitais moleculares da água. Cada orbital molecular é combinação de orbitais atômicos dos átomos hidrogênio e oxigênio.

Figura 2.2: Transporte de íons na água líquida facilitado pelas ligações de hidrogênio. (P. Needham *et al.* [45]).

Figura 2.3: Estrutura de informação do soluto com a água *via* interação dipolar. A figura foi retirada do artigo de B. Cabane *et al.* [50].

Figura 2.4: Formas iônicas da Cisteína (*parte superior*) e da Metionina (*parte inferior*) em função do pH da solução aquosa. Na parte superior de ambos os diagramas indica-se a carga das formas iônicas. Os pK_a estão indicados. Nestes valores, quando o pH se iguala ao pK_a , a concentração das espécies adjacentes ao símbolo se iguala. Nos pH indicados é possível maximizar a forma iônica superior.

Figura 3.1: Exemplos de alguns processos radiativos e não radiativos de relaxação eletrônica.

Figura 3.2: (a) Ilustração do comprimento de atenuação efetiva (EAL) e do livre caminho médio inelástico (IMFP) em um meio. Esquerda e Direita: muitos e poucos eventos de espalhamento, respectivamente. $I(A)$ é intensidade de elétrons de um ponto de partida A e $I(B)$ é intensidade atenuada em um ponto de chegada B (*adaptação da referência* [63]). (b) comprimento de atenuação efetiva (EAL). Pontos em vermelho são o EAL para a água líquida (*adaptação da referência* [63, 64]).

Figura 3.3: Efeito do aumento da energia dos fótons na capacidade de explorar monocamadas mais internas da superfície líquida. A esquerda se observa a relação entre o

EAL e a energia cinética do fotoelétron ejetado. A direita observamos um esboço teórico da curva de atenuação do sinal de fotoelétrons em função da profundidade z .

Figura 3.4: Corte do micro-jato líquido com três regiões identificadas: em (I) vemos o caroço líquido que contém o *bulk* e a interface líquido-vapor, em (II) a região de vapor e em (III) a região de regime de campo molecular ($IMFP \gg d$). O corte transversal do *skimmer* está desenhado em vermelho na figura.

Figura 3.5: Esquema do ondulador magnético: a posição dos magnetos faz um *zig-zag* com os elétrons fazendo-os emitir radiação coerente com intensidade de fótons muito maior que as dos ímãs de dipolo. Na parte inferior da figura, apresentamos a resolução calculada da linha de luz U11-PGM do LNLS em função da energia dos fótons, como consta em Cezar, J. C. *et al.* [72].

Figura 3.6: Analogia entre a transformada de Fourier e o espectro de distribuição em energia para um ondulador e um ímã de dipolo.

Figura 3.7: Esquema da linha de luz PGM – EPU50: ondulador APPLE II com 50 mm de período; E1: espelho toroidal colimador; E2: espelho plano monocromador; G: grade plana VLS; FS: fenda de saída; E3a, E3b: espelhos refocalizadores toroidais para cada braço da linha de luz, como consta em Cezar, J. C. *et al.* [72].

Figura 3.8: Esquema de um analisador hemisférico de elétrons: destacam-se as regiões onde ocorrem a interação com os fótons, a focalização dos elétrons realizadas pelas lentes e a região de campo entre os dois hemisférios. Elétrons com energia cinética T_0 partem do ponto A e atingem o ponto diametralmente oposto A'.

Figura 3.9: Aparato experimental para a espectroscopia de elétrons em líquidos: (1) analisador de elétrons Scienta R4000, (2,4) sistema de bombeamento com bombas turbo, (3) câmara principal de medidas, (3a) *skimmer* que auxilia no bombeamento diferencial, (3b) bico injetor de quartzo, (5) armadilha de nitrogênio líquido que funciona como bomba criogênica, (6) armadilha de nitrogênio líquido que funciona como bomba criogênica e armazena o líquido congelado após as medidas, (7) câmara de monitoramento do perfil de gelo, (8) quebrador de gelo.

Figura 3.10: Detalhe do micro-jato (diâmetro do jato < 18 μm). É possível observar uma região de fluxo contínuo (escura) e uma outra região formada por gotículas (branca). As medidas são realizadas com o feixe de fótons incidindo sobre a região escura.

Figura 3.11: Detalhe do alinhamento do micro-jato com a entrada do *skimmer* e com o feixe de fótons.

Figura 3.12: Espectro de valência da água líquida com o micro-jato numa posição otimizada (curva em preto) e não otimizada (curva em vermelho). Enquanto o orbital $1b_1$ é característico da fase líquida, o orbital $1b_{1g}$ é referente ao orbital de valência característico da fase gasosa da água. Os outros dois picos são compostos pela contribuição gasosa e líquida da água (orbitais de fase gasosa são indicados pelo subscrito “g”). Maximizando o sinal proveniente do orbital $1b_1$, maximizamos o sinal de fotoelétrons da água líquida. No quadrado dentro do gráfico, vemos o detalhe do alinhamento do micro-jato com a entrada do *skimmer* e com o feixe de fótons.

Figura 4.1: Analogia entre a superfície de uma proteína e a interface líquido-vácuo [81].

Figura 4.2: Três diferentes estados de carga para a Metionina aquosa em função do pH.

Figura 4.3: Espectro de fotoelétrons da Metionina na borda do C1s para diferentes pH com fótons de $h\nu = 342,3$ eV. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico. A cor da linha do pico se refere ao grupo ou átomo de mesma cor.

Figura 4.4: Espectro de fotoelétrons da Metionina na borda do N1s para diferentes pH com fótons de $h\nu = 463,6$ eV. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico.

Figura 4.5: Espectro de fotoelétrons da Metionina na borda do S2p para diferentes pH com fótons de $h\nu = 237,6$ eV. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico.

Figura 4.6: Concentração das formas iônicas da Cisteína em função do pH do meio aquoso.

Figura 4.7: Espectro de fotoelétrons da Cisteína na borda do C1s para diferentes pH (1,0; 5,0; 9,5 e 12,5) obtidos com fótons de energia, $h\nu = 342,3$ eV. As formas iônicas à direita

são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico. A cor da linha do pico se refere ao grupo ou átomo de mesma cor.

Figura 4.8: Espectro de fotoelétrons da Cisteína na borda do N1s para diferentes pH (1,0; 5,0; 9,5 e 12,5) obtidos com fótons de energia, $h\nu = 463,6$ eV. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico.

Figura 4.9: Espectro de fotoelétrons da Cisteína na borda do S2p para diferentes pHs (1,0; 5,0; 9,5 e 12,5) obtidos com fótons de energia, $h\nu = 237,6$ eV. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico.

Figura 4.10: Curva de titulação da Cisteína na região de pH 6 a 13. Figura baseada nos resultados de Dixon *et al.* e Benesch *et al.* [58, 92].

Figura 4.11: Espectro de fotoelétrons da Cisteína aquosa (pH 9,5) na borda N1s para duas energias de fótons diferentes. Os picos foram normalizados pela amplitude do pico referente ao nível N1s do NH₂.

Figura 4.12: Espectro de fotoelétrons da Cisteína aquosa (pH 9,5) na borda S2p para duas energias de fótons diferentes. Os picos foram normalizados pela amplitude do pico referente ao nível S2p_{3/2} do grupo S⁻.

Figura 4.13: Distribuição da concentração de espécies da Cisteína aquosa, evidenciando duas regiões de pH diferentes em torno de 9,5, uma mais ácida e outra mais básica.

Figura 4.14: Sinal do O1s *versus* energia cinética do fotoelétron ejetado e também porcentagem de sinal detectado exclusivamente da superfície *versus* energia de fótons $h\nu$. Esta figura é extraída de comunicação privada do Dr. Bernd Winter [98], mas parte do resultado apresentado consta no artigo [99], com exceção da porcentagem de sinal da superfície (*com adaptações*).

Figura 4.15: Formas iônicas da Cisteína mais abundantes no pH 9,5.

Figura 4.16: Explicação dos efeitos observados na superfície e no *bulk* da solução aquosa de Cisteína.

Figura 4.17: Curvas da razão das intensidades do $C_{Cl}1s/C_H1s$ versus energia de excitação do artigo de Söderström *et al.* [103].

Figura 4.18: Tiosulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3$) dissociado em água. Esferas amarelas representam os enxofres, vermelhas os oxigênios e roxas os íons sódio.

Figura 4.19: Espectro de fotoelétrons da borda $S2p$ do Tiosulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3$) dissolvido em água a 0,75 M, com energia de fótons de 210 eV. A distância entre os dubletos é de 6,1 eV e a distância entre as componentes $S2p_{3/2}$ e $S2p_{1/2}$ em cada dubleto é de 1,2 eV, para ambos os picos. Linhas tracejadas indicam a qual enxofre está associado um dado dubleto. Esferas amarelas representam os átomos de enxofre e vermelhas os átomos de oxigênio.

Figura 4.20: Gráfico da razão do sinal (SO_3/S) do Tiosulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3$) dissociado em água a 0,75M, versus a energia de incidência dos fótons. (A) espectro tomado com a luz em polarização horizontal, (B) espectro tomado com a luz em polarização vertical. A linha preta contínua é a forma da curva obtida no trabalho de J. Soderström *et al.* [103], mas a curva não corresponde quantitativamente ao resultado obtido e apresentado na figura 4.17.

Figura 4.21: Gráfico da intensidade do sinal de fotoelétrons ejetados dos orbitais $P2p$ do dihidrogenofosfato em água em função da concentração da solução aquosa de fosfato monossódico. No gráfico menor estão indicadas a soma das áreas dos picos $P2p_{3/2}$ e $P2p_{1/2}$ em função da concentração da solução. Símbolos são os dados experimentais e as linhas contínuas os resultados dos ajustes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Parâmetros experimentais ajustados para as bordas C1s, S2p e N1s da Metionina aquosa em três diferentes pH.

Tabela 4.2: Parâmetros experimentais ajustados para as bordas do S2p, C1s e N1s da Cisteína aquosa em quatro diferentes pH (1,0; 5,0; 9,5 e 12,5).

Tabela 4.3: Concentrações de formas iônicas da Cisteína aquosa com indicações de seus grupos, protonados ou desprotonados, para o pH 9,5.

Tabela 4.4: Energia de Ligação, FWHM e a razão absoluta entre os picos referentes as espécies químicas da Cisteína aquosa na borda S2p e N1s. As energias de fótons utilizadas foram 237,6 eV (superfície S2p), 786,2 eV (*bulk* S2p), 463,6 eV (superfície N1s) e 995,1 eV (*bulk* N1s) evidenciando se os elétrons são provenientes majoritariamente do *bulk* ou da superfície.

Tabela 4.5: Porcentagem de sinal de Cisteína (*valores aproximados*) originado exclusivamente na superfície em função da energia cinética dos fotoelétrons ejetados.

Tabela 4.6: Razão absoluta (R_{AB}) entre os picos do espectro na borda S2p e N1s e valor da razão entre a quantidade de espécies a partir do modelo I_{AB}^S e I_{AB}^B apresentado.

LISTA DE ARTIGOS

O doutorado foi composto por dois temas correlatos, a saber: o estudo de moléculas biológicas livres e o estudo a nível atômico de soluções aquosas, muitos deles incluindo biomoléculas. Para o corpo principal da tese escolhemos o segundo tema. O primeiro tema está apresentado nos artigos abaixo enumerados.

I - **Silva, Á.M.d.**, Mocellin, A., Farrokhpour, H., Mundim, M. S. P., Brito, A. Naves de., *Photo induced dissociation of amino acids free from thermal degradation effects: A case study applied to DL-Valine*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 2013. **189**, **Supplement(0)**: p. 56-60.

II - Naves de Brito, A., **A.M. da Silva**, and A. Mocellin, *The rule of synchrotron radiation in the prebiotic evolution*. International Journal of Astrobiology, 2012. **11(04)**: p. 235-241.

1. INTRODUÇÃO

Líquidos são compostos essenciais à vida. De modo especial e particular, a existência de água é considerada uma condição necessária para que a hipótese de vida extraterrestre seja considerada plausível [1, 2], apesar da possibilidade de organismos extremófilos existirem sem a presença de água líquida [2].

A água corresponde a mais de 70% da composição química do nosso planeta e, além disso, desempenha um papel fundamental na parte metabólica dos seres vivos. Ela é a única que age como solvente, eletrólito e catalisador nas reações químicas, fazendo dela um elemento fundamental para as reações químico-biológicas do corpo humano [3]. No meio aquoso, diversos aglomerados moleculares estão imersos e se encontram na forma solvatada, onde entendemos por solvatação o fenômeno em que o solvente interage com o soluto podendo gerar diversos fenômenos tais quais: mudança estrutural de uma molécula, delocalização de carga, fragmentação da molécula, comportamento diferenciado do soluto na superfície* e no *bulk*[†] líquido, formação de íons, entre outros.

O conhecimento atual da estrutura da água líquida, e numa extensão menor das soluções aquosas, tem sido obtido por diversas técnicas, sobretudo àquelas destinadas ao estudo do corpo do líquido (*bulk*), como a ressonância magnética nuclear, a espectroscopia Raman e de infravermelho [4, 5], a difração de nêutrons [6-8] e a de raios X [9-12]. É um enorme desafio descrever as propriedades físicas e estruturais da água líquida, sobretudo, entender as suas propriedades em nível molecular na superfície (PNMS). O foco desta tese é entender as PNMS das soluções aquosas na interação do soluto com a água. Apesar da água ser uma das substâncias mais estudadas na ciência, suas PNMS ainda são pouco compreendidas, e para se ter uma ideia, a espectroscopia de fotoelétrons na região do ultravioleta de vácuo, que permite obter a energia dos estados eletrônicos de valência numa molécula, só pôde ser utilizada para a água líquida a partir do desenvolvimento da técnica

* O conceito de superfície líquida será mais bem explicado no decorrer do texto da tese. Em princípio, a superfície líquida é a região de transição (interface) entre o estado líquido para o estado de gás. Essa interface líquido-vapor é o que chamamos de superfície líquida. Imediatamente abaixo dessa região, temos o corpo do líquido que chamamos de *bulk*.

[†] Usaremos o termo em inglês *bulk* para especificar o meio líquido imediatamente abaixo da interface líquido-gás.

de micro-jato em 1988 [13], embora K. Siegbahn e H. Siegbahn, ainda na primeira metade da década de 70, já tivessem apresentado resultados para valores de energia de orbitais de caroço e de valência para líquidos com baixa pressão de vapor [14-16].

A revolução que a técnica de micro-jato produziu nesta área da espectroscopia permitiu que líquidos com alta pressão de vapor (p_v), como é o caso da água ($p_v = 4.6 \text{ Torr}^\ddagger$), tivessem suas PNMS estudadas *via* espectroscopia de elétrons. Anteriormente, os estudos estavam restritos a líquidos com baixa pressão de vapor[§], como é o caso da formamida [14, 15]. Esta técnica, proposta por Manfred Faubel *et al.* [13], permite que os elétrons que são ejetados da superfície líquida sofram um número mais reduzido de colisões inelásticas com a camada de vapor da superfície do líquido. Evita-se assim que a informação, que a maioria dos elétrons detectados carregam na sua energia cinética, seja perdida nas colisões inelásticas.

No atual estágio do desenvolvimento da espectroscopia de elétrons de superfícies líquidas, podemos estudar como ocorre o fenômeno da solvatação de íons ou moléculas na superfície líquida, e se existe alguma diferença no comportamento de um dado íon ou molécula na superfície comparado ao *bulk* líquido. A técnica de micro-jato também permite analisar a interface líquido-vácuo que se aproxima da superfície líquido-gás e também permite analisar uma outra enorme gama de fenômenos. Podemos citar, como exemplo, íons ou moléculas em soluções aquosas que simulam a composição das gotículas de água que evaporam dos oceanos e participam na regulação da temperatura do planeta, como aqueles que capturam $(\text{CO}_2)_{\text{gás}}$ da atmosfera [18, 19]. Também pode ser aplicada a moléculas de elevado interesse biológico, como os aminoácidos [20-22].

A espectroscopia de fotoelétrons foi a técnica utilizada nos experimentos apresentados nesta tese de doutorado. Os resultados obtidos a partir da técnica de micro-jato conjuntamente à espectroscopia de fotoelétrons nos permitiram estudar:

- a) Deslocamentos químicos da energia de ligação e alargamento nas bordas do $C1s$, $N1s$ e $S2p$ na Cisteína $(\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})_{\text{aq}}$ e Metionina $(\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})_{\text{aq}}$ aquosas devido a mudança do pH. Estes são os dois únicos aminoácidos essenciais contendo enxofre. Como vamos demonstrar a Cisteína apresenta um padrão complexo de protonação mesmo se considerado apenas o corpo (*bulk*) da solução.

[‡] Em espectroscopia de fotoelétrons é comum usarmos o milibar como unidade de pressão (1 Torr = 1,33322 mbar).

[§] Resfriando-se o sistema a ser estudado é possível diminuir a pressão de vapor. Ainda assim, mesmo usando outros métodos não foi possível fazer XPS de valência de água líquida até 1997. (17. Faubel, M., B. Steiner, and J.P. Toennies, *Photoelectron spectroscopy of liquid water, some alcohols, and pure nonane in free micro jets*. Journal of Chemical Physics, 1997. **106**(22): p. 9013-9031.)

- b) Respondemos uma questão importante relacionada a se o pH de uma solução aquosa contendo biomoléculas de interesse varia entre o corpo (*bulk*) e a superfície da solução. Encontramos uma resposta surpreendente para esta questão tendo em vista que estudos anteriores em água pura apontavam para um pH mais ácido presente na superfície molecular do líquido.
- c) Testamos a hipótese que diz que a estequiometria pode ser utilizada como variável identificadora da presença de um determinado elemento na espectroscopia de fotoelétrons, independente da energia do fóton utilizada no experimento. Foram realizados estudos das intensidades do sinal do S_{2p} da solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) em função da energia dos fótons.
- d) Descrevemos as PNMS e em particular o efeito da concentração do soluto na solução aquosa de fosfato monossódico (NaH_2PO_4). Vale notar que este composto é muito utilizado como agente tamponador, ou seja, controlador de pH. Esta tese responde a questão se esta importante função de tamponador pode ser modificada devido a uma potencial variação de concentração do soluto entre o corpo e a superfície da solução. Aplicações importantes destas soluções tampão podem ser encontradas na química, incluindo agricultura, processamento de alimentos, medicina e fotografia.

Esta tese está estruturada em cinco capítulos: CARACTERÍSTICAS DO SOLVENTE UNIVERSAL: A ÁGUA LÍQUIDA – apresenta os aspectos físicos importantes desta molécula e as diferenças encontradas no estado líquido, ASPECTOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS – descreve os conceitos físicos necessários a análise de dados dos espectros obtidos nos experimentos, mostra o aparato experimental utilizado, a teoria de radiação síncrotron e onduladores e o modo de preparação das amostras, RESULTADOS – apresenta os resultados obtidos nos estudos que foram sumarizados no parágrafo anterior, CONCLUSÕES – resume o trabalho apresentado.

2. CARACTERÍSTICAS DO SOLVENTE UNIVERSAL: A ÁGUA LÍQUIDA

A fase gasosa é basicamente caracterizada por átomos ou moléculas praticamente sem interação uns com os outros (interação da ordem de $k_B T$), livres para mover-se de forma independente. Já a fase sólida, caracteriza-se pela presença de fortes interações entre as partículas (moléculas/átomos), obrigando-as a se moverem unicamente nos sítios da sua rede cristalina, para o caso dos sólidos cristalinos. Os líquidos apresentam características comuns a estas duas fases. Na fase líquida, a energia de interação entre as partículas é comparável à sua energia térmica e sua dinâmica se assemelha a fase gasosa [23], por sua vez, sua densidade é similar ao estado sólido. Sem perda de precisão, poderíamos tratar a fase líquida como uma fase híbrida entre a sólida e a gasosa. Tais propriedades explicam a grande importância das soluções líquidas para as reações químicas: alta densidade sem perda de mobilidade.

Uma maneira de tratar o problema das interações entre as partículas de um líquido é tentar descrever quais os potenciais que estão envolvidos entre estas partículas. Lembremos que quando estudamos gases, normalmente tratamos um gás de partículas idênticas (átomos/moléculas) e, para aproximar o modelo da realidade, introduzimos um termo de interação como o potencial de Lennard-Jones $w(r)$,

$$w(r) = -\frac{A}{r^n} + \frac{B}{r^m} \quad (2.1)$$

que leva em conta interações como a de Van der Waals ($n=6$ e $m=12$). No entanto, quando estamos lidando com líquidos, este potencial se torna muito simplificado, já que nos deparamos com o problema da interação de muitos corpos o que dificulta o tratamento teórico consideravelmente. Apesar de grande parte da teoria de muitos corpos ter sido desenvolvida para a fase sólida, é bem complicado aplicá-la na descrição da estrutura líquida. Por exemplo, interações do tipo ligações de hidrogênio estão se formando e se

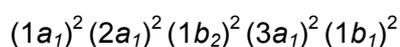
rompendo o tempo inteiro, introduzindo características bem mais complexas para um modelo como o potencial de Lennard-Jones.

Atualmente, utiliza-se uma grande variedade de métodos de cálculo de estrutura eletrônica para se obter as energias de ligação dos elétrons de caroço e os deslocamentos químicos para sistemas líquidos tais como: campo auto consistente (Δ SCF) [24, 25], Δ Kohn-Sham (Δ KS) [26, 27] e método de transição de estado [28-30]. Por sua vez, para contabilizar os efeitos do solvente, normalmente se considera a vizinhança; ou como um contínuo dielétrico [31], ou se usa um modelo supramolecular [32, 33] ou ainda modelos estatísticos [34, 35]. Embora modelos quânticos supramoleculares combinados com a dinâmica molecular clássica possam nos dar uma melhor descrição dos efeitos do solvente, o custo computacional envolvido torna sua utilização impraticável para grandes sistemas. Uma alternativa utilizada são modelos híbridos como o método (QM/MM) – (Mecânica Quântica/ Mecânica Molecular) que juntam a acurácia da mecânica quântica com a velocidade da mecânica molecular e permitem que estudemos sistemas grandes, como proteínas em solução [36, 37].

2.1 A molécula de água (H₂O)

A água é uma molécula que possui os dois elementos mais reativos da natureza: um átomo de oxigênio (O) ligado a dois átomos de hidrogênio (H) de forma covalente, com simetria C_{2v} . Na fase gasosa, o ângulo (α) entre o oxigênio e os dois hidrogênios é de 104,5° e o comprimento da ligação O-H é de 0.957854 Å, segundo cálculos mais recentes [38]. Os valores experimentais nos fornecem $\alpha_{\text{exp}} = 104,474^\circ$ e $\text{OH}_{\text{exp}} = 0.95718 \text{ \AA}$ [39]. Esses valores não se mantêm na fase líquida. Cálculos *ab initio* e estudos de difração sugerem valores ligeiramente superiores [40-42]. Isso se deve ao fato das ligações de hidrogênio enfraquecerem as ligações covalentes, reduzindo assim a repulsão entre os orbitais. Os comprimentos de ligação e os ângulos também mudam frequentemente devido as mudanças de polarização, a mudança do ambiente químico e quando a água se liga a outros solutos ou solventes. Modelos moleculares apresentam resultados de comprimentos de ligação entre 0,957 a 1,00 Å e ângulos (α) de 104,52° a 109,5° [43].

A simetria C_{2v} define a forma dos orbitais da água que são uma combinação dos orbitais 1s, 2s e 2p do oxigênio com os dois orbitais 1s dos dois hidrogênios. Desta forma, a configuração eletrônica no estado fundamental da água é a seguinte:



Na figura 2.1 podemos observar os orbitais moleculares da água e como eles são constituídos pela combinação dos orbitais atômicos [44]. O orbital molecular ($1a_1$) tem uma característica muito próxima do orbital atômico $1s$ do oxigênio, por isso, em casos de orbitais de caroço é comum tratarmos o orbital molecular ($1a_1$) como $O1s$. De forma análoga, usaremos a terminologia de orbitais atômicos para orbitais moleculares de caroço em outras moléculas ($C1s$, $S2p$, $N1s$).

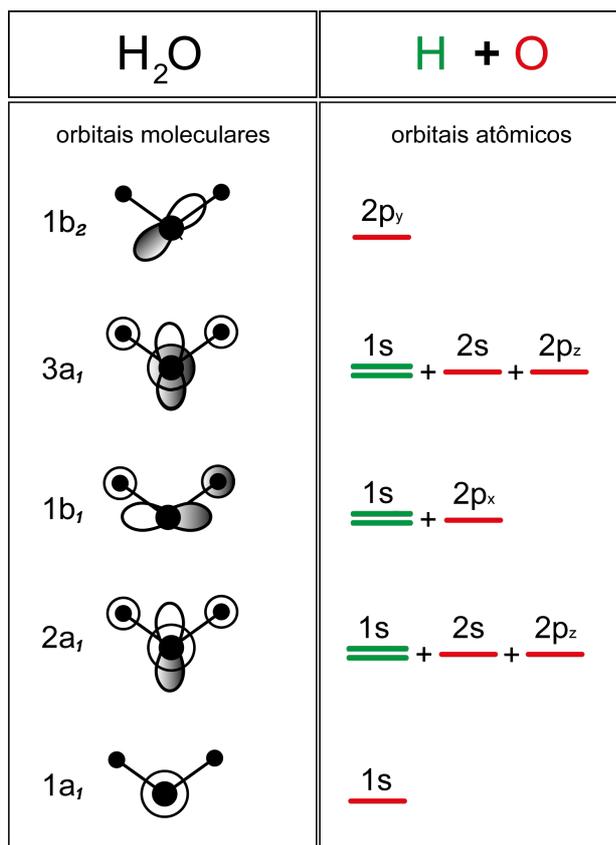


Figura 2.1: Orbitais moleculares da água. Cada orbital molecular é combinação de orbitais atômicos dos átomos hidrogênio e oxigênio.

2.2 As ligações de hidrogênio e o dipolo elétrico na água líquida

A água tem a propriedade excepcional de ter aproximadamente o mesmo número de ligações de hidrogênio que o número de ligações covalentes, já que cada átomo de oxigênio se liga covalentemente a dois hidrogênios e cada um destes dois hidrogênios faz ligação de hidrogênio com alguma molécula vizinha (água ou outros). A definição de **ligação de hidrogênio** dada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), é alvo de tentativas de reformulação e está atualmente sujeita a debates [45]. Levando isso em conta, não tentaremos redefinir o conceito de ligação de hidrogênio ou apresentá-lo de forma mais ampla, ao contrário, vamos restringi-lo ao que é importante para a água líquida e quais implicações que esse tipo de interação produz na mesma e nos solutos solvatados nela.

Na molécula de água (H_2O), o núcleo do oxigênio tem carga +8 e atrai mais os elétrons que o hidrogênio, que tem carga nuclear +1. O átomo de oxigênio fica carregado parcialmente com carga negativa e, por sua vez, o hidrogênio fica parcialmente positivo. Esta atração é a base das ligações de hidrogênio. A energia que envolve esta interação é cerca de dezessete vezes maior que a interação de Van der Waals (~ 0.01 eV para moléculas pequenas [46]) [47], cerca de dez vezes menor que a ligação covalente, e de 3 a 10 vezes maior que as flutuações térmicas ($k_bT \sim 25$ meV) [43, 45, 46]. Numa escala de intensidade de forças, a ligação de hidrogênio está numa região intermediária entre a ligação covalente e as forças de Van der Waals.

O transporte dos íons H_3O^+ e OH^- é facilitado pelas ligações de hidrogênio, como pode ser observado na figura 2.2 [46]. Na parte superior da figura observamos o transporte de um íon H_3O^+ e na parte inferior o transporte de um íon OH^- que é facilitado pela ampla rede de ligações de hidrogênio. O processo de transporte de íons (H_3O^+), é fruto da autoionização** da água ou mesmo da adição de ácidos ou bases em soluções aquosas, e é considerado um processo adiabático para um líquido super-resfriado, e quando levamos em conta a temperatura do laboratório, esse processo pode ser descrito por um tunelamento num poço duplo [48, 49].

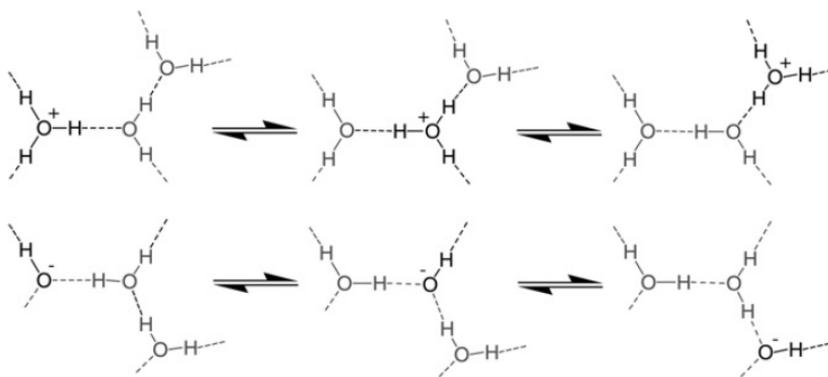


Figura 2.2: Transporte de íons na água líquida facilitado pelas ligações de hidrogênio. (P. Needham *et al.* [45]).

O fato da água ser uma molécula polar faz com que uma molécula de soluto polar tenha um momento de dipolo por molécula muito maior que o momento de dipolo de sua molécula isolada. Na parte superior da figura 2.3, observamos a representação de uma molécula de água, em termos do seu dipolo elétrico, e um íon de carga positiva. Quando observamos um cátion solvatado por várias moléculas de água, (parte inferior figura 2.3), percebemos o efeito de reorientação das moléculas de água na interação dos dipolos da

** Na autoionização, duas moléculas de água reagem produzindo íons hidrônios (H_3O^+) e hidróxidos (OH^-), de acordo com a seguinte reação de equilíbrio: $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$.

água com o cátion. A água líquida (H_2O) foi representada pelas esferas brancas com momento de dipolo assinalado e a reorientação das moléculas faz com que o momento de dipolo por molécula seja muito maior (3 D)^{††} que o da molécula isolada (1.85 D). Apesar do momento de dipolo por molécula não ser uma observável bem definida, ele é uma informação computacional importante durante a modelagem [50-56].

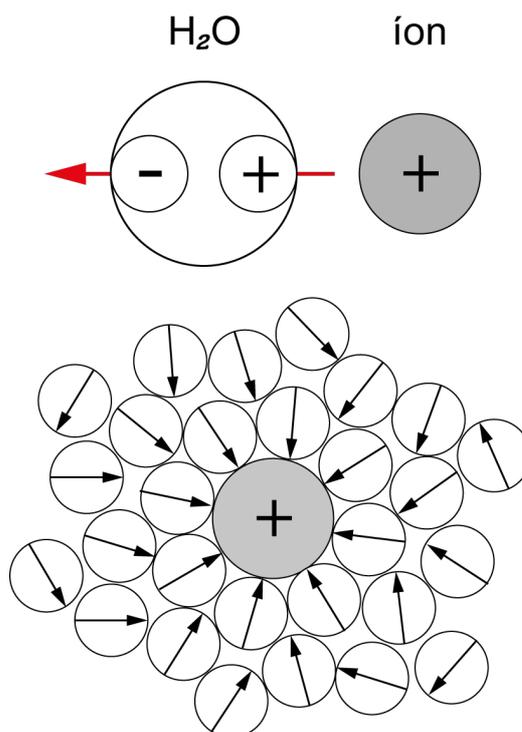


Figura 2.3: Estrutura de informação do soluto com a água *via* interação dipolar. A figura foi retirada do artigo de B. Cabane *et al.* [50].

2.3 Aminoácidos em meio aquoso

Aminoácidos são moléculas que contêm um grupo amina – NH_2 –, um grupo carboxila – COOH – e um outro grupo característico, ligado a um carbono quiral, com exceção da glicina. Por terem presentes em sua composição os grupos amina e carboxila, os aminoácidos são caracterizados como ácido e base ao mesmo tempo (anfóteros). A definição de Brønsted-Lowry nos diz que um ácido é um doador de prótons (H^+)^{‡‡} e uma base é um receptor de prótons, assim, um aminoácido pode desempenhar o papel de ácido ou base dependendo do pH do meio em que ele está inserido.

Na sua forma gasosa, um aminoácido se encontra apenas na forma neutra, o que não é verdade quando vamos para a forma líquida ou sólida [57]. De fato, o estado de carga

^{††} O símbolo D (Debye) indica a unidade do momento de dipolo elétrico no sistema CGS (centímetro-grama-segundo). $1 \text{ D} \approx 3.33564 \times 10^{-30} \text{ C.m}$ (Coulombs x metro).

^{‡‡} Na prática não existem prótons livres (H^+) na água líquida, os prótons se propagam na forma de íons H_3O^+ , como descrito na figura 2.2.

de um aminoácido é fortemente dependente do pH de seu meio solvente, assim, sua forma catiônica(+), zwitteriônica [neutra] (0) ou aniônica (-) é função do pH líquido. As concentrações de cada uma destas formas podem ser maximizadas ou praticamente reduzidas a zero escolhendo-se um pH específico para o solvente.

O pH da água líquida pode ser variado pela adição de um ácido ou uma base. Em nossos experimentos, para alterar o pH da solução adicionamos ácido clorídrico (HCl) P.A. ou hidróxido de sódio (NaOH) para aumentar ou diminuir a concentração de íons (H^+), já que estes ácidos ou bases se dissociam completamente em água. Tendo em vista que o pH apresenta pequena alteração em função da temperatura, a determinação do pH em algumas soluções foi feita na temperatura em que a solução se encontra no experimento (cerca de 4°C). Numa solução aquosa de um ácido monoprótico **HA**, podemos descrever a sua reação de dissociação como:



E ainda podemos definir a **constante de acidez** (K_a) como:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}, \quad (2.3)$$

onde os valores entre colchetes representam as concentrações de H^+ , da base conjugada de HA , A^- e do próprio HA .

Neste caso, HA é um ácido a partir da definição de Brønsted-Lowry (doador de prótons). A partir da constante de acidez podemos definir o pK_a , que é o logaritmo negativo da equação 2.2:

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]}. \quad (2.4)$$

Como exemplo, na figura 2.4, apresentamos as diversas formas iônicas dos aminoácidos Cisteína e Metionina em função do pH de uma solução aquosa. Para maximizar a concentração de uma determinada forma iônica (espécie química), é suficiente preparar as soluções com os valores de pH indicados na escala da figura 2.4.

Para um aminoácido como a Cisteína (**HSCH₂CH(NH₂)COOH**), que possui três grupos ionizáveis (SH, COOH e NH₂), haverá três pK_a diferentes. Deste modo, a Cisteína pode ter quatro estados de carga; um catiônico (1^+), um zwitteriônico (0), duas formas aniônicas (1^-) e uma (2^-) [58].

Percebemos da equação 2.3, que vale no caso de ácidos monopróticos, que quando a concentração do ácido e da base conjugada são iguais, o pK_a se iguala ao pH . Usando este fato, escolhendo o pH no mesmo valor do pK_a , a concentração de espécies está em equilíbrio dinâmico em torno deste valor de pK_a . Ainda na figura 2.4, estão indicados os valores de pK_a para a Cisteína ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$) e Metionina ($\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$). Nos valores assinalados de pK_a temos a mesma concentração de espécies que se encontram em torno do símbolo (\leftrightarrow). Para maximizar alguma das espécies químicas é suficiente variar o pH para o valor indicado na escala de pH deslocando o equilíbrio químico, ou ainda, no caso dos extremos, como a forma catiônica (1^+) ou aniônica (1^-) para a Metionina ou (2^-) para a Cisteína, deixar o pH o mais próximo de 1 ou 14, respectivamente. No caso específico da Cisteína existem três grupos ionizáveis, o que permite que duas espécies possam ter carga (1^-) quando o pH é igual a 9.5. Essa propriedade será melhor abordada na análise de nossos resultados (Capítulo 4).

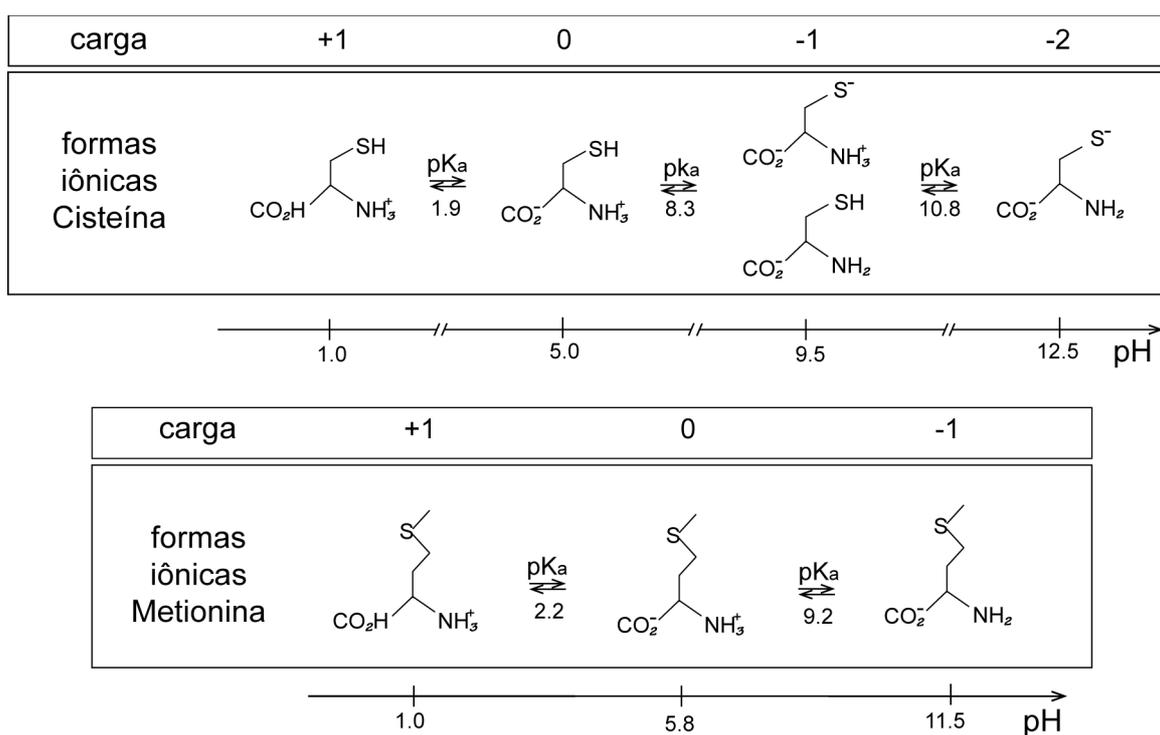


Figura 2.4: Formas iônicas da Cisteína (*parte superior*) e da Metionina (*parte inferior*) em função do pH do solução aquosa. Na parte superior de ambos os diagramas indica-se a carga das formas iônicas. Os pK_a estão indicados. Nestes valores, quando o pH se iguala ao pK_a , a concentração das espécies adjacentes ao símbolo se iguala. Nos pH indicados é possível maximizar a forma iônica superior.

3.1 ASPECTOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS

Todos os resultados experimentais desta tese foram baseados na análise de espectros de fotoelétrons nas bordas (C1s, N1s, S2p e P2p) e região de valência. Pretendemos com este capítulo descrever os elementos básicos de processos de fotoabsorção, fotoionização e os principais caminhos de relaxação resultantes desses processos. Abordaremos também a técnica de micro-jato que foi usada em todos os experimentos, bem como, faremos uma revisão de alguns aspectos da espectroscopia de fotoelétrons com ênfase em líquidos. Finalmente, descreveremos todo o aparato experimental utilizado e como nossas amostras foram preparadas.

3.1 Espectroscopia de Fotoelétrons

A absorção de fótons pela matéria, seja ela sólida, líquida ou gasosa, permite que elétrons possam ser arrancados das moléculas ou átomos. Esse fenômeno é a base do efeito fotoelétrico, que apesar de já ser conhecido por Hertz em 1887, apenas em 1905 Albert Einstein pôde explicá-lo. A energia de um fóton, para todos os tipos de radiação eletromagnética, é dada pela relação de Einstein:

$$E = h\nu \quad (3.1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s) e ν é a frequência em Hertz (Hz) da radiação. Quando falamos de espectroscopia de fotoelétrons, nos referimos à análise da energia cinética dos elétrons arrancados da matéria devido a absorção dos fótons (fotoabsorção). Veremos mais adiante que existem elétrons emitidos da matéria que não são fruto da absorção direta da radiação, neste caso, essa outra emissão trata-se de um fenômeno secundário que ocorre durante a relaxação do sistema excitado.

A espectroscopia de fotoelétrons ou espectroscopia de fotoemissão – *Photo Electron Spectroscopy* (PES) usa fontes monocromáticas de radiação, isto é, fótons com uma única energia. Com isso, podemos encontrar a energia de ligação do fotoelétron arrancado, se sua energia cinética for conhecida, a partir da expressão:

$$E_c = h\nu - E_b \quad (3.2)$$

A relação 3.2 assume que toda a energia cinética do fotoelétron ejetado, E_c , é igual a diferença entre a energia do fóton absorvido, $h\nu$, e a energia de ligação do elétron naquele sistema (*binding energy*), E_b . Com esta relação, podemos encontrar e mapear os estados eletrônicos de um dado sistema atômico ou molecular. Se a energia do fóton incidente for menor do que a energia de ligação do elétron não produziremos fotoelétrons.

3.1.1 Fotoionização, fotoabsorção e processos de relaxação

Utilizando a linguagem de partícula independente, podemos dizer que quando um elétron de uma molécula absorve um fóton, ele pode ser promovido para um orbital mais externo com energia ($E < 0$), ou ainda, ser arrancado para um nível de contínuo ($E > 0$), considerando ($E = 0$) no limiar de sua ionização. A vacância deixada por este elétron deixa o sistema molecular com um excesso de energia para aquela configuração. Com isso a relaxação deste sistema pode ocorrer. Um elétron mais externo decai para a vacância originada da fotoabsorção, emitindo um fóton com energia igual à da transição por ele realizada (*luminescência*), ou ainda, o excesso de energia é convertido em energia cinética de um elétron que é ejetado (*autoionização ou decaimento Auger*).

A figura 3.1 pretende ser um resumo de alguns dos possíveis processos de relaxação que ocorrem em sistemas atômicos ou moleculares. Ela está dividida em duas partes: processos radiativos (emissão de fótons) e processos não-radiativos (emissão de elétrons secundários). Na parte (a) da figura 3.1, observamos um sistema com estados eletrônicos representados por linhas horizontais numeradas (1 a 5). Os estados de 1 a 3 representam estados ocupados por elétrons, onde o estado 1 é um estado de caroço e 2 e 3 são estados de valência, 4 representa um estado não ocupado. O estado 5 é limite para o contínuo, $E_c = 0$. O eixo à esquerda mostra que estados com energias menores que 5 são estados ligados e energias maiores ou iguais a 5 representam estados de contínuo. Essa mesma descrição se aplica para todos os diagramas a seguir (b, c, d, e, f e g).

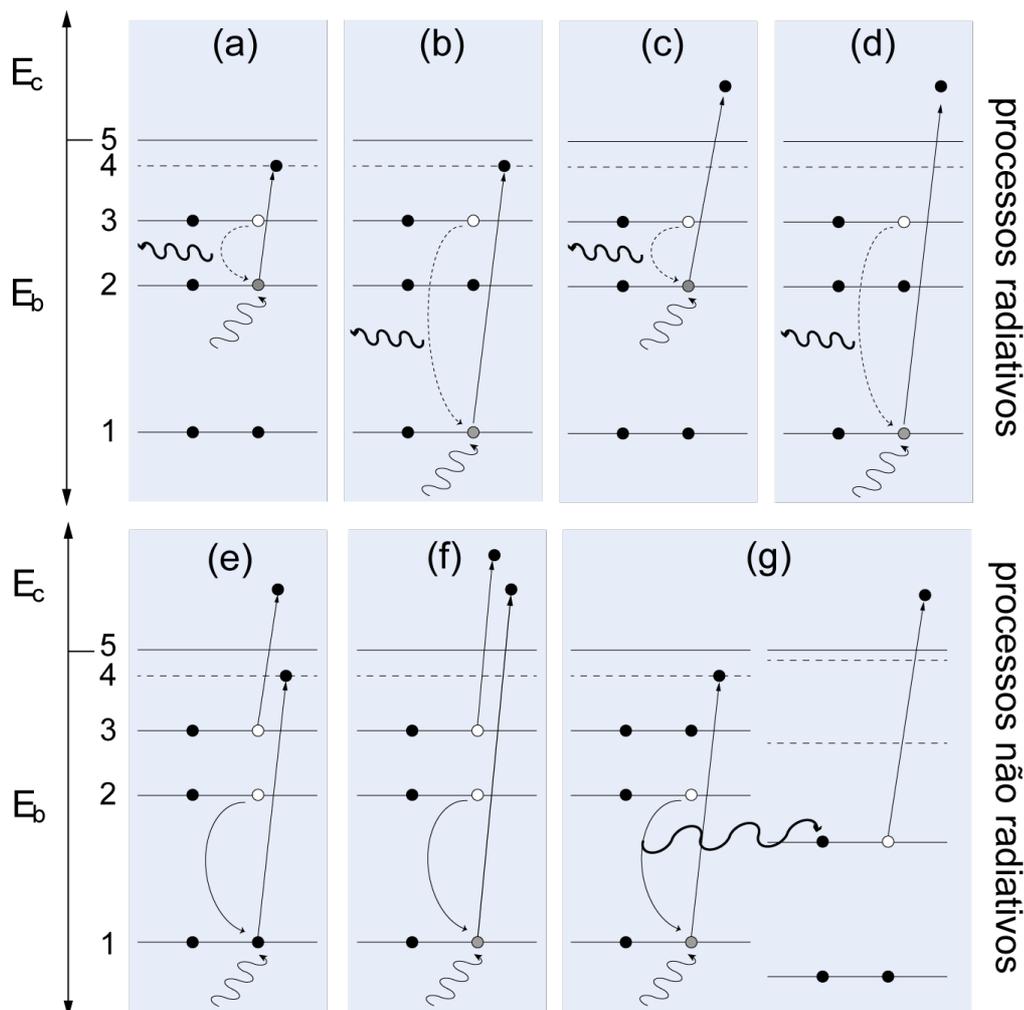


Figura 3.1: Exemplos de alguns processos radiativos e não radiativos de relaxação eletrônica.

Na figura 3.1 (a), observamos um processo de fotoexcitação de valência (transição $2 \rightarrow 4$) fruto da absorção de um fóton $h\nu$, com emissão de outro fóton de energia igual a $h\nu_{32} = (E_3 - E_2)$, referente a diferença de energia entre os estados final e inicial do elétron que decai para ocupar a vacância original deixada pelo elétron fotoexcitado, fenômeno conhecido como luminescência^{ss}. Em (b), o que se pretende evidenciar é o mesmo processo de fotoexcitação, como ocorre em (a), mas neste caso, de um elétron de caroço (transição $1 \rightarrow 4$), com emissão de um fóton de energia $h\nu_{31} = (E_3 - E_1)$. A carga final dos dois processos permanece a mesma do sistema neutro (Z). Em (c) e (d) encontramos processos de fotoionização, em que os sistemas, após a relaxação, ficam com carga final ($Z+1$). Em (c) temos uma ionização na valência e em (d) uma ionização de caroço, o processo de relaxação emite um fóton de igual intensidade ao emitido na fotoabsorção ((a) e

^{ss} A luminescência pode ser dividida em dois processos: usamos o termo **fluorescência** para um tempo de vida mais curto (da ordem de 10^{-4} e 10^1 s) e **fosforescência** para um tempo de vida mais longo (da ordem de 10^{-9} e 10^{-7} s).

(b)), respectivamente. O decaimento não radiativo domina para átomos leves ($Z < 30$ u.m.a.) em relação a luminescência [59].

Dentro os processos de relaxação não radiativos descritos [3.1(e), 3.1(f), 3.1(g)], ao contrário da fluorescência, emitem-se elétrons secundários para minimizar a energia do sistema durante o processo de relaxação. Antes deste ocorrer, o processo inicial de interação com a radiação pode ser ou não ser do tipo ressonante. Quando dizemos que o processo é ressonante, estamos falando que o elétron que inicialmente interage com a radiação, é fotoexcitado de um nível mais interno para outro mais externo, e quando o processo é dito normal indicamos que um fotoelétron é ejetado pela interação do fóton $h\nu$ incidente, deixando o átomo ionizado. Em 3.1 (e) e 3.1 (f) mostramos exemplos de processos de desexcitação do tipo decaimento Auger. O primeiro caso é da emissão de um elétron Auger espectador (3.1 (e)) e o segundo de um elétron Auger normal (3.1 (f)). No caso da emissão Auger espectador, o processo inicial é a fotoexcitação ressonante do elétron $1 \rightarrow 4$, transição de $2 \rightarrow 1$, e emissão do elétron (3), na presença do elétron espectador (4), sendo que a carga final do sistema se altera para $(Z+1)$. O processo é dito espectador pois o elétron fotoexcitado não ocupa o buraco deixado no caroço interno, se fosse o caso, o processo seria dito participante, pois o elétron fotoexcitado participaria ativamente da desexcitação. No caso da emissão de um elétron Auger normal a carga final é $(Z+2)$, devido a fotoionização inicial, como representado em 3.1(f). É possível identificar os dois casos (Auger normal e Auger espectador), durante um experimento. No caso do decaimento Auger espectador, o elétron espectador blinda o sistema e faz com o que o elétron Auger ejetado tenha energia cinética superior àquela do processo Auger normal.

O meio líquido não só produz efeitos de relaxação em moléculas ou átomos individualmente (**intra**), mas pode gerar fenômenos de relaxação entre átomos (**inter**) ou moléculas vizinhas, aumentando a gama de fenômenos que podem ser observados. Em (3.1 (g)) temos a descrição do *decaimento coulombiano interatômico ou intermolecular* (DCI) que é um processo em que a relaxação da vacância envolve as espécies vizinhas – átomos ou moléculas – fracamente ligados. A natureza do DCI é similar ao decaimento Auger, exceto pelas vacâncias nos estados finais. O fenômeno já havia sido previsto anteriormente por L. S. Cederbaum *et al.* [60] e foi observado primeiramente por Marburger *et al.* [61] em clusters de neônio.

3.1.2 Livre Caminho Médio Inelástico (IMFP) e Comprimento de Atenuação Efetiva (EAL)

Quando os elétrons são emitidos de uma superfície estudada e se movem em direção ao analisador de elétrons, nem todos conseguem emergir sem sofrer nenhuma perturbação devido às colisões sofridas com outros átomos ou moléculas da superfície da amostra até a entrada do analisador. Essas colisões geram uma atenuação no sinal detectado devido ao espalhamento inelástico dos elétrons. A atenuação pode ser descrita pela exponencial de $e^{-z/IMFP}$, onde z é a distância atravessada pelo elétron em um meio e IMFP é o livre caminho médio inelástico (*Inelastic Mean Free Path*).

Por definição, o **livre caminho médio inelástico** é a distância média percorrida por um elétron, com uma certa energia cinética, **entre colisões inelásticas**. Para se determinar de que profundidade provém o sinal de fotoelétrons quando se está realizando medidas do tipo XPS, é importante usar este conceito, já que podemos associar o valor do IMFP com a profundidade estudada.

Uma pergunta que pode ser feita pelo leitor que não conhece a fundo a técnica de XPS é a seguinte: Elétrons que sofrem algum tipo de colisão inelástica também conseguem chegar no detector de elétrons? De fato, estes elétrons também podem alcançar o detector, porém não irão contribuir para o pico XPS. Para entender isso, basta lembrar que o pico XPS tem da ordem de 1 eV de largura e uma colisão inelástica deveria fazer o elétron perder menos de um 1 eV em energia.

Para o caso da água, a quantidade mínima de energia que um elétron pode perder é aquela necessária para produzir uma transição HOMO-LUMO^{***}, sendo igual a 6.9 eV [62]. Desta forma, aqueles elétrons que sofrerem esta colisão inelástica perderão uma energia que é muito maior que a largura do pico XPS, saindo fora da janela de análise.

Caso estejamos analisando o espectro XPS de uma solução aquosa, estados com energia menor que o LUMO da água pura podem surgir. Neste caso, haveria a possibilidade de algum efeito ser observado, no entanto, podemos retirar algumas conclusões a partir do que já foi aprendido de amostras sólidas. No exemplo do Paládio (Pd), onde existem níveis ocupados de um alta densidade próximo ao nível de Fermi, o que se observa é que o “background” passa a ser crescente com o aumento da energia cinética do pico. Nos resultados desta tese não observamos este comportamento em nenhum pico XPS. Isto parece ser bem razoável pois mesmo em um espectro de XPS de Prata (Ag) não se observa este fenômeno. Embora a prata seja condutora, o que implica os elétrons ocupados estarem

^{***} Transição do orbital molecular de maior energia ocupado ($E=0$ no limite do contínuo, com estados ligados negativos) para o orbital molecular de energia mais baixa desocupado (*Highest Occupied Molecular Orbital to the Lowest Unoccupied Molecular Orbital*).

muito próximos ao nível de Fermi, a ocupação do HOMO é muito baixa. Ou seja, não só a diferença HOMO-LUMO deve ser menor que cerca de 1 eV, mas o orbital HOMO deve ter uma ocupação alta. Como o número de moléculas de soluto para as concentrações aqui estudadas é de cerca de uma para cada 25 moléculas de água a presença do soluto não altera as conclusões feitas para a água pura.

Desta forma, para as soluções aquosas, os elétrons observados no pico XPS, descontando o *background*, não possuem contribuição dos elétrons que sofreram colisões inelásticas. Quando os elétrons são emitidos da superfície ou do *bulk* de uma solução aquosa estudada e se movem em direção ao analisador de elétrons, uma parte muito pequena dos elétrons consegue emergir sem sofrer nenhuma perturbação devido às colisões com outros átomos ou moléculas da amostra até a chegada ao analisador.

Experimentalmente, é impossível separar a contribuição dos elétrons espalhados inelasticamente dos elétrons espalhados elasticamente. Portanto, faz-se necessário um conceito mais apropriado, que leve em conta os processos elásticos e inelásticos e seja uma quantidade mensurável. O conceito adequado a ser utilizado é o de **comprimento de atenuação do elétron** – *Electron Attenuation Length* (EAL), que é a menor distância de um ponto A a um ponto B, no qual o sinal de elétrons é reduzido para $1/e$ do valor inicial, onde “e”, neste caso, é o número de Euler (figura 3.2(a)).

Podemos medir o valor do comprimento de atenuação do elétron, mas não podemos obter diretamente o valor do IMFP a partir de um resultado de EAL. De fato, **o conceito de IMFP é muito mais comum na literatura e é frequentemente utilizado no mesmo sentido do EAL, assim como, dentro desta tese**. Usaremos os dois com o mesmo sentido, apesar de salientar que existe uma diferença conceitual entre IMFP e EAL, e que essa diferença pode ser significativa. Por exemplo, um elétron pode ter um IMFP muito maior que o EAL, caso o espalhamento elástico seja altamente eficiente (figura 3.2(a) esquerda), ou então, uma $EAL \approx IMFP$, se o espalhamento elástico for fraco (figura 3.2(a) direita). Apesar de variar consideravelmente, dependendo da energia cinética do elétron ejetado, o IMFP possui um comportamento parecido para diferentes materiais. Muito embora, esta dependência material pode ser significativa, fazendo com que o IMFP varie mais que por um fator de dois [63].

A intensidade do sinal de fotoelétrons em um experimento de fotoemissão pode ser expressa como a integral sobre as funções densidade, $\rho_A(z)$, associadas com cada espécie molecular ou atômica, exponencialmente atenuada com o comprimento de atenuação efetiva (EAL), para uma dada energia cinética de fotoelétron, isto é, a transformada de Laplace das funções densidade na variável EAL^{-1} . Assumimos implicitamente que o número de fótons é constante (absorção da luz é desprezível) dentro do volume de amostra que contribui para o sinal de fotoelétrons. Como o comprimento de atenuação efetiva é, em uma

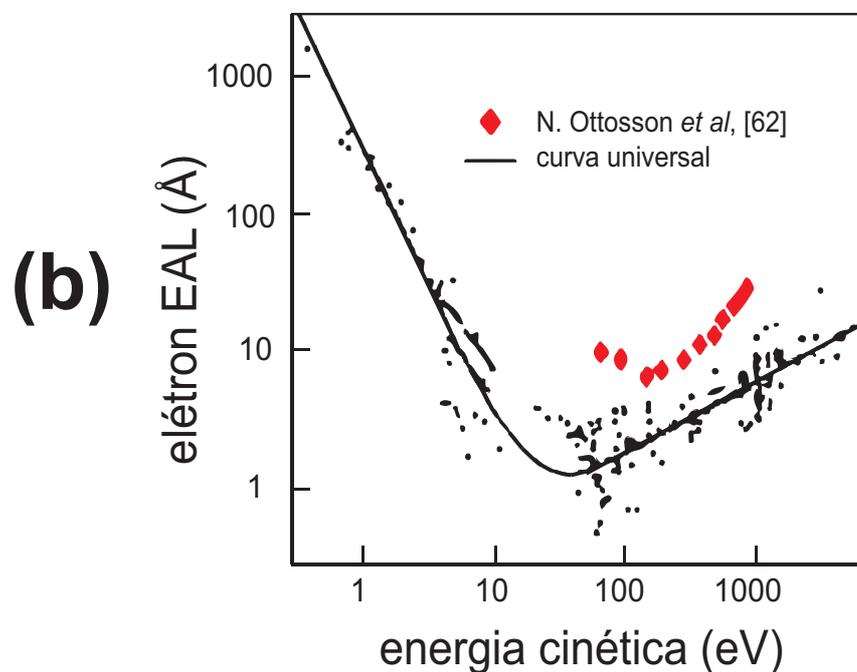
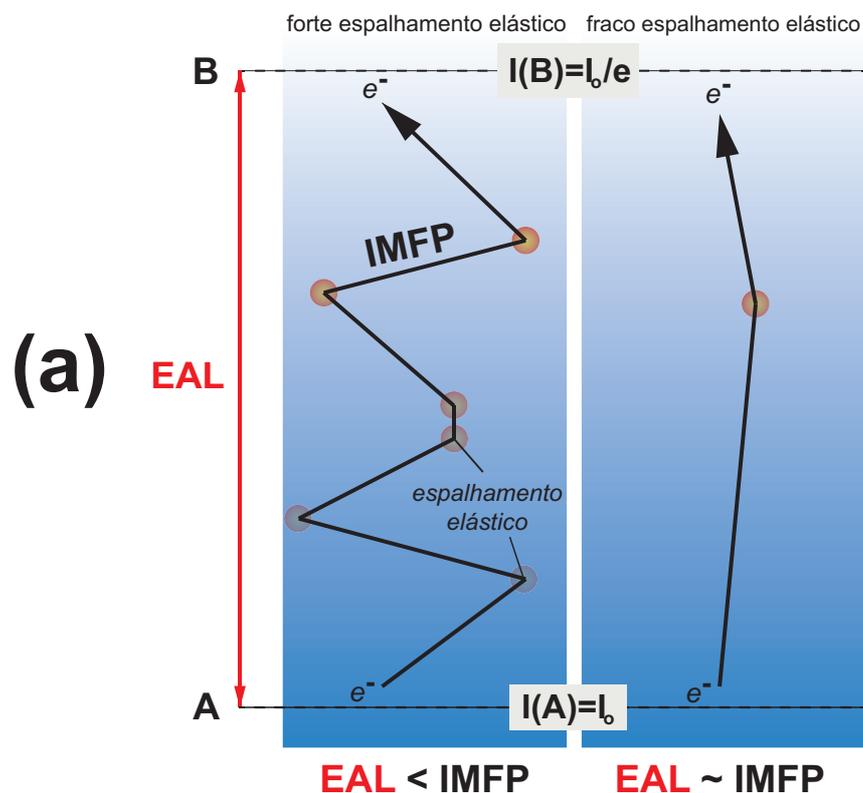


Figura 3.2: (a) - Ilustração do comprimento de atenuação efetiva (EAL) e do livre caminho médio inelástico (IMFP) em um meio. Esquerda e Direita: muitos e poucos eventos de espalhamento, respectivamente. $I(A)$ é intensidade de elétrons de um ponto de partida A e $I(B)$ é intensidade atenuada em um ponto de chegada B. (*adaptação da referência* [63]). (b) comprimento de atenuação efetiva (EAL). Pontos em vermelho são o EAL para a água líquida (*adaptação da referência* [63, 64]).

boa aproximação, inversamente proporcional a densidade de partículas integrada de uma profundidade de emissão de z a 0 (na qual todas as funções densidade caem para 0 em $z=0$), o sinal de fotoelétrons total medido I das espécies A , pode ser expresso como: atenuação efetiva (EAL).

$$I = \alpha F \sigma T \int_0^{\infty} \rho_A(z) \exp\left(-\frac{1}{\text{EAL}_{\text{jato}}} \int_0^z \frac{\rho_{\text{tot}}(y)}{\rho_0} dy\right) dz \quad (3.3)$$

onde $\rho_A(z)$ descreve o perfil de densidade das espécies A na amostra líquida irradiada. $\rho_{\text{tot}}(y)$ é a soma da densidade de todas as espécies, ρ_0 é a densidade total de todas as componentes no *bulk*, isto é, $\rho_{\text{tot}}(\infty) = \rho_0$. σ é a seção de choque de fotoionização que também depende do ângulo de detecção, F é o fluxo total de fótons e α um fator de alinhamento experimental, que é determinado pela área iluminada da amostra e o ângulo sólido de abertura da entrada do analisador de elétrons. T é a função transmissão do analisador de elétrons. Note que a integral interna da equação 3.3 descreve a situação de uma superfície de água em que a densidade aumenta gradativamente de zero até o valor do *bulk*. No caso especial de uma interface que muda abruptamente sua densidade para zero (caso especial dos sólidos), o termo entre parênteses da equação 3.3 se reduz a $-z/\text{EAL}$, como $I \propto \int_0^{\infty} \rho(z) \exp(-z/\text{EAL}) dz$.

A água pura consiste de uma única espécie molecular, fornecendo $\rho_A(z) = \rho_{\text{tot}}(z)$. Com a substituição $\alpha' = \alpha \rho_0$, a equação (3.3) é simplificada para:

$$I = \alpha' F \sigma T (\text{EAL}) \quad (3.4)$$

que pode ser usada para determinar o EAL já que todos os outros fatores podem ser estimados ou medidos. Normalmente, se fala de uma **curva universal de IMFP** (sendo mais apropriado se falar em **curva universal de EAL**), como pode ser observado na figura 3.2(b). Podemos usar a curva universal para inferir de qual profundidade os elétrons estão sendo emitidos, no entanto, precisamos usar uma barra de erro com um tamanho apropriado. A curva apresenta um mínimo para o qual com a energia cinética entre 10 e 100 eV o sinal de fotoelétrons detectados vem apenas da superfície. Para valores menores ou maiores que esta faixa de energia, o sinal de fotoelétrons passa a ter também contribuições do *bulk*.

Cabe salientar ainda que este é um dos fundamentos que justifica a grande potencialidade da análise de superfícies líquidas usando a PES. Se o sinal de PES é proporcional a $e^{-z/EAL}$, quando mudamos o comprimento de atenuação do elétron, pela variação da energia do fóton (que resulta na variação de energia cinética do elétron ejetado), podemos ajustar a coleta dos fotoelétrons para ser mais sensível à superfície ou ao *bulk* da solução estudada. Na figura 3.3, vemos um diagrama que representa o perfil de uma superfície líquida (à esquerda) e uma curva (à direita) que mostra como o sinal de fotoelétrons é atenuado em função da profundidade (z) analisada. Para energias cinéticas dos fotoelétrons baixas (~ 10 eV), o sinal é praticamente exclusivo da região de superfície (interface), fotoelétrons do *bulk* acabam se chocando com as moléculas do sistema perdendo a informação de sua energia cinética como pode ser visto na figura 3.3 (esquerda).

Na medida em que a energia cinética do fotoelétron ejetado aumenta, devido ao aumento na energia do fóton, permite-se que mais sinal do *bulk* esteja presente nos picos observados em um espectro, aumentando o número de camadas acessíveis além da interface [65]. Para o caso de energias cinéticas extremamente baixas (< 10 eV), a curva universal de EAL (figura 3.2) mostra que o poder de detecção se torna muito sensível ao *bulk*. Podemos compreender este último processo, entendendo que as colisões elásticas são frequentes em baixa energia, permitindo que elétrons de monocamadas mais profundas possam ser detectados pelo analisador.

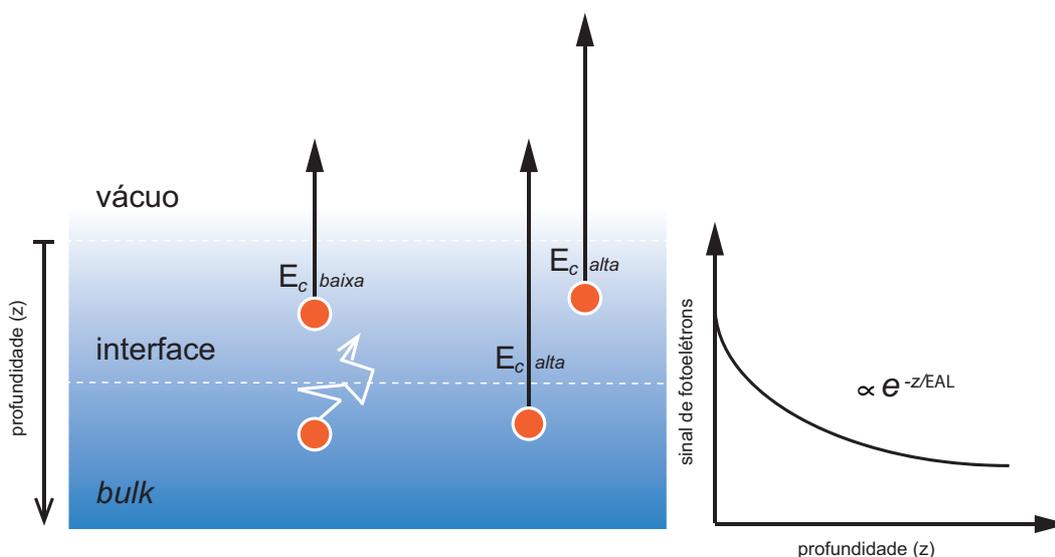


Figura 3.3: Efeito do aumento da energia dos fótons na capacidade de explorar monocamadas mais internas da superfície líquida. A esquerda se observa a relação entre o EAL e a energia cinética do fotoelétron ejetado. A direita observamos um esboço teórico da curva de atenuação do sinal de fotoelétrons em função da profundidade z .

Ainda na figura 3.2 inferior, vemos pontos vermelhos que representam o EAL para água líquida obtidos por N. Ottosson *et. al.* [63] a partir do sinal de PES do O1s. Vemos que, segundo este resultado, a água líquida possui um comportamento diferente da proposta de curva universal. Isso se deve certamente ao oxigênio que é um fraco espalhador (com o hidrogênio sendo desprezível) mas também pode ser consequência da rede de ligações de hidrogênio que facilita a passagem dos elétrons. Esse resultado para $\text{H}_2\text{O}_{(\text{liq})}$ indica o valor de cerca de $\text{EAL}=20 \text{ \AA}$ para fótons de 100 eV, o que contrasta com os valores assumidos em trabalhos publicados anteriormente (5 -10 \AA) [3, 66, 67]. Apesar deste resultado, não há um cálculo preciso do valor do IMFP e do EAL para a água líquida.

Considerando um jato cilíndrico de água em uma região em vácuo, o jato líquido terá uma densidade, $\rho(r)$, variável em função do raio r do jato, onde a densidade será a mesma da água líquida em $r = 0$, até que a densidade atinja o mesmo valor que o da água em estado gasoso para um $r \gg R$. Entre estas duas regiões, a de densidade $\rho=\text{H}_2\text{O}_{(\text{liq})}$ e a de densidade $\rho=\text{H}_2\text{O}_{(\text{gás})}$, vai existir uma região de **interface líquido-vapor**, é desta região que falamos quando dizemos **superfície líquida**. Quando usarmos os termos interface líquida ou superfície líquida, estaremos tratando do mesmo conceito.

O *bulk* da solução é a região imediatamente inferior a interface líquido-gás. É muito complexo definir em qual profundidade os átomos ainda compõe a superfície já que esse valor depende fortemente da energia cinética dos fotoelétrons ejetados. Nos trabalhos já publicados não há um consenso a respeito de até que profundidade os átomos ainda fazem parte da superfície. Isso se deve ao fato da própria estrutura da água líquida ser pouco compreendida.

3.2 Aspectos da Técnica de Micro-Jato

Como já foi apresentado na introdução, a técnica de micro-jato permitiu que os resultados experimentais desta tese pudessem ser obtidos. Pela técnica, não é só possível identificar, mas também separar as contribuições da parte gasosa e da parte líquida da amostra utilizada. Em 1985, a partir de suas observações experimentais, Hans Siegbahn apresentou um princípio básico para se obter uma intensidade suficiente de sinal de fotoelétrons para um experimento de fotoemissão. Para tal, é necessário que $P \cdot d < 0,1 \text{ Torr} \cdot \text{mm}$ [68], onde P é a pressão de vapor do líquido a ser estudado e d é a distancia da superfície do líquido a entrada do analisador de elétrons. Como a pressão de vapor da água líquida é alta (4,6 Torr), os experimentos de fotoemissão só conseguiam ser realizados para amostras com baixa pressão de vapor.

A proposição do micro-jato foi feita por Manfred Faubel em 1988 [13] e sua apresentação de resultados experimentais para líquidos voláteis como a água e outros foi apresentada em 1997 [17]. No caso do micro-jato (simetria cilíndrica), podemos aproximar o valor de $P \cdot d$ por:

$$P \cdot d = \int_{R_{jato}}^{R_{espc}} P(r) dr = P_0 R_{jato} (\ln R_{espc} - \ln R_{jato}) \quad (3.5)$$

$$P \cdot d \leq 0.1 \text{ Torr mm},$$

onde a pressão de vapor do líquido pode ser descrita por $P(r) = P_0 R_{jato}/r$. Na expressão 3.5, R_{jato} é o raio do micro-jato líquido, R_{espec} é a distância da entrada do espectrômetro a partir do centro do micro-jato e P_0 corresponde a pressão de vapor de equilíbrio na superfície do micro-jato. Em nossos experimentos, usamos bicos injetores de 10 a 20 μm , e a distância do analisador à superfície do líquido é de cerca de 1 mm, garantindo a condição proposta por Siegbahn [14, 68]. No nosso experimento, o micro-jato sai com uma velocidade de cerca de 46 m/s para um bico de 18 μm e pressão de injeção de líquido de 11 bar [69], a alta velocidade garante que a superfície estudada seja continuamente renovada, permitindo superar a dificuldade do carregamento superficial, presente em experimentos anteriores [70]. A expansão rápida do líquido ao entrar na câmara resfria o líquido a 4°C e esta é a temperatura em que o experimento é realizado.

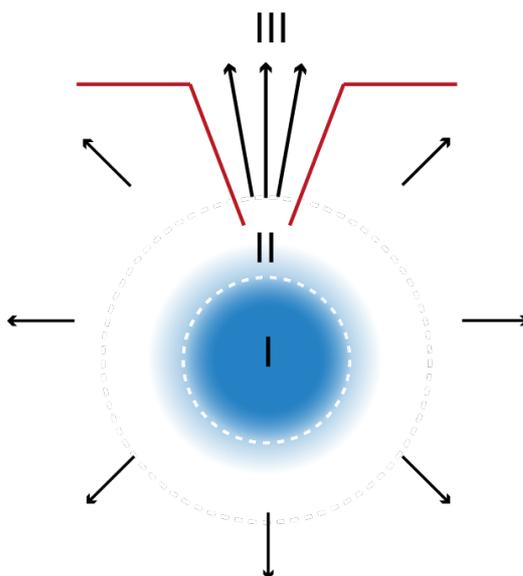


Figura 3.4: Corte do micro-jato líquido com três regiões identificadas: em (I) vemos o caroço líquido que contém o *bulk* e a interface líquido-vapor, em (II) a região de vapor e em (III) a região de regime de campo molecular ($IMFP \gg d$). O corte transversal do *skimmer* está desenhado em vermelho na figura.

Na figura 3.4, vemos um corte do micro-jato, com três regiões identificadas: o caroço líquido em I que contém o *bulk* e a superfície líquida (interface), a região de vapor em II e a fase de campo molecular ($\lambda \gg d$) em III. O melhor modo de reduzir a influência da região II é produzir um jato extremamente fino, e adicionado a isso, podemos utilizar um *skimmer*. O *skimmer* é um cone metálico com um orifício de abertura de 0.9 mm, (vide figura 3.4) que separa a câmara de medidas (onde está o micro-jato) da região das lentes do analisador. Apesar de não termos descrito o aparato experimental, entenda que os elétrons, para serem detectados, precisam ser focalizados em um detector. Essa focalização é feita pelo conjunto de lentes, o *skimmer* permite que o sistema de detecção dos elétrons esteja numa pressão muito menor que a da câmara de medidas, já que esta é uma condição necessária para detectarmos os elétrons.

A pressão de líquido de um micro-jato cai com $1/r$, devido a geometria cilíndrica, quando introduzimos o *skimmer* a geometria muda localmente na entrada do analisador de cilíndrica para esférica. Neste caso, a pressão passa a cair com $1/r^2$, podendo garantir um bom bombeamento diferencial entre a câmara de medidas e o analisador. Tipicamente, as medidas são realizadas com a pressão da câmara em cerca de $\sim 10^{-3}$ mbar enquanto o analisador permanece com pressões da ordem de 10^3 vezes menores. O aparato será apresentado em detalhes nas seções seguintes.

3.3 Radiação Síncrotron, LNLS e Linha PGM

A radiação síncrotron é um tipo de radiação eletromagnética que é várias vezes mais intensa que aquela produzida por tubo de raios X convencionais ou lâmpadas de ultravioleta. Normalmente, ela é produzida em anéis de armazenamento, quando elétrons viajam a velocidades relativísticas ($v/c \approx 1$). Várias propriedades deste tipo de radiação fazem dela um excelente instrumento para aplicações científicas. Dentre elas, podemos destacar: *alto brilho*^{†††} [59] *amplo espectro de emissão contínuo* (varrendo do infravermelho até os raios X), *alto grau de polarização* (luz linearmente polarizada no plano da órbita dos elétrons e elipticamente polarizada fora deste plano), *alta colimação* (podendo chegar a dezenas de μm), *estrutura temporal pulsada* e *alta estabilidade* em condições de ultra-alto vácuo.

O Brasil possui um Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado na cidade de Campinas, no estado de São Paulo. Para produzir este tipo de radiação no LNLS é necessário um grande canhão de elétrons capaz de produzir uma alta corrente (250 mA) por efeito termiônico, um acelerador linear que acelera estes elétrons por meio de

^{†††}Brilho é a medida do número de fótons emitidos por segundo, por unidade do tamanho da fonte, por unidade de ângulo espacial e pela largura de banda de 1/1000 da energia do fóton.

radiofrequência até 120 MeV e os introduz num anel injetor, até que suas energias atinjam 500 MeV. Finalmente, estes elétrons são inseridos num anel de armazenamento até que alcancem a energia de 1,37 GeV [71]. O anel de armazenamento não possui uma forma circular, mas a forma de um polígono com diversos ímãs de dipolo nas arestas, que curvam a trajetória dos elétrons, fazendo com que eles emitam a radiação síncrotron.

Em uma das seções retas do anel de armazenamento, se encontra um outro tipo de dispositivo de inserção conhecido como ondulator. Este dispositivo é uma fonte de radiação característica dos chamados laboratórios de terceira geração, apesar do LNLS ainda ser considerado um laboratório de segunda geração, já que a maioria de seus dispositivos de emissão ainda são ímãs de dipolo. O nome da linha de luz do ondulator chama-se **U11-PGM** (*Planar Grating Monochromator*) – fazendo referência ao tipo de monocromador utilizado, que é uma grade de difração plana [65].

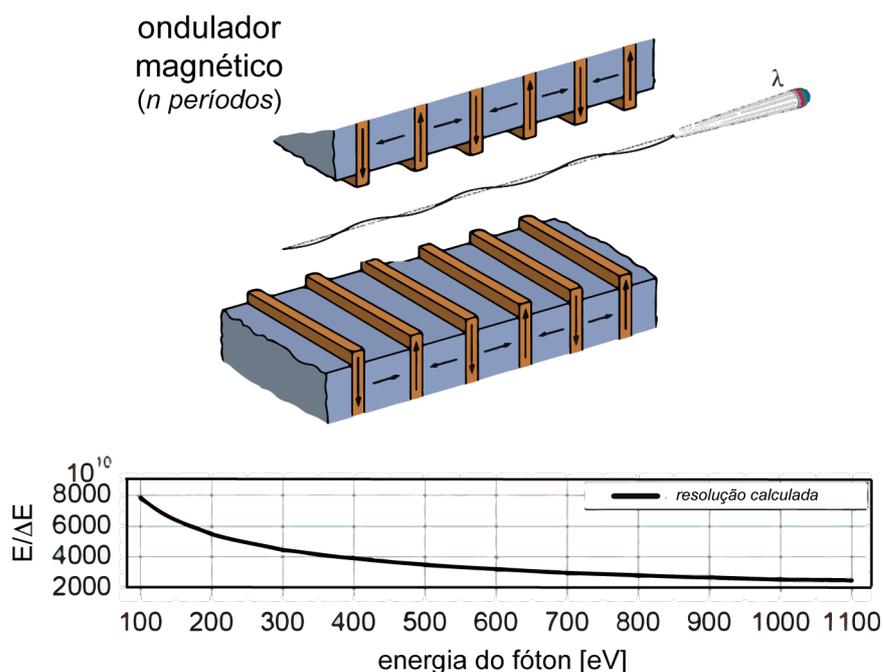


Figura 3.5: Esquema do ondulator magnético: a posição dos magnetos faz um *zig-zag* com os elétrons, fazendo-os emitir radiação coerente com intensidade de fótons muito maior que as dos ímãs de dipolo. Na parte inferior da figura, apresentamos a resolução calculada da linha de luz U11-PGM em função da energia dos fótons, como consta em Cezar, J. C. *et al.* [72].

Onduladores utilizam o princípio de geração harmônica, onde uma sequência de magnetos, figura 3.5, faz com que os elétrons oscilem com um período muito curto, produzindo emissão coerente da radiação e permitindo o aparecimento de interferências construtivas e destrutivas [73]. No caso da figura 3.5 essas interferências produziram um feixe com intensidade máxima de comprimento λ . O ondulator do LNLS produz um feixe altamente colimado e muitas ordens de grandeza superior aos ímãs de dipolo (pode chegar

$$\frac{\Delta E_{ond}}{E} = \frac{1}{n} \quad (3.6)$$

até 10^4 vezes maior que a produzida pela linha de um ímã de dipolo, como a linha de XAFS^{†††} [72, 74]. Na figura 3.6, podemos observar um esquema prático do porquê deste ganho de intensidade e brilho: a transformada de Fourier de uma função $x(t)$ que faz n oscilações é um pico de largura $1/n$ no espaço de frequências $x(\omega)$. Quanto maior o número de oscilações, o pico se torna mais estreito em energia ($n \rightarrow \infty$). Aplicando este mesmo princípio para um elétron oscilante, veremos que no caso de um ímã de dipolo o elétron não chega a fazer nem uma oscilação completa, por isso, o seu espectro de emissão é tão largo. No caso do ondulator o espectro é estreito e bem definido, e o mais importante, muito mais intenso e colimado. Podemos mudar a energia do feixe emitido mudando o espaçamento dos magnetos (*gaps*). A largura da linhas do ondulator é dada pela expressão 3.6. Isto nos dá, por exemplo, uma largura de 2 eV para um a energia do fótons de 100 eV. A resolução da linha é dada pelo monocromador. No caso da linha de luz, numa energia de 100 eV, com uma fenda de 100 μm e corrente de 200 mA no anel, a resolução é de 125 meV. Na parte inferior da figura 3.4, apresentamos a resolução da linha de luz U11-PGM em função da energia do feixe, obtida da referência [75]. Este fator também contribuirá para a resolução final dos picos observados nos espectros.

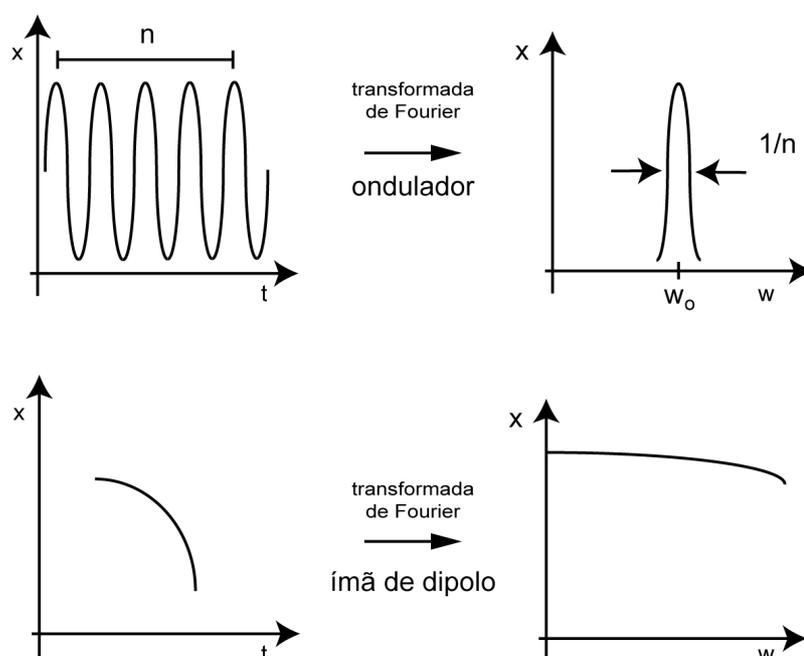


Figura 3.6: Analogia entre a transformada de Fourier e o espectro de distribuição em energia para um ondulator e um ímã de dipolo.

^{†††}X-ray Absorption Fine Structure – Estrutura Fina de Absorção de Raio-X

Na figura 3.7 apresentamos um esquema da linha U11-PGM vista de cima e lateralmente [65]: a fonte de luz é um ondulator de polarização elíptica (EPU^{sss}) construído no próprio LNLS. Ele é um ondulator do tipo APPLE II com 50 mm de período e 2,7 m de comprimento. O primeiro elemento óptico (E1) é um espelho lateral de tipo toroidal que colima o feixe verticalmente antes que o feixe chegue ao monocromador (E2). O monocromador está acoplado a uma grade (G) de densidade variável apresentando 1500 ranhuras/mm em seu centro. O feixe passa pela fenda de saída (FS) que define a banda passante e é refocalizado por um dois espelhos toroidais (E3a) ou (E3b). Cada um destes espelhos está destinado a um dos dois braços da linha de luz. Usa-se o braço (A) para experimentos que usam a técnica de dicroísmo circular magnético em amostras preparadas *in situ* e XPS em sólidos, e o braço (B) para experimentos com análise de XPS para amostras gasosas e líquidas usando o analisador de elétrons Scienta R4000.

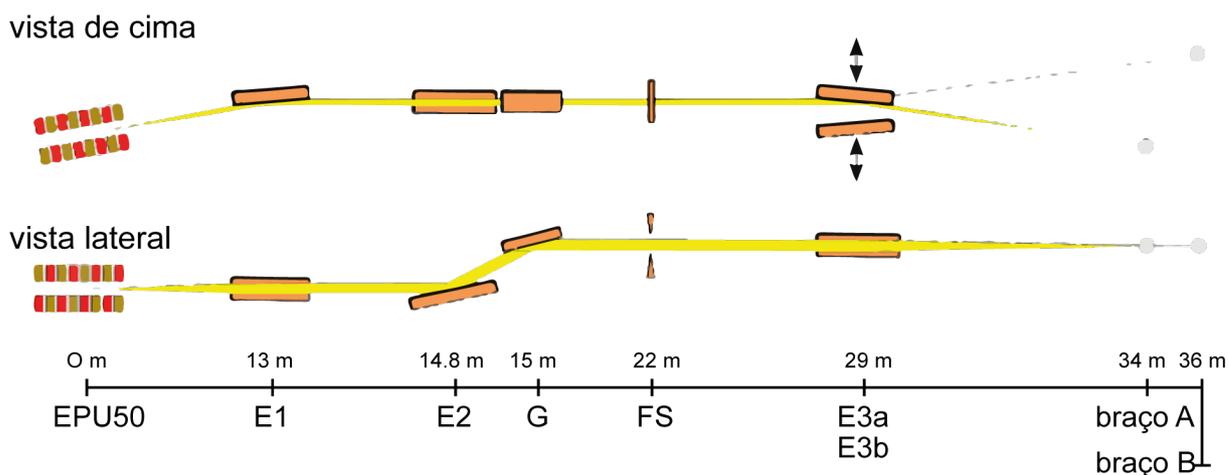


Figura 3.7: Esquema da linha de luz PGM – EPU50: ondulator APPLE II com 50 mm de período; E1: espelho toroidal colimador; E2: espelho plano monocromador; G: grade plana VLS; FS: fenda de saída; E3a, E3b: espelhos refocalizadores toroidais para cada braço da linha de luz, como consta em Cezar, J. C. *et. al.* [72].

Uma ampla gama de experimentos pode ser conduzida num laboratório síncrotron usando onduladores, no entanto, na sua construção, as especificações dos parâmetros dos onduladores acabam por restringir a faixa de energia dos fótons que possam ser gerados com intensidade suficiente para serem utilizados em experimentos. No nosso caso, a U11-PGM é capaz de produzir fótons de 100 a 1000 eV, sendo apropriada para experimentos na região dos raios X moles. Num futuro próximo o novo laboratório síncrotron brasileiro (Sirius), será uma fonte de terceira geração onde as suas linhas de luz serão, em sua

^{sss} Elliptically Polarizing Undulator

maioria, linhas de ondulador. A linha de luz também possui um importante sistema de bombeamento diferencial que permite que se possa realizar experimentos á pressão de até 1 mbar na câmara de medidas, mantendo-se uma pressão de 10^{-10} mbar nos espelhos E3a,b.

3.4 Analisador hemisférico de elétrons

As energias cinéticas dos vários fotoelétrons, i , ejetados da amostra líquida são iguais a:

$$E_c(i) = h\nu - E_b(i) \quad (3.7)$$

Assim, a energia cinética (E_c) representa uma medida direta de um estado eletrônico de uma amostra (E_b). Podemos medir o valor da energia cinética destes elétrons fazendo-os passar por um campo esfericamente simétrico entre dois eletrodos hemisféricos de raio r_1 e r_2 , como pode ser observado na figura 3.8.

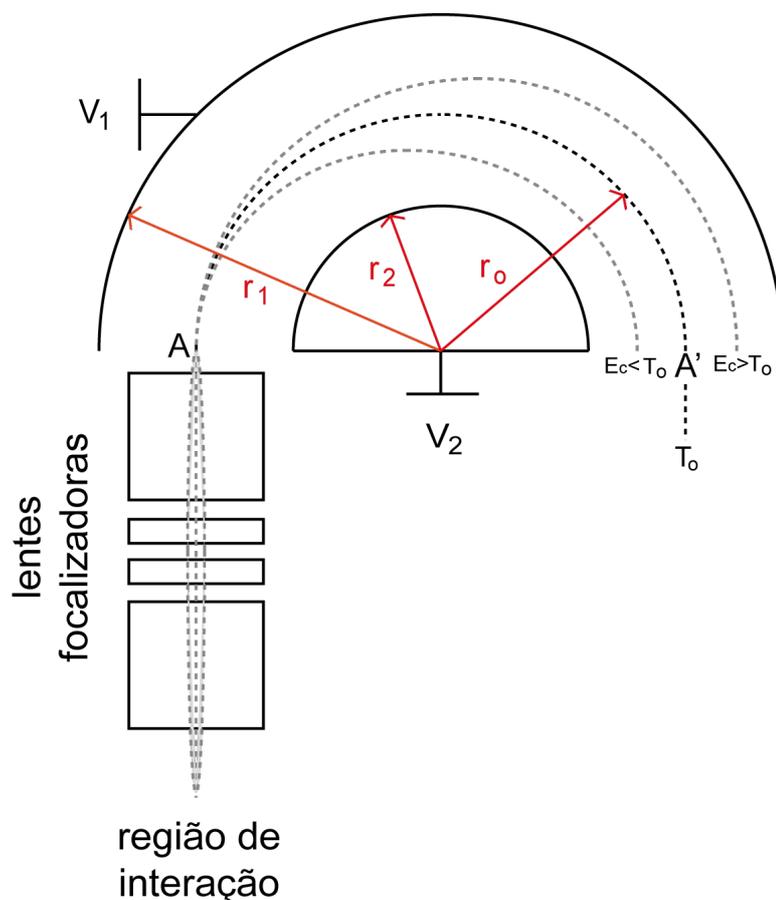


Figura 3.8: Esquema de um analisador hemisférico de elétrons: destacam-se as regiões onde ocorrem a interação com os fótons, a focalização dos elétrons realizadas pelas lentes e a região de campo entre os dois hemisférios. Elétrons com energia cinética T_0 partem do ponto A e atingem o ponto diametralmente oposto A'.

Este dispositivo dispersa os elétrons em função de sua energia cinética, analogamente a um prisma que dispersa a luz em função dos comprimentos de onda. Potenciais V_1 e V_2 são aplicados nos hemisférios, de forma que o campo elétrico $E_r(r)$ entre os dois hemisférios concêntricos de raios r_1 e r_2 é dado por:

$$E_r(r) = -\frac{(V_2 - V_1) r_1 r_2}{(r_2 - r_1) r^2} \quad (3.8)$$

Um elétron com energia cinética, $E_c = T_0$, em eV, que entra neste campo a partir do ponto A, tangencialmente ao raio médio $r_0 = (r_1 + r_2)/2$, se moverá entre as cascas esféricas se $E_r(r_0) = 2T_0/r_0$. Este campo fornece a voltagem dos dois hemisférios, relativas ao potencial central de raio r_0 como:

$$V_1 = \frac{T_0(r_2 - r_1)}{r_1} \quad (3.9)$$

$$V_2 = -\frac{T_0(r_2 - r_1)}{r_2} \quad (3.10)$$

Todos os elétrons com energia T_0 que chegam na fenda de passagem A atingem o ponto A', diametralmente oposto a A, de raio r_0 . Elétrons que chegam em A com energias diferentes, no intervalo $T_0 + \Delta T$, se moverão em trajetórias elípticas e atingirão o detector no ponto próximo a A' com raio r , tal que:

$$r = r_0 \left(1 + \frac{2\Delta T}{T_0} + 4r_0 \left(\frac{\Delta T}{T_0} \right)^2 + \dots \right) \quad (3.11)$$

A energia de dispersão D é da ordem de $D = dr/dT = 2r_0/T_0$. A energia cinética T_0 é chamada **energia de passagem**, e pode ser escolhida ajustando-se o conjunto de lentes focalizadoras, permitindo frear ou acelerar os elétrons no processo de focalização. Ganha-se em eficiência ou resolução dependendo da energia de passagem escolhida. Usamos uma $T_0 = 100$ eV em todos os nossos experimentos. Uma ampla discussão técnica sobre resolução, papel das lentes focalizadoras, desvio angular dos elétrons pode ser encontrada em B. Wannberg [76].

O analisador hemisférico de elétrons que usamos é um Scientia R4000 que funciona a altas pressões (cerca de 1 mbar) na câmara de medidas, mantendo o analisador numa pressão cerca de quatro ordens de grandeza menor que a câmara principal. A resolução em energia do analisador Scientia (ΔE_{Sci}) pode ser descrita pela seguinte aproximação:

$$\Delta E_{Sci} = \frac{T_0 S}{2r_0} \quad (3.12)$$

Onde S representa o tamanho da fenda de passagem presente em A, que é escolhida dependendo da eficiência ou resolução desejada. O raio médio (r_0) do analisador é de 200 mm e as fendas utilizadas foram de 0,1 e 0,2 milímetros. A energia de passagem (T_0) utilizada foi de 100 eV. Deste modo, a resolução em energia varia entre 100 e 200 meV.

Nos instrumentos modernos empregamos detectores com multicanais para que o espectro seja gravado rapidamente. Ele é baseado no uso de duas placas de multicanais (MCP)^{****} montados num arranjo chamado *chevron*. Os microcanais tem um diâmetro $D \sim 10 - 50 \mu\text{m}$ e o comprimento do canal é tipicamente $\sim 50D$. As superfícies dos canais são cobertas com uma camada de material semiconductor que fornece uma alta emissão de elétrons secundários. No fundo, elas trabalham como fotomultiplicadoras que produzem um pulso de elétrons detectável para cada elétron que atinge o detector. O pulso do elétron é convertido em um ponto de luz em um anteparo fosforescente, podemos vê-lo a olho nu ou com o auxílio de uma câmara CCD, que é o que usamos.

Nosso analisador também possui um sistema de bombeamento diferencial. No analisador temos a abertura de 0,9 mm num primeiro cone (como descrito na figura 3.6) e um segundo cone de 2,2 mm situada a cerca de 2 mm acima da abertura do primeiro cone. Os dois sistemas de bombeamento diferencial foram selados no LNLS sendo que só após estes melhoramentos foi possível atingir os parâmetros de trabalho com uma pressão adequada no analisador. É possível operar o sistema com 1 mbar de pressão na câmara de medidas enquanto o analisador se mantém numa pressão de 10^{-5} mbar.

A largura total em energia (ΔE_t) de um dado pico específico encontrado em um espectro é dada pela raiz quadrada da soma dos quadrados das incertezas da largura do fóton (ΔE_{ond})^{††††}, da largura devido ao Scientia (ΔE_{Sci}), da largura devido a outras contribuições físicas do experimento (ΔE_{out}), e ainda da contribuição Lorentziana (ΔE_{Lor}) referente ao tempo de vida do estado eletrônico.

^{****}*Multi Channel Plates*

^{††††}Neste caso, não é aquela descrita pela equação (3.6). A largura do fóton é menor que aquela ali apresentada, o valor correto é descrito pelo gráfico da figura 3.5.

$$\Delta E_t = \sqrt{\Delta E_{ond}^2 + \Delta E_{Sci}^2 + \Delta E_{out}^2 + \Delta E_{Lor}^2} \quad (3.13)$$

3.5 Interpretação e ajuste dos espectros

Alguns aspectos importantes devem ser avaliados durante a análise dos espectros obtidos nas medidas. Destacamos: **blindagem e polarização** – quando um átomo ou molécula é ionizado, surge uma redistribuição de carga das moléculas vizinhas, por meio de interações dipolares. Essa interação blindo o átomo ionizado diminuindo a energia do seu estado final, com isso, a energia cinética do fotoelétron emitido tem um valor maior do que aquela que seria para o átomo livre; **acoplamento spin-órbita** – o fenômeno de interação do momento angular (l) e do momento de spin do elétron (s), dá origem ao momento angular total (j), onde $j=l+s$. Todos os orbitais, exceto os de tipo s ($l=0$), dão origem a dupletos em um espectro⁺⁺⁺, devido aos spins poderem ser $+1/2$ ou $-1/2$. Orbitais do tipo p ($l=1$), d ($l=2$), f ($l=3$) terão sempre duas componentes, $j=l+1/2$ ou $j=l-1/2$ resultantes da interação do momento angular com o spin ($p_{1/2,3/2}$, $d_{3/2,5/2}$, $f_{5/2,7/2}$), por isso, descrevemos orbitais como $2p_{1/2}$, $2p_{3/2}$, etc; **ambiente químico** – o ambiente químico de um elemento, ou seja, a forma com que ele se liga ou interage com outros elementos, altera a energia de ligação de um determinado elétron, com essa propriedade, podemos usar o XPS como uma sonda a fim de determinar a estrutura de um sistema a ser estudado; **tempo de vida do estado** – o tempo de vida de um estado (τ) pode ser descrito a partir do princípio de incerteza de Heisenberg ($\Delta E \cdot \tau = \hbar$), onde \hbar é a constante de Planck (h) dividida por 2π e ΔE é a incerteza na energia. Com isso, o pico em um espectro, tem uma contribuição em sua largura a meia altura (FWHM^{§§§§}) associado a incerteza da energia do estado. O perfil desta contribuição tem a forma de uma *Lorentziana*, enquanto que a incerteza experimental dá origem a uma contribuição *gaussiana*.

Quando lidamos com a fase gasosa é possível encontrar estruturas vibracionais envelopadas bem definidas para uma transição eletrônica, mas quando observamos espectros de líquidos tais estruturas ficam tão alargadas que não é possível separar as contribuições vibracionais. Como o ambiente químico está continuamente mudando devido as constantes flutuações da geometria dos vizinhos no líquido, abrem-se grandes possibilidades de orientação das moléculas e não se consegue uma linha bem definida típica de uma estrutura vibracional.

Para se ajustar os picos dos orbitais $C1s$, $S2p$, $N1s$ e $P2p$ nos espectros foi usado o pacote SPANCF de autoria de Edwin Kukk [77, 78], instalado no programa Igor Pro

⁺⁺⁺ Isso não significa que o duplete esteja necessariamente bem resolvido.

^{§§§§} Full Width at Half Maximum – Largura total à meia-altura.

Wavemetrics [79] que é uma plataforma para análise de dados. O pacote permite a remoção do ruído e a inclusão do número de picos que for necessário ao ajuste. Podemos fixar ou alterar para cada pico individualmente a posição, a intensidade, a FWHM da contribuição Lorentziana, a FWHM da contribuição Gaussiana e o parâmetro de assimetria PCI (*Post-Collision Interaction*). A PCI, interação de pós-colisão, ocorre quando a energia cinética do fotoelétron emitido é menor que a do elétron Auger envolvido na relaxação da vacância gerado pelo fotoelétron. Nesse caso, o elétron Auger é ejetado e a vacância deixada por ele vai retardar o fotoelétron devido a uma atração Coulombiana residual. Esse atraso depende da distância do fotoelétron ao caroço iônico e faz com que a forma de linha dos picos tenha uma forma assimétrica no sentido de mais altas energia de ligação. Em nossos ajustes o parâmetro de assimetria foi fixado em zero, pois não se observou padrão assimétrico nos picos.

Por uma questão de organização, vamos descrever quais dos outros parâmetros foram ou não fixados na apresentação e discussão dos resultados. No próximo tópico vamos descrever o aparato experimental utilizado.

3.6 Descrição do aparato experimental

Para realizarmos as medidas de PES em líquidos, o seguinte aparato experimental foi montado e é descrito na figura 3.9. Precisamos de uma bomba para injetar o líquido na câmara, um bico injetor que faz com o que o jato tenha o diâmetro desejado e um analisador de elétrons com um bombeamento diferencial eficiente entre a câmara principal e o analisador.

Duas armadilhas de N₂ líquido [(5), (6)] são conectadas à câmara principal (3). A armadilha (6) funciona como um coletor do jato líquido (em azul) usado nas medidas; já a armadilha (5) auxilia no bombeamento da câmara, isso implica um reforço na capacidade bombeamento que se soma ao bombeamento da **bomba turbo molecular** (4) de 500 l/s). O **skimmer** (3a) permite a realização do bombeamento diferencial entre a câmara principal e o analisador. A pressão de trabalho na câmara principal é da ordem de 10⁻³ mbar e a pressão no analisador permanece em 10⁻⁶ mbar durante o experimento. No sistema do analisador de elétrons (1) são usadas três bombas turbo moleculares de 250 l/s (2), que fazem o bombeamento diferencial. A **câmera digital** (7) monitora o perfil do jato e coloca essa imagem num monitor, assim, quando o jato começa a congelar formando estalagmites, usamos o **quebrador de gelo** (8) para evitar que o experimento seja interrompido pelo congelamento do jato até o bico injetor (3b). No canto superior direito, temos um **zoom** no detalhe do **bico injetor** e do **skimmer**, na região de onde os elétrons são coletados.

O sistema de injeção do jato líquido é uma bomba **HPLC** (*High Performance Liquid Chromatography*), usada em experimentos de cromatografia líquida que força o líquido, sob alta pressão, a passar pelo bico do micro jato e entrar dentro da câmara. As amostras são inseridas a partir de uma chave que seleciona a amostra a ser bombeada. A chave tem capacidade para selecionar até seis amostras disponíveis, permitindo que as amostras possam ser trocadas durante o experimento sem a necessidade de interromper as medidas

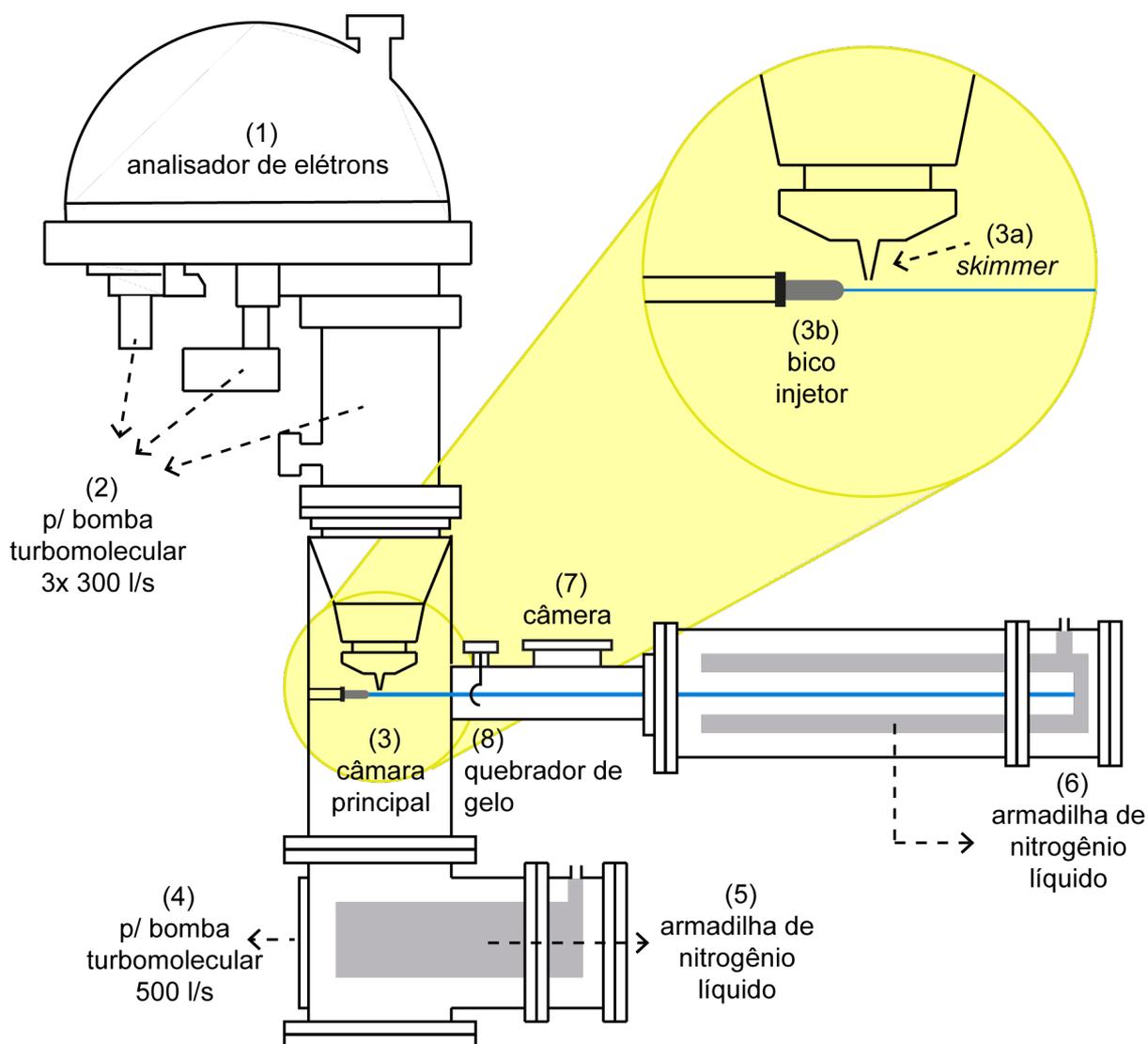


Figura 3.9: Aparato experimental para a espectroscopia de elétrons em líquidos: (1) analisador de elétrons Scienta R4000, (2,4) sistema de bombeamento com bombas turbo, (3) câmara principal de medidas, (3a) *skimmer* que auxilia no bombeamento diferencial, (3b) bico injetor de quartzo, (5) armadilha de nitrogênio líquido que funciona como uma bomba criogênica, (6) armadilha de nitrogênio líquido que funciona como bomba criogênica e armazena o líquido congelado após as medidas, (7) câmara de monitoramento do perfil de gelo, (8) quebrador de gelo.

3.7 Preparação das amostras

Analizamos amostras de sais iônicos (fosfato monossódico e tiosulfato de sódio) e também de aminoácidos (Cisteína e Metionina). Os dois tipos de amostra possuem preparos diferentes que vamos apresentar agora.

Soluções de sais iônicos: as amostras de fosfato monossódico – NaH_2PO_4 – ($M=163,94 \text{ g/mol}$) e tiosulfato de sódio – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – ($M=158,11 \text{ g/mol}$) foram compradas da Sigma-Aldrich com pureza de 96% e 99%, respectivamente. Ambas foram diluídas em água desmineralizada por um purificador ELGA ($>10 \text{ M}\Omega\text{-cm}$), em diferentes concentrações. Essas concentrações são bem próximas do limite de solubilidade dos sais, para que o sinal de fotoelétrons seja intenso o suficiente para ser detectável.

Soluções de aminoácidos: A fim de maximizar alguma forma iônica de um dado aminoácido (catiônica, aniônica ou zwitteriônica), é necessário alterar o pH do líquido no qual ele está em solução. Para tal, foram adicionados NaOH e/ou HCl P.A. nas soluções aquosas. O pH da solução foi medido em temperatura ambiente com um pHmetro^{*****} Orion Modelo 410A. No caso específico da solução de Cisteína ($M=121,16 \text{ g/mol}$), devido a precisão necessária na medida do pH, também realizamos a medida do pH com a solução a 4°C , já que esta é a temperatura da solução dentro da câmara. Observamos uma variação muito pequena no pH que foi incluída na barra de erros dos resultados apresentados. A solução de 1M de Cisteína foi preparada nos pH (1.0, 5.0, 9.5, 12.5) para maximizar a forma aniônica, zwitteriônica (neutra), catiônica(1+) ou catiônica (2+), respectivamente. Para o estudo na Metionina ($M=149,21 \text{ g/mol}$) também foram preparadas três soluções de 0.3 M de metionina nos pH (1.0, 5.8 e 11.5) para maximizar a forma aniônica, zwitteriônica (neutra) ou catiônica, respectivamente.

Todas as soluções são filtradas com filtros Millipore ($0.22 \mu\text{m}$), evitando que impurezas como poeira e pelos possam estar presentes na solução. Este tipo de impureza entope o bico injetor provocando o congelamento do micro-jato. Outro procedimento comum às amostras é colocar os frascos que contêm as amostras filtradas em ultrassom. Esse cuidado retira as bolhas de ar que podem estar presentes na solução. Quando uma bolha de ar sai do micro-jato, ela sofre uma expansão extremamente rápida, provocando o congelamento do jato. Com isso a medida é interrompida, a câmara de medidas precisa ser arejada e as armadilhas de nitrogênio líquido necessitam ser limpas. Isso leva um tempo de aproximadamente duas horas entre o arejamento e colocar o sistema em pleno

^{*****} O pHmetro é um instrumento que consiste de um eletrodo conectado a um potenciômetro. A concentração de íons H^+ altera o potencial do eletrodo de forma que essa mudança pode ser convertida numa escala de pH. O pHmetro é calibrado a partir de três soluções padrão, uma ácida, uma básica e outra neutra.

funcionamento novamente. Filtragem e ultrassom são fundamentais para que o experimento possa ocorrer sem interrupções por congelamento do jato. Outro cuidado importante para o jato não congelar, é iniciar o jato líquido antes de fazer vácuo na câmara experimental.

Na figura 3.10, vemos o micro-jato saindo do bico injetor. Podemos observar que na região imediatamente posterior a saída do bico o líquido é escuro e cerca de meio centímetro depois o líquido fica esbranquiçado. A faixa escura corresponde a região onde o jato líquido é contínuo, na região esbranquiçada o que vemos são inúmeras gotículas. O feixe de fótons precisa incidir na região de fluxo contínuo, pois quando ele incide sobre as gotículas elas rapidamente carregam, fazendo com que os elétrons ejetados sejam perturbados pelo campo gerado pelas gotículas carregadas.

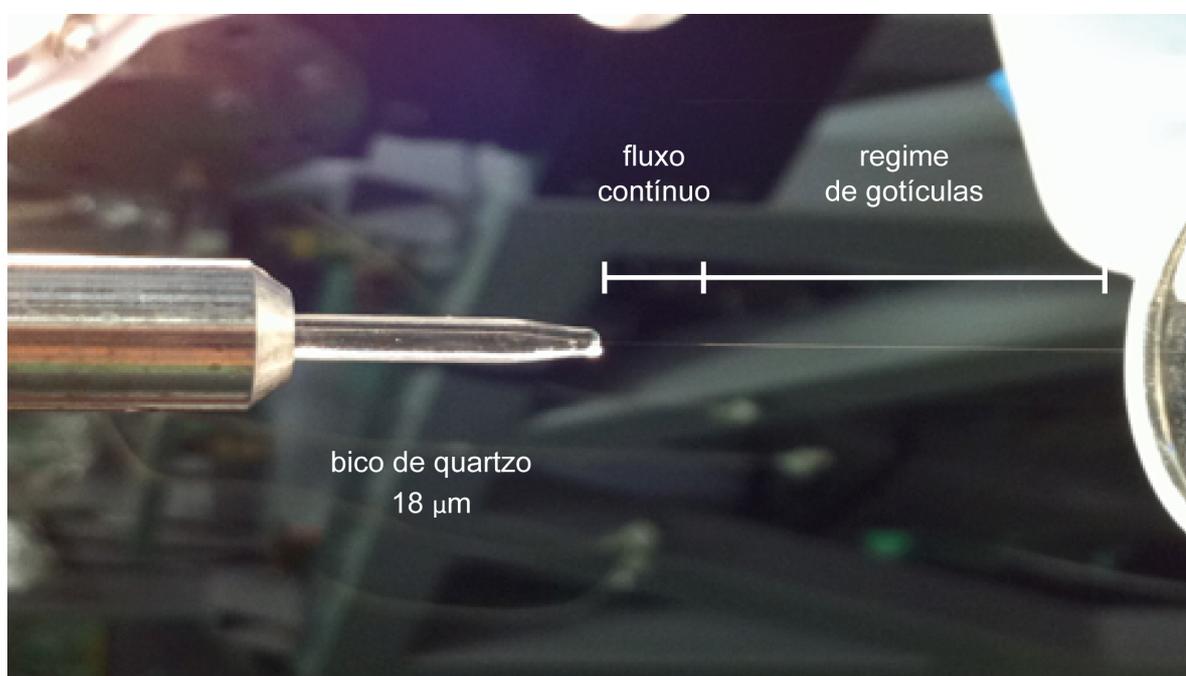


Figura 3.10: Detalhe do micro-jato (diâmetro do jato $< 18 \mu\text{m}$). É possível observar uma região de fluxo contínuo (escura) e uma outra região formada por gotículas (branca). As medidas são realizadas com o feixe de fótons incidindo sobre a região escura.

3.8 Alinhamento do micro-jato

Na figura 3.11, vemos o micro-jato a 1 mm de distância da entrada *skimmer* (cone na entrada do analisador dos elétrons), na posição usada para se obter os espectros de XPS de soluções líquidas. Para alinhar o micro-jato com o *skimmer* e com o feixe de fótons, usamos um manipulador de precisão micrométrica. Enquanto se ajusta a posição do jato com o manipulador, seleciona-se o espectrômetro para operar na função *modo de aquisição sem somar espectros*. Neste modo, o analisador nos mostra uma sequência de imagens de todos os elétrons coletados pela placa de MCP em 0.2 segundos de aquisição, numa faixa

de energia desejada (em geral usamos cerca de 15 eV). Com isso, podemos mover o jato com precisão micrométrica e observar em tempo real qual é o efeito da mudança da posição no espectro de valência da água líquida. Para quantificar essa mudança, nós selecionamos a região do espectro que contém só o pico da fase líquida, e neste caso, estamos falando do pico referente ao orbital $1b_1$. Selecionada esta região, o *software* do analisador Scienta, nos fornece a área do pico selecionado e com isso podemos maximizar a área, maximizando o sinal de fotoelétrons do líquido.

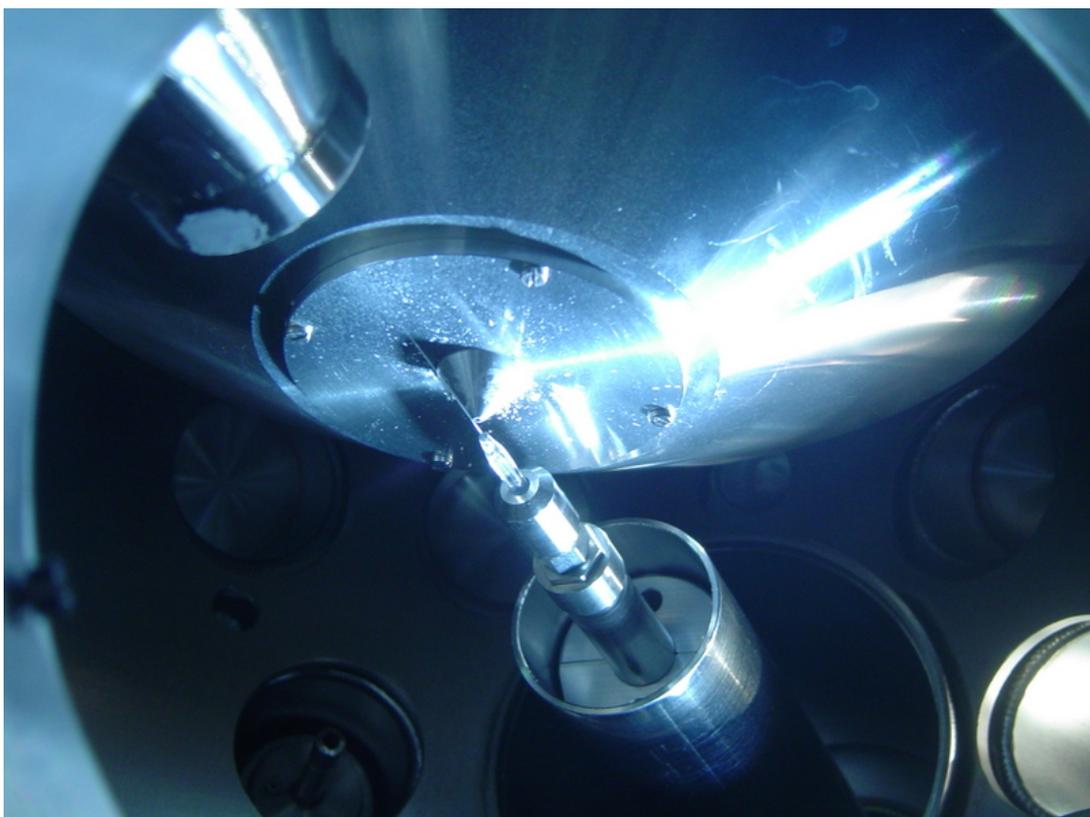


Figura 3.11: Detalhe do alinhamento do micro-jato com a entrada do *skimmer* e com o feixe de fótons.

Na figura 3.12, apresentamos um espectro de valência da H_2O (líq) para uma posição otimizada (curva em preto) e outra não otimizada do micro-jato (curva em vermelho). O pico assinalado como orbital $1b_{1g}$ está presente apenas na fase gasosa, e foi usado na normalização dos espectros, já o pico $1b_1$ é exclusivo da fase líquida. Como **apenas** no espectro de valência da água líquida existe este pico $1b_1$, podemos, maximizando a área deste pico, conseguir um sinal que tenha a máxima contribuição de líquido possível. Note que a largura dos outros picos aumenta a medida em que cresce a contribuição do pico referente ao orbital $1b_1$. Isso ocorre pois os picos referentes a fase líquida (sem subscrito “g”) são mais largos e deslocados para energias de ligação maiores. Sempre teremos a contribuição da fase gasosa, mas neste caso, o sinal líquido maximizado é muito maior que o sinal de gás. É possível maximizar ainda mais o sinal líquido quando a

luz incidente é micro-focalizada, permitindo, além disso, remover o *background* gasoso mantendo apenas o sinal da fase líquida [80]. Durante a otimização, é possível conseguir cerca de 17 milhões de contagens apenas no pico $1b_1$. No detalhe do gráfico da figura 3.12 mostramos um dos graus de liberdade para movimentar o micro-jato, próximo à entrada do *skimmer* e do feixe de fótons.

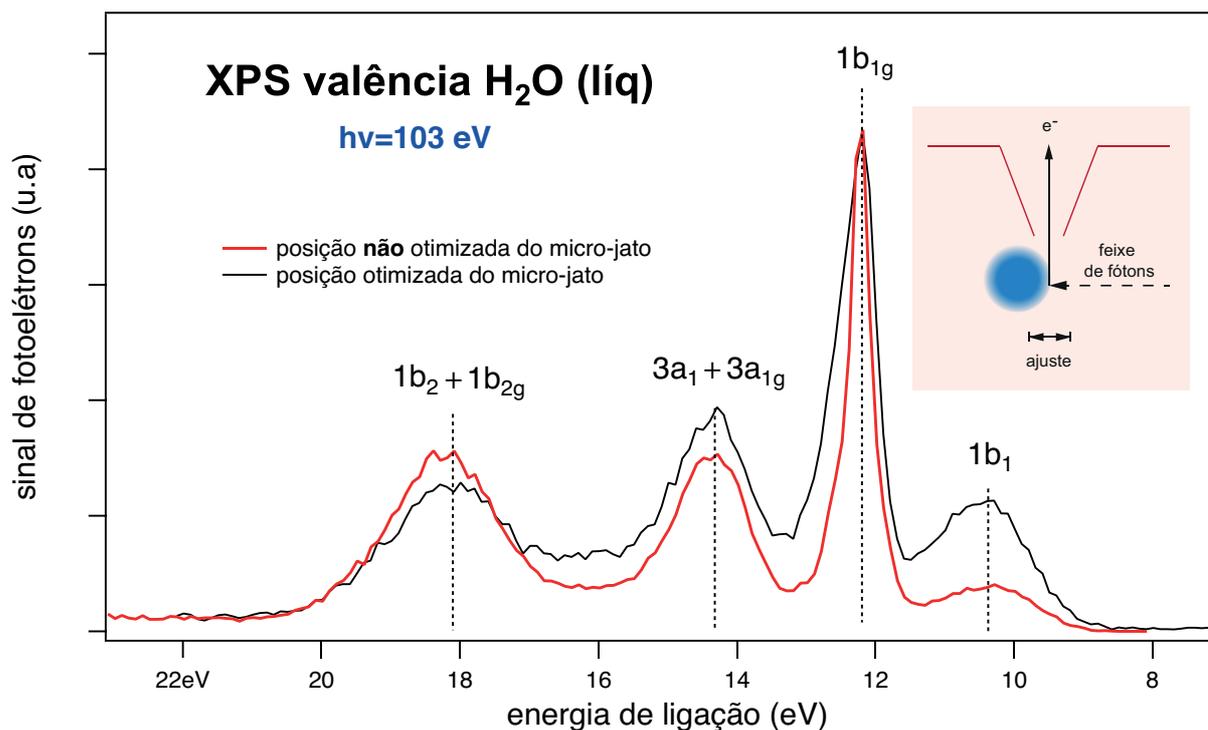


Figura 3.12: Espectro de valência da água líquida com o micro-jato numa posição otimizada (curva em preto) e não otimizada (curva em vermelho). Enquanto o orbital $1b_1$ é característico da fase líquida, o orbital $1b_{1g}$ é referente ao orbital de valência característico da fase gasosa da água. Os outros dois picos são compostos pela contribuição gasosa e líquida da água (orbitais de fase gasosa são indicados pelo subscrito "g"). Maximizando o sinal proveniente do orbital $1b_1$, maximizamos o sinal de fotoelétrons da água líquida. No quadrado dentro do gráfico, vemos o detalhe do alinhamento do micro-jato com a entrada do *skimmer* e com o feixe de fótons.

4. RESULTADOS

Para que o leitor possa utilizar os resultados desta tese, sem necessariamente ler todas as seções deste capítulo, vamos adotar um procedimento na descrição de nossos resultados. Para obter as informações de uma determinada análise apresentada é suficiente ler a seção correspondente aquele experimento, evita-se que nas longas discussões o leitor tenha que ficar indo e voltando na leitura do texto repetidamente.

Salientamos que todos os resultados apresentados nesta tese se baseiam na mesma técnica experimental (PES). Por isso, um ponto muito significativo deve ser avaliado. Apesar da aplicação de resultados de física atômica molecular, o experimento que realizamos reproduz/simula o ambiente químico de uma situação concreta como o de uma célula ou de uma gotícula de água na atmosfera. A partir da figura 4.1 vamos mostrar, primeiramente, que podemos usar os resultados de PES da superfície líquida para entendermos melhor o comportamento de um íon ligado a uma proteína ou molécula.

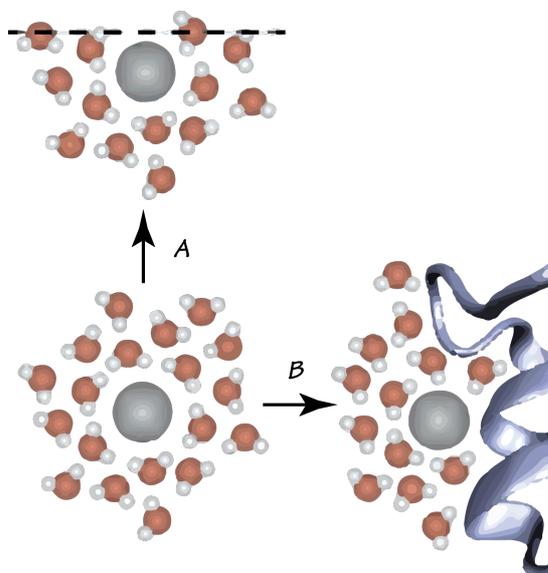


Figura 4.1 - Analogia entre a superfície de uma proteína e a interface líquido-vácuo [81].

Na técnica que usamos, é possível determinar a energia de ligação dos orbitais moleculares em meio aquoso, pois fazemos a medida direta das energias dos elétrons que estão em ambiente líquido, mas muito além disso, como concluiu Pegram *et al.* [81] (Figura 4.1),

observamos a analogia do íon ligado a superfície de uma proteína hidratada por diversas moléculas de água (B) e do mesmo íon na superfície líquida (A).

Nas duas situações A e B, há uma desidratação parcial do íon/molécula, o íon sai do *bulk* líquido e vai para a superfície em A ou se liga a uma proteína B. Essa desidratação parcial é o que permite que tenhamos *insights* do comportamento de um determinado íon/molécula na superfície de uma proteína. A desidratação parcial é uma chave para apresentarmos conclusões importantes do comportamento de biomoléculas dentro do ambiente celular, majoritariamente aquoso.

A interface líquido-ar está espalhada por todas as partes do planeta, sobretudo, nos aerossóis atmosféricos que emanam do oceano. Estes proporcionam ambientes especialmente vantajosos para a formação de peptídeos e para reações químicas que ajudam a regular a temperatura do planeta [82].

Coletivamente, os aerossóis formados no mar têm uma área de superfície muito maior do que todas as outras superfícies de água encontrados na Terra combinadas como rios, lagos e oceanos. De fato, os aerossóis presentes na atmosfera terrestre têm uma superfície 5000 vezes maior do que aquela da superfície dos oceanos [83]. Aerossóis são constantemente gerados pela quebra das ondas do mar, desta forma, saber a concentração de moléculas orgânicas na superfície em relação ao *bulk* é algo muito importante para compreender melhor as questões ambientais e a química da atmosfera.

4.1 Deslocamentos químicos induzidos pela variação do pH na Metionina e na Cisteína

Cisteína e Metionina são os únicos aminoácidos que possuem enxofre em sua composição, dentre a lista dos *20 aminoácidos*^{††††} *que são encontrados em eucariontes*. A Metionina é um *aminoácido essencial*^{‡‡‡‡} que é usado na produção de diversas substâncias necessárias a nutrição, a resposta imunológica e a defesa contra agressões externas. Encontramos a Metionina em ovos, carnes e peixes. A Metionina é um composto intermediário na síntese de Cisteína, portanto, a não ingestão de Metionina pode causar deficiências na síntese deste aminoácido. A Cisteína, devido ao seu grupo tiol (-SH), funciona como uma grande estruturadora das proteínas, podendo fazer ligações do tipo dissulfeto (-S-S-), formando o aminoácido cistina via oxidação do grupo tiol. A Cisteína é

†††† São eles: Glicina, Alanina, Serina, Treonina, Cisteína, Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina, Prolina, Fenilalanina, Tirosina, Triptofano, Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico, Asparagina, Glutamina, Histidina, Lisina e Arginina.

‡‡‡‡ Aminoácido essencial é aquele que não é sintetizado pelo organismo.

considerada polar (hidrofílica), devido ao grupo tiol (-SH), enquanto a Metionina é considerada apolar (hidrofóbica).

4.1.1 Metionina

Os estados de carga da Metionina em função do pH do *bulk* do meio aquoso podem ser observados na figura 4.2. Fica claro que na medida em que se varia o pH o processo de desprotonação ou protonação, ou seja a perda ou o ganho de um próton, dá origem as diferentes formas do aminoácido (cátion, zwitterion e ânion). Os valores de pK_a estão indicados e são numericamente iguais aos pH necessários para que haja equilíbrio na concentração das espécies. Os valores de pK_a foram obtidos a partir da referência [84]. Com base nestes valores, preparamos três soluções aquosas de Metionina na concentração de 0,3 M nos pHs 1,0; 5,8 e 11,5, conforme a figura 4.2, aonde as formas catiônica, neutra e aniônica são predominantes, respectivamente.

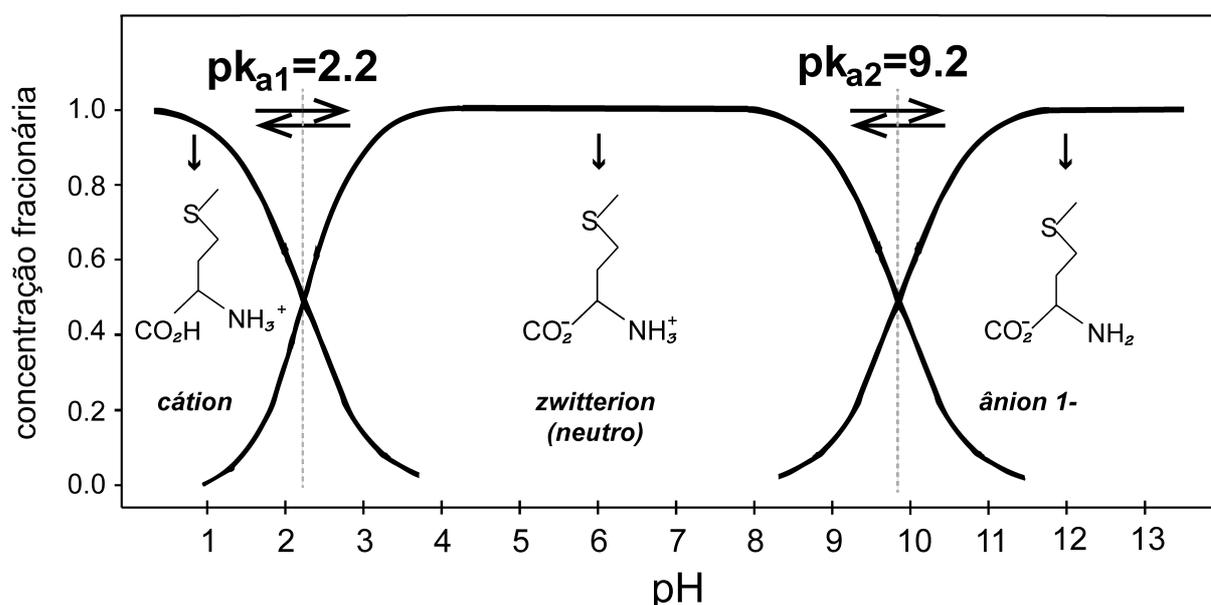


Figura 4.2 - Três diferentes estados de carga para a Metionina aquosa em função do pH.

Espectros de fotoelétrons nas bordas do $C1s$, $N1s$ e $S2p$ da Metionina em solução aquosa foram obtidos com fótons de energia $h\nu = 342,3; 463,6; 237,6$ eV, respectivamente. Esses espectros são apresentados nas figuras 4.3, 4.4 e 4.5.

Na figura 4.3 observamos os espectros de fotoelétrons na borda do $C1s$ da Metionina aquosa para os pHs 1,0; 5,8 e 11,5. Em cada um destes pH um determinado estado de carga está maximizado (cátion, zwitterion e ânion, respectivamente). Não observamos assimetrias nos picos, nesta faixa de energia cinética de fotoelétrons ejetados

(50 eV para o C1s, 60 eV para o N1s e 70 eV para o S2p) e também não é possível observar o efeito PCI. Neste caso, fixamos o parâmetro PCI nos nossos ajustes teóricos em zero. Em resultados de XPS para fase gasosa da Metionina, observa-se claramente a assimetria dos picos S2p e N1s (elétrons com energia cinética da ordem de 90 eV) [85, 86] que surge do próprio padrão de estrutura vibracional da molécula, indicando que a interação com o meio líquido também produz novas estruturas vibracionais mudando o padrão assimétrico observado na fase gasosa.

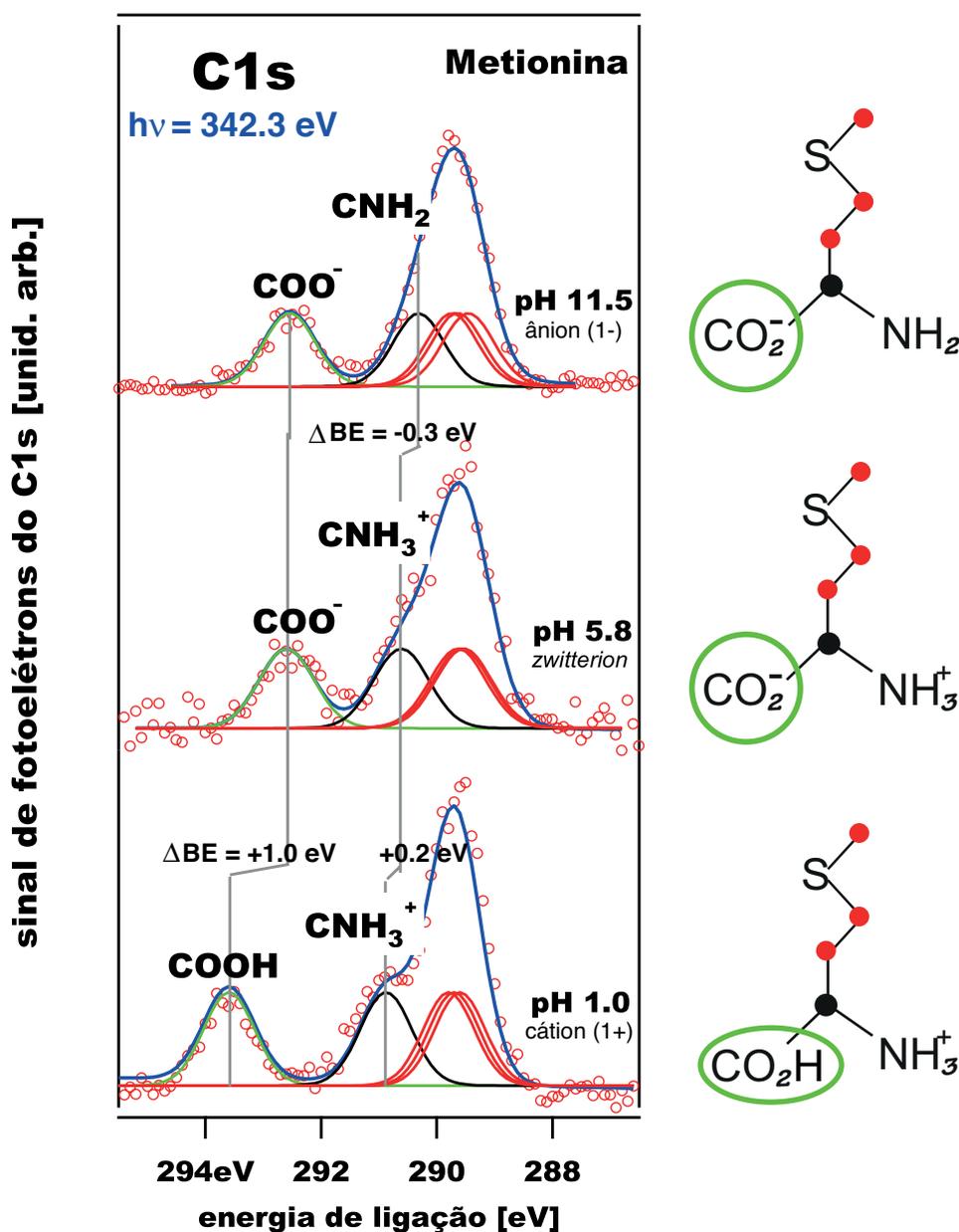


Figura 4.3 - Espectro de fotoelétrons da Metionina na borda do C1s para diferentes pH com fótons de $h\nu = 342,3 \text{ eV}$. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico. A cor da linha do pico se refere ao grupo ou átomo de mesma cor.

Na Fig. 4.3 o pico que aparece na energia de ligação maior (em torno de 293 eV) está associado ao carbono do grupo carboxílico (COOH/COO^-), o que pode ser explicado pela alta eletronegatividade do oxigênio, comparado ao nitrogênio e ao carbono (3,5)^{§§§§§}. Quando um átomo da molécula é ligado a outros átomos com diferentes eletronegatividade, a energia de ligação pode aumentar ou diminuir. Essa mudança na energia de ligação é chamada de deslocamento químico, que pode ser usado para dar informação estrutural da molécula. E ainda, no caso de líquidos, podemos obter informação sobre a hidratação (o número de moléculas de água ligadas ao solvente) ou solvatação da molécula. Por exemplo, quando um átomo de carbono é ligado a diferentes grupos de átomos, um deslocamento sistemático em energia de ligação (deslocamento químico) é observado para o pico do $\text{C}1s$; de modo que quanto mais eletronegativo o grupo maior será a energia de ligação do pico do $\text{C}1s$. Neste caso, a densidade eletrônica é menor fazendo com que a energia de ligação do elétron do nível $\text{C}1s$ do COOH , seja a mais alta na molécula. Este comportamento também foi observado nos espectros de XPS para as moléculas de Lisina e Glicina em solução aquosa [20, 21].

A estrutura que aparece em torno de 291 eV em forma de um ombro do pico mais intenso, e que é bem mais proeminente no espectro de pH 1,0, está associada ao carbono ligado ao grupo amina ($\text{CNH}_3^+/\text{CNH}_2$). Sua energia de ligação é a segunda mais alta dos três picos no espectro. Essa ordem também obedece a relação de eletronegatividade, onde apesar do oxigênio e nitrogênio terem valores de eletronegatividade próximas, (3,5 e 3,0; respectivamente) os dois oxigênios da carboxila, em comparação com o único nitrogênio da amina, geram esse grande deslocamento em energia do COOH/COO^- em relação ao $\text{CNH}_3^+/\text{CNH}_2$. Quando comparamos o deslocamento químico do grupo amina e o grupo carboxílico percebemos que o primeiro ocorre numa escala bem menor em relação ao segundo, em parte, pois a distribuição da nuvem eletrônica na carboxila é maior que na amina.

A última estrutura que aparece nos espectros da figura 4.3, é a estrutura mais larga e intensa, pois é composta pelos outros três carbonos da molécula que estão em ambientes químicos diferentes, mas que apresentam praticamente a mesma energia de ligação. Esses três carbonos estão ligados com outros carbonos ($-\text{C}-\text{C}-$) ou com átomos de enxofre ($-\text{C}-\text{S}-$) ou com átomos de hidrogênio ($-\text{C}-\text{H}-$), que têm eletronegatividade muito próximas, ficando difícil distingui-los no espectro.

^{§§§§§} Para se ter ideia o elemento mais eletronegativo é o Flúor (F) com valor de eletronegatividade 4,0 na escala de Pauling, e o menos eletronegativo é o Frâncio (Fr) com valor de eletronegatividade igual a 0,7. A eletronegatividade do oxigênio é 3,5 e do nitrogênio é 3,0. Carbono (C) e Enxofre (S) tem eletronegatividade aproximadamente iguais a 2,5 e o Hidrogênio (H) tem eletronegatividade igual a 2,2. A escala foi obtida empiricamente por Linus Pauling.

Tabela 4.1: Parâmetros experimentais ajustados para as bordas C1s, S2p e N1s da Metionina aquosa em três diferentes pH.

pH	Estado Molecular	Nível	BE (eV)	FWHM (eV)	ΔBE^*
11,5	<p>anion</p>	S2p _{3/2}	167,8	0,83	0,0
		S2p _{1/2}	168,9	0,83	0,0
		δ C1s	289,5	1,03	-0,1
		β C1s	289,6	1,03	0,1
		γ C1s	289,7	1,03	0,1
		α C1s	290,3	1,03	-0,3
		C1s	292,5	1,03	0,0
N1s	403,6	1,21	-2,3		
5,8	<p>zwitterion</p>	S2p _{3/2}	167,8	0,83	0,0
		S2p _{1/2}	169,0	0,83	0,0
		δ C1s	289,5	1,1	0,0
		β C1s	289,6	1,1	0,0
		γ C1s	289,6	1,1	0,0
		α C1s	290,6	1,1	0,0
		C1s	292,6	1,1	0,0
N1s	405,9	1,66	0,0		
1,0	<p>cation</p>	S2p _{3/2}	167,7	0,92	-0,1
		S2p _{1/2}	168,9	0,92	-0,1
		δ C1s	289,6	1,02	0,0
		β C1s	289,7	1,02	0,1
		γ C1s	289,8	1,02	0,1
		α C1s	290,9	1,02	0,3
		C1s	293,6	1,02	1,0
N1s	406,0	1,36	0,1		

* $\Delta BE = BE(\text{pH } 5,8) - BE$

Os deslocamentos em energia são quantificados em relação a posição dos picos para a forma neutra (zwitterion) do aminoácido (pH 5,8). Verificamos que a protonação do COOH gera um deslocamento químico de +1,0 eV em comparação com o grupo COO⁻ típico na forma neutra do aminoácido, como pode ser observado pelas linhas-guia verticais na figura 4.3. A perda do H⁺ representa um aumento na densidade eletrônica e consequente diminuição da energia de ligação do elétron. No caso do grupamento amina (CNH₃⁺/CNH₂), ainda que localmente não haja perda de prótons do pH 5,8 para o 1,0, os efeitos de vizinhança de perda do H⁺ na carboxila (COOH → COO⁻) já são capazes de alterar o ambiente químico do grupo amina que é evidenciado pelo deslocamento de +0,3 eV entre o NH₃⁺ da forma catiônica e neutra. Já na mudança de pH de 5,8 para 11,5 a molécula é desprotonada, perde um próton, e isso causa um deslocamento de -0,3 eV.

Fizemos um ajuste teórico preliminar para definirmos a largura a meia altura (FWHM) e a intensidade dos picos nos espectros. Aproveitando que o pico do COOH/COO⁻ é bem isolado em todos os três espectros da figura 4.3, usamos ele para definirmos inicialmente a FWHM e a intensidade dos picos. O ajuste preliminar consistiu na convolução de uma Gaussiana e uma Lorentziana. A largura da Lorentziana foi mantida fixa em 100 meV, que corresponde ao tempo de vida do estado C1s para o HCN_(gás) [87] a largura da Gaussiana ficou livre para variar durante o ajuste. A intensidade do pico também foi mantida livre para variar. Com os valores de largura e intensidade deste pico, fixamos a largura e a intensidade de todos os outros quatro picos, deixando-os os livres para variar apenas em energia. A fixação das larguras e intensidades para os outros picos não é uma aproximação muito drástica, já que as variações na seção de choque de fotoionização dos carbonos são pequenas e podem ser negligenciadas nesta faixa de energia cinética dos fotoelétrons (~50 eV) [20]. Veremos mais adiante, na seção 4.3, que esse procedimento pode não funcionar para qualquer faixa de energia cinética de fotoelétrons. Verificaremos que a seção de choque de fotoionização do orbital C1s depende da energia cinética do fotoelétron ejetado, devido à interação com os átomos vizinhos. Essa discussão ficará mais clara quando apresentarmos o estudo do Tiosulfato na seção 4.3. Na figura 4.3, cada pico representa um dos cinco carbonos da molécula.

Os resultados experimentais dos espectros da Metionina obtidos a partir do ajuste teórico estão sumarizados na Tabela 4.1. Identificamos o pH, o estado molecular (cátion, zwitterion ou ânion), o nível eletrônico, a energia de ligação (BE) em eV, a largura dos picos (FWHM) em eV e a variação da energia de ligação (Δ BE). Em cada estado molecular da Metionina, identificamos os carbonos do aminoácido pelas letras gregas α , β , γ , e δ . O carbono α é o que se liga diretamente ao grupo amina e o carbono do grupo carboxila é tratado genericamente como carbono C1s.

Como a eletronegatividade do carbono e do enxofre são praticamente iguais (2,5 Pauling), fica muito complicado definir qual carbono específico representa um dado pico puramente do ajuste experimental, ainda que tenhamos indicado a energia de ligação dos níveis C 1s (β , γ , e δ). De acordo com os dados experimentais, é difícil dizer se de fato existe deslocamento químico entre os três carbonos, embora seja plausível que ele exista. Um cálculo computacional poderia adicionar alguma informação relevante neste caso. Podemos observar que a diferença em energia entre estes picos (β , γ , e δ) é da ordem de 0,1 eV.

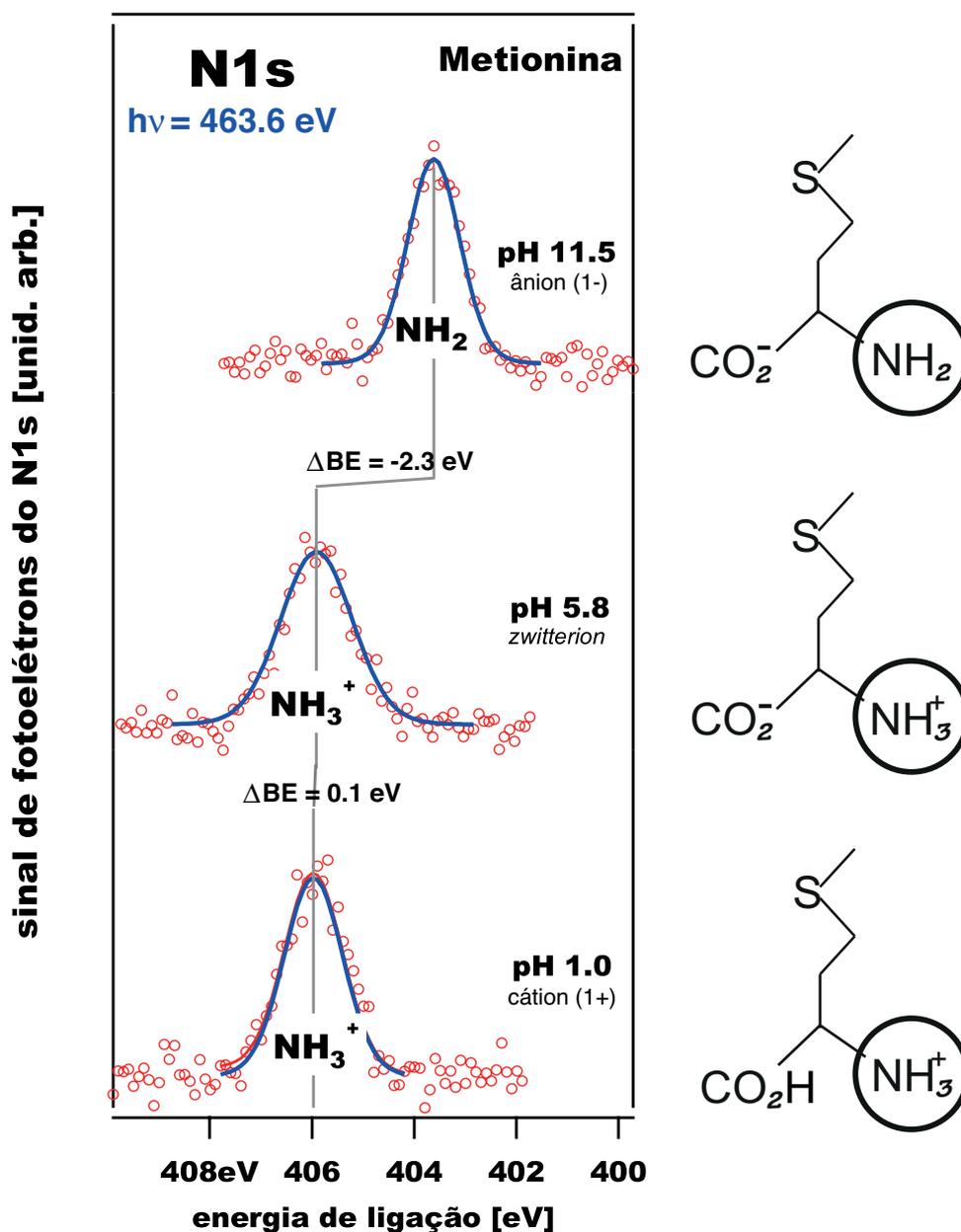


Figura 4.4 - Espectro de fotoelétrons da Metionina na borda do N1s para diferentes pH com fótons de $h\nu = 463,6 \text{ eV}$. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual grupo está associado cada pico.

Na figura 4.4, apresentamos os espectros de fotoelétrons na borda do N1s da Metionina em solução aquosa para os pH 1,0, 5,8 e 11,5. Observamos que entre a forma neutra (zwitterion) e a forma catiônica existe uma pequena variação de energia de ligação, de +0,1 eV, fruto de rearranjo da camada de solvatação de água. Com a perda do próton do grupo NH_3^+ no zwitterion, que dá origem a forma aniônica da Metionina, produz-se um deslocamento químico de -2,3 eV na energia de ligação na borda do N1s. A desprotonação, diminui a densidade da nuvem eletrônica gerando a diminuição da energia de ligação deste orbital. Podemos observar que a FWHM do pico N1s na forma zwitteriônica é bem mais larga quando comparada a forma catiônica e aniônica. A largura varia 0,45 eV entre sua forma aniônica e zwitteriônica e quando comparamos a largura da forma catiônica e zwitteriônica temos uma diferença de 0,35 eV, Também observamos uma diferença de 0,15 eV na FWHM entre a forma aniônica e catiônica. Esse efeito de alargamento também foi encontrado na Cisteína aquosa, mas será descrito mais adiante, e as conclusões encontradas podem ser usadas para a Metionina também. A análise se baseia no trabalho de N. Ottosson *et. al.* [21] aplicada a protonação da glicina aquosa.

Devido ao processo utilizado para ajustar os picos do C1s, figura 4.3, no qual fixamos as larguras e intensidades de todos os picos, só podemos fazer uma análise do pico COOH/COO^- , e nele não identificamos os mesmos efeitos de alargamento, tais quais observados na borda do N1s.

Os espectros N1s e S2p foram ajustados com convoluções de Gaussianas e Lorentzianas, onde os respectivos tempos de vida dos estados (largura das Lorentzianas) foram fixados com os valores de fase gasosa encontrados na literatura (S2p – 70 meV [88], N1s – 140 meV [87]. No caso específico do enxofre, a largura da Gaussiana estava livre para variar, no entanto, cada pico de um dado dubleto foi forçado a apresentar o mesmo valor de largura. A distância entre as componentes S2p_{1/2} e S2p_{3/2} também foi forçada a ter o mesmo valor em todos os dubletos. O tempo de vida (largura da Lorentziana) do estado S2p foi tomado como 70 meV que corresponde aos resultados experimentais para o tempo de vida do estado S2p_{3/2} no SF₆(gás) [88].

Quando analisamos o espectro do S2p para Metionina aquosa nos pH 1,0; 5,8 e 11,5 na figura 4.5, não observamos nenhum desvio em energia já que a localização do enxofre na molécula de Metionina não permite que haja protonação ou desprotonação do enxofre, fazendo que apenas uma pequena flutuação na energia de ligação possa ser observada (+0,1 eV) entre a forma catiônica e zwitteriônica, fruto de rearranjo na camada de solvatação da água em torno do enxofre, o que permite que pequenos desvios em energia possam ocorrer.

O comportamento diferenciado da largura de linha entre os sinais do C1s e o N1s será analisado na próxima seção.

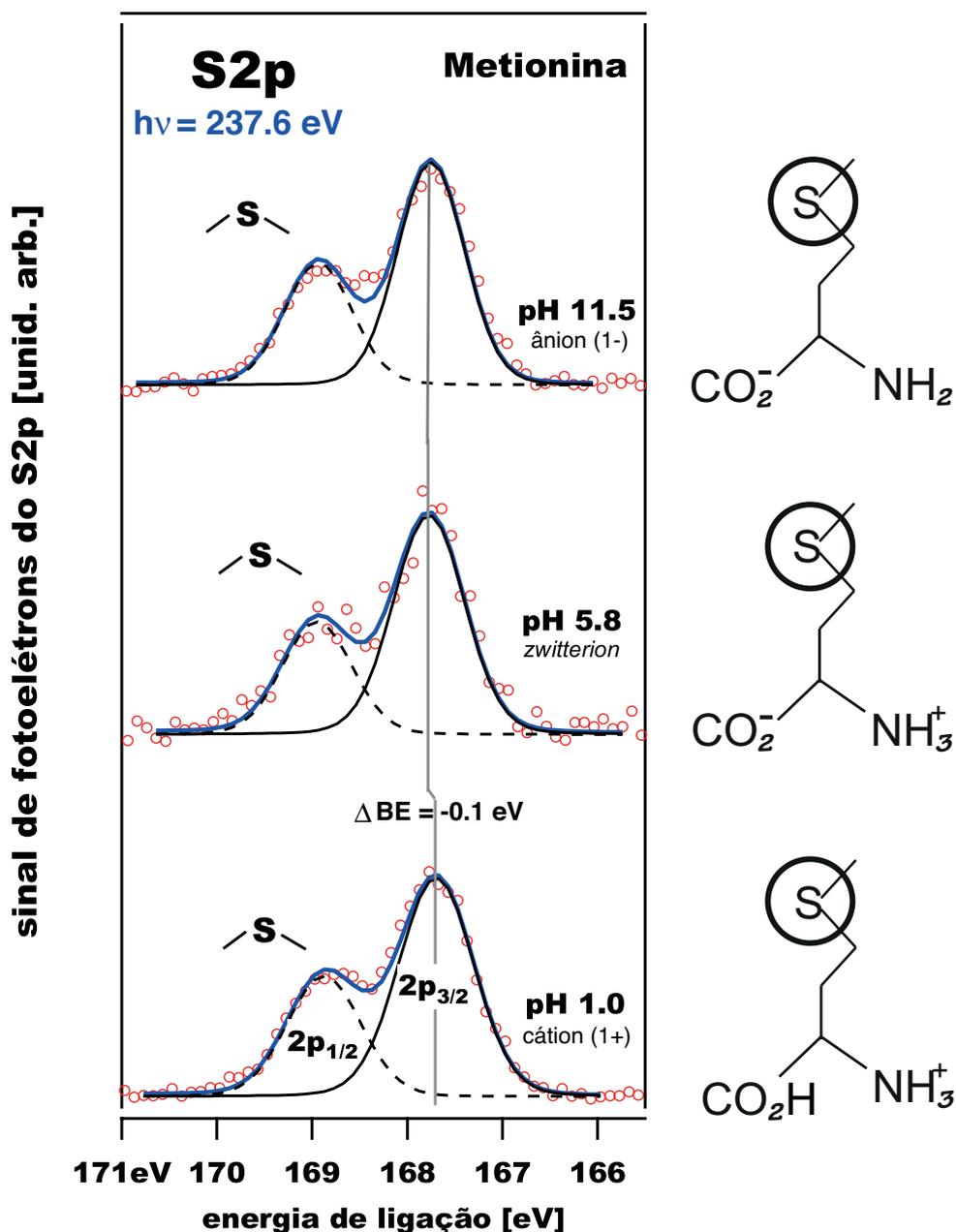


Figura 4.5 - Espectro de fotoelétrons da Metionina na borda do S2p para diferentes pH com fótons de $h\nu = 237,6 \text{ eV}$. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual grupo está associado cada pico.

4.1.2 Cisteína

A Cisteína aquosa possui mais estados de carga que aqueles observados na Cisteína gasosa, que só possui a forma $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$. Além disso, a Cisteína aquosa possui a peculiaridade de possuir duas formas com carga -1 e não apenas uma

como é o caso da Metionina aquosa. Essa peculiaridade permitirá que analisemos a distribuição de espécies químicas no *bulk* e na superfície líquida. Por ora, iremos fazer a análise dos espectros obtidos para os diferentes valores de pH da Cisteína aquosa em que maximizamos as diferentes formas iônicas do aminoácido, tal qual foi apresentado para a Metionina aquosa.

Na figura 4.6, observamos a distribuição das cinco formas iônicas da Cisteína em meio aquoso. O gráfico indica a concentração fracionária de cada uma das espécies químicas em função do pH do meio aquoso. A Cisteína pode se apresentar em cinco formas iônicas – o cátion ($\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{SH}$), a forma neutra ou zwitteriônica ($^-\text{O}_2\text{CCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{SH}$), as duas formas aniônicas de carga 1- ($^-\text{O}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$) e ($^-\text{O}_2\text{CCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{S}^-$), e finalmente outra forma aniônica, agora com carga 2-, ($^-\text{O}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{S}^-$) – estas cinco formas são resultado da protonação ou desprotonação de cada um dos seus três grupos ionizáveis: o grupo tiol ($-\text{SH}/-\text{S}^-$), a amina ($-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$) e o grupo carboxílico ($-\text{COOH}/-\text{CO}_2^-$). Podemos tirar bastante informação do comportamento da Cisteína a partir da figura 4.6.

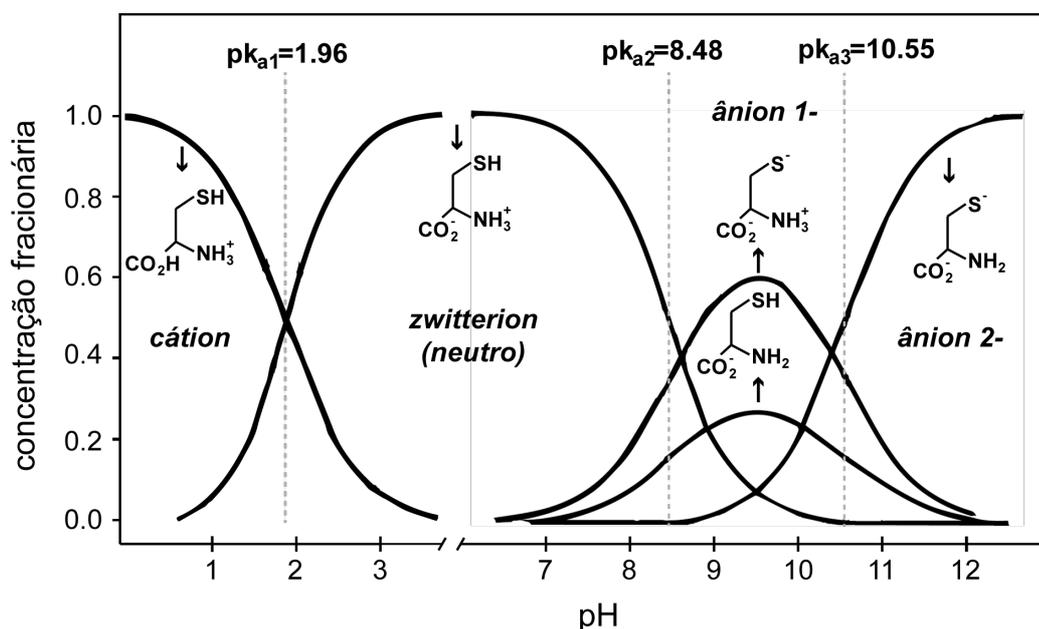


Figura 4.6: Concentração das formas iônicas da Cisteína em função do pH do meio aquoso.

Os valores de pK_a são definidos em termos da concentração das espécies coexistentes, ou seja, nos valores onde o pH se iguala numericamente ao pK_a , temos a mesma concentração das espécies adjacentes. Observe que no caso do pK_{a1} temos a mesma concentração de cátions e *zwitterions*, e no caso do pK_{a2} a concentração de espécies neutras é igual a da soma das duas formas aniônicas 1-. De forma análoga, no pK_{a3} temos a mesma concentração de ânions 2- que a soma da concentração das duas espécies de ânions 1-. A partir destes resultados, escolhemos quatro valores de pH a fim de

maximizar cada uma das formas iônicas: 1,0; 5,0; 9,5 e 12,5. As referências para os três pK_a da Cisteína, referentes a cada grupo ionizável (-COOH, -NH₂ e -SH) podem ser obtidas nas referências [89-91], a primeira obtida a 20°C e as duas últimas a 25°C.

No caso específico do pH 9,5 coexistem quatro espécies iônicas, mas é possível observar que este valor de pH minimiza a forma neutra e a forma aniônica 2-, deste modo, escolheu-se o pH 9,5 para maximizar as formas aniônicas 1-. Ainda no pH 9,5, percebemos que há uma grande diferença na concentração de ânions 1-: uma mais abundante ($^-\text{O}_2\text{CCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{S}^-$) (~57%), e outra menos abundante ($^-\text{O}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$) (~27%). A soma das concentrações da forma neutra e aniônica 2- não ultrapassa 16%. Ainda na figura 4.6, verificamos que mesmo uma variação de 0,5 no pH da solução 9,5 altera significativamente a distribuição das formas iônicas, sobretudo das formas neutra e aniônica 2-. Durante o experimento, a temperatura da solução cai para cerca de 4°C devido a expansão rápida do líquido ao entrar na câmara em vácuo. Como a temperatura é um fator que altera o pH de uma solução, para certificar que a mudança de temperatura não produziria nenhum efeito significativo na distribuição de formas iônicas da solução, também medimos o pH da solução com a temperatura de 4°C. Inicialmente preparamos uma solução de pH 9,5 na temperatura do laboratório, e posteriormente, resfriamos a mesma solução até 4°C e medimos com o mesmo pHmetro a amostra aquosa. Não observamos nenhuma variação de pH suficiente para alterar a conclusão de nossos resultados.

O estudo realizado nestas amostras nos permitiu obter os deslocamentos nas energias dos orbitais do *C1s*, *N1s* e *S2p* da Cisteína aquosa em função da variação do pH de nossas soluções. Espectros de fotoelétrons foram obtidos com fótons de energia $h\nu = 342,3$, $463,6$ e $237,6$ eV, respectivamente, e são apresentados nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9.

O procedimento de ajuste dos espectros é o mesmo utilizado para a Metionina e daremos detalhes complementares nesta seção. Para o caso da Cisteína, uma particularidade é que no pH 9,5, considerando a figura 4.6, não ajustamos picos para as quatro formas iônicas diferentes que estão presentes na solução. Para fazer o ajuste nos espectros em pH 9,5, utilizamos apenas as duas estruturas com carga 1-, figura 4.6. Esse recurso é válido, em princípio, já que a concentração das formas 1- representa aproximadamente 85% das espécies disponíveis. Nesta seção nos preocupamos, como já dissemos, em descrever os efeitos de deslocamento químico nas bordas do *C1s*, *N1s* e *S2p*, e na próxima seção vamos descrever em detalhes o comportamento das formas iônicas no pH 9,5.

Na figura 4.7, podemos observar os picos referentes a fotoelétrons dos orbitais do *C1s* da Cisteína aquosa, em diferentes valores de pH. A energia dos fótons é de 342,3 eV e conseqüentemente, a energia cinética dos fotoelétrons ejetados é da ordem de 51 eV. Não

se observa assimetrias nos espectros, por isso, o parâmetro do PCI foi mantido constante. O procedimento de ajuste utilizado foi exatamente o mesmo adotado para a Metionina na

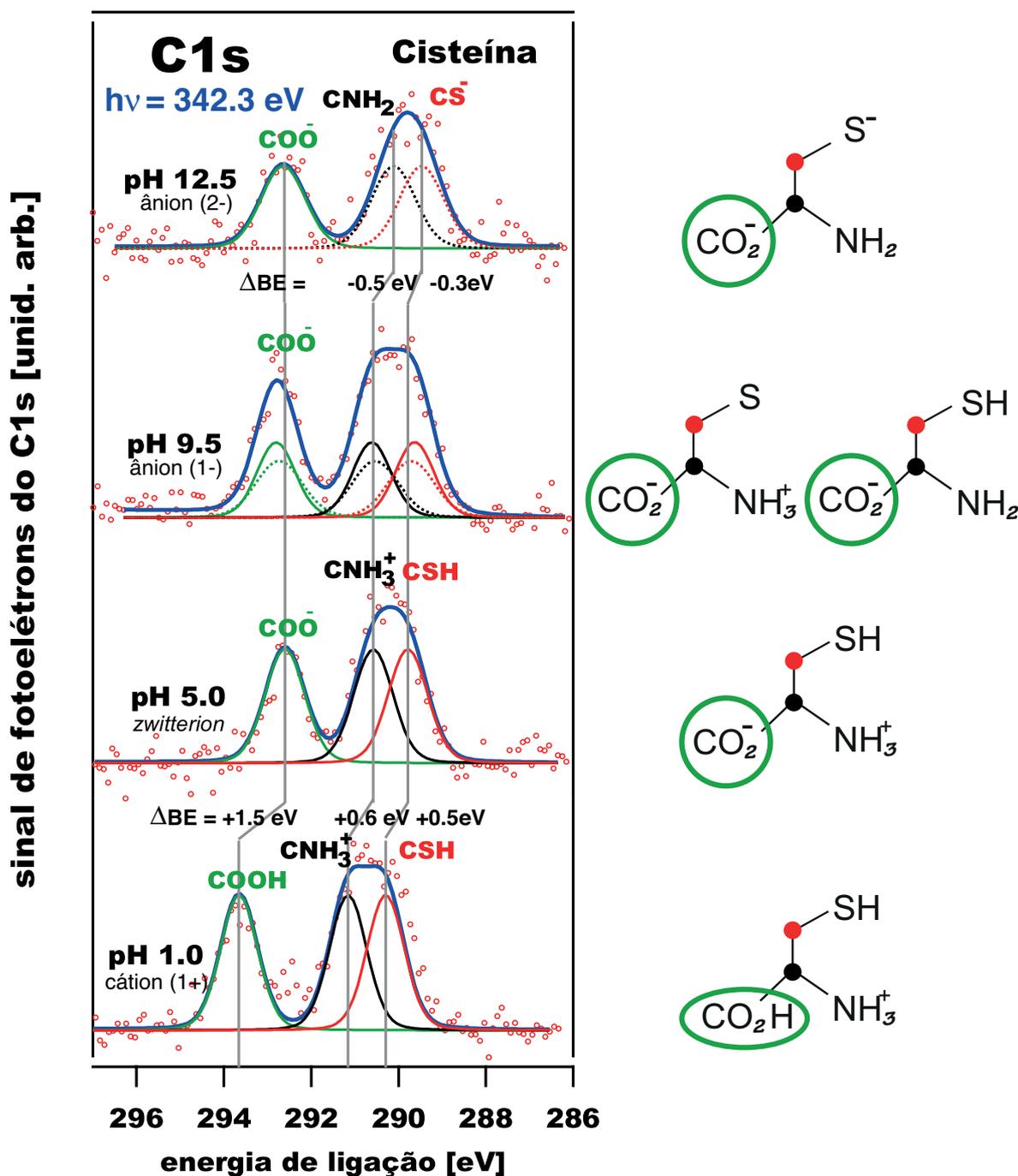


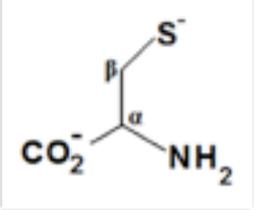
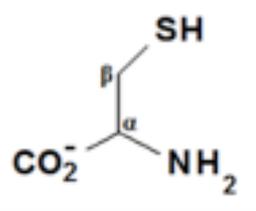
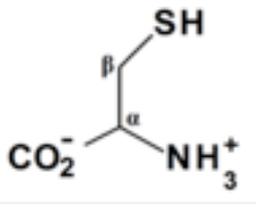
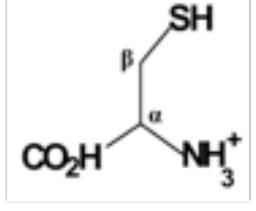
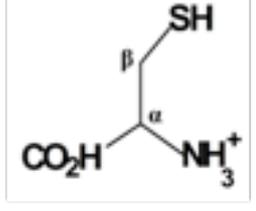
Figura 4.7: Espectro de fotoelétrons da Cisteína na borda do C1s para diferentes pH (1,0; 5,0; 9,5 e 12,5) obtidos com fótons de energia, $h\nu = 342,3 \text{ eV}$. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico. A cor da linha do pico se refere ao grupo ou átomo de mesma cor.

seção anterior. O pico com maior energia de ligação, tal como a Metionina, lisina [20] e glicina [21], está associado ao carbono do grupo carboxílico ($-\text{COOH}/-\text{CO}_2^-$), onde a presença dos dois oxigênios torna a nuvem eletrônica mais difusa. Na medida em que a densidade eletrônica aumenta, devido a presença de mais átomos que compartilham este elétron, e adicionado a isso, a intensidade com que cada átomo ligado atrai este elétron (eletronegatividade), a energia de ligação deste elétron se torna maior. A desprotonação por sua vez, altera a energia do orbital $C1s$, aumentando a densidade eletrônica e diminuindo a energia de ligação. O deslocamento químico observado devido a desprotonação ($\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2^-$) é de $+1,1$ eV em relação a estrutura COO^- (forma zwitteriônica), que é um valor muito próximo do observado em outros aminoácidos já estudados (Met $+1,0$ e Gli $+0,98$ [21]). Fazendo uma análise comparada, o valor de $+1,0$ eV se repete em meio líquido para o deslocamento em energia no carbono do grupo carboxílico nos aminoácidos já estudados, indicando que este resultado pode não ser um caso particular de um dado aminoácido mas, na verdade, um resultado mais geral para o caso dos aminoácidos e que também pode ser estendido a outras moléculas que possuam este grupo. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar esta hipótese e seria uma boa perspectiva para continuidade deste trabalho.

Por possuir menos carbonos que a Metionina, a estrutura da Cisteína pode ser facilmente deconvoluída e com isso, indicamos cada um dos três picos associados nas estruturas observadas no espectro, *vide* figura 4.7. As duas estruturas correspondem aos três carbonos presentes na molécula de Cisteína; uma estrutura com energia de ligação maior, referente ao pico do $-\text{COOH}/-\text{CO}_2^-$ e uma estrutura mais intensa e mais larga, formada pela sobreposição dos picos dos carbonos $-\text{CNH}_2/-\text{CNH}_3^+$ e $-\text{CSH}/-\text{CS}^-$, respectivamente em diminuição da energia de ligação. A indicação da energia de ligação destes picos no espectro segue em forma decrescente dos valores de eletronegatividade dos átomos ligados ao carbono ($\text{O} > \text{N} > \text{S}$), como pode ser observado na figura 4.7. Percebemos mais uma vez a consistência do procedimento de ajuste usado na Metionina, que fixa a largura e a intensidade dos picos ($-\text{CNH}_2/-\text{CNH}_3^+$) e ($-\text{CSH}/-\text{CS}^-$) como sendo igual àquela do pico ($-\text{COOH}/-\text{CO}_2^-$). Com isso, conseguimos deconvoluir os picos no caso do pH 9,5.

No pH 9,5 temos quatro formas iônicas presentes na amostra, no entanto, só ajustamos as duas formas mais abundantes (~ 85 % total), como já foi ressaltado anteriormente. A forma mais abundante corresponde ao $\text{S}^- \text{CH}_2 \text{CH}(\text{NH}_3^+) \text{COO}^-$ (linha contínua), e por sua vez, a forma $\text{SH} \text{CH}_2 \text{CH}(\text{NH}_2) \text{COO}^-$ (linha pontilhada) corresponde ao pico de menor intensidade e menor abundância. Os três picos contínuos correspondem, em sentido decrescente de energia de ligação ao $-\text{COO}^-$, $-\text{CNH}_3^+$ e $-\text{CS}^-$, e no caso dos três picos pontilhados ao $-\text{COO}^-$, $-\text{CNH}_2$ e $-\text{CSH}$.

Tabela 4.2: Parâmetros experimentais ajustados para as bordas do S2p, C1s e N1s da Cisteína aquosa em quatro diferentes pH (1,0; 5,0; 9,5 e 12,5).

pH	Estado Molecular	Nível	BE(eV)	FWHM (eV)	ΔBE^*
12,5	 anion (2 ⁻)	S2p _{3/2}	165,8	0,92	-2,2
		S2p _{1/2}	167,0	0,92	-2,2
		β C1s	289,5	1,2	-0,3
		α C1s	290,1	1,2	-0,5
		C1s	292,6	1,2	0,0
		N1s	403,8	0,87	-2,2
9,5	 anion (1 ⁻)	S2p _{3/2}	168,0	1,10	0,0
		S2p _{1/2}	169,2	1,10	0,0
		β C1s	289,7	1,25	-0,1
		α C1s	290,5	1,25	-0,1
		C1s	292,7	1,25	0,1
		N1s	403,8	1,05	-2,2
5,0	 zwitterion	S2p _{3/2}	165,5	0,97	-2,5
		S2p _{1/2}	166,7	0,97	-2,5
		β C1s	289,6	1,03	-0,2
		α C1s	290,6	1,03	0,0
		C1s	292,8	1,03	0,2
		N1s	406,1	1,18	0,1
1,0	 cation	S2p _{3/2}	168,0	0,98	0,0
		S2p _{1/2}	169,2	0,98	0,0
		β C1s	289,8	1,06	0,0
		α C1s	290,6	1,06	0,0
		C1s	292,6	1,06	0,0
		N1s	406,0	1,54	0,0
1,0	 cation	S2p _{3/2}	168,0	1,11	0,0
		S2p _{1/2}	169,2	1,11	0,0
		β C1s	290,3	1,0	0,5
		α C1s	291,2	1,0	0,6
		C1s	293,7	1,0	1,1
		N1s	406,0	1,46	0,0

* $\Delta BE = BE_{(pH\ 5,8)} - BE$

Na tabela 4.2, indicamos o pH, o estado molecular, o nível eletrônico, a energia de ligação (BE) em eV, a largura dos picos (FWHM) em eV e a variação da energia de ligação (Δ BE) dos picos observados para a Cisteína em relação a posição dos picos na forma zwitteriônica. Em cada estado molecular da Cisteína, identificamos os carbonos do aminoácido pelas letras gregas α e β , sendo α referente ao carbono ligado ao grupo amina $-\text{CNH}_3^+/-\text{CNH}_2$ e β referente ao carbono ligado ao grupo tiol $-\text{S}^-/-\text{SH}$. O carbono do grupo carboxila é referido simplesmente como C1s sem índice grego.

Podemos observar a partir da figura 4.7 e da tabela 4.2, que quando comparamos as estruturas do pH 9,5 com as estruturas das formas zwitteriônicas (pH 5,0) e aniônicas 2- (pH 12,5), percebemos que o pico não coincidente é o pico tracejado (carbono α) do pico CNH_2 em pH 9,5 e o pico CNH_2 em pH 12,5 (temos uma diferença de 0,5 eV), evidenciando que apesar da carga local não ter se alterado (neutro), a perda de outro próton em um outro grupo na molécula ($-\text{CSH} \rightarrow -\text{CS}^-$), poderia, em princípio, produzir uma interação de maior alcance que justificaria a alteração na posição em energia do pico. No entanto, como temos mais de uma forma iônica presente na solução, o procedimento de ajuste também deve levar em conta a abundância de cada uma das espécies, para dar o peso necessário a cada uma das formas encontradas. Esse trabalho é bem mais delicado e se encontra dentro de um perspectiva futura de continuidade de nosso trabalho. Cálculos de dinâmica molecular, e posteriormente, da densidade de espécies na superfície, com o cálculo final do XPS da superfície líquida, podem ajudar substancialmente no ajuste final do espectro para o pH 9,5.

A etapa de calibração do pH é crucial para esse trabalho, já que uma alteração no pH em torno do pH 9,5, pode gerar uma mudança drástica na disponibilidade das formas da Cisteína. Eliminamos a hipótese de erro de leitura no pH repetindo a mesma medida em amostras diferentes e calibrando o pHmetro devidamente antes de aferir o pH de todas as soluções, tal como descrito na seção 3.7 do capítulo 3. Além disso, utilizamos uma curva de titulação na determinação do valor do pH para eliminar a chance de erros sistemáticos.

Na figura 4.8, observamos os picos referentes a borda do N1s da molécula de Cisteína, para os quatro valores de pH das soluções preparadas. Identificam-se picos referentes aos grupos $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{NH}_2$. De forma qualitativa, podemos observar que os picos NH_3^+ têm sua largura maior que as estruturas NH_2 . Na tabela 4.2, podemos observar os valores numéricos da largura dos picos e a variação da energia de ligação, Δ BE em eV, em relação à forma neutra. No caso do NH_3^+ a largura varia de 1,54 a 1,18 eV, e tal como a Metionina, a forma neutra possui a estrutura mais larga. Quando observamos o NH_2 a largura é de 0,87 eV no pH 12,5 e 1,05 eV no pH 9,5. Como não temos cálculos de XPS para a Cisteína aquosa, vamos usar os cálculos de N. Ottoson *et al.* [21] para Glicina

aquosa e apresentar conclusões a respeito da diferença nas larguras, já que o efeito também é observado de forma semelhante por eles.

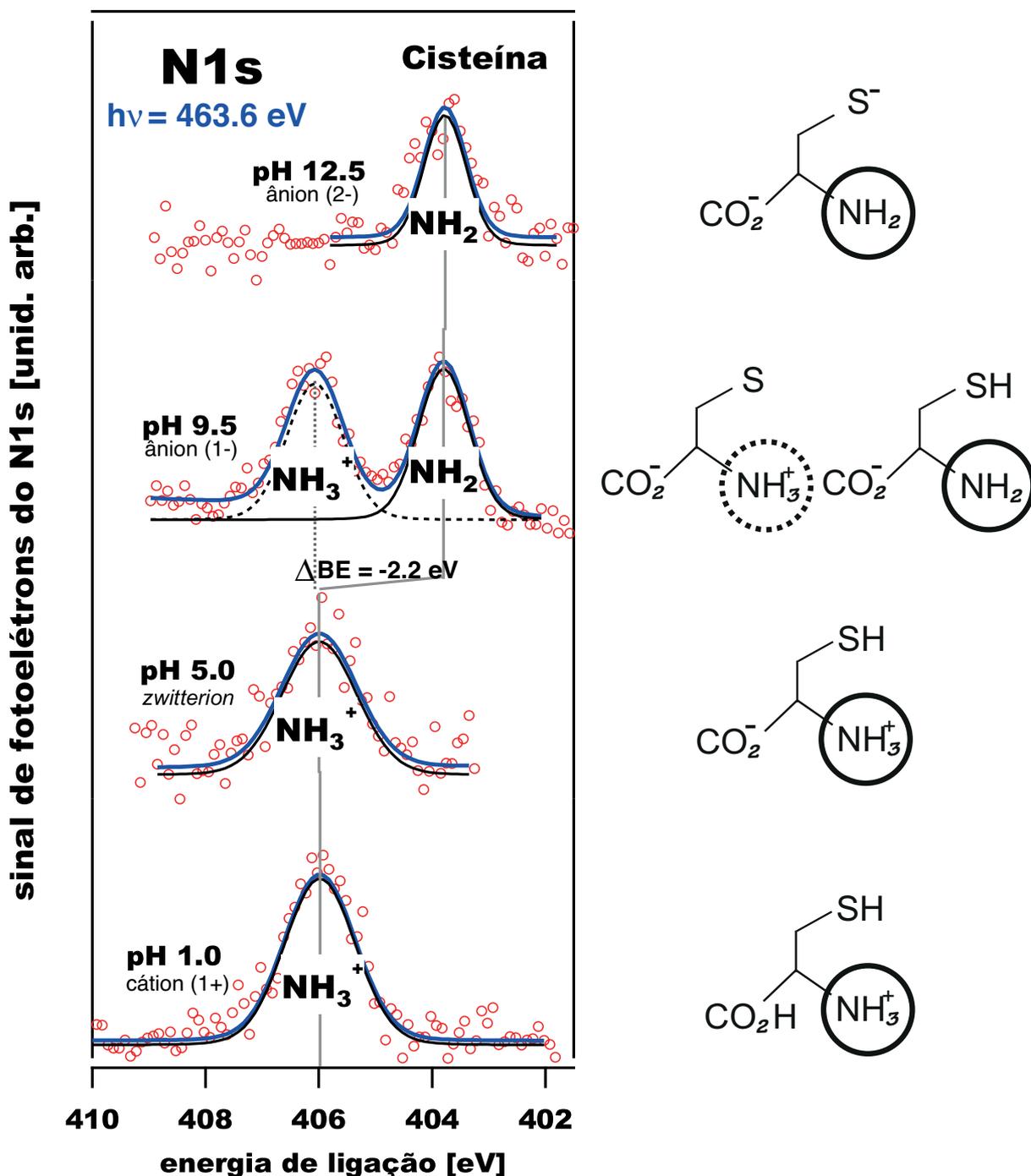


Figura 4.8: Espectro de fotoelétrons da Cisteína na borda do N1s para diferentes pH (1,0, 5,0, 9,5 e 12,5) obtidos com fótons de energia, $h\nu = 463,6 \text{ eV}$. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual grupo está associado cada pico.

menor no $\text{NH}_3^{2+} \cdots \text{O}$ em relação ao $\text{NH}_2^+ \cdots \text{O}$. Como a energia é muito sensível a posição das moléculas de água vizinhas, o efeito da carga do estado final explicaria, pelo menos em parte, a diferença de larguras, fazendo da largura do NH_3^+ maior que a do NH_2 . A questão do aumento da largura na forma zwitteriônica tanto para a Metionina quanto para a Cisteína

O cálculo computacional deste artigo indica que a largura adicional é função da contribuição dos estados finais de carga nas ligações de hidrogênio. No caso do grupo nitrogenado, temos, após a ionização, duas configurações possíveis ($\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_3^{2+}$) ou ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_2^+$). A blindagem devido à polarização cresce com o quadrado da carga do estado final, assim, o comprimento da ligação de hidrogênio deveria ser pelo menos três vezes não é bem compreendida e cálculos computacionais podem ajudar bastante nesta tarefa. Exceto pela forma zwitteriônica, percebemos uma diminuição da largura do pico N1s diretamente proporcional ao aumento valor do pH da água.

No caso da tabela 4.2 chama a atenção o fato das larguras do orbital N1s mudarem muito de acordo com a forma iônica. É necessário realizar mais medidas nesta borda já que os espectros foram tomados em diferentes turnos e também em dois tempos de luz diferentes. Esses fatores podem alterar a resolução dos espectros, além do alargamento natural do analisador.

O espectro da borda do N1s leva mais tempo para ser coletado devido a baixa estatística, por isso é preciso muito mais tempo na coleta dos dados que aquele necessário para coletar os espectros da borda do S2p e C1s. No momento atual (dezembro de 2013), a linha PGM está com uma otimização ainda melhor que aquela que encontramos em 2012 e no início de 2013, anos em que foram realizadas as medidas de XPS para a Cisteína. Com isso, é possível obter resultados mais rápidos e sanar as dúvidas que possamos ter neste processo. Caso este comportamento se repita, esse interessante efeito merece ser melhor estudado.

Na borda do C1s observamos um efeito de alargamento bem menor que no N1s, mas, neste caso, temos panoramas bem diferentes. No caso da borda C1s, as duas configurações de estados finais possíveis são um estado neutro ($\text{CO}_2^{1-} \rightarrow \text{CO}_2$) e um estado de carga 1- ($\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2^{1-}$). A carboxila se comporta como uma doadora de elétrons e a blindagem feita pelos hidrogênios das moléculas de água é muito menos eficiente que aquela feita pelos oxigênios das águas, temos um alargamento bem menor, quando comparado ao da amina carregada ($\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_3^{2+}$ ou $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_2^+$). No caso da amina, o comportamento é de uma receptora de elétrons e a blindagem é feita pelos oxigênios das águas vizinhas, fazendo com que a largura dos picos do N1s variem mais que as larguras dos picos do C1s. Ainda de acordo com os dados da tabela 4.2, a largura dos picos referentes ao CO_2^- parecem ficar maiores na presença do grupo NH_2 , já que a largura permanece praticamente inalterada com o grupo S^- ou SH.

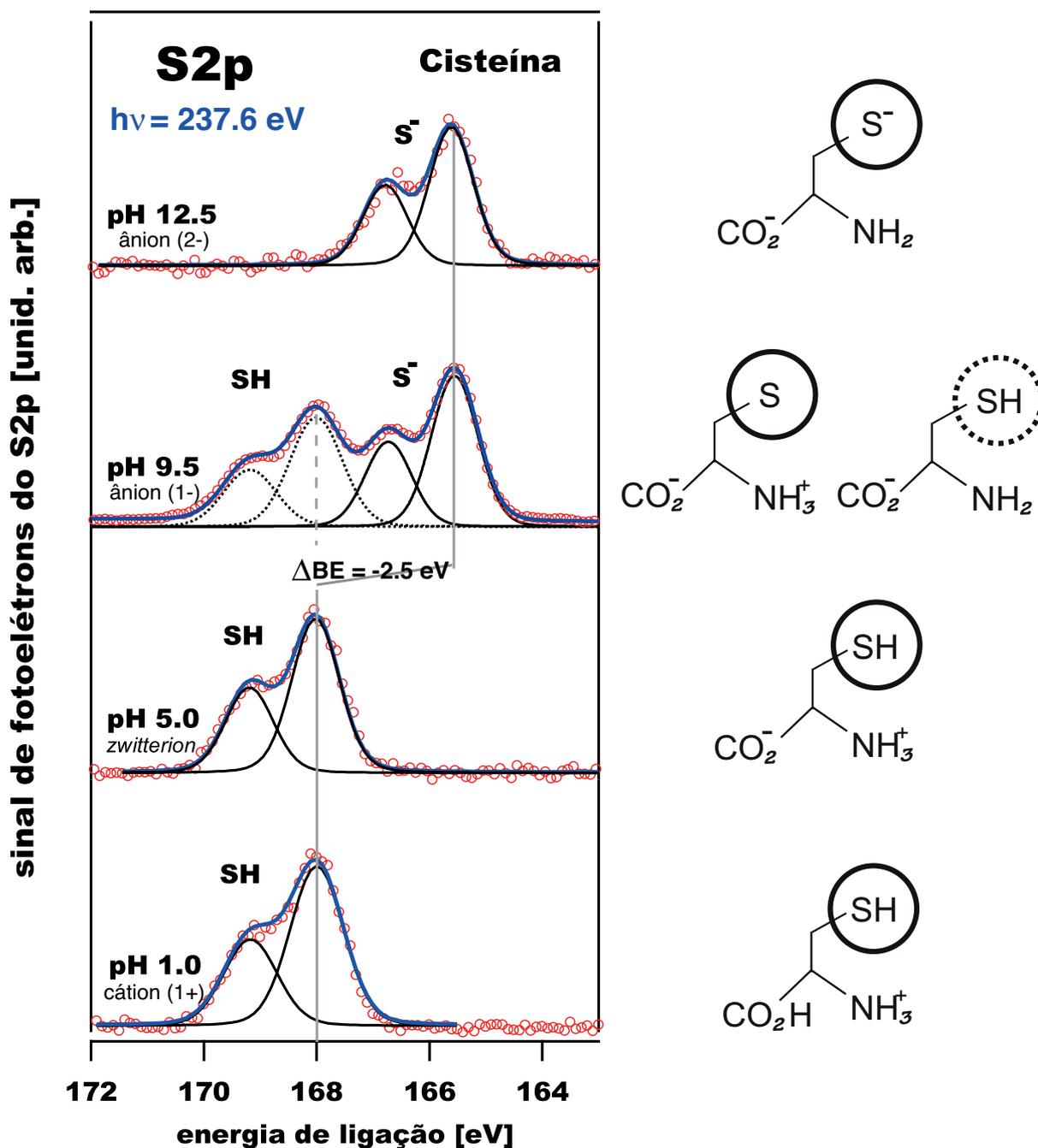


Figura 4.9: Espectro de fotoelétrons da Cisteína na borda do S2p para diferentes pH (1,0, 5,0, 9,5 e 12,5) obtidos com fótons de energia, $h\nu = 237,6 \text{ eV}$. As formas iônicas à direita são referentes aos pH indicados e ajudam o leitor a identificar a qual átomo ou grupo está associado cada pico.

Finalmente, na figura 4.9, observamos os espectros de fotoelétrons na borda S2p para a Cisteína aquosa em diferentes pHs. O método de ajuste destes espectros seguiu os mesmos procedimentos utilizados na Metionina, descritos na seção anterior. A única diferença é que no caso do pH 9,5, nós ajustamos dois pares de picos ($S2p_{1/2}$ e $S2p_{3/2}$), referentes as formas iônicas mais intensas neste pH ($S^-CH_2-CH(NH_3^+)COO^-$ e $SH-CH_2-CH(NH_2)COO^-$). As linhas-guia verticais cruzam os picos referentes à ejeção de fotoelétrons

do orbital $S2p_{3/2}$ e nos mostram que não há um deslocamento significativo em energia para o $S2p$ se não há a perda/ganho de um hidrogênio na molécula de Cisteína. Neste caso, a perda do hidrogênio gera o maior deslocamento em energia de todas as bordas ($\Delta BE = -2,5$ eV). Provavelmente, os efeitos de mais longo alcance não sejam significativos para o $S2p$, já que pelo fato do grupo tiol estar distante dos dois outros grupos que sofrem protonação e desprotonação ($-NH_2/-NH_3^+$ e $-COOH/-CO_2^-$), não observamos variação das posições dos picos. Também se observa que a largura do grupo tiol varia entre 0,92 e 1,1 eV (tabela 4.2) devido a mudança do pH e, com exceção da forma aniônica ($SH-CH_2-CH(NH_2)COO^-$), a largura diminui com o aumento do pH do meio aquoso.

Finalizamos aqui a parte em que descrevemos os espectros que obtivemos para a Cisteína e Metionina em diferentes pH e nos quais observamos que efeitos de protonação e desprotonação são induzidos pela mudança do pH das soluções aquosas preparadas, o que também gera uma mudança na energia de ligação dos orbitais $C1s$, $N1s$ e $S2p$. Percebemos que, de forma geral, a largura dos picos referentes ao $N1s$ é maior quando comparada ao $C1s$ para uma mesma molécula, induzidas pela carga do estado final do grupo ionizado. Além disso, observamos que os deslocamentos químicos são muito sensíveis ao ambiente químico, onde a protonação altera drasticamente o ambiente químico de um dado átomo da molécula devido a mudança da densidade eletrônica. A presença de duas espécies predominantes no pH 9,5 da Cisteína aquosa nos permitirá estudar a propensão superficial de uma dada forma iônica comparada ao *bulk* da solução, e será analisada na seção a seguir.

4.2 Assimetrias na distribuição das formas iônicas da Cisteína entre a superfície e o *bulk* da solução aquosa

Quando analisamos o caso do pH 9,5 para a Cisteína aquosa e descrevemos todas as espécies iônicas presentes na subseção 4.1.2, percebemos que o equilíbrio de espécies em torno deste pH é bem intrincado, já que a presença dos três diferentes grupos que podem doar ou aceitar prótons (carboxílico, amina e tiol), e suas diferentes afinidades por prótons, aumentam a variedade de formas iônicas presentes na solução. Em uma primeira hipótese, sem observar a curva de titulação da Cisteína, acreditávamos que deveríamos observar somente uma única forma iônica de carga -1, pois imaginávamos a protonação/desprotonação deveria ser sucessiva, iniciando com a carboxila, depois com o grupo amina e por fim com o grupo tiol.

Rapidamente percebemos o engano, pois os picos das bordas $S2p$ e $N1s$ mostravam duas grandes bandas, referentes aos grupos ($-NH_3^+$ e $-NH_2$) e ($-SH$ e $-S^-$), respectivamente

(figuras 4.8 e 4.9). Ficava claro que um caso mais complexo se apresentava diante de nós, assegurada a acurácia na determinação do pH em nosso experimento.

Dixon *et al.* [58] discutem os resultados para as curvas de titulação da Cisteína de Benesch e Benesch [92] e, como consta na parte inferior da figura 4.10, apresentam o comportamento da curva de titulação e das espécies iônicas da Cisteína em função do pH, na região de 6 a 13.

A linha guia vertical tracejada serve para indicar o pH do *bulk* de nossa solução. Neste pH, a Cisteína se apresenta em quatro formas iônicas diferentes: uma espécie zwitteriônica ou neutra, com grupos (**SH, NH₃⁺, COO⁻**), que é a mais abundante no pH 5,8, representando 8% da concentração total das formas iônicas. Chamaremos esta estrutura de forma abreviada como **ZO** (zwitterion-oxigênio). Também representando 8% da concentração total de espécies, encontramos uma espécie aniônica (carga 2⁻), tipicamente

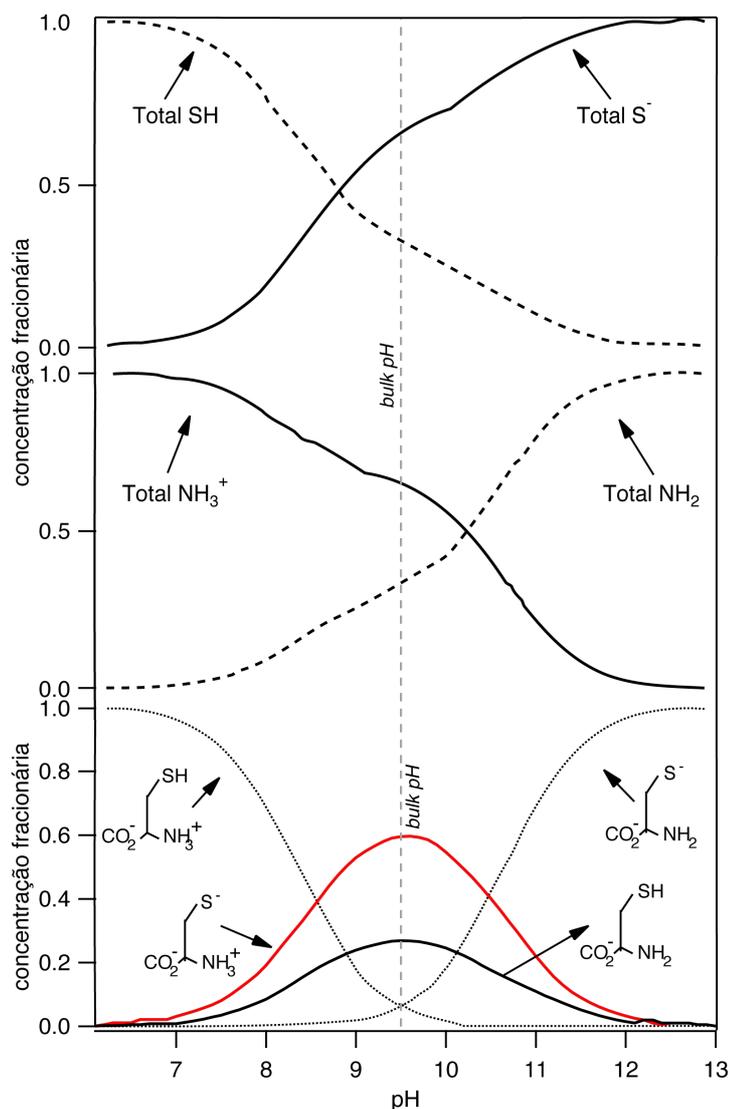


Figura 4.10: Curva de titulação da Cisteína na região de pH 6 a 13. Figura baseada nos resultados de Dixon *et al.* e Benesch *et al.* [58, 92].

encontrada em pH superiores a 12, que corresponde ao menor grau de protonação do aminoácido, com grupos (S^- , NH_2 , COO^-). Chamaremos esta forma de **AA** (ânion-ânion), evidenciando o caráter do ânion duplamente carregado. As outras duas espécies aniônicas também típicas do pH 9,5, ambas possuem carga total (1^-) e se diferem por um próton que se encontra ora no grupo tiol ora no grupo amina. A forma mais abundante, que corresponde a 57% da concentração total, tem grupos (S^- , NH_3^+ , COO^-) e chamaremos de zwitterion-ânion **ZA**, por sua vez, a forma com grupos (SH , NH_2 , COO^-), abreviada por **AO** (ânion com carga no oxigênio), e corresponde a 27% da concentração total. Juntas, estas duas estruturas possuem a quase totalidade das espécies presentes no *bulk* (~85%). Ainda na figura 4.10, na parte central e superior, apresentamos a soma das concentrações das estruturas que contém (NH_3^+ e NH_2 ,) e (SH e S^-). Por este gráfico esperamos que a intensidade de sinal de $\text{NH}_3^+ > \text{NH}_2$, bem como, $\text{S}^- > \text{SH}$. Na tabela 4.3, resumimos as abreviaturas e concentrações obtidas da figura 4.10.

Tabela 4.3: Concentrações de formas iônicas da Cisteína aquosa com indicações de seus grupos protonados ou desprotonados para o pH 9,5.

Forma	Grupos	Concentração <i>bulk</i> (%) [93]
ZO	(SH , NH_3^+ , COO^-)	8
AA	(S^- , NH_2 , COO^-)	8
ZA	(S^- , NH_3^+ , COO^-)	57
AO	(SH , NH_2 , COO^-)	27

Todas as quatro formas que constam na tabela 4.3 possuem um grupo COO^- , e por isso, podemos prever que se tomarmos o espectro de fotoelétrons na borda $\text{O}1s$ obteremos uma única banda larga referente aos dois oxigênios ligados ao carbono. No caso do espectro do $\text{N}1s$ e $\text{S}2p$, observaremos duas estruturas referentes aos grupos amina e tiol que podem estar protonados ou não. Isso pode ser confirmado nas figuras 4.11 e 4.12. Nelas, apresentamos os espectros de fotoelétrons das bordas $\text{N}1s$ e $\text{S}2p$ para a Cisteína aquosa em pH 9,5.

Na figura 4.11, observamos os espectros da borda $\text{N}1s$ da Cisteína aquosa em duas energias de fótons diferentes: 463,6 eV (círculos vermelhos) e 995,1 eV (triângulos azuis). Os valores das energias de ligação (BE) e das larguras à meia altura (FWHM) estão descritos na tabela 4.4. O ajuste dos espectros foi feito usando convolução de Gaussianas e Lorentzianas, onde a largura da Lorentziana é mantida fixa em 140 meV, que corresponde ao tempo de vida do estado $\text{N}1s$ para o N_2 gás [87] e a largura da Gaussiana é livre para variar durante o ajuste. A diferença entre essas duas energias de fótons nos permite explorar a variação do livre caminho médio inelástico (IMFP), que depende diretamente da

energia do fóton, como consta da expressão 3.3, do capítulo 3. Com isso, podemos analisar o sinal de fotoelétrons que é majoritariamente da superfície do líquido para energias de fótons mais baixas (463,6 eV), e ter acesso a camadas mais internas do líquido, referentes ao *bulk*, com energias mais altas (995,1 eV).

Observando a figura 4.11 fica evidente que a intensidade do sinal de NH_3^+ aumenta substancialmente em relação ao NH_2 no *bulk* (curva azul) quando comparamos relativamente ao sinal proveniente da superfície (curva vermelha). A razão absoluta entre as áreas ($\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$) para uma energia de fótons $h\nu=436,6$ eV (sensível a superfície) é de 1,1, diminuindo drasticamente para 0,4 quando a energia é de $h\nu=995,1$ eV (mais sensível ao *bulk*). No caso do *bulk*, esse resultado corrobora com a hipótese inicial de que a intensidade $\text{NH}_3^+ > \text{NH}_2$, como consta da figura 4.10 (curva azul), mas não temos o mesmo comportamento das intensidades quando observamos o resultado da superfície, figura 4.11 (curva vermelha). Ressaltamos que, durante as medidas, nenhuma mudança foi observada na solução aquosa de Cisteína.

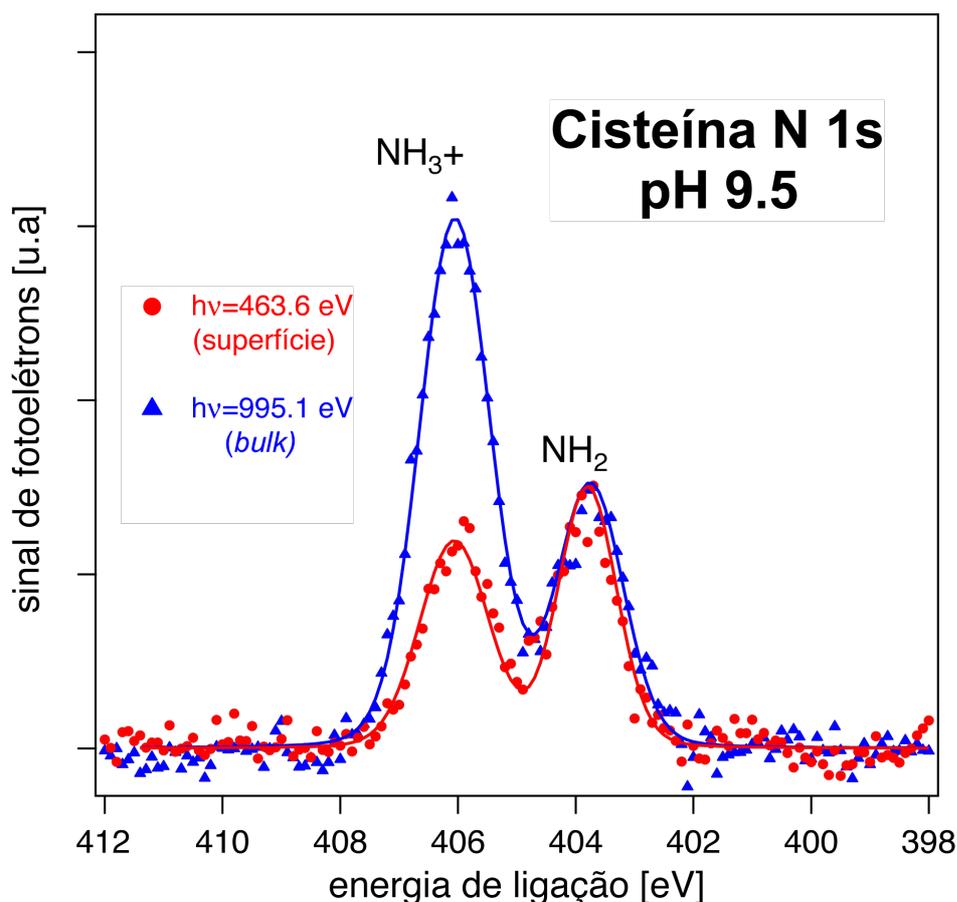


Figura 4.11: Espectro de fotoelétrons da Cisteína aquosa (pH 9,5) na borda N1s para duas energias de fótons diferentes. Os picos foram normalizados pela amplitude do pico referente ao nível N1s do NH_2 .

Na figura 4.12, apresentamos espectros da borda S2p da Cisteína aquosa em duas energias de fótons: 237,6 eV (vermelho) e 786,2 eV (azul). O ajuste dos espectros foi feito usando convolução de Gaussianas e Lorentzianas, onde a largura da Lorentziana é mantida fixa em 70 meV, que corresponde ao tempo de vida do estado S2p para o SF₆ gás [88]. A largura da Gaussiana estava livre para variar, no entanto, cada dubleto foi forçado a apresentar o mesmo valor de largura para os dois picos do dubleto. A distância entre as componentes S2p_{1/2} e S2p_{3/2} também foi forçada a ter o mesmo valor em ambos os dubletos referentes ao SH e S⁻. No caso do S2p, a intensidade de sinal de S⁻ é maior que o de SH, seja na superfície ou no bulk, mas essa diferença é maximizada no bulk, o que se encaixa no resultado esperado do pH 9,5, a partir da figura 4.10.

Esses resultados evidenciam que a distribuição de espécies iônicas da Cisteína aquosa é claramente assimétrica entre a superfície e o *bulk*. No caso do S2p, figura 4.12, o deslocamento químico é de 2,5 eV entre os dubletos e a razão absoluta entre as espécies (S⁻/SH) é de 2,4 e 1,4 para o *bulk* e a superfície, respectivamente. A tabela 4.4 apresenta todas as BE para os níveis S2p e N1s para 1M de Cisteína em solução aquosa no pH 9,5.

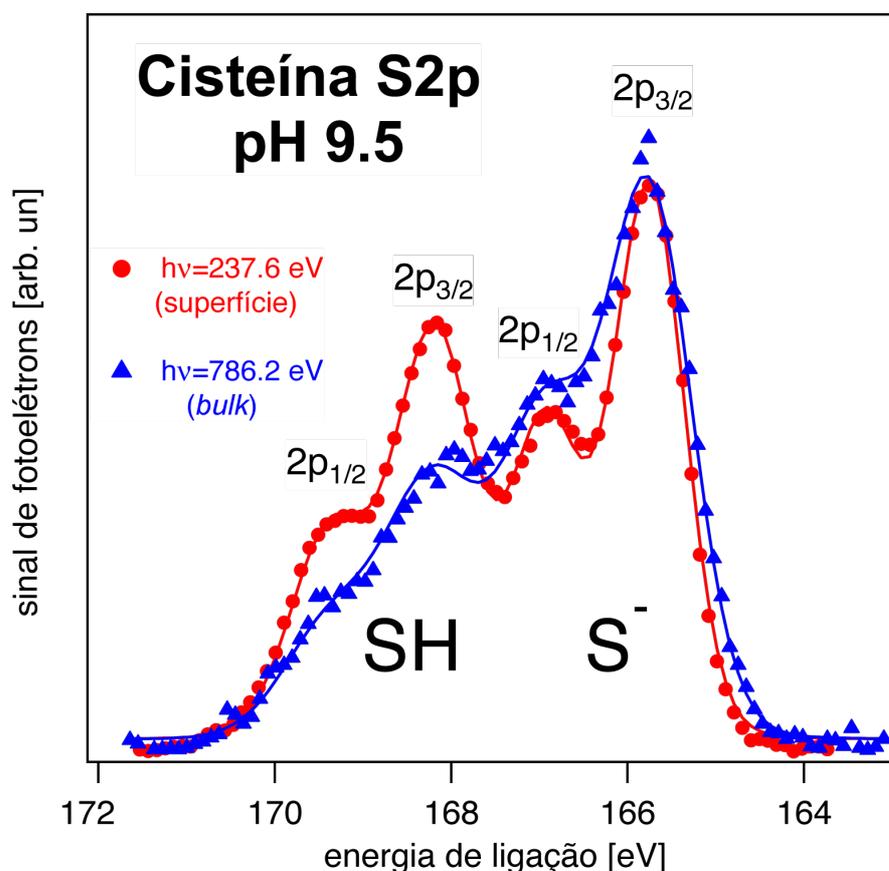


Figura 4.12: Espectro de fotoelétrons da Cisteína aquosa (pH 9,5) na borda S2p para duas energias de fótons diferentes. Os picos foram normalizados pela amplitude do pico referente ao nível S2p_{3/2} do grupo S⁻.

As larguras dos picos (FWHM) para o *bulk* e superfície são apresentados, bem como, a razão das áreas absoluta entre os picos. As energias de fótons que foram utilizadas foram 237,6 eV¹, 786,2 eV², 463,6 eV³ e 995,1 eV⁴, elas nos permitem determinar a energia cinética dos fotoelétrons ejetados, e se o sinal obtido contém mais informação da interface líquido/gás (superfície) ou do *bulk* líquido, como será descrito logo mais adiante no texto. Os valores apresentados na razão absoluta das espécies **não** correspondem necessariamente à ocupação (densidade) real das espécies na superfície/*bulk*, já que apesar da razão absoluta ter sido rotulada, sempre teremos contribuição destas duas regiões, embora a contribuição de uma dada região no espectro de fotoelétrons tenha um peso muito maior dependendo do IMFP, que é função da energia cinética do elétron ejetado.

Analisando de forma comparativa os espectros obtidos nas figuras 4.11 e 4.12, percebemos que as formas protonadas (NH₃⁺ e SH) têm comportamentos opostos na superfície e no *bulk*. Enquanto para o nitrogênio a forma protonada NH₃⁺ aumenta na superfície em relação ao *bulk*, temos uma redução na forma protonada SH na superfície, para o caso enxofre. Ainda dentro de uma abordagem qualitativa, podemos comparar a razão entre os picos e as concentrações molares que constam da tabela 4.3. [68]. A razão entre a concentração das espécies, obtida a partir dos dados da tabela 4.3, oferece (S⁻/SH)=1,85 e (NH₂/NH₃⁺)=0,54, o que difere dos valores de *bulk* apresentados na tabela 4.4, já que a razão absoluta obtida dos gráficos não separa a contribuição da superfície, o que justificaria em parte a diferença observada.

Tabela 4.4: Energia de Ligação, FWHM e razão absoluta entre os picos referentes as espécies químicas da Cisteína aquosa na borda S2p e N1s. As energias de fótons utilizadas foram 237,6 eV (superfície S2p), 786,2 eV (*bulk* S2p), 463,6 eV (superfície N1s) e 995,1 eV (*bulk* N1s) evidenciando se os elétrons são provenientes majoritariamente do *bulk* ou da superfície.

Pico	Nível	BE (eV)	FWHM (eV) superfície ¹	FWHM (eV) <i>bulk</i> ²	Razão			
					S ⁻ /SH superfície ¹	S ⁻ /SH <i>bulk</i> ²	NH ₂ /NH ₃ ⁺ superfície ³	NH ₂ /NH ₃ ⁺ <i>bulk</i> ⁴
S ⁻	S2p _{1/2}	166,9	0,94	1,14	1,4	2,4		
	S2p _{3/2}	165,7	0,94	1,14				
SH	S2p _{1/2}	169,4	1,05	1,26				
	S2p _{3/2}	168,2	1,05	1,26				
NH ₂	N1s	403,8	1,17	1,32			1,1	0,5
NH ₃ ⁺	N1s	406,1	1,38 [†]	1,41 [†]				

[†]Note que a largura deste pico (NH₃⁺) na superfície e no *bulk* é praticamente a mesma. Este fato tende a eliminar a explicação trivial de que o alargamento observado no *bulk* é devido ao feixe de fótons. De fato neste caso, todos os picos relacionados ao *bulk* deveriam estar alargados em relação aos da superfície o que não ocorre neste caso, veja o texto para mais detalhes.

Ainda na tabela 4.4, percebemos que todos os picos são mais largos no *bulk* comparados a superfície, uma razão para este efeito é que os espectros relacionados ao *bulk* são obtidos utilizando uma energia do feixe de fótons consideravelmente maior. A resolução da linha de luz diminui com o aumento da energia do fóton o que causa um alargamento. Outro fato a ser tomado em consideração é que a resolução do analisador de elétrons tende a ser reduzida quanto maior a energia cinética dos elétrons detectados. No caso específico da borda $S2p$, há uma variação de largura de 0,2 eV na largura entre um pico no *bulk* e o mesmo pico no espectro de superfície, basicamente devido ao aumento da largura do fóton (conforme figura 3.5). Somando estes dois fatores poderíamos explicar parcialmente os alargamentos observados entre o espectro referente à superfície e aquele referente ao *bulk*. Ocorre que no pico devido ao NH_3^+ isto não é observado. Eliminando estas duas explicações mais óbvias e triviais parte do alargamento observado também poderia ser pela desidratação parcial na superfície quando comparada ao *bulk*, tal como mostrado na figura 4.1. Objetivamente, vemos que os picos protonados da amina (NH_3^+) sempre possuem uma largura maior que seus respectivos picos neutros (NH_2) e isso, como foi justificado na seção anterior, é influenciado pela carga final do grupo após a ionização (seção 4.1.2). Vale comentar que estas medidas foram tomadas em tempos de luz diferentes, por este motivo temos valores de largura diferentes na tabela 4.2 (dados para a superfície), o que aumenta a barra de erros de nossos resultados devido a possíveis variações de condições do analisador e da própria linha de luz. Seria interessante, numa perspectiva futura, analisar outras moléculas e inclusive a própria Cisteína para estudar a variação de largura entre o *bulk* e a superfície e verificar se isso é influenciado pela propensão a superfície (desidratação parcial). Em um trabalho com íons clorados foi observada essa diferença na largura das linhas $Cl\ 2p$ do *bulk* e da superfície [67].

Dentro de uma análise qualitativa, uma hipótese plausível para explicar este comportamento seria pensar que há algum tipo de diferença no pH da superfície líquida da solução de Cisteína. O equilíbrio entre as espécies seria deslocado para um lado ou para o outro da curva de titulação, mudando as intensidades entre o sinal da interface e do *bulk*. Essa hipótese não é uma novidade em física de superfície de líquidos, há um amplo debate na comunidade científica se a superfície da água pura líquida é ou não enriquecida por íons OH^- ou H^+ . Ainda sem um veredicto final, essas discussões se baseiam em diferentes experimentos e simulações que mostram que a superfície é mais ácida ou mais básica, mas a opinião majoritária concorda que a superfície líquida é mais ácida [94-97].

Acreditar que a superfície da água tem um pH diferente do *bulk* é o mesmo que dizer que a curva de titulação de um dado aminoácido se comporta de forma diferente daquela encontrada no *bulk*. Para que isso ocorra, necessariamente devemos ter alteração do pH para deslocar o equilíbrio da solução para uma dada espécie. A figura 4.13 mostra a soma

da concentração das espécies que contém SH, S⁻, NH₃⁺ e NH₂, obtida a partir da curva teórica apresentada na figura 4.10. Ainda nesta figura destacamos duas regiões para indicar para onde o equilíbrio seria deslocado caso houvesse algum tipo de alteração do pH.

Se partimos da premissa que a **superfície do líquido é mais ácida**, o resultado da razão absoluta da área entre os picos S⁻/SH=1,4, parece se ajustar bem a uma superfície enriquecida com íons H⁺ (faixa de pH ácido na figura 4.13). Deste modo, nosso resultado realmente parece concordar com a hipótese de que o pH da superfície é ligeiramente mais ácido [96, 97]. Yamaguchi *et. al.* medem uma diferença menor que 1,7 no valor do pH da superfície em relação ao *bulk*, fazendo a superfície aquosa ser ligeiramente mais ácida. Nossa solução não é de água pura, mas podemos estimar que o pH da interface líquido-gás esteja numa região de 8,5 e 9,0 na escala de pH.

Em toda esta faixa de pH (8,5 a 9,0), o sinal de fotoelétrons proveniente do NH₃⁺_{total} deve ser bem superior ao do NH₂(_{total}), no mínimo 2,5 vezes maior que este último a partir da curva de titulação. Quando usamos a energia de 445 eV (sensível a superfície), o que se percebe, no entanto, é que a razão é de NH₂/NH₃⁺=1,1. Essa razão concorda com uma superfície mais básica, com pH de cerca de ~10. Chegamos a uma contradição, que invalida nossa hipótese inicial. Se assumimos que a **superfície do líquido é mais básica**, é necessário que o sinal de fotoelétrons proveniente do S⁻_{total} seja mais que o dobro do sinal de fotoelétrons que vem do SH_{total}.

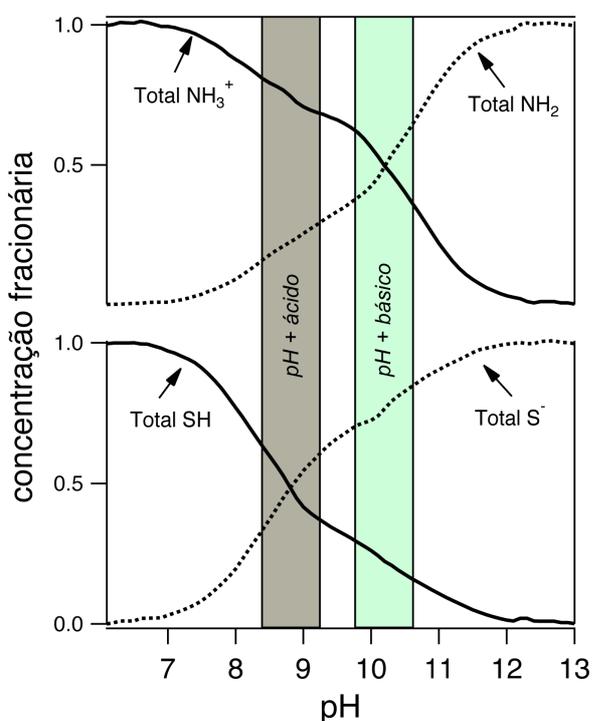


Figura 4.13: Distribuição da concentração de espécies da Cisteína aquosa, evidenciando duas regiões de pH diferentes em torno de 9,5, uma mais ácida e outra mais básica.

A primeira conclusão importante é que neste problema não podemos falar de uma curva de titulação diferente na superfície de um líquido comparada com a do *bulk*. Nosso exemplo mostra claramente que no caso de uma solução de aminoácido essa justificativa não descreve corretamente o problema. A curva de titulação é feita em função do pH de uma solução, se usamos o termo *curva de titulação na superfície* deveríamos subentender que há um pH diferente, e não observamos isso em nossos resultados. O conceito de titulação na superfície de um líquido não é adequado, de acordo com nossos resultados.

Queremos quantificar a diferença na distribuição das espécies entre a superfície e o *bulk*, e para isto, usamos o fato que se incidimos fótons com uma energia mais alta, podemos extrair os elétrons de camadas mais internas do líquido, e assim, obter informações complementares da superfície, já que podemos ter acesso ao *bulk* da solução. Finalmente, queremos estabelecer as causas dessa assimetria na distribuição.

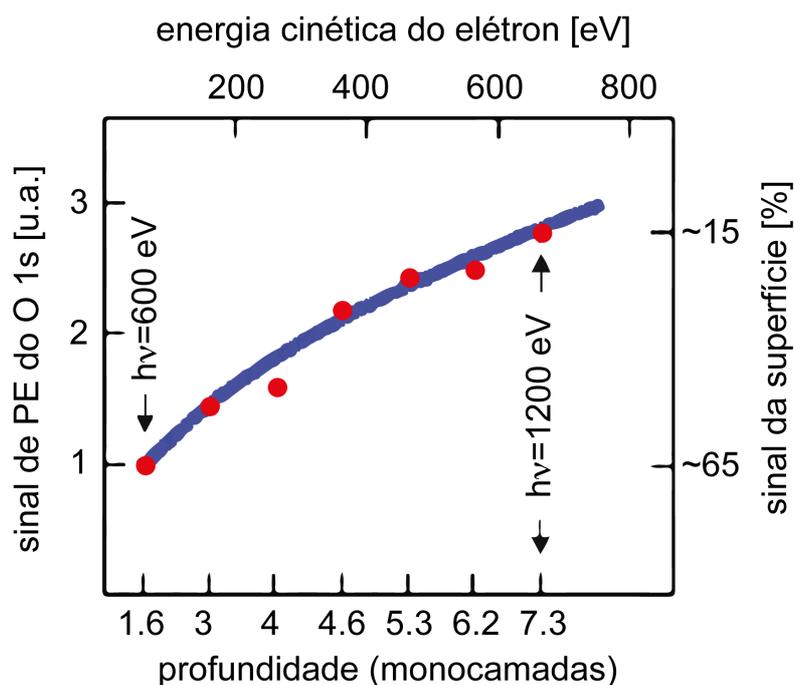


Figura 4.14: Sinal do O 1s versus energia cinética do fotoelétron ejetado e também porcentagem de sinal detectado exclusivamente da superfície versus energia de fótons $h\nu$. Esta figura é extraída de comunicação privada do Dr. Bernd Winter [98], mas parte do resultado apresentado consta no artigo [99], com exceção da porcentagem de sinal da superfície (com adaptações).

Na tentativa de obter esta abordagem quantitativa, utilizaremos os resultados do trabalho de B. Winter *et al.* [98, 99] em que se identifica a fração da superfície do líquido que emite um sinal detectável de fotoelétrons para os picos O1s da água líquida, em função da energia cinética destes fotoelétrons ejetados, como consta na figura 4.14. A partir destes dados, fazemos uma aproximação em que, a partir da energia cinética dos fotoelétrons

emitidos pela Cisteína, usamos os mesmo valores de fração da superfície que emite um sinal de elétrons detectável para o $O1s$. Sumarizamos estes resultados na tabela 4.5.

A energia cinética dos fotoelétrons ejetados da Cisteína aquosa é da ordem de ~ 70 eV para a superfície e de ~ 618 eV para o *bulk*, no caso do enxofre. Para o caso do nitrogênio, temos ~ 60 eV para a superfície e da ordem de ~ 590 eV para o *bulk*. Com isso sondamos em média uma profundidade de 2 a 10 monocamadas, considerando a curva universal do livre caminho médio (figura 3.2). Segundo Winter [98], para uma energia cinética de cerca 70 eV teríamos $\sim 64\%$ de contribuição do sinal de elétrons da superfície (equivalente a 1,8 monocamadas), e para uma energia cinética de 620 eV, temos uma contribuição de 15% da superfície (equivalente a 6,8 monocamadas). Para uma energia cinética de 60 eV, 65% (1,7 monocamadas) de sinal da superfície e para 590 eV, 18 % de sinal da superfície (6,4 monocamadas), estes resultados estão sumarizados na tabela 4.5 abaixo.

Tabela 4.5: Porcentagem de sinal de Cisteína (*valores aproximados*) originado exclusivamente na superfície em função da energia cinética dos fotoelétrons ejetados.

	KE (eV)	% sinal da superfície	número de monocamadas
N 1s	60	65	1,7
	590	18	6,4
S 2p	70	64	1,8
	618	15	6,8

Esses dados, mostrados na tabela 4.5, serão usados diretamente no modelo que descrevemos logo abaixo, para explicar o problema da assimetria na distribuição das formas iônicas entre a superfície líquida e o *bulk*.

A razão absoluta entre duas espécies A e B que constam em um espectro, presentes em uma amostra líquida, é definida como R_{AB} . Essa razão não é constante, podendo variar dependendo de onde R_{AB} é tomada, por exemplo, na interface líquido-gás R_{AB} é geralmente bem diferente de R_{AB} no *bulk*.

A técnica de PES pode ser mais ou menos superficialmente sensível dependendo da energia dos fótons incidentes. Para uma energia de fóton mais baixa e conseqüente energia cinética dos fotoelétrons ejetados mais baixa, o IMFP é menor, fazendo com que tenhamos uma intensidade de sinal muito mais intensa advinda exclusivamente das primeiras monocamadas, com uma contribuição bem menor de camadas mais internas (*bulk*). Por outro lado, se a energia de fótons é maior, conseqüentemente, a energia cinética dos fotoelétrons será também maior, fazendo com que o sinal de fotoelétrons tenha uma

contribuição de fotoelétrons do *bulk* muito maior que os fotoelétrons que são ejetados da superfície.

Simulações computacionais do perfil de densidade (*density profile*) mostram a variação da densidade de espécies da superfície e no *bulk* para diversos tipos de compostos solvatados em água [3, 66, 67, 98-100]. Entretanto, é possível construir um modelo simples do qual poderemos inferir a razão entre as espécies presentes exclusivamente no *bulk* ou exclusivamente na superfície.

Vamos admitir que a superfície do líquido tenha uma concentração de espécies bem definida e as camadas imediatamente mais internas (*bulk*) tenham uma densidade de espécies constante. Se conhecemos a porcentagem de sinal de elétrons que vem exclusivamente da superfície, para uma certa energia de fótons, podemos obter a razão entre duas espécies A e B apenas no *bulk* ou apenas na superfície.

Nossos espectros são tomados em duas energias diferentes, uma mais sensível à interface e a outra mais sensível ao *bulk*, assim, R_{AB} pode ser redefinida como: R_{AB}^S para a razão absoluta de energia de fótons menor que é sensível a interface líquido-gás e como R_{AB}^B para a parte mais sensível ao *bulk*. Vamos definir também a porcentagem de sinal como sendo "a" para uma energia de fótons mais baixa e como sendo "b" para uma energia de fótons mais alta. Com isso, a razão absoluta entre duas espécies A e B pode ser descrita como nas equações a seguir:

$$\frac{a \cdot I(A_S) + (1 - a) \cdot I(A_B)}{a \cdot I(B_S) + (1 - a) \cdot I(B_B)} = R_{AB}^S \quad (4.1)$$

$$\frac{b \cdot I(A_S) + (1 - b) \cdot I(A_B)}{b \cdot I(B_S) + (1 - b) \cdot I(B_B)} = R_{AB}^B, \quad (4.2)$$

Onde, $I(A_S)$ e $I(B_S)$ representam a intensidade de sinal de fotoelétrons das espécies A e B que são exclusivamente da superfície. Por sua vez, $I(A_B)$ e $I(B_B)$ representam a intensidade de sinal de fotoelétrons exclusivamente do *bulk*.

Nossos espectros podem ser normalizados de tal modo que o denominador destas duas equações podem ser igualados a um, ou seja, a área do pico referente a espécie B está sendo normalizada com área igual a um. Se fizermos isso, chegamos a um conjunto de quatro equações e quatro variáveis:

$$a \cdot I(A_S) + (1 - a) \cdot I(A_B) = R_{AB}^S \quad (4.3a)$$

$$b \cdot I(A_S) + (1 - b) \cdot I(A_B) = R_{AB}^B \quad (4.3b)$$

$$a \cdot I(B_S) + (1 - a) \cdot I(B_B) = 1 \quad (4.3c)$$

$$b \cdot I(B_S) + (1 - b) \cdot I(B_B) = 1 \quad (4.3d)$$

Destas equações, são conhecidas as porcentagens “a” e “b” de modo indireto pelo sinal de fotoelétrons do O1s na água pura no trabalho de B. Winter *et al.* [98, 99] e os valores de R_{AB}^S e R_{AB}^B são obtidos diretamente da razão das áreas dos picos presentes em nossos gráficos nas figuras 4.11 e 4.12. Resolvendo este sistema para a razão $I(A_S)/I(B_S)$ e $I(A_B)/I(B_B)$, obtemos:

$$\frac{I(A_B)}{I(B_B)} \doteq I_{AB}^B = \frac{a \cdot R_{AB}^B - b \cdot R_{AB}^S}{a - b} \quad (4.4)$$

$$\frac{I(A_S)}{I(B_S)} \doteq I_{AB}^S = \frac{(1 - a) \cdot R_{AB}^B - (1 - b) \cdot R_{AB}^S}{b - a} \quad (4.5)$$

I_{AB}^B é a razão de espécies exclusivamente no bulk e I_{AB}^S é a razão de espécies exclusivamente na superfície. Para cada energia de fóton, teremos uma razão diferente, pois as porcentagens “a” e “b” variam com o IMFP, que é função da energia do fóton. A partir destes dados e dos de Winter [98] encontramos os seguintes valores:

Tabela 4.6: Razão absoluta (R_{AB}) entre os picos do espectro na borda S2p e N1s e valor da razão entre a quantidade de espécies a partir do modelo I_{AB}^S e I_{AB}^B apresentado.

	R_{AB}^S superfície	I_{AB}^S superfície	R_{AB}^B bulk	I_{AB}^B bulk
S^{2p}/SH	1,4	0,7	2,4	2,7
NH₂/NH₃⁺	1,1	1,4	0,5	0,3

Da tabela 4.6 vemos uma clara diferenciação entre os valores obtidos da razão absoluta e os valores corrigidos pelo modelo simples construído (MS), que separa as contribuições da superfície e do *bulk* do sinal de fotoelétrons detectado (normalização). Dentre as quatro espécies que estão contidas dentro de nossa solução, as duas mais abundantes (ZA e AO) representam a sua quase totalidade (~84%). Se considerarmos que os picos são formados apenas por essas duas espécies (ZA e AO), se obtém 0,7 na razão

(S⁻/SH) e o valor de 1,4 em (NH₂/NH₃⁺) na superfície, enquanto no *bulk* esse valor muda drasticamente para 2,7 na razão (S⁻/SH) e para 0,3 na razão (NH₂/NH₃⁺).

A tabela 4.6 reforça ainda mais o comportamento diferenciado na superfície e no *bulk* das espécies de Cisteína. Por exemplo, enquanto no modelo **R_{AB}** a razão (S⁻/SH) dobra da superfície para o *bulk*, no modelo **I_{AB}** (normalizado) percebemos que a razão na verdade quadruplica. O mesmo se observa para a razão (NH₂/NH₃⁺), no modelo **R_{AB}** ela se reduz a metade da superfície para o *bulk*, enquanto no modelo **I_{AB}** o valor no *bulk* é quatro vezes e meio menor que o valor na superfície. Este resultado é bastante coerente com o modelo proposto, já que necessariamente o valor de uma razão deve ser o inverso da outra, pois se ZA possui os grupos (S⁻, NH₃⁺) e AO (SH, NH₂), então $ZA/AO = (S^-/SH) = (NH_2/NH_3^+)^{-1}$. O comportamento também se repete de modo aproximado nos resultados do MS (*bulk*), onde $(S^-/SH) \cong (NH_2/NH_3^+)^{-1}$

Este resultado confirma a teoria de que se um grupo possui carga, a configuração de menor energia para este sistema é que ele seja blindado pela polarização do meio solvente. Essa estrutura, por sua vez, evita a superfície do líquido, pois ali a sua energia de equilíbrio seria maior, por esse motivo, espécies com grupos neutros são mais propensas a serem superficialmente ativas que aquelas carregadas. Enquanto no *bulk* há uma maior concentração da estrutura carregada ZA, na superfície, o que observamos, é um enriquecimento da forma neutra AO. É claro que este modelo não inclui a orientação molecular, o que poderia justificar a diferença nas razões observadas. Para isso, basta que os grupos carregados fiquem imersos e os grupos neutros tendam a se orientar em direção a superfície, o que geraria a diferença nas razões entre os picos que foi observada no sinal dos fotoelétrons.

Este modelo proposto seria mais preciso se conhecêssemos a profundidade de sondagem, ou seja, se conhecêssemos quantas camadas estamos contando como superfície. De fato, o IMFP para água líquida ainda não foi devidamente calculado e apenas algumas tentativas aproximadas mostram que é realmente complicado calcular este resultado [101]. Com este último resultado, percebemos que a diferença de equilíbrio nas espécies não é fruto de uma variação de pH (o que implicaria falarmos em uma curva de titulação diferente) mas sim de uma diferente propensão de distribuição das formas iônicas.

O problema é mais propriamente descrito em função da propensão das formas iônicas neutras serem mais superficialmente ativas quando comparadas às formas carregadas. Se analisássemos apenas uma única estrutura da molécula de Cisteína seja o (S⁻, SH) ou o (NH₃⁺, NH₂), seríamos conduzidos a pensar que a superfície do líquido seria ácida ou básica, aumentando assim a variedade de experimentos que se propõem a responder a pergunta se a superfície líquida é ácida ou não [94, 97]. De fato, o aminoácido

Cisteína tem esta propriedade única de possuir dois grupos ionizáveis amina e tiol, permitindo que tenhamos duas sondas que possam descrever o experimento.

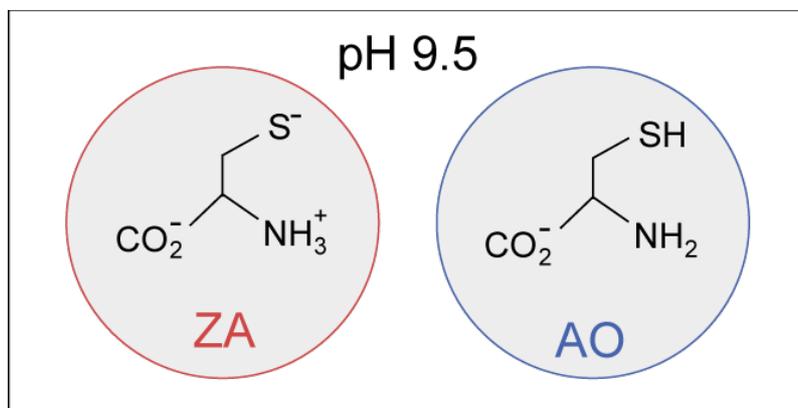


Figura 4.15: Formas iônicas da Cisteína mais abundantes no pH 9,5.

Outra tentativa de solução do problema é basear-se no fato de que existe uma propensão das formas iônicas neutras serem mais ativas na superfície comparadas às formas carregadas de acordo com o modelo de Onsager-Samaras^{*****} [102]. Se analisássemos apenas grupos específicos da molécula de Cisteína seja o (S⁻, SH) ou o (NH₃⁺, NH₂), para as espécies relevantes descritas na fig. 4.15, chegamos a conclusão de que os grupos SH e NH₂ seriam mais ativos na superfície do que S⁻ e NH₃⁺. Dentro desta análise, teremos uma situação parecida com aquela descrita na fig. 4.16. A situação descrita na figura 4.16 explica as observações experimentais.

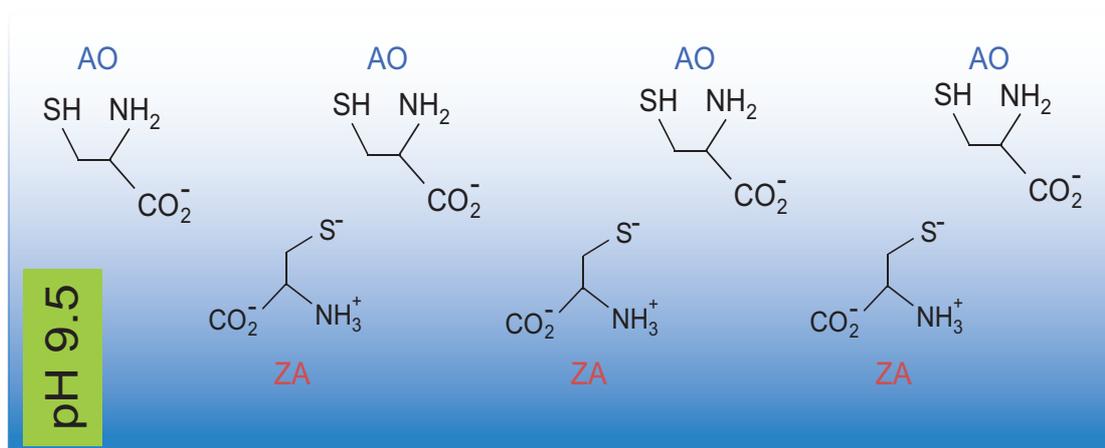


Figura 4.16: Explicação dos efeitos observados na superfície e no *bulk* da solução aquosa de Cisteína.

^{*****} Onsager e Samaras concluíram que os íons são repelidos da superfície líquida pelas cargas imagem produzidas na interface. Sabemos que em eletrólitos existe uma alta propensão dos íons se encontrarem na superfície líquida, o que, apesar de contradizer a hipótese inicial de Onsager-Samaras, descreve bem a realidade de líquidos extremamente diluídos.

No presente momento cálculos estão sendo realizados pelo grupo do professor Hans Ågren (Universidade de Uppsala). A partir desses cálculos poderemos ter mais informações a respeito deste comportamento.

4.3 - Distribuição não estequiométrica do sinal de fotoelétrons do nível S2p na solução aquosa de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃)

. A espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), em princípio, pode ser usada para deduzir a estequiometria de um composto químico baseando-se na hipótese que as seções de choque para orbitais de camada interna sejam independentes da composição molecular de uma dada amostra. Isso não é o que foi observado no experimento conduzido e apresentado no artigo “*Nonstoichiometric Intensities in Core Photoelectron Spectroscopy*”, publicado recentemente por J. Söderström *et al.* [103]. Faremos um breve resumo das conclusões apresentadas pelos autores e que nos motivaram ao estudo do tiosulfato de sódio dissociado em água.

J. Söderström *et al.* [103] obtiveram espectros de XPS da borda C1s de três compostos gasosos clorados (CH₃CCl₃, CH₃CHCl₂ e CH₃CH₂Cl) para uma ampla faixa de energia de fótons (300 a 800 eV). Todos os três compostos possuem dois átomos de carbono e era de se esperar, caso a seção de choque para o orbital C 1s fosse independente da composição molecular, que as intensidades dos dois picos que surgem no espectro de fotoelétrons da borda C1s tivessem a mesma intensidade. Isso significaria que as intensidades refletiriam a estequiometria das amostras. Os autores observaram que as intensidades relativas dos picos no espectro de fotoelétrons não refletem a estequiometria dos carbonos em toda a faixa de energia estudada para todos os três compostos.

A fim de quantificar as diferenças na seção de choque de cada um dos dois carbonos observados, a razão das áreas dos picos referentes ao C1s foram apresentadas num gráfico da razão das intensidades $C_{Cl}1s/C_H1s$, onde $C_{Cl}1s$ é referente ao carbono ligado ao(s) Cloro(s) e C_H1s ao carbono ligado ao(s) hidrogênio(s), *versus* a energia dos fótons. O gráfico da razão $C_{Cl}1s/C_H1s$ *versus* energia dos fótons mostra um padrão oscilatório, muito semelhante àquele observado em espectros de EXAFS⁺⁺⁺⁺⁺(figura 4.17). A amplitude das oscilações cresce com o número de átomos de cloro e as intensidades não estequiométricas

⁺⁺⁺⁺⁺*Extended X-ray Absorption Fine Structure* – espectroscopia de estrutura fina de absorção de raios X para energias maiores que a borda de absorção (50 eV acima). De forma simples, o experimento consiste em medir a intensidade do feixe de fótons que inicialmente atinge e, posteriormente, atravessa uma amostra. A razão entre essas intensidades nos fornece o padrão de absorção da amostra. Essa técnica espectroscópica permite que se estude a estrutura de um determinado composto já que as modulações observadas no espectro de EXAFS, estão associadas ao retroespalhamento dos fotoelétrons de raios X que variam a seção de choque de absorção do átomo absorvedor. A técnica também permite obter informações da distribuição radial do número de átomos vizinhos.

persistem mesmo para energias muitas centenas de eV acima da borda de absorção. Essas oscilações são interpretadas como uma modulação 'tipo'-EXAFS da seção de choque de fotoionização que é dominada pelo retro espalhamento dos elétrons pelos átomos de Cloro. Essa interpretação tem o suporte de cálculo teórico de múltiplo espalhamento que usa códigos FEFF, que simulam espectros de absorção de raios X para interpretação de espectros de EXAFS [103].

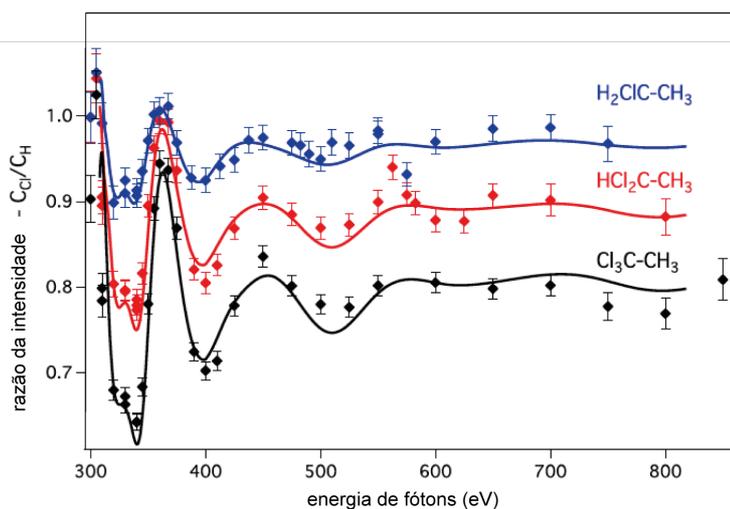


Figura 4.17: Curvas da razão das intensidades do $C_{Cl}1s/C_{H}1s$ versus energia de excitação do artigo de Söderström *et al.* [103].

Finalmente, na discussão dos resultados obtidos, os autores ressaltam que o padrão oscilatório observado se comporta como um *tipo*-EXAFS, mas que o termo PEXAFS^{#####} (EXAFS de fotoelétrons), que se refere ao acrônimo que foi utilizado em estudos semelhantes no caso dos sólidos, tem questionamentos em relação a associação direta dos resultados do PEXAFS e do EXAFS. Maiores discussões podem ser encontradas nas referências [104, 105]. Outro trabalho também foi recentemente publicado obtendo resultados semelhantes por R. Kushawaha *et al.* [106] na análise de hidrocarbonetos.

É importante observar que normalmente se usam as intensidades dos sinais obtidos sem uma compreensão mais profunda do papel das seções de choque relativas na análise quantitativa de alguns resultados. Por isso nos motivamos a estudar uma molécula semelhante àquela que produziu o maior padrão oscilatório (CH_3CCl_3), para verificar se o comportamento oscilatório se repete em meio aquoso. A molécula escolhida foi o $S_2O_3^{2-}$ que surge da dissociação do tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) em água ($2Na^+$ e $S_2O_3^{2-}$), conforme pode ser observado na figura 4.18. A estrutura $S_2O_3^{2-}$ é bem semelhante ao CH_3CCl_3 com exceção da ausência dos hidrogênios, e tem como substituintes o carbono pelo enxofre e os

Photoelectron EXAFS. No EXAFS propriamente dito, se analisa a intensidade do sinal de fótons inicial e final que atravessa uma amostra, e não os fotoelétrons.

cloros pelos oxigênios. Vale notar que no nosso caso, os centros espalhadores são átomos relativamente pequenos ($R_O=60$ pm) e os centro emissores são átomos grandes ($R_S=100$ pm). Isto é exatamente ao contrário do estudo anterior feito em gás. Uma das razões para nossa escolha ser diversa, está no fato de querermos investigar se parte do padrão oscilatório em líquidos também pode vir das moléculas de água que compõem a primeira camada de solvatação. Queríamos também investigar se o efeito oscilatório seria atenuado e, em caso afirmativo, em qual proporção.

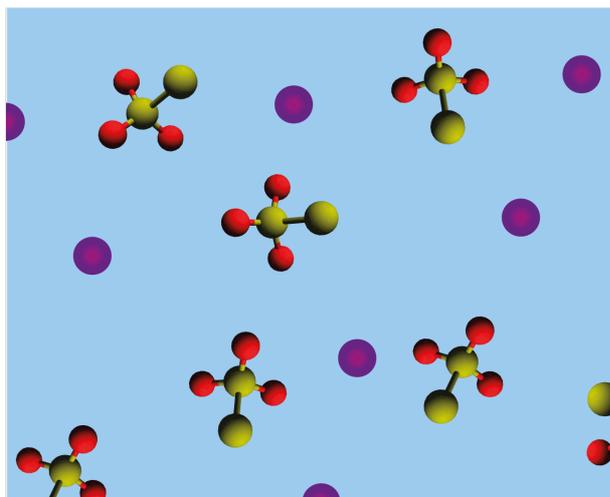


Figura 4.18: Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dissociado em água. Esferas amarelas representam os enxofres, vermelhas os oxigênios e roxas os íons sódios.

Na figura 4.19 apresentamos o espectro de fotoelétrons da borda $\text{S}2p$ da solução aquosa de tiosulfato de sódio com energia de fótons de 210 eV. O ângulo entre o analisador e o vetor de polarização da luz síncrotron estava em 90° . As amostras foram preparadas na concentração de 0,75 M de tiosulfato de sódio em água. Os dois picos $\text{S}2p$ foram ajustados com a convolução de uma Gaussiana e uma Lorentziana, onde o tempo de vida do estado é fixado aos valores da fase gasosa encontrados na literatura ($\text{S}2p - 70$ meV) [88]. A largura da Gaussiana estava livre para variar, no entanto, cada pico de um dado dupletto foi forçado a apresentar o mesmo valor de largura. Também fixamos a distância entre os dubletos e a distância entre as componentes $\text{S}2p_{1/2}$ e $\text{S}2p_{3/2}$ de cada dupletto.

Ainda na figura 4.19, observamos que os dois dubletos que surgem no espectro são referentes aos dois enxofres do grupo $\text{S}-\text{SO}_3^{2-}$ presente na solução aquosa. O dupletto com energia de ligação mais alta está associado ao enxofre ligado aos oxigênios que têm maior eletronegatividade. Por sua vez, o enxofre isolado, ligado ao outro enxofre, possui a energia de ligação mais baixa. Este último, pode fazer ligações de hidrogênio, o que pode aumentar

a largura do pico comparado ao do SO_3 devido a um número variado de coordenações possíveis da molécula.

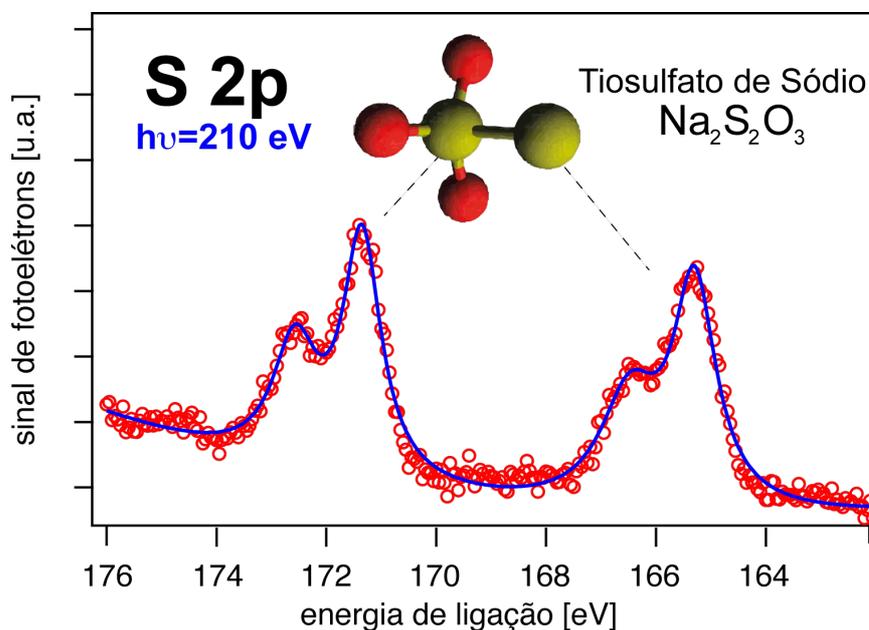


Figura 4.19: Espectro de fotoelétrons da borda S2p do Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dissolvido em água a 0,75 M, com energia de fótons de 210 eV. A distância entre os dupletos é de 6,1 eV, e a distância entre as componentes $\text{S}2p_{3/2}$ e $\text{S}2p_{1/2}$ em cada duplete é de 1,2 eV, para ambos os picos. Linhas tracejadas indicam a qual enxofre está associado um dado duplete. Esferas amarelas representam os átomos de enxofre e vermelhas os átomos de oxigênio.

Gravamos diversos espectros de fotoelétrons, como o da figura 4.19, na borda S2p na região de 190 a 670 eV. Construímos um gráfico da razão da área dos picos (SO_3/S) versus a energia dos fótons, onde a área de um dado pico é a soma das componentes $\text{S}2p_{1/2}$ e $\text{S}2p_{3/2}$ referentes a um enxofre. O resultado obtido pode ser verificado na figura 4.20. Na parte (A) da figura 4.20 temos o espectro obtido para uma polarização horizontal da luz incidente e em (B) para a polarização vertical. As barras de erro da área dos picos são tomadas a partir da raiz quadrada do número de contagens (área do pico), com elas calculamos o erro da razão com propagação de erros.

Medir os espectros na polarização vertical e horizontal também permite que observemos se o efeito de anisotropia na distribuição de fotoelétrons muda o padrão de interferência observado. Em ambos os gráficos (A e B) da figura 4.20, podemos observar um padrão oscilatório semelhante aquele encontrado na fase gasosa para o (CH_3CCl_3).

Para se ter uma compressão qualitativa, colocamos a forma da curva teórica obtida no trabalho de J. Söderström *et al.* [103] sobre o gráfico, assim podemos fazer uma análise comparada (linha preta contínua). Ressaltamos que esse procedimento é puramente qualitativo. As variações observadas podem ser devido a diferença de comprimento de ligação da molécula analisada e a própria interação do $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ com as moléculas de água *via*

ligações de hidrogênio ou outros efeitos que precisam de um cálculo computacional mais preciso para serem contabilizados.

As oscilações observadas ocorrem devido a interferência dos fotoelétrons ejetados com os átomos vizinhos, o que produz uma modulação na seção de choque de fotoionização.

Em nosso resultado observamos que as oscilações tendem a se estabilizar em torno da razão igual a 1, da mesma maneira, as amplitudes das oscilações também diminuem assintoticamente com o aumento da energia dos fótons incidentes. Observamos ainda que a amplitude das oscilações é maior que a observada no experimento com gás [98] na energia de fótons cerca 30 eV acima do limiar de ionização (1,0 em oposição ao 0,4 do gás), no entanto, a nossa oscilação parece ser atenuada mais rapidamente, a partir de cerca de 400 eV (figura 4.20). J. Soderström *et al.* não obtiveram o mesmo resultado para os estudos em gás (figura 4.17), percebemos que ali as oscilações flutuam em torno de um valor menor que 1, o que é justificado devido a processos *shake-up* e *shake-off* [98]. Esse fenômeno, aparentemente não é observado para o tiosulfato de sódio em água, já que as flutuações ocorrem em torno de 1,0.

Ao leitor que chegou a este ponto da tese, uma pergunta parece surgir de forma natural: o que garante que o procedimento de ajuste dos picos C1s na Cisteína e na Metionina, que tomou todos os picos com a mesma área (seção de choque igual), não possa ter influência da variação da seção de choque devido ao espalhamento produzido pelos átomos vizinhos? Primeiramente, temos que observar que estas oscilações são importantes quando comparamos a área de picos dentro de uma mesma molécula e tiramos conclusões quantitativas a partir disto. Fizemos isso apenas na análise da seção 4.2. Naquela seção, comparamos, numa mesma energia (na superfície ou no *bulk*), a área de dois picos que correspondem a formas iônicas diferentes. No caso, a diferença entre as formas era normalmente de um **único próton**. Vamos responder a esta pergunta em termos da figura 4.17 e do resultado obtido por nós, nos gráficos da figura 4.20.

Observe que na figura 4.17 a amplitude das oscilações depende do número e de qual elemento é o átomo espalhador. O composto com menor número de cloros ($\text{H}_2\text{Cl}-\text{C}-\text{CH}_3$) produz o menor padrão oscilatório (gráfico em azul). Já no caso do maior padrão oscilatório ($\text{Cl}_3\text{C}-\text{CH}_3$), apresentado no gráfico preto, um maior número de cloros aumenta a amplitude das oscilações observadas na figura 4.17. A amplitude das oscilações é dominada pela seção de choque de espalhamento dos átomos espalhadores. Observamos então um padrão linearmente crescente da intensidade das oscilações em função do número de átomos espalhadores. De modo particular, nos aminoácidos estudados, Cisteína e Metionina, o átomo espalhador passa a ser o hidrogênio que protona ou não o grupo a ser estudado.

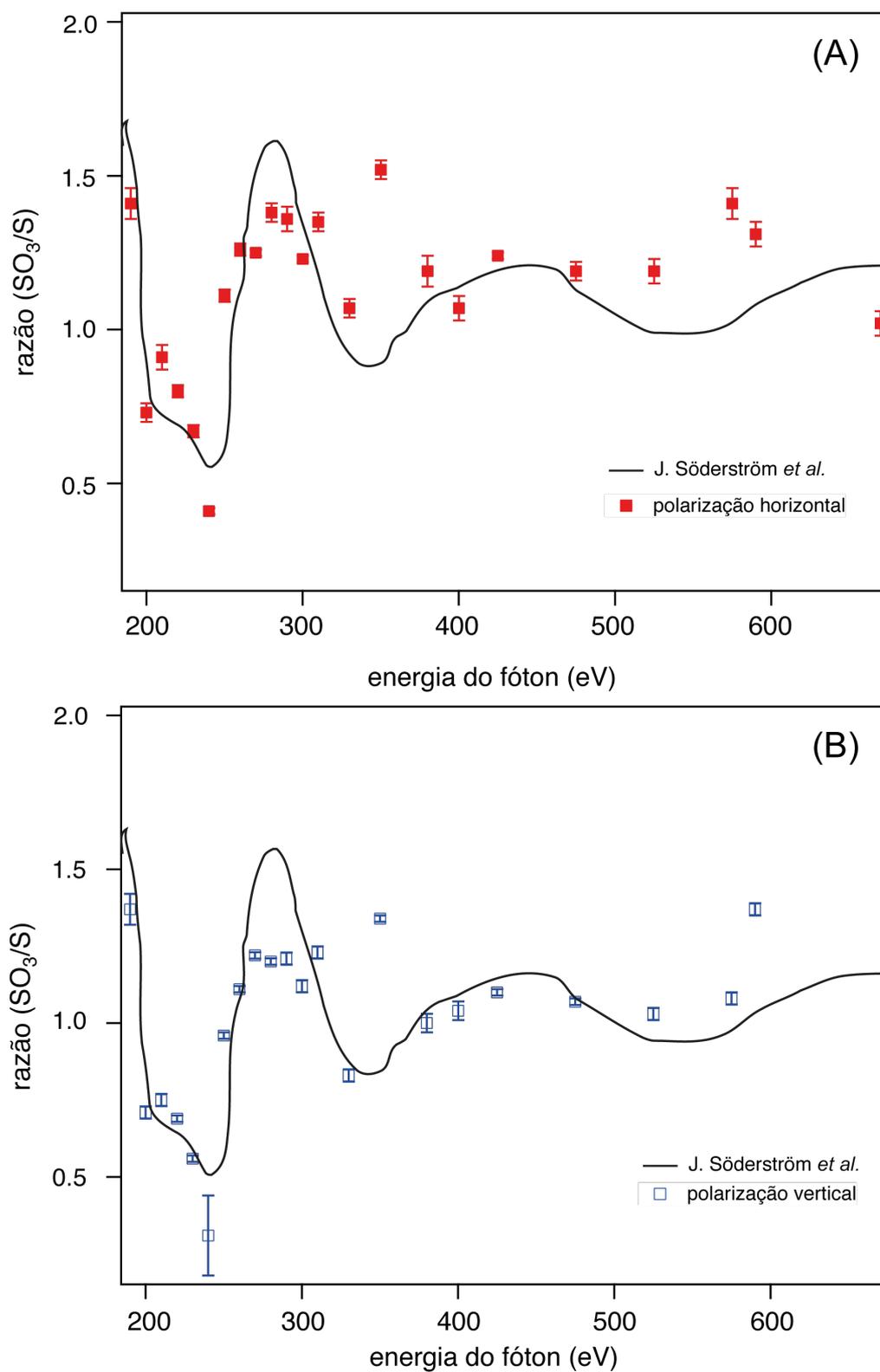


Figura 4.20: Gráfico da razão do sinal (SO_3/S) do Tiosulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3$) dissociado em água a 0,75 M, versus a energia de incidência dos fótons. (A) espectro tomado com a luz em polarização horizontal, (B) espectro tomado com a luz em polarização vertical. A linha preta contínua é a forma da curva obtida no trabalho de J. Soderström *et al.* [103], mas a curva não corresponde quantitativamente ao resultado obtido e apresentado na figura 4.17.

O cloro tem uma seção de choque de espalhamento bem maior que a do hidrogênio, de tal forma, que o padrão oscilatório, no caso dos aminoácidos, é bastante reduzido.

Observamos que a partir da energia dos fotoelétrons ejetados, que nos mostra onde estaríamos na curva da figura 4.17. Na faixa de energia cinética dos fotoelétrons ejetados das amostras de Cisteína e Metionina (50 a 70 eV), no regime de análise da interface, estamos aproximadamente na razão 1:1 dos picos da figura 4.17, já que o valor médio da energia de ligação dos dois carbonos é de 294 eV [103]. O efeito produzido nessa faixa de energia cinética é o mesmo produzido quando os fotoelétrons tem energia cinética maior que 200 eV (a partir de 500 eV de energia de fótons). Assim os resultados obtidos no *bulk* praticamente não possuem efeitos de interferência, mas passam a ser cruciais na superfície. Somando-se ao pequeno efeito produzido pelo hidrogênio, podemos considerar desprezíveis estes efeitos em termos da análise da seção 4.2.

O cálculo acurado da variação da seção de choque para os diferentes enxofres entra numa perspectiva futura de continuidade deste trabalho, já que não podemos associar diretamente o resultado do EXAFS com o resultado deste padrão oscilatório observado. J. Mustre *et al.* [104] e P. A. Lee *et al.* [105] mostram que da teoria não é possível reproduzir os resultados de um espectro de EXAFS e o chamado PEXAFS (caso sólido e gasoso). No caso líquido, temos um regime mais complexo, pois além da ausência da estrutura de rede cristalina, a dinâmica da ordem em temperatura ambiente faz com os resultados quantitativos (distâncias de ligação e número de coordenação) sejam muito mais complexos de serem calculados. Apesar das dificuldades, esta seria a primeira observação deste fenômeno para a fase líquida. Sabemos que no momento o grupo sueco de Olle Björneholm está trabalhando num artigo semelhante em que observam a variação da seção de choque de uma molécula com dois carbonos. Vale notar que não existe nenhum trabalho onde se analisou o efeito da polarização sobre as oscilações observadas. O trabalho do grupo sueco foi realizado utilizando o ângulo mágico para o espectrômetro.

4.4 - Efeito da concentração do soluto na interface da solução aquosa de fosfato monossódico (NaH_2PO_4)

O fosfato monossódico, também chamado dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), $M=118,98$ g/mol, é uma substância que age como tamponador. Tamponadores são muito usados em química já que eles fazem com que o pH de uma dada solução se estabilize. Ao invés dos constituintes da solução interagirem com os íons H_3O^+ ou OH^- , eles reagem com o tamponador, alterando as concentrações das formas iônicas mas não alterando o pH.

Um exemplo simples pode explicar esta propriedade: se originalmente tivermos uma solução de ácido monoprótico tal que o $pK_a=7$ e $[HA]=[A^-]$ (eq. 4.6a), após adicionarmos uma base forte (tamponador) que reduza $[HA]$ à metade e dobre $[A^-]$ (eq. 4.6b), teremos uma variação de pH de 7 para 7,6 (eq. 4.6c). Se por outro lado, adicionarmos 0,001 mol de NaOH em uma solução não tamponada, o pH mudaria de 7 para 11.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (4.6a)$$

$$pH_{novo} = pK_a + \left(\log \frac{[A^-] \cdot 2}{[HA] \cdot 1/2} \right) \quad (4.6b)$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} + \log(4) \quad (4.6c)$$

A ideia deste experimento foi analisar o comportamento da borda P2p do íon dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$) em função da concentração da solução aquosa, verificando se existe algum tipo de correlação entre a concentração de soluto e as propriedades a nível molecular na superfície (PNMS). Soluções aquosas de fosfato monobásico são fracamente ácidas em água [107] e o pH de uma solução aquosa de NaH_2PO_4 se estabiliza em torno de $pH=4,5$ para as concentrações que utilizamos (0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 M). É possível calcular o pH da solução aquosa de NaH_2PO_4 a partir dos valores do $K_{a1}=7.1 \times 10^{-3}$, e $K_{a2}=H_2PO_4^-$ do ácido fosfórico (H_3PO_4), resultado bastante conhecido na literatura de química analítica [108] como sendo $pH \approx -\log \left[\sqrt{K_{a1}K_{a2}} \right]$.

Com estas condições, na solução teremos praticamente apenas íons $H_2PO_4^-$ dissociados. Se duas espécies iônicas $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} estivessem presentes na interface da solução, em princípio, deveríamos observar duas estruturas diferentes no espectro. Lembremos que mesmo na desprotonação do grupo COOH da Cisteína (seção 4.1.2, figura 4.7, $pH 1,0 \rightarrow pH 5,0$), verifica-se um deslocamento químico da ordem de +0,5 eV na borda C1s dos grupos amina e tiol(CNH_3^+/CSH), ainda que eles dois não tenham sofrido desprotonação em $pH 1,0$ e $5,0$. O deslocamento químico entre as formas $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} deveria ser desta ordem, o deveria ser suficiente para vermos no espectro.

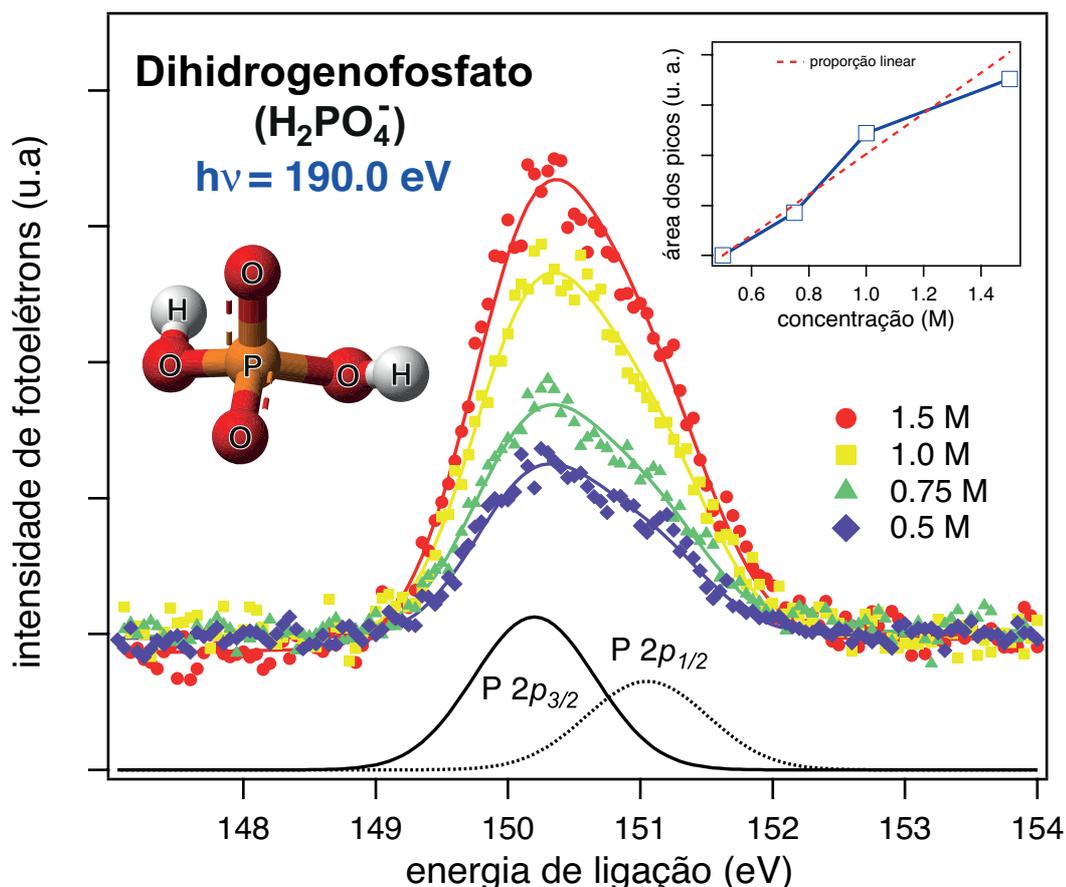


Figura 4.21: Gráfico da intensidade do sinal de fotoelétrons ejetados dos orbitais $P2p$ do dihidrogenofosfato em água em função da concentração da solução de fosfato monossódico. No gráfico menor estão indicadas a soma das áreas dos picos $P2p_{3/2}$ e $P2p_{1/2}$ em função da concentração da solução. Símbolos são os dados experimentais e as linhas contínuas os resultados dos ajustes.

Ressaltamos que mais estudos merecem ser realizados nesta molécula que age como tamponador nas células. Ajustar e medir o pH da solução para certificar a disponibilidade de espécies, para depois explorando a variação do EAL com a variação da energia do fóton, para se ter acesso ao *bulk* da solução. Outro interessante experimento a ser realizado seria ajustar a solução ao mesmo pH da célula ($\text{pH}=7,35$) e observar o comportamento das espécies na superfície, já que neste pH específico temos a coexistência das duas espécies H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} . Esse seria um resultado muito relevante para a área de bioquímica celular já que simularíamos o comportamento do tampão na superfície da célula e não no *bulk* aquoso.

A solução foi irradiada com fótons de 190 eV. Normalizamos os espectros obtidos pela corrente produzida num fotodiodo (medida indireta do fluxo) e pelo número de varreduras do analisador. Os parâmetros do analisador foram mantidos constantes em todas as concentrações analisadas. A figura 4.21 apresenta o efeito do aumento da concentração

do fosfato monossódico na solução aquosa e área destes picos em função da concentração do fosfato monossódico. Na parte inferior do gráfico estão indicados os picos referentes ao $P2p_{3/2}$ e $P2p_{1/2}$, a distância entre eles foi fixada a partir dos dados da fase gasosa do PO_4 [109] como sendo 0,86 eV. O energia de ligação é do orbital das componentes do orbital $P2p$ é $P2p_{3/2}=150,2$ eV e $P2p_{1/2}=151,1$ eV. A largura dos picos praticamente não sofreu variação na medida em que aumentávamos a concentração, também observamos que a intensidade dos picos cresce linearmente na faixa de concentrações estudada (gráfico área dos picos *versus* concentração).

É de se esperar que exista algum grau de saturação na propensão do íon na superfície líquida. Neste limite de saturação, os próprios íons vão começar a repelir-se uns aos outros, mudando esse comportamento de linear para assintótico.

5. CONCLUSÕES

Nesta tese apresentamos a técnica de micro-jato aplicada a espectroscopia eletrônica como uma poderosa ferramenta de análise da superfície da água líquida e soluções em nível molecular. Com a técnica de micro-jato resolvem-se diversos problemas de ordem prática, como a questão da camada de vapor que impedia que os elétrons emitidos pela superfície líquida fossem detectados pelo analisador e permite-se que líquidos com alta pressão de vapor, como é o caso da água, possam ser estudados. Pelos resultados apresentados na tese, pode-se constatar o poder da técnica e a grande multiplicidade de resultados que ela permite encontrar.

Deslocamentos químicos nas bordas C1s, N1s e S2p em soluções aquosas de aminoácidos sulfurados: Medimos os deslocamentos químicos e alargamento nas bordas C1s, N1s e S2p na Cisteína ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$)_{aq} e na Metionina ($\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$)_{aq} aquosas, com a mudança do pH da solução. Estes aminoácidos podem se apresentar nas formas neutra (zwitteriônica), aniônica ou catiônica, dependendo do pH da água. A diversidade de formas iônicas é gerada pela protonação ou desprotonação induzida pela variação do pH. Ela pôde ser diretamente observada pelos desvios químicos que cada uma das bordas sofre devido a perda de prótons ou devido a mudança de carga na molécula com um todo. Escolhidos os pH apropriados, maximizamos a presença de uma dada forma iônica e obtivemos a energia de ligação dos orbitais C1s, N1s e S2p para cada um dos dois aminoácidos. De um modo geral, conseguimos verificar que as curvas de titulação disponíveis na literatura representam corretamente o comportamento das espécies na superfície. De fato, os resultados experimentais que existiam, comprovando a validade das curvas de titulação, eram verdadeiros somente no *bulk* do material. Os resultados apresentados nesta tese, constituem a primeira observação experimental do comportamento das diversas espécies protonadas na superfície de uma solução aquosa, Vale notar que observamos que no pH 9,5 para a Cisteína aquosa houve uma grande discrepância na distribuição das formas iônicas observada na superfície e no *bulk*.

Efeitos observados nas bordas C1s, N1s e S2p na Cisteína e Metionina aquosas. Borda N 1s: Observamos que os picos referentes as estruturas NH_3^+ são mais

largos que as estruturas NH_2 tanto na Cisteína quanto na Metionina aquosas. Isso se deve, pelo menos em parte, à configuração de carga do estado final após a ionização. Duas configurações finais são possíveis ($\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_3^{2+}$) ou ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_2^+$), como a blindagem devido a polarização cresce com o quadrado da carga do estado final, assim, o comprimento da ligação de hidrogênio deveria ser pelo menos três vezes menor no $\text{NH}_3^{2+} \cdots \text{O}$ em relação ao $\text{NH}_2^+ \cdots \text{O}$. Ainda, como a energia é muito sensível a posição das águas vizinhas, o efeito da carga do estado final explicaria, ao menos parcialmente, a diferença nas larguras. Verificou-se o aumento da largura na forma zwitteriônica tanto para a Metionina quanto para a Cisteína. No entanto, esse comportamento não foi bem compreendido e cálculos computacionais podem ajudar nesta tarefa, dentro de uma perspectiva futura de prosseguimento do trabalho. Exceto pela forma zwitteriônica, percebemos uma diminuição da largura do pico $\text{N}1s$ diretamente proporcional ao aumento do valor do pH da água.

Borda S2p– Como o enxofre (**S**) da Metionina não sofre protonação durante a variação de pH, por ser uma estrutura incrustada dentro da cadeia carbônica C-S-C, não observamos nenhum desvio químico na borda $\text{S}2p$. Por outro lado, no caso da Cisteína, o grupo SH, presente no aminoácido, pode ser ou não protonado, o que produz um deslocamento químico de 2,5 eV entre a forma neutra e a forma aniônica.

Borda C1s – Nos espectros da borda $\text{C}1s$ (Met, Cis) identificamos claramente a posição do pico referente a carboxila COOH/COO^- em ambos os aminoácidos. Este pico é o de energia de ligação mais alta, resultado da presença dos dois oxigênios que são fortemente eletronegativos, o que acarreta uma diminuição na densidade da nuvem eletrônica. O segundo pico de energia mais alta é aquele ligado ao grupo nitrogenado $\text{CNH}_2/\text{CNH}_3^+$, que é o carbono que se liga ao segundo átomo com maior eletronegatividade. É possível identificar e resolver bem todos os três picos do nível $\text{C}1s$ na Cisteína aquosa, referentes aos seus três carbonos. Já no caso da Metionina, é difícil dizer se de fato existe algum deslocamento químico entre os níveis dos três carbonos do grupo do aminoácido. Isso ocorre, pois os três carbonos que compõem o grupo da metionina ($\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2$) formam uma estrutura bem superposta no espectro, excetuando os carbonos COOH/COO^- e $\text{CNH}_2/\text{CNH}_3^+$ que são bem resolvidos no espectro. Um cálculo computacional mais preciso poderia adicionar alguma informação relevante neste caso.

A superfície da Cisteína aquosa é mais ácida ou básica que o bulk? A Cisteína apresenta um padrão complexo de protonação mesmo se considerado apenas o corpo (*bulk*) da solução. No *bulk*, ela se apresenta em quatro formas iônicas diferentes, para um pH 9,5: uma espécie zwitteriônica ou neutra, com grupos (**SH, NH₃⁺, COO⁻**), uma espécie aniônica (carga 2⁻) com grupos (**S⁻, NH₂, COO⁻**) e outras duas espécies aniônicas com carga total (1⁻) e se diferem por um próton que se encontra ora no grupo tiol ora no grupo amina. A forma mais abundante, que corresponde a 57% da concentração total, tem grupos (**S⁻**

, NH_3^+ , COO^-), por sua vez, a forma com grupos ($\text{SH},\text{NH}_2,\text{COO}^-$), corresponde a 27% da concentração total. Juntas, estas duas estruturas possuem a quase totalidade das espécies presentes no *bulk* (~85%).

O experimento nos permitiu identificar uma distribuição claramente diferente das espécies na superfície do líquido, comparada aos valores esperados para o *bulk*, descritos no parágrafo anterior. Este resultado pode ser obtido a partir de gráficos de XPS para as bordas N1s e S2p da Cisteína, em duas energias de fótons diferentes, uma mais sensível ao *bulk* e outra mais sensível a superfície. A primeira tentativa de justificar essa assimetria foi considerar a superfície da água com um pH diferente do pH do *bulk* líquido. Entretanto, quando se considera apenas a análise de uma das duas bordas (S2p ou N1s) somos induzidos a concluir que a superfície pode ser ácida (usando o S2p) ou básica (usando o N1s). A conclusão, obtida pela análise de um dos espectros contradiz diretamente a do outro. Como a superfície só pode ser ou ácida ou básica, esta primeira hipótese, de um pH diferente, foi diretamente descartada. Concluímos assim, que a distribuição de espécies na superfície líquida não indica a basicidade ou acidez da superfície em relação ao *bulk*. *Nem tampouco podemos falar numa curva de titulação na superfície já que isso implicaria dizer que o pH é diferente daquele do bulk.*

Como justificar as assimetrias observadas nas bordas N1s e S2p entre a superfície e o bulk líquidos da Cisteína aquosa? Por meio de um modelo empírico simples, baseado em observações experimentais do grupo de B. Winter *et al.* [98, 99], apresentamos resultados compatíveis com o evento observado e definimos que o comportamento assimétrico é fruto da diferente propensão de distribuição das formas iônicas. Obtivemos a razão absoluta entre as espécies por meio do modelo e o resultado vai ao encontro da ideia que se um grupo possui carga, a configuração de menor energia para este sistema é que ele seja blindado devido a polarização do meio solvente. Essa estrutura, por sua vez, evita a superfície do líquido pois ali a energia de equilíbrio seria maior. Ou seja, espécies com grupos neutros são mais propensas a serem superficialmente ativas que aquelas carregadas. Enquanto no *bulk* há uma maior concentração da estrutura ($\text{S}^-,\text{NH}_3^+,\text{COO}^-$), na superfície, o que observamos, é um enriquecimento da forma carregada ($\text{SH},\text{NH}_2,\text{COO}^-$). É claro que o modelo não explica a orientação molecular, o que também poderia justificar a diferença nas razões observadas. Para isso, basta que os grupos carregados fiquem imersos e os grupos neutros tendam a se orientar em direção a superfície, o que geraria a assimetria observada no sinal dos fotoelétrons.

A estequiometria pode ser utilizada como variável identificadora da presença de um determinado elemento na espectroscopia de fotoelétrons independente da energia do fóton utilizada no experimento? A pergunta a ser respondida aqui é se a área de determinado pico, que representa a medida da seção de choque de determinado orbital,

pode ser associada diretamente à estequiometria, ou seja, a quantidade de um determinado elemento numa dada molécula. Para responder a pergunta, que foi motivada pelo estudo de compostos clorados apresentados por Söderström *et al.* [103], realizamos estudos da razão das intensidades dos sinais do S2p dos dois enxofres do íon $S_2O_3^{2-}$ solvatado em água, em função da energia dos fótons. O espectro obtido se assemelha a um espectro de EXAFS com oscilações que diminuem de amplitude, a medida em que se aumenta a energia dos fótons. Concluímos que as oscilações observadas ocorrem devido à interferência dos fotoelétrons ejetados que podem ou não colidir com os átomos vizinhos, o que produz uma modulação na seção de choque de fotoionização. Assim, a resposta à pergunta que inicia o parágrafo é negativa, mas sob algumas condições, pode ser assumida como verdadeira, como no caso do estudo da Metionina e Cisteína.

Mostramos que este resultado não invalida as conclusões obtidas no estudo dos aminoácidos Cisteína e Metionina. Nesses casos, o átomo espalhador é o hidrogênio, que espalha muito menos os fotoelétrons que o cloro. Por isso, os efeitos de espalhamento tornam-se desprezíveis. Moléculas que possuam átomos espalhadores com uma seção de choque de espalhamento significativa necessitam de uma devida atenção na escolha da energia de fótons que será usada para se obter o XPS. Como o comportamento é oscilatório, com uma escolha apropriada, é possível escolher uma energia de fótons que não tenha problemas com a variação da seção de choque, de modo que o resultado reflita a estequiometria da amostra.

Testamos também, pela primeira vez, mapear como as oscilações, recém descobertas, se comportam para duas direções da polarização linear do feixe de fótons incidente em relação ao feixe de fotoelétrons ejetados. Um comportamento similar foi observado mostrando que a distribuição anisotrópica de fotoelétrons não afeta as oscilações observadas de forma significativa, pelo menos para ionização a partir de orbitais do tipo *p*.

Efeito da concentração do soluto na solução aquosa de fosfato monossódico (NaH₂PO₄): Este composto é muito utilizado como agente tamponador, ou seja, controlador de pH. Analisamos o comportamento da borda P2p do dihidrogenofosfato $H_2PO_4^{2-}$, em função da concentração das soluções aquosas de NaH_2PO_4 . Observamos que a intensidade dos picos cresce linearmente na faixa de concentrações estudada. É de se esperar que exista algum grau de saturação na propensão do íon $H_2PO_4^{3-}$ na superfície líquida. Neste limite de saturação, os próprios íons vão começar a repelir-se uns aos outros, mudando esse comportamento de linear para assintótico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grady, M.M., 21 - *The physical constraints on extraterrestrial life*, in *Evolution on Planet Earth*, J.R. Lynn and M.L. Adrian, Editors. 2003, Academic Press: London. p. 397-414.
2. Popa, R., A.R. Smith, R. Popa, J. Boone, and M. Fisk, *Olivine-respiring bacteria isolated from the rock-ice interface in a lava-tube cave, a Mars analog environment*. *Astrobiology*, 2012. **12**(1): p. 9-18.
3. Brown, M.A., M. Faubel, and B. Winter, *X-Ray photo- and resonant Auger-electron spectroscopy studies of liquid water and aqueous solutions*. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*, 2009. **105**(0): p. 174-212.
4. Dougherty, R.C. and L.N. Howard, *Analysis of excess Gibbs energy of electrolyte solutions: a new model for aqueous solutions*. *Biophysical Chemistry*, 2003. **105**(2-3): p. 269-278.
5. Maréchal, Y., *Observing the water molecule in macromolecules using infrared spectrometry: structure of the hydrogen bond network and hydration mechanism*. *Journal of Molecular Structure*, 2004. **700**(1-3): p. 217-223.
6. Leberman, R. and A.K. Soper, *Effect of high salt concentrations on water structure*. *Nature*, 1995. **378**(6555): p. 364-366.
7. Postorino, P., R.H. Tromp, M.A. Ricci, A.K. Soper, and G.W. Neilson, *The interatomic structure of water at supercritical temperatures*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 668-670.
8. Soper, A.K., *The quest for the structure of water and aqueous solutions*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 1997. **9**(13): p. 2717.
9. Head-Gordon, T. and G. Hura, *Water Structure from Scattering Experiments and Simulation*. *Chemical Reviews*, 2002. **102**(8): p. 2651-2670.

10. Hura, G., D. Russo, R.M. Glaeser, T. Head-Gordon, M. Krack, and M. Parrinello, *Water structure as a function of temperature from X-ray scattering experiments and ab initio molecular dynamics*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2003. **5**(10): p. 1981-1991.
11. Krack, M., A. Gambirasio, and M. Parrinello, *Ab initio x-ray scattering of liquid water*. *The Journal of Chemical Physics*, 2002. **117**(20): p. 9409-9412.
12. Sorenson, J.M., G. Hura, R.M. Glaeser, and T. Head-Gordon, *What can x-ray scattering tell us about the radial distribution functions of water?* *The Journal of Chemical Physics*, 2000. **113**(20): p. 9149-9161.
13. Faubel, M., S. Schlemmer, and J.P. Toennies, *A molecular beam study of the evaporation of water from a liquid jet*. *Zeitschrift für Physik D Atoms, Molecules and Clusters*, 1988. **10**(2-3): p. 269-277.
14. Siegbahn, H. and K. Siegbahn, *ESCA applied to liquids*. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 1973. **2**(3): p. 319-325.
15. Siegbahn, H., L. Asplund, P. Kelfve, K. Hamrin, L. Karlsson, and K. Siegbahn, *ESCA applied to liquids. II. Valence and core electron spectra of formamide*. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 1974. **5**(1): p. 1059-1079.
16. Fellner-Feldegg, H., H. Siegbahn, L. Asplund, P. Kelfve, and K. Siegbahn, *ESCA applied to liquids IV. A wire system for ESCA measurements on liquids*. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 1975. **7**(5): p. 421-428.
17. Faubel, M., B. Steiner, and J.P. Toennies, *Photoelectron spectroscopy of liquid water, some alcohols, and pure nonane in free micro jets*. *Journal of Chemical Physics*, 1997. **106**(22): p. 9013-9031.
18. Lewis, T., M. Faubel, B. Winter, and J.C. Hemminger, *CO₂ Capture in Amine-Based Aqueous Solution: Role of the Gas-Solution Interface*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011. **50**(43): p. 10178-10181.
19. Prisle, N.L., N. Ottosson, G. Ohrwall, J. Soderstrom, M. Dal Maso, and O. Bjorneholm, *Surface/bulk partitioning and acid/base speciation of aqueous decanoate: direct*

observations and atmospheric implications. Atmospheric Chemistry and Physics, 2012. **12**(24): p. 12227-12242.

20. Nolting, D., E.F. Aziz, N. Ottosson, M. Faubel, I.V. Hertel, and B. Winter, *pH-Induced protonation of lysine in aqueous solution causes chemical shifts in X-ray photoelectron spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(45): p. 14068-14073.

21. Ottosson, N., K.J. Borge, D. Spangberg, H. Bergersen, L.J. Saethre, M. Faubel, W. Pokapanich, G. Ohrwall, E. Bjorneholm, and B. Winter, *On the Origins of Core-Electron Chemical Shifts of Small Biomolecules in Aqueous Solution: Insights from Photoemission and ab Initio Calculations of Glycine(aq)*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(9): p. 3120-3130.

22. Ottosson, N., E. Wernersson, J. Soderstrom, W. Pokapanich, S. Kaufmann, S. Svensson, I. Persson, G. Ohrwall, and O. Bjorneholm, *The protonation state of small carboxylic acids at the water surface from photoelectron spectroscopy*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(26): p. 12261-12267.

23. Ottosson, N., *Aqueous Solutions as seen through an Electron Spectrometer [Elektronisk resurs] : Surface Structure, Hydration Motifs and Ultrafast Charge Delocalization Dynamics*, 2011, Acta Universitatis Upsaliensis: Uppsala.

24. Bagus, P.S., *Self-Consistent-Field Wave Functions for Hole States of Some Ne-Like and Ar-Like Ions*. Physical Review, 1965. **139**(3A): p. A619-&.

25. Bagus, P.S., D. Coolbaugh, S.P. Kowalczyk, G. Pacchioni, and F. Parmigiani, *Molecular-Orbital Theory for the Analysis of Photoemission Spectra*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 1990. **51**: p. 69-74.

26. Triguero, L., L.G.M. Pettersson, and H. Agren, *Calculations of near-edge x-ray-absorption spectra of gas-phase and chemisorbed molecules by means of density-functional and transition-potential theory*. Physical Review B, 1998. **58**(12): p. 8097-8110.

27. Triguero, L., O. Plashkevych, L.G.M. Pettersson, and H. Agren, *Separate state vs. transition state Kohn-Sham calculations of X-ray photoelectron binding energies and chemical shifts*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 1999. **104**(1-3): p. 195-207.

28. Chong, D.P., *Density-Functional Calculation of Core-Electron Binding-Energies of C, N, O, and F*. Journal of Chemical Physics, 1995. **103**(5): p. 1842-1845.
29. Chong, D.P., *Accurate Calculation of Core-Electron Binding-Energies by the Density-Functional Method*. Chemical Physics Letters, 1995. **232**(5-6): p. 486-490.
30. Slater, J.C., *Statistical Exchange-Correlation in the Self-Consistent Field*, in *Advances in Quantum Chemistry*, L. Per-Olov, Editor. 1972, Academic Press. p. 1-92.
31. Agren, H., C.M. Llanos, and K.V. Mikkelsen, *A Self-Consistent Reaction Field Approach to Liquid Photoionization*. Chemical Physics, 1987. **115**(1): p. 43-55.
32. Agren, H. and V. Carravetta, *Origin of Phase-Transition Shifts of Ionization Energies in Water*. Molecular Physics, 1985. **55**(4): p. 901-922.
33. Arbman, M., H. Siegbahn, L. Pettersson, and P. Siegbahn, *Core Electron-Binding Energies and Auger-Electron Energies of Solvated Clusters - a Computational Study*. Molecular Physics, 1985. **54**(5): p. 1149-1160.
34. Agren, H. and H. Siegbahn, *A Statistical-Model for Solvation Shifts of Core Electron-Binding Energies of Atomic Ions*. Journal of Chemical Physics, 1984. **81**(1): p. 488-494.
35. Agren, H. and H. Siegbahn, *Statistical-Analysis of Photoelectron and Auger Energy Shifts in Ionic-Solutions*. Chemical Physics, 1985. **95**(1): p. 37-42.
36. Canuto, S., *Solvation Effects on Molecules and Biomolecules: Computational Methods and Applications*. 2010: Springer.
37. Warshel, A. and M. Levitt, *Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme*. Journal of Molecular Biology, 1976. **103**(2): p. 227-249.
38. Csaszar, A.G., G. Czako, T. Furtenbacher, J. Tennyson, V. Szalay, S.V. Shirin, N.F. Zobov, and O.L. Polyansky, *On equilibrium structures of the water molecule*. J Chem Phys, 2005. **122**(21): p. 214305.

39. Franks, F., *Water, a Comprehensive Treatise: The physics and physical chemistry of water*. 1972: Plenum Press.
40. Silvestrelli, P.L. and M. Parrinello, *Structural, electronic, and bonding properties of liquid water from first principles*. *Journal of Chemical Physics*, 1999. **111**(8): p. 3572-3580.
41. Soper, A.K. and C.J. Benmore, *Quantum Differences between Heavy and Light Water*. *Physical Review Letters*, 2008. **101**(6): p. 065502.
42. Zeidler, A., P.S. Salmon, H.E. Fischer, J.C. Neufeind, J.M. Simonson, and T.E. Markland, *Isotope effects in water as investigated by neutron diffraction and path integral molecular dynamics*. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2012. **24**(28): p. 284126
43. Chaplin, M. *Water Structure and Science*. 2012 28 July, 2013 [cited 2013 13/08/2013]; Available from: <http://www.lsbu.ac.uk/water/index2.html>.
44. Stöhr, J., *NEXAFS Spectroscopy*. 1992: Springer.
45. Needham, P., *Hydrogen bonding: Homing in on a tricky chemical concept*. *Studies in History and Philosophy of Science*, 2013. **44**(1): p. 51-65.
46. Marechal, Y., *The Hydrogen Bond and the Water Molecule: The Physics and Chemistry of Water, Aqueous and Bio-Media*. 2006: Elsevier Science.
47. Stillinger, F.H., *Water Revisited*. *Science*, 1980. **209**(4455): p. 451-457.
48. Ando, K. and J.T. Hynes, *Molecular Mechanism of HCl Acid Ionization in Water: Ab Initio Potential Energy Surfaces and Monte Carlo Simulations*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997. **101**(49): p. 10464-10478.
49. Cohen, B. and D. Huppert, *Connection between Proton Abnormal Conductivity in Water and Dielectric Relaxation Time*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2003. **107**(19): p. 3598-3605.
50. Cabane, B. and R. Vuilleumier, *The physics of liquid water*. *Comptes Rendus Geoscience*, 2005. **337**(1-2): p. 159-171.

51. Guillot, B., *A reappraisal of what we have learnt during three decades of computer simulations on water*. Journal of Molecular Liquids, 2002. **101**(1-3): p. 219-260.
52. Guillot, B. and Y. Guissani, *How to build a better pair potential for water*. Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(15): p. 6720-6733.
53. Guissani, Y. and B. Guillot, *A Computer-Simulation Study of the Liquid-Vapor Coexistence Curve of Water*. Journal of Chemical Physics, 1993. **98**(10): p. 8221-8235.
54. Jorgensen, W.L., J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, and M.L. Klein, *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water*. Journal of Chemical Physics, 1983. **79**(2): p. 926-935.
55. Rick, S.W., *Simulations of ice and liquid water over a range of temperatures using the fluctuating charge model*. Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(5): p. 2276-2283.
56. Silvestrelli, P.L. and M. Parrinello, *Water molecule dipole in the gas and in the liquid phase (vol 82, pg 3308, 1999)*. Physical Review Letters, 1999. **82**(26): p. 5415-5415.
57. Silva, Á.M.d., A. Mocellin, H. Farrokhpour, M.S.P. Mundim, and A.N.d. Brito, *Photo induced dissociation of amino acids free from thermal degradation effects: A case study applied to DL-Valine*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 2013. **189**, **Supplement**(0): p. 56-60.
58. Dixon, H.B.F. and K.F. Tipton, *Negatively Cooperative Ligand Binding*. Biochemical Journal, 1973. **133**(4): p. 837-842.
59. Mocellin, A., *Espectroscopia de Multicoindência Aplicada ao Estudo de Moléculas*, in *Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física Gleb Wataghin 2002*, Universidade Estadual de Campinas: Campinas.
60. Cederbaum, L.S., J. Zobeley, and F. Tarantelli, *Giant Intermolecular Decay and Fragmentation of Clusters*. Physical Review Letters, 1997. **79**(24): p. 4778-4781.
61. Marburger, S., O. Kugeler, U. Hergenbahn, and T. Möller, *Experimental Evidence for Interatomic Coulombic Decay in Ne Clusters*. Physical Review Letters, 2003. **90**(20): p. 203401.

62. Couto, P.C.d., R.C. Guedes, and B.J.C. Cabral, *The density of states and band gap of liquid water by sequential Monte Carlo/Quantum mechanics calculations*. Brazilian Journal of Physics, 2004. **34**: p. 42-47.
63. Ottosson, N., M. Faubel, S.E. Bradforth, P. Jungwirth, and B. Winter, *Photoelectron spectroscopy of liquid water and aqueous solution: Electron effective attenuation lengths and emission-angle anisotropy*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 2010. **177**(2-3): p. 60-70.
64. Seah, M.P. and W.A. Dench, *Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standard data base for electron inelastic mean free paths in solids*. Surface and Interface Analysis, 1979. **1**(1): p. 2-11.
65. Seidel, R., S. Thürmer, and B. Winter, *Photoelectron Spectroscopy Meets Aqueous Solution: Studies from a Vacuum Liquid Microjet*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2011. **2**(6): p. 633-641.
66. Ottosson, N., J. Heyda, E. Wernersson, W. Pokapanich, S. Svensson, B. Winter, G. Ohrwall, P. Jungwirth, and O. Bjorneholm, *The influence of concentration on the molecular surface structure of simple and mixed aqueous electrolytes*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(36): p. 10693-10700.
67. Ottosson, N., R. Vacha, E.F. Aziz, W. Pokapanich, W. Eberhardt, S. Svensson, G. Ohrwall, P. Jungwirth, O. Bjorneholm, and B. Winter, *Large variations in the propensity of aqueous oxychlorine anions for the solution/vapor interface*. Journal of Chemical Physics, 2009. **131**(12): p. 124706.
68. Siegbahn, H., *Electron-Spectroscopy for Chemical-Analysis of Liquids and Solutions*. Journal of Physical Chemistry, 1985. **89**(6): p. 897-909.
69. Manfred, F. *Dynamics of Complex Fluids*. 2013 12/02/2013 11:05 [cited 2013 05/09/2013]; Available from: <http://www.dcf.ds.mpg.de/index.php?id=132&L=3>.
70. Faubel, M. *Spectroscopy of aqueous surfaces*. 2014 02/04/2014 [cited 2014 19/05/2014]; Available from: <http://www.dcf.ds.mpg.de/index.php?id=132&L=3>.

71. *Brazilian Synchrotron Light Laboratory*. 2013 [cited 2013 09/07/2013]; Available from: <http://lnls.cnpem.br/accelerators/accelerator-parameters/>.
72. Cezar, J.C., P.T. Fonseca, G.L.M.P. Rodrigues, A.R.B.d. Castro, R.T. Neuenschwander, F. Rodrigues, B.C. Meyer, L.F.S. Ribeiro, A.F.A.G. Moreira, J.R. Piton, M.A. Raulik, M.P. Donadio, R.M. Seraphim, M.A. Barbosa, A.d. Siervo, R. Landers, and A.N.d. Brito, *The U11 PGM beam line at the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory*. *Journal of Physics: Conference Series*, 2013. **425**(7): p. 072015.
73. Attwood, D., *Soft X-Rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications*. 2007: Cambridge University Press.
74. Tolentino, H., J.C. Cezar, D.Z. Cruz, V. Compagnon-Cailhol, E. Tamura, and M.C.M. Alves, *Commissioning and first results of the LNLS XAFS beamline*. *Journal of Synchrotron Radiation*, 1998. **5**: p. 521-523.
75. Delahay, P., *Electron Spectroscopy: Theory, Techniques and Applications*. Vol. 5. 1984: Academic Press.
76. Wannberg, B., *Electron optics development for photo-electron spectrometers*. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, 2009. **601**(1-2): p. 182-194.
77. Kukk, E. *SPANCF - Spectral Analysis by Curve Fitting [Curve Fitting Macro Package for Igor Pro]*. 2004; Available from: edwin.kukk@utu.fi.
78. Kukk, E., *SPANCF - Spectrum Analysis by Curve Fitting*. 2004.
79. *Igor Pro Wavemetrics*. 2013; Available from: <http://www.wavemetrics.com>.
80. Winter, B. and M. Faubel, *Photoemission from liquid aqueous solutions*. *Chem Rev*, 2006. **106**(4): p. 1176-211.
81. Pegram, L.M. and M.T. Record, *Hofmeister salt effects on surface tension arise from partitioning of anions and cations between bulk water and the air-water interface*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(19): p. 5411-5417.

82. *Origin of Life: Essential Step in Chemistry Unraveled*. 2013 [cited 2014 20/01/2014]; Available from: <http://cires.colorado.edu/news/press/2013/chemistry.html>.
83. Bjorneholm, O., *Private Communications*, 2013.
84. *The Titration Behavior of Amino Acids*. 2013; Available from: <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/titr.html>.
85. Plekan, O., V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. de Simone, K.C. Prince, and V. Carravetta, *Photoemission and the shape of amino acids*. *Chemical Physics Letters*, 2007. **442**(4-6): p. 429-433.
86. Plekan, O., V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. de Simone, K.C. Prince, and V. Carravetta, *Photoemission from amino acids in the gas phase*. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2007. **156**: p. Lxviii-Lxviii.
87. Giertz, A., K.J. Borve, M. Bassler, K. Wiesner, S. Svensson, L. Karlsson, and L.J. Saethre, *Vibrationally resolved photoelectron spectra of the carbon 1s and nitrogen 1s shells in hydrogen cyanide*. *Chemical Physics*, 2002. **277**(1): p. 83-90.
88. Svensson, S., A. Ausmees, S.J. Osborne, G. Bray, F. Gelmukhanov, H. Agren, A.N. Debrito, O.P. Sairanen, A. Kivimaki, E. Nommiste, H. Aksela, and S. Aksela, *Observation of an Anomalous Decay Ratio between the Molecular-Field Split Levels in the S-2p Core Photoelectron and Lvv Auger Spectrum of H2s*. *Physical Review Letters*, 1994. **72**(19): p. 3021-3024.
89. Albert, A., *Quantitative Studies of the Avidity of Naturally Occurring Substances for Trace Metals .2. Amino-Acids Having 3 Ionizing Groups*. *Biochemical Journal*, 1952. **50**(5): p. 690-698.
90. Li, N.C. and R.A. Manning, *Some Metal Complexes of Sulfur-Containing Amino Acids*. *Journal of the American Chemical Society*, 1955. **77**(20): p. 5225-5228.
91. Stricks, W. and I.M. Kolthoff, *Reactions between Mercuric Mercury and Cysteine and Glutathione - Apparent Dissociation Constants, Heats and Entropies of Formation of Various Forms of Mercuric Mercapto-Cysteine and Mercapto-Glutathione*. *Journal of the American Chemical Society*, 1953. **75**(22): p. 5673-5681.

92. Benesch, R.E. and R. Benesch, *The Acid Strength of the -SH Group in Cysteine and Related Compounds*. Journal of the American Chemical Society, 1955. **77**(22): p. 5877-5881.
93. Dixon, H.B. and K.F. Tipton, *Negatively co-operative ligand binding*. Biochem. J., 1973. **133**(4): p. 837-842.
94. Beattie, J.K., A.M. Djerdjev, and G.G. Warr, *The surface of neat water is basic*. Faraday Discussions, 2009. **141**(0): p. 31-39.
95. Saykally, R.J., *Air/water interface: Two sides of the acid-base story*. Nat Chem, 2013. **5**(2): p. 82-84.
96. Winter, B., M. Faubel, R. Vácha, and P. Jungwirth, *Reply to comments on Frontiers Article 'Behavior of hydroxide at the water/vapor interface'*. Chemical Physics Letters, 2009. **481**(1-3): p. 19-21.
97. Yamaguchi, S., A. Kundu, P. Sen, and T. Tahara, *Communication: Quantitative estimate of the water surface pH using heterodyne-detected electronic sum frequency generation*. The Journal of Chemical Physics, 2012. **137**(15): p. 151101 <http://dx.doi.org/10.1063/1.4758805>.
98. Winter, B., *Private Communications*.
99. Winter, B., E.F. Aziz, U. Hergenahn, M. Faubel, and I.V. Hertel, *Hydrogen bonds in liquid water studied by photoelectron spectroscopy*. The Journal of Chemical Physics, 2007. **126**(12): p. 124504 <http://dx.doi.org/10.1063/1.2710792>.
100. Petersen, P.B., R.J. Saykally, M. Mucha, and P. Jungwirth, *Enhanced Concentration of Polarizable Anions at the Liquid Water Surface: SHG Spectroscopy and MD Simulations of Sodium Thiocyanide*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(21): p. 10915-10921.
101. Lewis, T., B. Winter, A.C. Stern, M.D. Baer, C.J. Mundy, D.J. Tobias, and J.C. Hemminger, *Does Nitric Acid Dissociate at the Aqueous Solution Surface?* Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(43): p. 21183-21190.

102. Onsager, L. and N.N.T. Samaras, *The Surface Tension of Debye - Hückel Electrolytes*. The Journal of Chemical Physics, 1934. **2**(8): p. 528-536.
103. Soderstrom, J., N. Martensson, O. Travnikova, M. Patanen, C. Miron, L.J. Saethre, K.J. Borge, J.J. Rehr, J.J. Kas, F.D. Vila, T.D. Thomas, and S. Svensson, *Nonstoichiometric intensities in core photoelectron spectroscopy*. Phys Rev Lett, 2012. **108**(19): p. 193005.
104. de Leon, J.M., J.J. Rehr, C.R. Natoli, C.S. Fadley, and J. Osterwalder, *Spherical-wave corrections in photoelectron diffraction*. Physical Review B, 1989. **39**(9): p. 5632-5639.
105. Lee, P.A., *Possibility of adsorbate position determination using final-state interference effects*. Physical Review B, 1976. **13**(12): p. 5261-5270.
106. Kushawaha, R.K., M. Patanen, R. Guillemin, L. Journal, C. Miron, M. Simon, M.N. Piancastelli, C. Skates, and P. Declava, *From double-slit interference to structural information in simple hydrocarbons*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(38): p. 15201-15206.
107. Schrödter, K., G. Bettermann, T. Staffel, F. Wahl, T. Klein, and T. Hofmann, *Phosphoric Acid and Phosphates*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
108. Skoog, D.A., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 2004: Thomson-Brooks/Cole.
109. Naumkin, A.V., A. Kraut-Vass, S.W. Gaarenstroom, and C.J. Powell, *NIST Standard Reference Database 20, Version 4.1* 2012.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena

journal homepage: www.elsevier.com/locate/elspec

Photo induced dissociation of amino acids free from thermal degradation effects: A case study applied to DL-Valine



Á. Miranda da Silva^a, A. Mocellin^a, H. Farrokhpour^b, M.S.P. Mundim^a, A. Naves de Brito^{c,*}

^a Instituto, Universidade de Brasília, Box 04455, 70919-970 Brasília-DF, Brazil

^b Chemistry Department, Isfahan University of Technology, 84156-83111 Isfahan, Iran

^c Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, 13083-859 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 15 March 2013

Keywords:

Valine
Thermal degradation
Photofragmentation
Photodissociation

ABSTRACT

We present a careful study of the thermal degradation effects in the mass spectrum of DL-Valine using a quadrupole mass spectrometer and a time of flight – mass spectrometer. This allows setting the temperature of 95 ± 10 °C as threshold for the sublimation of our solid sample. Based on the assignments for each ionic fragment detected, it is possible to separate the mass peaks in groups, explaining what are the principal bond breaks involved in the specific ionic yield, whose procedure can be extended to other amino acids.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amino acids are the building blocks of proteins. Their spectroscopic study is of importance to understand the properties of biological systems such as living cells. The demand for gas phase information of amino acids arises from the anticipation that many biological phenomena can be traced to the fundamental properties of molecular constituents. Despite the fact that the amino acids are not neutral in its crystalline and solution form, which may be in the anionic, cationic or zwitterionic form in the case of solutions (pH-dependent) and in the zwitterionic form when they are in its crystalline form, intrinsic properties of biomolecules, difficult to rationalize in the complex medium of biological systems, can be understood in isolated environments as in gas phase [1]. As an example, we have the photo dissociation of amino acids when irradiated by vacuum ultraviolet (VUV) photons or electron impact, which was widely studied by mass spectrometry [2–10]. The study of such molecular systems in the absence of solvents provides an understanding of their geometrical and electronic structure allowing the distinction between intrinsic properties and those due to the interaction with the environment.

All amino acids, in standard conditions (25 °C and 100 kPa), exist in solid state. The low volatility of amino acids provides a significant experimental challenge to transport these fragile biomolecules into gas phase. Some of the proposed methods to solve this limitation,

however, produce biomolecules as multicharged ions, which are incompatible with spectroscopy studies of neutral species [9]. A technique, based on aerosol thermal desorption, provides neutral species of very fragile biomolecules [10]. A more conventional approach may be possible for less critically fragile biomolecules. In order to produce a molecular beam with a desirable density, an oven-like device is used to heat the solid sample. Consequently, great care is required to be taken in order to guarantee no spurious effect due to thermal decomposition and degradation [8].

An improvement in the ability to monitor thermal degradation in amino acids is obtained by recording mass spectrum as a function of the temperature. In this way, the temperature threshold where degradation starts to take place can be obtained. The mass spectrum is a fingerprint of a given molecule for certain excitation energy. This permits to monitor all the heating process and detect when changes start to appear in the mass spectrum. In this way, a safe upper limit to the heating temperature can be obtained.

Although the strongest evidence of thermal degradation is the presence of additional spurious peaks in the mass spectrum, a much more sensitive procedure is to observe the changes in the relative intensity of each peak as a function of the temperature. For so, a quadrupole mass spectrometer is suitable to this evaluation.

Valine ($\text{NH}_2(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)\text{COOH}$) is an amino acid found in most proteins and is essential in human diet. The molecular structure of DL-Valine is shown in Fig. 1. Valine together with alanine, isoleucine and isoValine, although not interacting well with water, interact with each other and form a structure where the DNA molecule is assembled [11]. There are some publications in which the gaseous phase of Valine is analyzed by different spectroscopic methods

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 5376.

E-mail addresses: arnaldo.naves@gmail.com, arnaldo@ifi.unicamp.br (A.N.d. Brito).

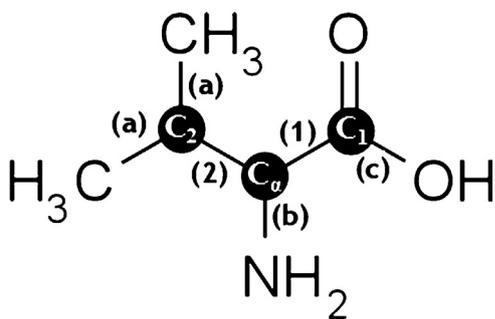


Fig. 1. Schematic representation of DL-Valine. The chemical bonds and the structural carbons are labeled by numbers and letters to help the reader: (1) $C_\alpha-C_1$ bond, (2) $C_\alpha-C_2$ bond, (a) C_2-CH_3 bond, (b) $C_\alpha-NH_2$ bond, (c) C_1-OH bond. The $C_1=O$ bond (double bond) was not labeled. The fragmentation pathways groups, disposed in the text, are labeled based on which chemical bonds are broken.

[2–5,7]. In these studies, several temperatures are employed to volatilize the amino acid. In order to study the thermal degradation of amino acids, we use the DL-Valine and compare with previous results.

2. Experiment

The study of thermal degradation using a Pfeiffer Vacuum Quadrupole Mass Spectrometer (QMS), model IO 220 D-35614 Asslar, was performed keeping a constant pressure of approximately 1×10^{-6} mbar in the main chamber. The QMS used 70 eV electron impact for the sample ionization. The DL-Valine samples, used without any further purification, are made of crystalline powder purchased from Aldrich® with a stated purity higher than ninety seven per cent. The sample was evaporated by heating the pure Valine in a resistively heated oven that is directly connected to the main chamber by a needle. The needle itself is heated to prevent condensation of the molecules in the walls. The temperature is measured by a thermocouple inserted in the external wall of the oven. The oven is inside a stainless steel cylinder. Therefore, the temperature is kept uniform as uniform as possible over the whole oven. The DL-Valine samples were slowly heated, approximately $10^\circ\text{C}/\text{h}$, to ensure the thermal equilibrium between the sample and the oven. More details in Ref. [4].

The coincidence mass spectrum has been recorded at the Toroidal Grating Monochromator beamline (D05-TGM) in the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), at Campinas, using a Time of Flight Mass Spectrometer (TOF-MS), which allows Photoelectron-Photoion Coincidence (PEPICO) spectra to be recorded [12]. The apparatus is mounted in a chamber that can rotate with respect to the polarization vector of the light beam, and was kept at the angle of 54.7° . The spectrometer (TOF-MS) has been described in details in Ref. [12–15]. The TGM beamline was operated using a Neon gas filter [15]. The filter parameters used in the present experiment guarantee five orders of magnitude high harmonics energy suppression, thus these effects are totally negligible in our case.

3. Thermal degradation analysis

A careful analysis of the thermal degradation effects upon heating DL-Valine was obtained by monitoring changes in the relative intensities of peaks as well as possible growth of spurious peaks in the mass spectrum of two different mass analyzers. Each study is described in detail below.

3.1. Relative intensities using the quadrupole mass spectrometer

The quadrupole mass spectrum (QMS) of DL-Valine was taken as a function of the oven temperature. Table 1 shows the evolution of relative intensities (RI) for all DL-Valine fragments detected. As expected, the amount of evaporated molecules increases with temperature. If no degradation is present, the ratio of any peak in the mass spectrum with respect to another shall be constant. A different situation occurs when thermal degradation starts to take place. In this case, the neutral molecule will break into neutral fragments and ionization of those produces a mass spectrum corresponding to the ions from neutral fragment instead of the entire molecule. A common result of thermal degradation is the appearance of smaller ion fragments in the mass spectrum. These new ionic fragments might already be present in the QMS compounding the intensity of ions from the molecule or also new ionic species may appear. The increase of ions with relatively larger mass is unlikely. Normalizing the peaks in the QMS with respect to a larger mass ion peak facilitates the task of spotting the presence of new peaks and the increase of the relative intensity of smaller mass peaks. The RI of a given peak is defined as the ratio between the area of this peak and the area of the peak $m/q = 72$ ($NH_2(CH_3)_2(CH)_2^+$). Peak $m/q = 72$ is the most intense peak in the mass spectrum, corresponding to the loss of the COOH neutral radical from DL-Valine (breaking of $C_\alpha-C_1$ bond, Fig. 1).

As can be seen in Table 1, the ions of m/q smaller than 45 have their RI increased to temperatures greater than 95°C . And around $T = 120^\circ\text{C}$ the RI of singly ionized water $m/q = 18-H_2O^+$ changes drastically, jumping from 20% to 80% in the range of ($120-144^\circ\text{C}$). The presence of water contamination in our sample could be claimed as originating the behavior. However, our sample prior to its utilization was warmed during 24 h at 50°C in the oven in vacuum. We therefore put forward the interpretation that H_2O^+ is a reaction product of photoionization of DL-Valine, and the rapid growth observed suggests that thermal degradation is occurring above 120°C . We observe other signs of thermal degradation, which would not depend on water free sample condition: a strong thermal degradation sign is observed at temperature above 120°C . Above this temperature two new spurious peaks, in the mass spectrum, appears with $m/q = 50$ and $m/q = 81$.

In Table 1 we can observe that fragments $m/q = 41, 42, 43$ and 44 , all hydrocarbons assigned as $C_3H_x^+$, $x = 5.8$ respectively, present significant relative growth given by 15–19%, 6–11%, 10–14%, and 6–9% respectively, when the temperature is raised from 95 to 110°C . Furthermore no change is observed when the temperature is raised from 83 to 95°C . Moreover, fragments 27 and 28 increased from 20% to 23% and 64% to 73% when the temperature is raised from 95 to 110°C . Perhaps less sensitive to thermal degradation below 120°C are fragments 29 and 30. They increased from 24% to 29% and 36% to 42% respectively when the temperature raised from 110 to 120°C . These results show that thermal degradation takes place for Valine molecule for temperatures above $95 \pm 10^\circ\text{C}$. In conclusion, fragments $m/q = 41-44$ and $m/q = 27-28$ seem to be good candidates as indicators of thermal degradation effects. Indeed, they seem to be more sensitive to thermal degradation effects while the difficult requirement of a water free sample does not need to be fulfilled. From the analysis of the Table 1 the oven temperature was set at 95°C where thermal degradation does not occur. In this temperature the chamber pressure was around 10^{-6} mbar, which is the same working pressure reported by other researches [2–5]. We notice, however, that other studies reported a substantially higher oven/sample operating temperature: undetermined [2], 200°C [3], $115-165^\circ\text{C}$ [4], $150-200^\circ\text{C}$ (chamber temperature) [5]. Therefore, the present study raises questions like the possibility of significant contributions of degraded sample in the experimental results of aminoacids, and to what extent this affects the spectrum

Table 1
Relative intensities (RI) of cations formed upon electron impact ionization of Valine in the gas phase in function of the temperature.

m/q	Ion	RI photon impact present results $T=95^\circ\text{C}$	RI electron impact, Junk and Svec [2]**	RI photon impact Jochims et al. [5]*	RI electron impact, Denifl et al. [7] $T=120^\circ\text{C}$
118	ValH ⁺	–	–	–	0.5
117	Val ⁺	–	0.1	1	0.1
75	NH ₂ CH ₂ COOH ⁺	18	16	12	11
74	NH ₂ CHCOOH ⁺	37	34	45	30
73	C ₂ H ₃ NO ₂ ⁺	6	5	–	^b
72	NH ₂ (CH ₃) ₂ (CH) ₂ ⁺	100	100	100	100
70	C ₄ H ₈ N ⁺	3	1	–	^b
58	C ₃ H ₈ N ⁺	16	4	–	^b
57	C ₃ H ₇ N ⁺	35	29	60	23
56	(CH ₃) ₂ (CH) ₂ ⁺	22	11	Present but unresolved	15
55	C ₄ H ₇ ⁺	26	30	64	38
53	C ₃ H ₃ N ⁺	1	–	–	^b
46	NH ₂ CHOH ⁺	11	5	13	10
45	HOCO ⁺	1	3	6	3
44	C ₃ H ₈ ⁺	6	2	–	^b
43	(CH ₃) ₂ CH ⁺	8	7	13	8
42	C ₃ H ₆ ⁺	2	4	Unresolved	4
41	C ₃ H ₅ ⁺	6	8	9	10
39	C ₃ H ₃ ⁺	1	8	3	9
30	NH ₂ CH ₂ ⁺	16	12	19	15
29	NH ₂ CH ⁺	24	21	36	21
28	HCONH ⁺	29	31	36	33
27	C ₂ H ₃ ⁺ , HCN ⁺	4	9	6	10
19	H ₃ O ⁺	1	1	–	^b
18	H ₂ O ⁺ , NH ₄ ⁺	6	4	^a	3
17	OH ⁺	–	–	–	–

^a High water impurity

^b Only the most intense cations are displayed at the table.

* The specific pick up cell temperature is not displayed for valine, but the chamber was heated to temperatures, typically 150–200 °C.

** The specific valine sublimation temperature is not mentioned.

obtained at high temperatures. In the next section we will compare our results using the TOF spectrometer with other studies already published with different temperatures.

3.2. Relative intensities using TOF spectrometer

We hypothesized that the quadrupole mass spectrometer (QMS) may not be the most accurate device to determine the thermal degradation temperature (TDT). The QMs takes into account

gas contribution from the whole chamber, as an average. In this way, fragments produced at different temperatures may contribute, leading to an incorrect measure of an upper safe operational temperature limit. In fact, if molecules produced at lower temperature do contribute strongly to the average seen by the QMs, artificially higher thermal degradation temperature will be obtained. Hence, to investigate this hypothesis, we proceed with the same study based upon relative intensities using TOF spectroscopy.

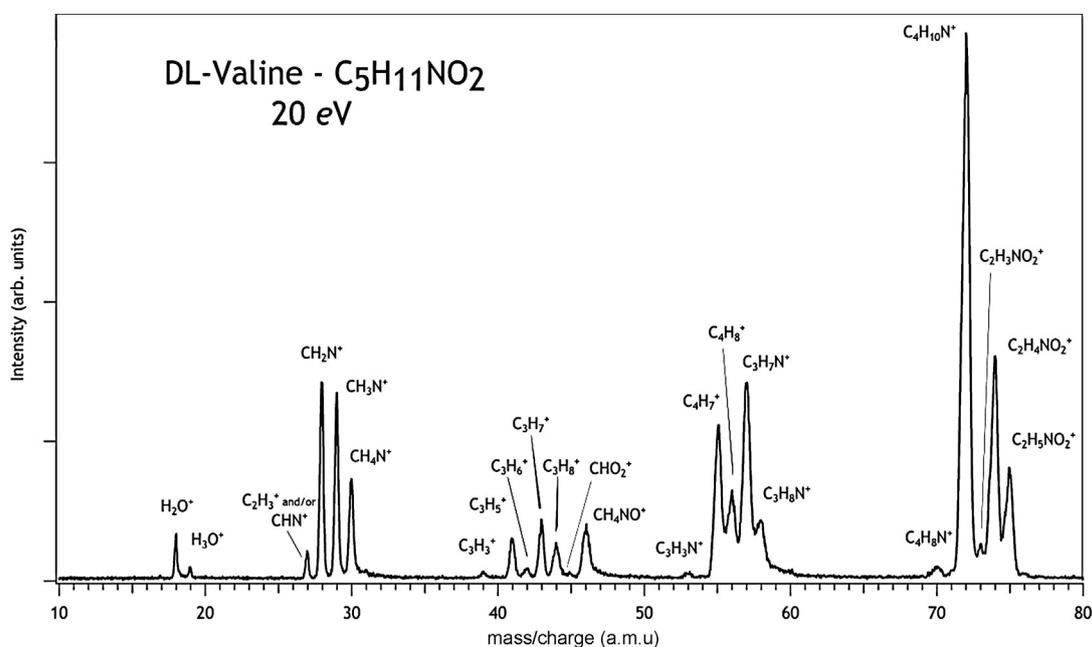


Fig. 2. DL-Valine coincidence mass spectrum: molecule irradiated by photons of 20 eV at 95 °C. The assignment of peaks are indicated.

This method is far more sensitive because the detected ions in a TOF spectrum come from ionized molecules just after they leave the oven needle tip. This is ensured because the ions are created, in practice, only at the crossing of the molecular beam and the photon beam which is placed few millimeters below the needle tip. Simulations, including molecular beam density variation, and focusing conditions of the TOF lens elements, contained in Ref. [12], guaranteed the averaging problems affecting QMs are not present at TOF data.

Surprisingly, TOF and quadrupole data lead us to obtain the same TDT. Probably this came from the fact that we waited at least 1 h after temperature stabilization in the oven to test sample integrity with the QMS. From the above findings we conclude that the substantially simpler methods based on QMs analysis may be sufficient for TDT, however, this comes at price of a longer waiting time for stabilization.

In Fig. 2, we present a coincidence mass spectrum of DL-Valine at 95 °C, obtained by photon ionization at 20 eV. The assignments of peaks are indicated in the figure. Fragmentation patterns of the Valine are widely discussed by Lago et al. [4] and Jochims et al. [5]. Although we do not explicitly describe each of the fragmentation pathways, we can separate the peaks in groups explaining which are the bond breaks, based on pathways previously published [2,5] and in our present result. Fig. 1 is labeled to help in this analysis. The photodissociation of DL-Valine takes the following pathways: a single backbone break in **groups (1) and (2)**; a double backbone breaks in **groups (1) + (2), (1) + (a), (1) + (b) and 1 + (c)**. Belonging to **group (1)** we group peaks $m/q = 45, 70$ and 72 which are formed by the rupture in the $C_{\alpha}-C_1$ bond, see Fig. 1. Fragment $m/q = 46$ (NH_2CHOH^+) could also be assigned to fragment $HCOOH^+$ but his fragmentation path is not supported by experiments with α -Valine- d_3 [5], and in that case it is not placed at the **group (1)**. The fragments that we classified belonging to **group (2)** are $m/q = 39, 41, 42, 43, 44, 73, 74$ and 75 formed by the rupture in the chemical bonding between the α -carbon (C_{α}) and the $CH(CH_3)_2$ radical, which characterizes Valine. The **group (1) + (2)** represents fragments which result from two bond cleavages in the molecular main backbone. They are $m/q = 28, 29$ and 30 . Note that radiation causing two bond cleavages in biological systems leads to damage much harder to be repaired than single back-bond break and can be easier to spot using our proposed classification. The last three groups – **(1) + (a), (1) + (b) and (1) + (c)**–are made of rupture in **(1)** and a methyl **(a)**, amine **(b)** or hydroxyl radical **(c)** loss. In the specific case of hydroxyl radical loss **(1) + (c)** group, it is perfectly possible that the double bond $C=O$ is broken, so this group describes any rupture between $C-O$ bonds forming H_xO^+ ions ($x = 1, 2$). Classification of fragments 46 and 27 are given further down in the text. Listing the groups composed by double fragmentations: **group (1) + (a)** – $m/q = 53, 57$ and 58 –, **group (1) + (b)** – $m/q = 55$ and 56 –and finally **group (1) + (c)** – $m/q = 18$ and 19 .

The Jochims et al. spectrum [5] shows the peaks $m/q = 57$ overlapped with the peak $m/q = 58$, whose behavior could be interpreted as a metastability of the peak $m/q = 57$, but we observe a clear separation of the peaks $m/q = 57$ and 58 as confirmed by the high resolution mass spectra of Denifl et al. [7]. These fragments $m/q = 57$ and $m/q = 58$ are probably $C_3H_7N^+$ and $C_3H_8N^+$, respectively. Furthermore, fragment $m/q = 27$ is assigned to $C_2H_3^+$, fragments $m/q = 45$ is assigned to $COOH^+$ and the fragment $m/q = 46$ is assigned to NH_2CHOH^+ , all of them is confirmed in the α -valine- d_3 mass spectrum [5].

We did not observe the parent peak $m/q = 117$ ($NH_2(CH_3)_2(CH_2)_2COOH^+$) corresponding to the singly ionized Valine molecule, suggesting instability of these species in the time scale of the experiments and an efficient molecular bond rupture upon ionization [4]. This result is consistent with previous studies [4–7] that find no peak or very small, less than 1% RI for

Table 2

Relative intensities of cations formed upon electron impact ionization of Valine in the gas phase. The present values are compared with a previous electron impact study [2,5] and photoionization studies [7].

m/q	Ion	Relative intensities					
		83 °C	95 °C	110 °C	120 °C	134 °C	144 °C
118	ValH ⁺	*	*	*	*	*	*
81		0%	0%	0%	0%	1%	10%
75	NH ₂ CH ₂ COOH ⁺	13%	13%	14%	13%	12%	12%
74	NH ₂ CHCOOH ⁺	32%	32%	32%	31%	30%	30%
73	C ₂ H ₃ NO ₂ ⁺	6%	6%	6%	6%	7%	6%
72	NH ₂ (CH ₃) ₂ (CH) ₂ ⁺	100%	100%	100%	100%	100%	100%
70	C ₄ H ₈ N ⁺	2%	2%	4%	4%	4%	5%
58	C ₃ H ₈ N ⁺	7%	6%	6%	7%	7%	7%
57	C ₃ H ₇ N ⁺	38%	38%	38%	39%	41%	41%
56	(CH ₃) ₂ (CH) ₂ ⁺	18%	18%	20%	22%	21%	21%
55	C ₄ H ₇ ⁺	45%	45%	45%	47%	51%	51%
54		4%	4%	5%	5%	5%	6%
53	C ₃ H ₃ N ⁺	2%	2%	3%	3%	3%	4%
50		0%	0%	1%	1%	1%	5%
46	NH ₂ CHOH ⁺	11%	11%	10%	12%	12%	11%
45	HOCO ⁺	6%	6%	7%	7%	7%	7%
44	C ₃ H ₈ ⁺	6%	6%	9%	10%	20%	22%
43	(CH ₃) ₂ CH ⁺	10%	10%	14%	16%	16%	18%
42	C ₃ H ₆ ⁺	6%	6%	11%	12%	12%	16%
41	C ₃ H ₅ ⁺	15%	15%	19%	22%	24%	26%
40		2%	2%	3%	3%	3%	4%
39	C ₃ H ₃ ⁺	15%	15%	18%	20%	20%	22%
31		1%	1%	1%	1%	3%	17%
30	NH ₂ CH ₂ ⁺	25%	24%	24%	29%	41%	38%
29	NH ₂ CH ⁺	36%	36%	36%	42%	43%	43%
28	HCNH ⁺	65%	64%	73%	84%	81%	83%
27	C ₂ H ₃ ⁺ , HCN ⁺	20%	20%	23%	28%	28%	30%
26		3%	3%	4%	5%	5%	5%
18	H ₂ O ⁺ , NH ₄ ⁺	16%	17%	21%	27%	76%	88%
17		3%	3%	5%	7%	21%	24%
16		1%	1%	3%	4%	8%	8%
15	CH ₃ ⁺ , NH ⁺	6%	7%	7%	9%	10%	11%

* Indicates that we do not find the corresponding fragment (parent ion) in our measurements.

the parent ion, see Table 2. Table 2 presents the RI of the most intense ions observed in the TOF spectrum. Also included in the table for comparison are data for previous studies obtained from photoionization by Lago et al. [4] and Jochims et al. [5] and from electron impact by Junk and Svec [2] and Denifl et al. [7]. The most abundant cation is the $NH_2(CH_3)_2(CH)_2^+$, $m/q = 72$ a.m.u., and is equal in all studies. This ion is formed by the lost of the carboxyl group $COOH$. It is interesting to note that, the complementary ion $COOH^+$ is hardly observed.

We did not observed the protonated Valine ($ValH^+$), which is in agreement with previous works. The only exception is the Denifl et al. [7] study. The major differences found in Table 2 where in RI for $m/q = 57$ and 58 and for $m/q = 55$ and 56 . These peaks in our TOF-MS are well resolved and the areas can be calculated which better precision.

4. Conclusions

The study of thermal degradation in the DL-Valine allowed establishing a limit for the oven temperature used for sublimation of the samples at 95 ± 10 °C. Fragments ($m/q = 41-44$ and $m/q = 27, 28$) are good candidates as thermal degradation indicators. Their relative intensities increase above 95 °C thus revealing that thermal degradation occurs above this temperature. The same methods can be applied to other biomolecules that need to be vaporized directly from its solid form.

Although we did not explicitly describe each of the fragmentation pathways, we can separate the peaks in groups explaining which are the principal bond breaks involved in the fragmentation paths. Particularly, the higher resolution of our spectrometer allows

identification of a new peak $m/q = 58$ in the valine mass spectrum. Now, the peak $m/q = 58$ is assigned to $C_3H_8N^+$ and peak $m/q = 57$, assigned to $C_3H_7N^+$. They were not well resolved in previous works [6,8], peak $m/q = 58$ being confused with the metastability of the peak $m/q = 57$.

Acknowledgements

This work has been supported by CNPq, CAPES, FAPESP, DPP/UnB and LNLS. We greatly appreciate the help from LNLS staff.

References

- [1] F. Widjaja, Z. Jin, J.J. Nash, H.I. Kenttämä, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 2085–2093.
- [2] G. Junk, H. Svec, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 839–845.
- [3] L. Klasinc, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 8 (1976) 161–164.
- [4] A. Lago, L. Coutinho, R. Marinho, A. Naves de Brito, G. de Souza, Chem. Phys. 307 (2004) 9–14.
- [5] H. Jochims, M. Schwell, J. Chotin, M. Clemino, F. Dulieu, H. Baumgartel, S. Leach, Chem. Phys. 298 (2004) 279–297.
- [6] D. Nolting, C. Marian, R. Weinkauff, Phys. Chem. Chem. Phys. 6 (2004) 2633–2640.
- [7] S. Denifl, I. Mähr, F. Ferreira da Silva, F. Zappa, T.D. Märk, P. Scheier, Eur. Phys. J. D 51 (2009) 73–79.
- [8] J. Tamuliene, L.G. Romanova, V.S. Vukstich, A.V. Snegursky, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B 279 (2012) 128–134.
- [9] H. Farrokhpour, F. Fathi, A. Naves De Brito, J. Phys. Chem. A 116 (2012) 7004–7015.
- [10] F. Gaie-Levrel, G.A. Garcia, M. Schwell, L. Nahon, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 7024–7036.
- [11] T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York, 1993.
- [12] F. Burmeister, L.H. Coutinho, R.R.T. Marinho, M.G.P. Homem, M.A.A. de Morais, A. Mocellin, O. Bjorneholm, S.L. Sorensen, P.T. Fonseca, A. Lindgren, A. Naves de Brito, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 180 (2010) 6–13.
- [13] A. Mocellin, R. Marinho, L. Coutinho, F. Burmeister, K. Wiesner, A. Naves de Brito, Chem. Phys. 289 (2003) 163–174.
- [14] R. Cavasso, M. Homem, R. Landers, A. Naves de Brito, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 144 (2005) 1125–1127.
- [15] R.L. Cavasso Filho, M.G.P. Homen, P.T. Fonseca, A. Naves de Brito, Rev. Sci. Instrum. 78 (2007).

The rule of synchrotron radiation in the prebiotic evolution

A. Naves de Brito¹, A. Miranda da Silva² and A. Mocellin²

¹Instituto de Física 'Gleb Wataghin', Universidade Estadual de Campinas, 13083-859, Campinas-SP, Brazil
e-mail: arnaldo.naves@gmail.com

²Instituto de Física, Universidade de Brasília, Box 04455, 70919-970, Brasília-DF, Brazil

Abstract: Synchrotron radiation-based spectroscopic techniques are discussed. Their relevance to obtain information regarding the prebiotic evolution problem is pointed out. We present photoelectron–photoion coincidence (PEPICO) spectra of adenine and glycine obtained using 12 and 21 eV photons. The fragmentation pattern belonging to these molecules was found to present striking differences, which are discussed. Adenine partial ion yield in the energy region 12–21 eV is also presented. The neutral fragments were found to have very simple assignment. The importance of hydrogen cyanide (HCN) as a building block of these molecules is confirmed. A special instrumentation allowing precise comparisons between photon-induced desorption and energetic ion bombardment desorption is described. As an example, we show, for the first time, the frozen CO₂ ice mass spectra bombarded by photons and energetic ions, under the same experimental conditions. The comparison shows that prebiotic evolution may only be properly understood if more than one particle, as energy source, is considered.

Received 16 February 2012, accepted 14 May 2012, first published online 5 July 2012

Key words: adenine, glycine, photo-degradation, Plasma desorption mass spectroscopy, Partial ion yield.

Introduction

Photo-ion spectroscopy (PIS) and photoelectron spectroscopy (PES) are related by the photoelectric effect described by Albert Einstein in the beginning of the last century. These techniques find many applications, among them, there is one, perhaps most people do not think about: simulation of realistic prebiotic scenarios in a laboratory. Why those testing are of interest in the first place? Most readers will agree that molecular origin of life is one of the most intriguing and interesting problems to be researched. Despite this easy-to-agree interest, one may never find out exactly how life emerged on Earth. The best we can hope for is to propose feasible pathways for its emergence. One of the key premises, behind this field of research, is that life, even in its simplest form, is too complex and it is not reasonable to assume that it could be formed simply by a random mixture of atoms and molecules. Some prebiotic evolution, at a molecular level, is bound to have taken place prior to life emergence. Further to this, prebiotic evolution is considered necessary for the creation of the basic constituents of living organisms such as amino acids, DNA basis and bio-molecules that are more complex. As many of these essential bio-molecules reach a certain degree of complexity, they can exist in two mirror image forms. Often, we call them left and right symmetry. For example: all 20 amino acids can be classified into one of these two forms except glycine, which is too simple. Chirality is the name of this property of molecules that have a non-superposable mirror image. Life on Earth is made of left-handed amino acids. This

is a fact called homochirality. Before going into detail and hypothesis on how this conspicuous characteristic of life originated, let us focus on how bio-molecules could be created in the first place. Indeed, simple biomolecular building block can be rather easily be produced abiotically by adding a source of energy and simple molecules such as CO, H₂O and NH₃. These are the so-called Miller-type experiments after the pioneering work of Miller (Miller 1953). In his experiment, biomolecular building blocks were created abiotically using electric discharges in a gas mixture simulating the primeval atmosphere of Earth. In fact, in the first half of the 20th century Urey, from United States, knew that the giant planets, Jupiter and Saturn, atmosphere was dominated by H₂, CH₄ and NH₃. He argued that these gases were captured from Solar nebula and were maintained in these planets, which were too large to loose hydrogen to space. He also speculated that Earth, including other smaller planets, had this atmosphere in the beginning before they had time to evolve (Urey 1952). Miller used an electric discharge (simulating lightning) and an atmosphere made of H₂O, CH₄, NH₃ and H₂, producing amino acids and other more complex organic compounds. Among these organic compounds, the absolute majority had relevance for the molecular origin of life. This is of importance since a random combination of these compounds could generate other organic molecules not important for the origin of life on Earth. In 1969, a carbonaceous meteorite fell in Murchison, Australia. The meteorite turned out to have high concentrations of the same kind of amino acids you get in prebiotic experiments like Miller's. This discovery made it

plausible that similar processes of those in Miller's experiment could have happened on primitive Earth or on an asteroid. The agreement supported greatly the assumptions of Miller and Urey for decades. Experiments were also performed using ultraviolet light in this type of atmosphere (Sagan & Khare 1971). Ultraviolet light as well as electron and energetic ion beams have advantage compare to the discharge, as replacement to the energy source, because they can be found in space abundantly. The advantage of considering prebiotic evolution in space comes from obvious reasons such as: in space we have access to longer prebiotic evolution time (the universe have >10 G year compare to 4.4 G years of the Solar System). On top of that, the composition of the prebiotic atmosphere, assumed by Miller, did not explain the presence of volcanic gases on prebiotic earth. An alternative composition was proposed by Rubey (Rubey 1955). This theory was further developed by Holland (Holland 1962). Accordingly, during recent year, geochemical opinion is that the prebiotic atmosphere was weakly reducing and not strongly reducing as in Miller–Urey-type experiments. The more realistic mixture would be CO₂, N₂ and water combined with smaller amounts of CO and H₂ (Walker *et al.* 1983; Holland 1984; Kasting *et al.* 1993). Choosing ultraviolet light as the energy source together with the more realistic mixture of prebiotic atmosphere leads to the situation where bioorganic compounds are difficult to be synthesized (Schlesinger & Miller 1983). Therefore, according to this discussion, ultraviolet light as an option for the energy source does imply that the prebiotic molecules would be formed preferably in space where the conditions regarding gas mixture are much less strict and the exposure time is not restricted to Earth lifetime. In space, energy sources such as energetic ions and electrons do present an overall higher cross-section with the prebiotic molecules. This fact alone would make these sources more relevant to the prebiotic chemistry. However, Miller-type experiments, using as energy sources: ions, electron or discharge, present a serious problem: the amino acids and other more complex biomolecules are always produced as a racemic mixture in those experiments. This is in complete disagreement with the conditions required for the emergence of life: namely, the homochirality of its building blocks. In Miller-type experiments, molecular excitation and dissociation are two key processes: the simple molecules are converted into ions and free radicals, via photoelectric effect for example. Subsequently, they form molecules that are more complex. In this process, however, left- and right-handed molecules are produced in equal amounts. The specific homochirality of terrestrial biomolecules may be accidental, but possible mechanisms for its origin are a vital and growing cross-disciplinary research field (Cline 1997; Brack 1998). Several possible mechanisms have been proposed, e.g. charge-parity (CP) violation in nuclear decay and catalysis on asymmetric mineral surfaces. Most proposed mechanisms have severe problems; CP violation is estimated to be much too weak and mineral surfaces of the two symmetries exist in equal amounts (Brack 1998). Photons, however, like those biomolecules we discussed, do also present chiral (helicity) properties. If their spin and momentum are parallel

(anti-parallel), the particle is said to be right-handed (left-handed). This is also known as photons being right- (left-) handed circularly polarized. But do we have circularly polarized radiation in space where possible prebiotic evolution took place? Cosmic circularly polarized radiation has been observed, and various mechanisms for its production are astronomically possible (Cline 1997; Bailey *et al.* 1998; Bailey 2001). The proposed mechanisms all result in equal total amounts of left- and right-handed circularly polarized radiation due to symmetry, but the two handedness are emitted in different directions. Symmetry may thus be broken locally, where locally, however, could mean star-formation regions on the cubic light years scale. Recent results using synchrotron light shows that circularly polarized light is more absorbed by one enantiometer (Meierhenrich & Thiemann 2004). This experiment is relevant since the wavelength with shown absorption asymmetry has exactly the Hydrogen Lyman Alpha energy. It does also suggest another interesting pathway to produce an excess of a particular enantiometer which can be amplified by other methods. Radiation in a Miller-type experiment was shown to produce more complex molecules, but this same radiation is also very effective to destroy enantiometer belonging to a particular symmetry. In this context, many energy sources can act on simple prebiotic molecules producing more complex building block such as amino acids but circularly polarized ultraviolet are candidates to produce the much needed asymmetric photolysis. These sets the grounds for the research lines our group has pursued along the last few years. It has been our aim to critically test many steps comprising this vast puzzle. Our first goal was to abiotically produce bio-molecules important to the origin of life. Perhaps the most important result obtained in this line of research consisted in the simulation of Titan atmosphere. The Miller–Urey-type experiment used Synchrotron-produced X-ray as energy source. The resulting tholin, after 73 hours of irradiation has shown the presence of DNA basis, Adenine among other compounds (Pilling *et al.* 2009). Despite the success, namely: this experiments shows for the first time the presence of life building blocks in an astronomical object different from Earth, some questions still remain unanswered. For example: can we track down the intermediate steps, starting from simple molecules to the final products? How important are each intermediate step to the final product? In order to enter into the physics and chemistry belonging to these intermediate steps, we have developed, during a number of years, appropriate instrumentation and devised methods to tackle these interesting questions. Synchrotron radiation was our main choice of excitation source not only because it does produce chiral photons at easy but also because it is tunable from the ultraviolet to the X-ray region. Furthermore, if needed, it can also deliver wide frequency band. This feature is important to allow mimicking Solar or other stars radiation in space or in Earth. In our case, we produced this last broadband, in the ultraviolet region, using a special gas filter called MIRHACLE developed in our SR facility (Cavasso Filho *et al.* 2007a). A source also requires experimental stations for the successful experiments. We develop several.

PDMS

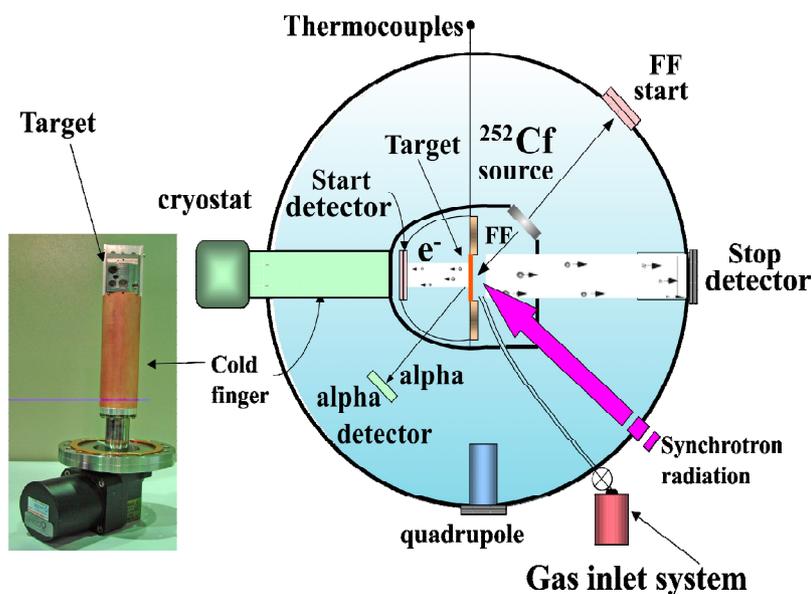


Fig. 1. Experimental chamber for plasma desorption mass spectrometry (PDMS). It is composed by ^{252}Cf radioactive source and allows the use of SR source as well. The target can be cooled by a cryostat. In the target, space ice analogous may be formed by introducing gases via an inlet gas system. Four detectors are available, three micro-channel plate detectors: one to detect electrons giving the start signal, another gives an alternative start signal and the last one is used to detect ions providing the stop signal. There is an alpha particle detector for sample thickness evaluation.

Here, however, we will briefly discuss two of them: a multicoincidence time of flight spectrometer, which we used to follow photo-fragmentation of amino acids and DNA basis in the gas phase (Burmeister *et al.* 2010). As an example, we will describe two experiments with interesting consequences to the present subject. A second experimental chamber was designed specifically to monitor *in situ* photo catalyses and photolysis. This experimental chamber has, in special, the ability to perform, under the same conditions, mass spectra of space ice analogues bombarded by energetic ions or synchrotron radiation (Farenzena *et al.* 2005, 2006; Martinez *et al.* 2006; 2007a, b; Ponciano *et al.* 2006, 2008; Homem *et al.* 2007). In these experiments we also used another important property of SR: its timing. SR laboratories around the world can operate in a special mode called single bunch. In it, researchers have access to pico-second pulses, which are perfect for time of flight mass spectrometry. We will show one experiment using this capability. In it, we compare, for the first time, under the same conditions, photolysis resulting from energetic ions and Vacuum Ultra-Violet photons (VUV).

Experimental details

One of the main problems we, as physicist, faced, performing Miller–Urey-type experiment, is the outcome dependence of enormous amount of parameters. The scientist knows the initial conditions and other parameters such as temperature, photon flux and length of time for some macro stages. He also knows the resulting compounds created via gas phase

chromatography analysis. In this classical approach, cause and effect might turn out to be difficult to properly screen systematically. Another question we asked was: how was the chemical development of the system during the Miller-type experiment? Our solution to these questions materialized in the development of the first synchrotron-based plasma desorption mass spectrometry (PDMS) instrument, see Fig. 1. This instrument is not well described in the previous literature data and we will devote some attention to pinpoint its most relevant aspects to our present discussion. In this set-up, we employ a radioactive source producing ^{252}Cf fission fragments. Their energy is about 65 MeV (after passing the protection foil of the Cf source). The radioactive source produces fission fragments in two opposite directions. A target receives one of the fragments and a cryostat is used to keep its temperature as low as 20 K (monitored by a thermocouple). Thus, we can simulate, in the SR laboratory, space ice analogues. The fragments aiming towards the target penetrated the ice layer at its front side, from where target ions were backward ejected with respect to the incident projectiles and accelerated towards the stop detector.

If the target is thin enough, the fission fragments trespasses it as well as a thin supporting metal foil. The crossing produces electrons at the back of the foil, which are accelerated towards a micro-channel plate detector placed behind the target. The generated signal is used as ‘start’ in the time counting process to determine the flight time of ions ejected from the target surface. The radioactive source also produces alpha particles. The energy loss from alpha particles is a statistical process, often resulting in a wide energy loss distribution; however, if the

fluctuations of the acquired data are relatively small, then the average energy loss is precise and target thickness can be determined. This allows target thickness determination *in situ*. The second fission fragment (FF), emitted in the opposite direction, is also detected by another micro-channel plate 'start FF'. The originated pulse gives a second 'start' signal that can be used when the target is too thick. It can also be used in coincidence with the electron 'start' allowing possible spurious electron signal to be eliminated. An opening is placed so that the sample can be irradiated with synchrotron radiation or any other photon source. Using a special operation SR can deliver pulses of 60 picoseconds width and 311 nanoseconds period. In this case, mass spectrum of photo-induced desorption can be obtained.

The other two relevant instrumentations, which we will provide results from, are the Toroidal grating monochromator, briefly discussed in the introduction and thoroughly discussed in Cavasso Filho *et al.* (2007a). All the gas phase experiments were performed in the electron ion coincidence spectrometer described in detail in Burmeister *et al.* (2010).

Discussion

The problems we will treat in this section will follow the criteria base on its increasing complexity. In this way, we will discuss initially gas phase molecules which are building blocks of leaving organisms, i.e. amino acids and DNA basis. Isolated molecules are excellent candidates to investigate intrinsic properties and behaviours. This knowledge can be used to help elucidate the extrinsic behaviour present in ice analogues, solid-state matter or bio-molecules in solution. Another advantage of pursuing this research line is the access of experimental data which is in better condition to be compared with theoretical calculations.

In Fig. 2, we present a result compiled from Pilling *et al.* (2007). In it, the ion yield of adenine from 12 to 21 eV is presented. This spectrum was taken at the Toroidal Grating Monochromator (TGM) beamline using the multi-coincidence spectrometer (Cavasso Filho *et al.* 2007b; Burmeister *et al.* 2010). The figure shows the expected ion yield behaviour. In this figure, the energy corresponding to the maximum of each curve shows that the ions having maximum yield at lower (higher) energy have larger (lower) mass. We can also observe an interesting pattern in the missing neutral fragment. They are formed simply by $N \times \text{HCN}$ ($N=1, 2, 3, 4$). Excluding a hydrogen, in one case, which, being the most abundant atom in the universe, this fact bears no practical importance. HCN is known to be very poisonous to living organisms today, but, it is also known for being important in the prebiotic chemistry (Zahnle 1986). Here, we see the manifestation of this importance since only HCN is needed as a building block to this important molecule for the prebiotic chemistry. The relevance of HCN also emphasizes, in turn, the validity to perform Miller-type experiments using synchrotron radiation as energy source. Most of the Miller-type experiments, using ultraviolet as energy source, were restricted to fix wavelength, for example, Groth *et al.* used 8.4 and 9.6 eV photons (Groth &

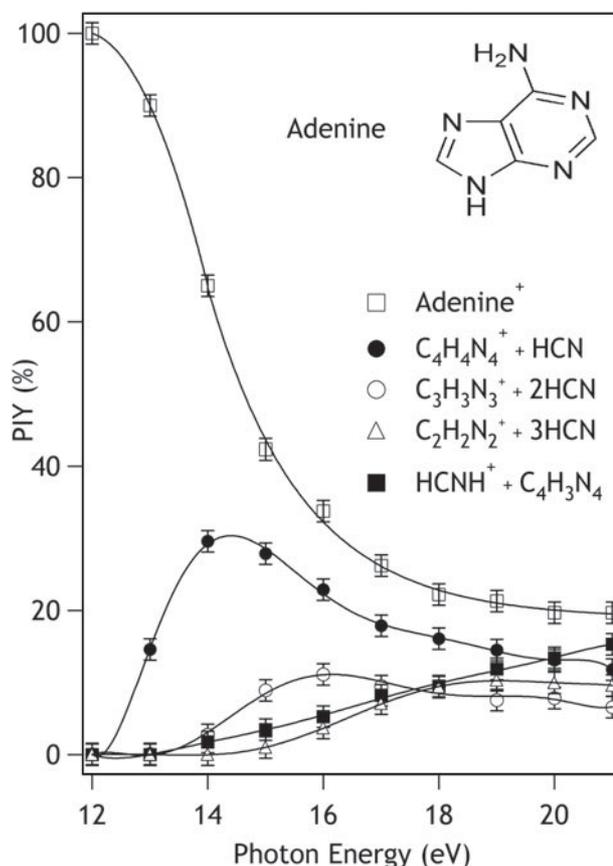


Fig. 2. The partial ion yield of adenine molecule obtained from PEPICO (photo electron- photo ion coincidence) spectra in the energy region 12–21 eV. The points in the spectra are measured with 1 eV energy step. The molecular ion is the most abundant in the complete energy range. The others ion fragments, and neutral fragments are made of multiples of HCN, see text for details.

Weyssenhoff 1960). They were plagued by their lack of effectiveness in synthesizing organic compounds. There were also reports of experiments using even lower wavelength, 6.7 eV. This restriction in the wavelength prevented the production of amino acids containing nitrogen (Bar-Nun & Chang 1983). Further to this HCN was found to require synchrotron radiation with an energy of 15.58 eV for its production in photochemical processes (Zahnle 1986). Indeed Fig. 2 shows how critical is it to be able to produce HCN in the prebiotic chemistry.

Both DNA basis and amino acids are building blocks of living organisms. One interesting question we may ask about these two classes of biomolecules is their behaviour with regard to photo-degradations. During the last few years, we performed a number of photo-fragmentation studies in these two classes of important molecules (Lago *et al.* 2004; Coutinho *et al.* 2005; Marinho *et al.* 2006; Pilling *et al.* 2007, 2011). As we described previously, photo-degradations studies may hold the explanation for the homochirality observed in amino acids. In Fig. 3, we show the mass spectra taken at the TGM beamline at two energies 21 and 12 eV (Lago *et al.* 2004). The lower energy is very close to the He-I emission line, while the higher

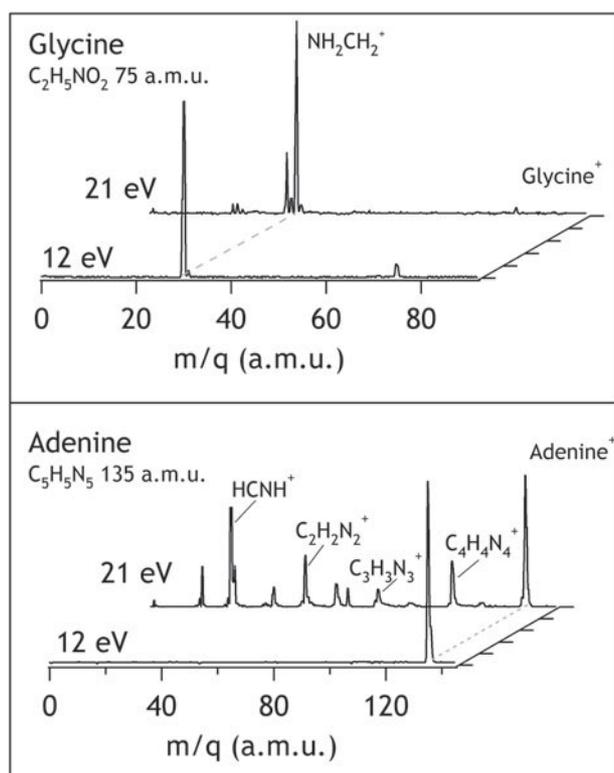


Fig. 3. PEPICO spectra of adenine (bottom panel) and glycine (top panel) molecules. Each molecular spectrum was obtained at 12 and 21 eV photon energy. The spectra were normalized by the area under the curve. It is interesting to observe that for adenine, in 12 or 21 eV, the most abundant ion is the intact molecule. In contrast, in the glycine spectra the ion NH₂CH₂⁺ dominates the spectra in both energies, this fragment releases the neutral COOH radical.

is some how close to Hydrogen Lyman alpha emission-line. Both are the most abundant elements in the Universe making these photon energies relevant to the prebiotic photochemistry. Adenine shows a very distinct mass spectrum at 12 eV compared to glycine. Adenine shows no sign of photo-fragmentation at this energy, while amino acids, such as glycine, loose the COOH group already at 12 eV. At 21 eV, further fragmentation takes place for glycine. The DNA basis, at this energy, shows sign of fragmentation. However, even at this energy, substantial amounts of intact ionized adenine remains. The stability of adenine comes in part from its ring-type molecular structure. It bears nitrogen atoms which are more electronegative than carbon. These two atoms, in the molecule, are well distributed. Thus, configuration is unfavourable to the creation of an electric repulsion between neighbour atoms leading to a possible bond break. Glycine is constituted by two electronegative ends, one having O and OH and the other NH₂. Consequently, the electron deprived central carbons become positive. Upon ionization, another negative charge is removed leaving the two carbons even more positive. In this situation, the two carbon atoms face Coulomb repulsion. If the Coulomb repulsion is strong enough, the chemical bond between the carbons will break explaining qualitatively the experimental observations. It is

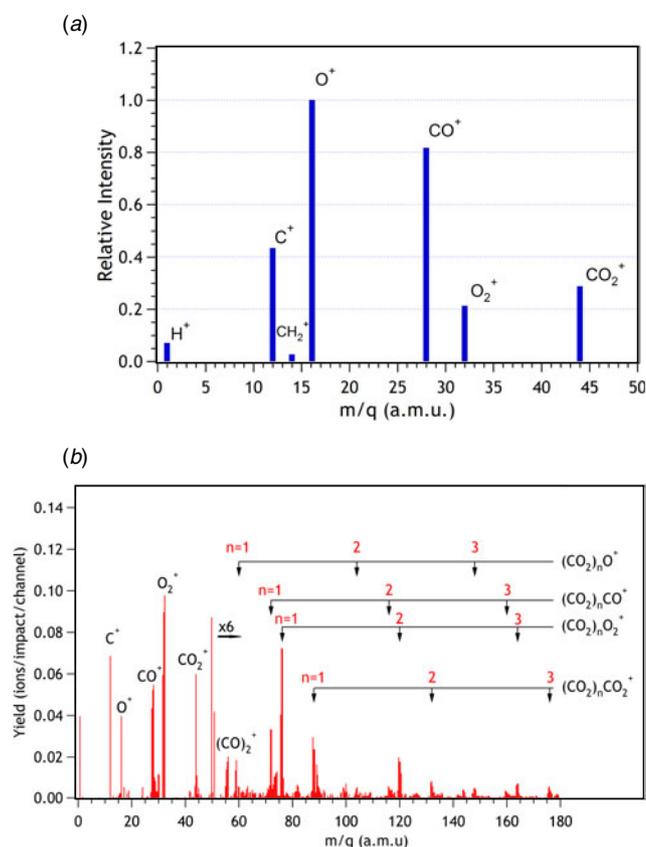


Fig. 4. (a) Time of flight mass spectrum showing the secondary ions emission from condensed CO₂ bombarded by 40 eV photons from SR in the single bunch mode. (b) Time of flight mass spectrum showing the secondary ions emission from condensed CO₂ heavily bombarded by MeV fission fragments. The spectrum intensities for mass above 50 a.m.u. are multiplied by 6 to show the molecular cluster formation.

known that the DNA basis holds the genetic code information. It seems that nature kept, in this key position, molecules that are comparatively much more resistant to radiation damage.

Another question we investigated with our PDMS special experimental station was the prebiotic chemistry resulting from two different energy sources namely: energetic ion bombardment and 40 eV photons. We remind the reader that He II line has around 40 eV energy. As we discussed in the introduction, Miller-type experiments employing fix energy ultraviolet sources show pure bio-molecules productions. Here, we put forward the concept that more than one source of energy may need to be considered for a proper simulation of the abiotic production of amino acids other biomolecules. Indeed, abiotic biomolecular chemistry is made of many steps. It is possible that for a particular step a certain energy source is required while other steps require another source. In order to test this hypothesis, we compared the results of ions production originating from two different energy sources. This testing requires equal conditions for the sample, thus avoiding false results.

Our developed PDMS station is suitable for this test since both ion-impact and photon-impact ionic desorption can be

performed using the same sample. One of the key points for this to be possible is related to the nature of the radioactive source. This source impinges MeV fragments in the sample at a relatively small rate (about 1 kHz). Simple calculations show that in practice an ion never hits the same spot in the sample. The surface remains practically unaltered by the PDMS probing. Therefore, it is possible to make a mass spectrum with only the radioactive source on and followed this measurement by another using SR pulsed source. The new measurements using the SR source will not be affected by the previous measurements. Let us now discuss, briefly, the synchrotron-based measurements. In order to measure the ejected ions time-of-flight, there is a need for a start signal marking the instant of the ion creation. Usually, the synchrotron delivers radiation pulses with duration of less than 100 picoseconds at a period of about 2 nanoseconds. This period is far too small and a special SR ring-filling pattern is required. Achieving longer periods requires a special filling pattern where only one electron bunch is kept in the ring. In the Brazilian synchrotron, this single bunch mode results in a period of 311 nanoseconds between pulses. Therefore, during single bunch operation mode we were able to use the pulsed radiation as start signal and measure the time-of-flight of the desorbed ions. The resulting spectrum is shown in Fig. 4(a) (Homem, M.G.P. *et al.* to be published 2012). In it, we use frozen CO₂ as test molecules. As a comparison, the same sample spectrum bombarded with energetic ions is shown in Fig. 4(b). A detailed description of the spectrum, shown in Fig. 4(b), can be found in Ponciano *et al.* (2006). Here, we will only keep our attention in the ions with smaller mass compared to CO₂. The photon spectrum in Fig. 4(a) has its highest ion production given by O⁺ and the smallest O₂⁺. In this spectrum, we see a small amount of contamination coming from H⁺ and CH⁺. In the energetic ion-impact spectrum, the opposite yield is observed; O⁺ is the smallest peak and O₂⁺ the largest. Small contaminations such as H⁺, etc., are also present. As a conclusion, from the clear observed contrast, we may argue that, depending on the ion fragment needed in a specific step in the abiotic production, one source of energy may be needed to provide that species while, in another step, another energy source may be required to provide the needed ionic species. Therefore, only after studying carefully the intermediate reactions, we will be able to evaluate the importance of each energy source.

Concluding remarks

The PEPICO spectra of Adenine and Glycine obtained using 12 and 21 eV photons were presented. Adenine was found to be considerably more stable towards photo-fragmentation in the VUV range, compared to glycine. This may point out to a more general behaviour where amino acids, in general, seems to be more damaged by VUV radiation than DNA basis. Adenine partial ion yield was studied in the energy region 12–21 eV. The neutral fragments related to all ionic fragments detected could be described as X(HCN) for X=1, 2, 3 or 3(HCN)CN. The ionic fragments are also very simply related to HCN. This

reveals the importance of HCN as building block to the DNA basis. The experimental set-up called PDMS is described. Emphasis is given to its first implementation in a synchrotron environment. Specifically, the PDMS chamber allows precise comparisons between photon-induced and energetic ion-induced desorption. The mass spectra of photon- and ion-induced desorption of frozen CO₂ are compared. The most (less) intense ionic fragment in the photon-induced mass spectrum is O⁺ (O₂⁺). The opposite was observed in the energetic ion bombardment spectrum. In this case, only ions with mass smaller than the parent ion CO₂ were considered. This supports the general idea that prebiotic evolution may only be properly understood if several excitation sources are taken into account. We hope to have shown the importance of synchrotron radiation source to the molecular origin of life.

Acknowledgments

A.N.B. wishes to thank M.G.P. Homem for work in the data treatment and discussions concerning the CO₂ photon impact data. The TGM personal is also greatly acknowledged for their support with instrumentations. CNPq–Brazil is thanked for financial support.

References

- Bailey, J. (2001). *Orig. Life Evol. Biosph.* **31**(1), 167–183.
- Bailey, J., Chrysostomou, A., Hough, J., Gledhill, T., McCall, A., Clark, S., Ménard, F. & Tamura, M. (1998). *Science* **281**(5377), 672.
- Bar-Nun, A. & Chang, S. (1983). *J. Geophys. Res.* **88**(C11), 6662–6672.
- Brack, A. (1998). *The Molecular Origins of Life: Assembling Pieces of the Puzzle*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Burmeister, F. *et al.* (2010). *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **180**(1–3), 6–13.
- Cavasso Filho, R.L., Homem, M.G.P., Fonseca, P.T. & de Brito, A.N. (2007a). *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 115104.
- Cavasso Filho, R.L., Lago, A.F., Homem, M.G.P., Pilling, S. & de Brito A.N. (2007b). *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **156**, 168–171.
- Cline, D.B. (1997). Physical origin of homochirality in life, Santa Monica, CA (United States), 15–17 Feb 1995; AIP Conference Proceedings, No. 379 [APCPCS]; OSTI Identifier: 452850, Report Number(s): CONF-9502169. American Institutes of Physics, New York, NY.
- Coutinho, L., Homem, M., Cavasso, R., Marinho, R., Lago, A., de Souza, G. & de Brito, A. (2005). *Braz. J. Phys.* **35**(4A), 940–944.
- Farenzena, L., Martinez, R., Iza, P., Ponciano, C., Homem, M., de Brito, A., da Silveira, E. & Wien, K. (2006). *Int. J. Mass Spectrom.* **251**(1), 1–9.
- Farenzena, L.S. *et al.* (2005). *Earth Moon Planets* **97**(3–4), 311–329.
- Groth, W. & Weyssenhoff, H. (1960). *Planet. Space Sci.* **2**(2–3), 79–85.
- Holland, H.D. (1962). In *Petrologic Studies: A Volume to Honour A. F. Buddington*, Engel, A. E., James, H. and Leonard, B. F. (eds), p. 447–477. Geological Society of America, New York.
- Holland, H.D. (1984). *The Chemical Evolution of the Atmosphere and Oceans*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Homem, M.G.P., Faraudo, G.S., Farenzena, L.S., Wien, K., da Silveira, E.F. & Naves de Brito, A. (2007). *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **156**, XLII–XLII.
- Kasting, J.F., Egger, D.H. & Raeburn, S.P. (1993). *J. Geol.* **101**, 245–257.
- Lago, A., Coutinho, L., Marinho, R., de Brito, A. & de Souza, G. (2004). *Chem. Phys.* **307**(1), 9–14.
- Marinho, R., Lago, A., Homem, M., Coutinho, L., de Souza, G. & de Brito, A. (2006). *Chem. Phys.* **324**(2–3), 420–424.

- Martinez, R., Ponciano, C., Farenzena, L., Iza, P., Homem, M., de Brito, A., Wien, K. & da Silveira, E. (2006). *Int. J. Mass Spectrom.* **253**(1–2), 112–121.
- Martinez, R., Farenzena, L.S., Iza, P., Ponciano, C.R., Homem, M.G.P., de Brito, A.N., Wien, K. & da Silveira, E.F. (2007a). *J. Mass Spectrom.* **42**(10), 1333–1341.
- Martinez, R., Ponciano, C.R., Farenzena, L.S., Iza, P., Homem, M.G.P., de Brito, A.N., da Silveira, E.F. & Wien, K. (2007b). *Int. J. Mass Spectrom.* **262**(3), 195–202.
- Meierhenrich, U.J. & Thiemann, W.H.P. (2004). *Orig. Life Evol. Biosph.* **34**(1), 111–121.
- Miller, S.L. (1953). *Science* **117**(3046), 528–529.
- Pilling, S., Lago, A.F., Coutinho, L.H., de Castilho, R.B., de Souza, G.G.B. & Naves de Brito, A. (2007). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**(22), 3646–3652.
- Pilling, S., Andrade, D.P.P., Neto, A.C., Rittner, R. & de Brito, A.N. (2009). *J. Phys. Chem. A* **113**(42), 11161–11166.
- Pilling, S. *et al.* (2011). *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **411**(4), 2214–2222.
- Ponciano, C.R., Martinez, R., Farenzena, L.S., Iza, P., da Silveira, E.F., Homem, M.G.P., de Brito, A.N. & Wien, K. (2006). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**(8), 1120–1128.
- Ponciano, C.R., Martinez, R., Farenzena, L.S., Iza, P., Homem, M.G.P., de Brito, A.N., Wien, K. & da Silveira, E.F. (2008). *J. Mass Spectrom.* **43**(11), 1521–1530.
- Rubey, W.W. (1955). Development of the hydrosphere and atmosphere, with special reference to probable composition of the early atmosphere. In *Crust of the Earth* ed. Poldervaart, *Geol. Soc. America, Spec. Pap.* **62**, pp. 631–650.
- Sagan, C. & Khare, B.N. (1971). *Science* **173**(3995), 417.
- Schlesinger, G. & Miller, S.L. (1983). *J. Mol. Evol.* **19**(5), 376–382.
- Urey, H.C. (1952). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **38**(4), 351.
- Walker, J., Klein, C., Schidlowski, M., Schopf, J., Stevenson, D. & Walter, M. (1983). In: *Earth's Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution (A84-43051 21-51)*. Princeton University Press, Princeton, NJ, vol. 1, pp. 260–290.
- Zahnle, K.J. (1986). *J. Geophys. Res.* **91**(D2), 2819–2834.