

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE FÍSICA-IF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

TESE DE DOUTORADO

ESTUDO DE MOLÉCULAS DE RELEVÂNCIA ATMOSFÉRICA E
BIOLÓGICA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS E
DA TÉCNICA DE MICROJATO.

OSCAR CARDOSO ARAÚJO

Brasília, 30 de Setembro 2020

OSCAR CARDOSO ARAÚJO

ESTUDO DE MOLÉCULAS DE RELEVÂNCIA ATMOSFÉRICA E
BIOLÓGICA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS E
DA TÉCNICA DE MICROJATO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Física da Universidade de
Brasília, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor

ORIENTADORA: Profa. Dra. Alexandra Mocellin

Brasília, 30 de Setembro 2020

ESTUDO DE MOLÉCULAS DE RELEVÂNCIA ATMOSFÉRICA E
BIOLÓGICA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS E
DA TÉCNICA DE MICROJATO.

Por

Oscar Cardoso Araújo

Aprovado por:

Profa. Dra. Alexandra mocellin

Instituto de Física / UnB

Prof. Dr. Arnaldo Naves de Brito

Instituto de Física Gleb Wataghin/Unicamp

Prof. Dr. Diego Oliveira Nolasco da Silva

Universidade Católica de Brasília/ UCB

Prof. Dr. Ricardo dos Reis Teixeira Marinho

Instituto de Física / UnB

Brasília, 30 de Setembro 2020

Resumo

Neste trabalho estudamos dois sistemas de interesse ambiental e um terceiro sistema de interesse biológico. Um deles foi o estudo de aminoácidos em interfaces líquidas, para isso medimos e analisamos os espectros de XPS dos aminoácidos glicina, alanina, valina e metionina em solução aquosa. O outro foi a medida das seções de choque absolutas de fotoabsorção e fotoionização da molécula de ozônio, um importante dado para física de atmosfera ainda pouco conhecido e estabelecido, devido as dificuldades de medida com amostras de ozônio. O terceiro sistema estudado foram os osmólitos; Tmao, betaína, uréia, e a mistura de Tmao com uréia, em solução aquosa com XPS. Essas amostras foram estudadas em diferentes concentrações e para pH fisiológico e ácido.

Os aminoácidos constituem uma fração importante dos compostos nitrogenados orgânicos solúveis em água em aerossóis e estão envolvidos em muitos processos na atmosfera. Descobrimos que os aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas e tamanho menor, a glicina e a alanina, tendem a permanecer no *bulk* do líquido, enquanto os aminoácidos hidrofóbicos e maiores, valina e metionina, se concentram mais na superfície. Encontramos evidências experimentais de que os aminoácidos têm orientação preferencial em relação à superfície, sendo que a cadeia lateral hidrofóbica fica mais próxima a superfície do que o grupo carboxílico hidrofílico. A propensão a superfície observada nos aminoácidos tem implicações na ciência atmosférica, uma vez que a interação da superfície desempenha um papel fundamental na formação de gotas nas nuvens e elas devem ser consideradas nos modelos climáticos.

Determinamos as seções de choque absolutas de fotoabsorção e fotoionização da molécula de ozônio a partir da medida das correntes de ionização, determinação de fluxo de fótons e da pressão absoluta do gás, utilizando uma câmara experimental de dupla ionização e o nosso sistema de produção de amostras de ozônio com grande pureza.

Experimentalmente, é um desafio medir as distribuições de osmólitos em torno das proteínas. Assim, esse conhecimento é inferido a partir de estudos de interfaces ar-água que têm alguma semelhança com a interface não polar-água de proteínas fornecidas por resíduos hidrofóbicos. Apesar de estudos intensivos, os mecanismos a nível molecular dos osmólitos não são bem conhecidos. Além de fornecer conhecimento básico de como a vida se desenrola, desvendar esses mecanismos permitirá projetar novos e mais eficientes osmólitos para controlar

estruturas moleculares. O objetivo deste estudo é fornecer estimativas da concentração relativa e a afinidade de diferentes osmólitos na interface vapor-água usando a técnica de Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS) em soluções aquosas. Isso nos permitirá comparar mecanismos de ação de diferentes osmólitos protetores; Tmao e betaína, bem como o osmólito desnaturante; uréia. Em função da concentração do soluto em água, observamos que o Tmao tem uma afinidade maior à superfície do que a uréia e a betaína. Essas moléculas não chegam a formar uma camada de saturação na superfície, a intensidade cresce linearmente mesmo até a concentração de 4 M, que foi a máxima estudada. Em função do pH, vimos que o Tmao, se protona em pH menor que o pKa da solução e vai menos para a superfície que o Tmao não protonado. Quando estudamos misturas de Tmao+uréia observamos que para o pH neutro, a mistura se concentra mais no bulk da solução comparado com as espécies sozinhas, isso indica que na mistura as moléculas se afastam das superfícies hidrofóbicas, podendo favorecer o estado enovelado. O contrário acontece para o pH ácido, indo mais para a superfície, ou seja se concentrando nas superfícies hidrofóbicas. Não notamos diferenças significativas quando a concentração de uréia é aumentada nas misturas.

Palavras-chave: *PES, superfície líquida, interface líquido-gás, interface líquida, bulk líquido, água, glicina, alanine, valina, metionina, osmólitos, Tmao, betaína, uréia, ozônio, propensão, afinidade a superfície, microjato, XPS, concentração de soluto, seção de choque de fotoabsorção, seção de choque de fotoionização, pH, soluções aquosas.*

Abstract

In this work we study two systems of environmental interest and a third system of biological interest. One of them was the study of amino acids in liquid interfaces. We measured and analyzed the XPS spectra of amino acids; glycine, alanine, valine and methionine in aqueous solution. The other was the measurement of the absolute photoabsorption and photoionization cross sections of the ozone molecule, an important data for atmosphere physics that is still poorly known and established due to measurement difficulties with ozone samples. The third system studied was osmolytes; Tmao, betaine, urea, and the mixture of Tmao and urea in aqueous solution with XPS. These samples were studied at different concentrations and for physiological and acid pH.

We determined the absolute photoabsorption and photoionization cross sections of the ozone molecule from the measurement of ionization currents, photon flux and absolute gas pressure determination, using an experimental double-ion chamber technique and our homemade system for production of ozone gas with high purity.

Experimentally, it is challenging to measure distributions of osmolytes around proteins. Thus, this knowledge is inferred from studies of air-water interfaces, which has some resemblance to the nonpolar-water interface of proteins provided by hydrophobic residues. Despite intensive studies, the atomic mechanisms of osmolytes are not well understood. In addition of providing basic knowledge of how life unfolds, unraveling these mechanisms will enable rational designs of new and more efficient osmolytes to control molecular structures.

The aim of this study is to provide estimates of the relative concentration as well as affinity of different osmolytes at the vapour-water interface, using X Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) technique in aqueous solutions. This will allow us to compare mechanisms of action of different protecting osmolytes; Tmao, betaine as well as denaturant osmolyte; urea.

Due to the concentration of the solute in water, we observed that the Tmao has a higher surface affinity than urea and betaine. These molecules do not even form a saturation layer on the surface, the intensity increases linearly even to the concentration of 4 M, which was the maximum studied. As a function of pH, we have seen that the Tmao protonates at a pH lower than the pKa of the solution and is more depleted than the unprotonated Tmao. When we study Tmao + urea mixtures, we observed that for neutral pH, the mixture is more concentrated in the bulk of the solution compared to the species alone, which indicates that in

the mixture the molecules move away from the hydrophobic surfaces, which may favor the folded state of proteins. The opposite is true for acidic pH, having more surface propensity, ie concentrating more on hydrophobic surfaces. We did not notice any significant differences when the urea concentration is increased in the mixtures.

Keywords: PES, liquid surface, liquid-gas interface, liquid interface, liquid bulk, water, glycine, alanine, valine, methionine, osmolytes, Tmao, betaine, urea, ozone, propensity, surface affinity, micro-jet, XPS, solute concentration, photoabsorption cross section, photoionization cross section, pH, aqueous solutions.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por tudo que ele tem feito na minha vida.

A minha esposa Edna, pela verdadeira amizade amor e compreensão.

A minha mãe, Ivone Gomes e a minha vó, Joana Gomes de Carvalho, por terem me ensinado o caminho e me acompanhado nesta longa caminhada.

E aos meus familiares que, sempre torce por mim, em especial: meus irmãos e irmãs; Aciomar, Raimundinho, Nenê, Ivoneide, Ivonete e Cássia.

A meus filhos, Stanley, Edelaine e Elaine que eu amo tanto.

A minha tia, Erivan, Adelaide e a meu tio, Edvar.

Aos meus primos e primas; Dionísio, Francisco Antônio, Eveline, Liduina e os demais que eu não citei.

À minha orientadora Alexandra Mocellin, por todo apoio e amizade durante a orientação do trabalho.

À professora Maria Suely Pedrosa Mundim, por ter contribuído muito para a minha aprendizagem durante o período de mestrado.

Aos professores do IF-UnB que colaboraram com minha formação profissional, em particular: Alexandra, Suely, Pinzul, Ricardo, Arnaldo e Arsen.

Aos meus amigos: Edmar, Genilson, Felipe, Alexandre, Edilson, Paulinho, Renato, Felipe gordinho, Will, e os demais pela verdadeira amizade.

Ao professor Arnaldo Naves de Brito da Unicamp, por contribuir com a minha formação.

Aos funcionários do IF, pela ajuda e colaboração por todo apoio em prol desse trabalho no decorrer do curso.

Aos colaboradores e funcionários do LNLS, pelo auxílio prestado durante as medidas com luz síncrotron.

A todos, os meus amigos os meus sinceros agradecimentos.

Lista de Figuras

Figura 1: Ligações de hidrogênio de moléculas de água. Cada molécula de água liga outras quatro moléculas de água.	7
Figura 2: Ligações de hidrogênio por grupos funcionais.	8
Figura 3: A) Superior, estrutura genérica de um α -aminoácido (com exceção da prolina, um aminoácido cíclico). Abaixo, exemplos de α -aminoácidos com grupos laterais contendo anéis aromáticos. B) Esquema da ligação peptídica. C) Esquema da ligação dissulfeto. Adaptado de [16], [17].	10
Figura 4: Mostra os quatro possíveis tipos de estrutura das proteínas [20].	13
Figura 5: Esquema do processo de emissão de radiação síncrotron por elétrons relativísticos na presença de um campo magnético.	16
Figura 6: Foto do Hall Experimental do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).	17
Figura 7: Esboço do layout da linha de viga. EPU50: ondulador APPLE II de período de 50 mm; M1: espelho toroidal colimador; M2: espelho plano monocromador; G: grade plana VLS; ES: fenda de saída; M3a, M3b: espelhos de focagem toroidais para cada linha de ramificação [23].	18
Figura 8: Esquema de configuração da linha TGM, adaptada da referência [24].	19
Figura 9: Câmara Experimental da linha de Luz TGM: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).	20
Figura 10: Câmara Experimental da linha de Luz PGM: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.	21
Figura 11: Foto do microjato líquido que já está em funcionamento com um espectrômetro de elétrons e está montado no LNLS, [25].	22
Figura 12: Principais processos de excitação e relaxação eletrônica: Decaimento Auger ou Autoionização.	26
Figura 13: Esquema de um modelo simples do lado esquerdo e direito usados para estimar os fatores de enriquecimento superficial para soluções de aminoácidos a partir de concentrações conhecidas. Devido ao espalhamento inelástico, o sinal a uma profundidade x é atenuado por $e^{-x/\lambda}$	31
Figura 14: Esquema da Câmara dupla ionização usada no trabalho.	33
Figura 15: Estruturas químicas dos quatro aminoácidos investigados nas formas zwitteriônicas. O carbono COO é indicado em vermelho, a letra α está perto do carbono alfa,	

CC α , mostrado em verde. Todos os outros carbonos são identificados como cadeia lateral ou CCR	38
Figura 16: Estrutura molecular dos aminoácidos em função do pH do líquido	40
Figura 17: (a) Instantâneos para gotículas de água contendo diferentes aminoácidos. (b) Ligação de hidrogênio em moléculas de fenilalanina na superfície das gotas, figura retirada da Ref. [9].....	41
Figura 18: Espectros de fotoelétrons na borda do C1s (esquerda) e N1s (direita) de aminoácidos em solução aquosa, Glicina (GLY, azul), Alanina (ALA, verde), Metionina (MET, castanho) e Valina (VAL, vermelho). Os símbolos são os dados experimentais, as linhas contínuas são o ajustes total resultante e as linhas tracejadas são as componentes de ajuste individuais.	45
Figura 19: Áreas dos espectros de XPS para C1s e N1s dos quatro aminoácidos, respectivamente. O eixo x é representado graficamente começando com os carbonos da cadeia lateral, seguido pelo carbono alfa e o carbono do grupo carboxílico da molécula, e no lado direito da Figura, a área do N1s. As cores correspondem ao aminoácido: Glicina (GLY, azul), Alanina (ALA, verde), Metionina (MET, marrom) e Valina (VAL, vermelho).	46
Figura 20: Correlação entre o número de átomos na cadeia lateral e a concentração superficial para os aminoácidos estudados.....	48
Figura 21: Representação esquemática das moléculas estudadas para o pH neutro da solução.	53
Figura 22: Área normalizada para as amostras aquosas de Tmao, Betaína e Uréia em diferentes concentrações. Os espectros de XPS foram medidos na borda do C1s e as áreas totais foram normalizadas pelo número de átomos de C na molécula.	54
Figura 23: Mostra as ligações de hidrogênio entre o O do Tmao e 3H da água. Figura retirada da referência [52].....	54
Figura 24: Espectros na borda do C1s para o Tmao (superior), mix (meio) e uréia (inferior) nos pH's neutro (em azul) e ácido (em vermelho). O Tmao tem três átomos de carbono e a uréia um.	56
Figura 25: Espectros na borda do N1s para o Tmao (superior), mix (meio) e uréia (inferior) nos pH's neutro (em azul) e ácido (em vermelho). O Tmao tem um átomo de N e a uréia tem dois.	58

Figura 26: Na esquerda representação da molécula de Tmao e na direita a molécula de Tmao protonada, Tmaop, do artigo Elizabeth et al. [55]. O átomo de oxigênio está representado em vermelho, os nitrogênios em verde, o carbono em azul e os hidrogênios em branco.	61
Figura 27: Interação entre a uréia e o Tmao com três moléculas de água. Figura retirada do artigo [37].	63
Figura 28: Espectros na borda do C1s, comparando o Tmao, mix e uréia no mesmo espectro, para os pH's neutro (superior) e ácido (inferior).	65
Figura 29: Espectros na borda do N1s, comparando o Tmao, mix e uréia no mesmo espectro, para os pH's neutro (superior) e ácido (inferior).	66
Figura 30: Espectros na borda do C1s (superior) e N1s (inferior), para a mistura em duas proporções 1:1 e 1:2 de Tmao e uréia, respectivamente para os pH neutro.	67
Figura 31: Desenho esquemático de produção e purificação do ozônio.	70
Figura 32: Curva de generalização para o fluxo I_0 para os gases nobres.	72
Figura 33: Seções de Choque de fotoionização do Argônio do limiar de 15,3 eV a 21,3 eV.	73
Figura 34: Seções de Choque de fotoionização do Xenônio do limiar 13,44 eV a 21,3 eV.	74
Figura 35: Seção de choque de fotoabsorção do oxigênio. Curvas em vermelho dados atuais e em azul os dados de Fennelly. Estados eletrônicos do O_2^+ retirados da referência [88].	75
Figura 36: Seção de Choque de Absorção, a curva em vermelho nosso resultado e a em verde a de Cook.	76
Figura 37: Seção de Choque Absorção do O3, O2 e N2. A curva em vermelho temos o espectro do Ozônio, em verde o do Nitrogênio e a em azul o Oxigênio.	78
Figura 38: Seção de choque de Fotoabsorção do O3, O2 e N2. O espectro do N2 foi multiplicado à 12%, já o do O2 à 25%.	79
Figura 39: Seção de choque de Fotoabsorção e Fotoionização do O3. O espectro em vermelho é o de Fotoabsorção do O3 (—) de nosso trabalho, a curva em rosa é o espectro de Fotoionização do O3 (—), a curva em preto de Fotoionização da literatura referente ao de Cook (Δ).	80
Figura 40: Seção de choque de fotoionização do ozônio e Seção de choque parcial absoluta do O_3^+ , O_2^+ e decaimento neutro.	81

Lista de Tabelas

Tabela 1: Energias de ligação (BE) em eV, e as áreas relativas (Area) para os diferentes C1s e para o N1s da solução aquosa dos quatro aminoácidos investigados, obtidos a partir da regressão.	45
Tabela 2: Mostra a razão da área do pH neutro pela área do pH ácido para as diferentes soluções e na borda do C1s e N1s. As áreas dos picos foram obtidas por fitting com gaussiana e tem um erro relativo associado entre 1 e 3 %.	59
Tabela 3: Parâmetros experimentais ajustados para as bordas C1s e N1s do Tmao, uréia e mix aquosa em dois diferentes pH. O erro associado a BE e a FWHM, obtido a partir do fitting é menor que ± 0.01	60
Tabela 4: Razão entre as áreas do Tmao pela da Uréia para as amostras binárias, ou seja, Tmao+água e uréia+água, e para as amostras terciárias, que são os mix, Tmao+uréia+água.	64
Tabela 5: Potenciais de ionização determinados no espectro de TPES do O3 e sua designação, na região de 11,50 a 21,00 eV comparados com os dados de PES de Wiesner [91] e Katsumata [90], [92].	77

Sumário

<i>CAPÍTULO 1</i>	<i>1</i>
1.1 Introdução	1
<i>CAPÍTULO 2</i>	<i>5</i>
2	5
2.1 Fundamentos Teóricos e Experimentais	5
2.1.1 A água Líquida	5
2.1.2 A molécula de água	5
2.1.3 Quatro tipos de estrutura de proteínas	10
2.1.4 Métodos Experimentais	14
2.1.5 Microjato para Líquidos	21
2.1.6 Fundamentos Teóricos.....	24
2.1.7 Modelo simplificado.....	29
2.1.8 Seção de Choque de Fotoabsorção	32
2.1.9 A seção de choque de decaimento neutro.....	37
<i>CAPÍTULO 3</i>	<i>38</i>
3	38
3.1 Aminoácidos	38
3.1.1 Introdução.....	38
3.1.2 Resultados e Discussões	44
3.1.3 Conclusão	49
<i>CAPÍTULO 4</i>	<i>50</i>
4	50
4.1 Osmólitos	50
4.1.1 Introdução.....	50
4.1.2 Método experimental.....	50
4.1.3 Efeito da concentração do soluto em soluções aquosas de Tmao, Uréia e Betaína.....	52
4.1.4 Efeito da mudança do pH da solução no deslocamento químico e as diferentes espécies iônicas.	55
4.1.5 Efeito da mistura dos solutos e a influência na propensão a superfície	61
4.1.6 Conclusões.....	67

<i>CAPÍTULO 5</i>	68
5	68
5.1 Ozônio.....	68
5.2 Introdução	68
5.3 Resultados e discussões	71
5.3.1 Resultados e Discussões	71
<i>CAPÍTULO 6</i>	83
6	83
6.1 Conclusões Gerais.....	83
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	87
<i>APÊNDICE</i>	97

Siglas

- CCD (*Charge-coupled device*)
- CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)
- ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*)
- LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron)
- MCP (*Multi Channel Plate*)
- PEPICO (Photoelectron-Photoion-Coincidence)
- PES (*Photoelectron Spectroscopy*)
- TGM (*Toroidal Grating Monochromator*)
- PGM (*Plane Grating Monochromator*)
- TOF (*Time-of-flight*)
- u.m.a. (Unidade de massa atômica)
- UPS (*Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy*)
- UV (*Ultraviolet*)
- VUV (*Vacuum Ultraviolet*)
- XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*)
- O₃ (Ozônio)
- O₂ (Oxigênio)
- TMAO (N-óxido de Trimetilamina)

Capítulo 1

1.1 Introdução

Entender as interfaces aquosas a nível molecular não é apenas fundamentalmente importante, mas também altamente relevante para uma variedade de disciplinas. Por exemplo, interfaces eletrodo-água são relevantes para a eletroquímica, assim como as interfaces água-mineral para geoquímica e interfaces ar-água para a química ambiental; interfaces água-lipídio constituem os limites da membrana celular e, portanto, são relevantes para a bioquímica. Um dos grandes desafios nesses campos é vincular propriedades macroscópicas tais como reatividade interfacial, solubilidade e permeabilidade, bem como observáveis macroscópicas termodinâmicas e espectroscópicas, com a estrutura eletrônica, mudanças estruturais e dinâmica das moléculas nessas interfaces. Experimentos apropriados, sozinhos ou em conjunto com simulações computacionais, podem fornecer, tais informações em nível molecular para interfaces aquosas.

O presente trabalho tem por objetivo principal o estudo da superfície e das interfaces de soluções, de moléculas biológicas e osmólitos em solução aquosa, assim como o estudo da seção de choque da molécula de ozônio. Como solvente utilizamos a água, que é o solvente universal e fundamental para a vida e está presente em cerca de 71% da superfície do nosso planeta [1]. Ela está presente nas soluções aquosas, no meio ambiente, nos oceanos, no solo e em organismos vivos. A água está presente nas células biológicas, ela também controla os padrões de dobramento das proteínas e orienta o transporte através das membranas celulares [2]. Entender bem os fenômenos que acontecem nas interfaces aquosas, é de grande importância para várias áreas do conhecimento.

Em áreas como biologia, biotecnologia, diagnóstico e medicina, as interfaces aquosas são muito importantes, por exemplo, as biointerfaces, isto é, interfaces entre células, tecido biológico ou material orgânico com outro biomaterial ou material inorgânico/orgânico. Um outro exemplo, é a interface líquido-vapor da água que é de grande importância na atmosfera. Os biomateriais, isto é, os aminoácidos constituem uma fração importante dos compostos nitrogenados orgânicos solúveis em água em aerossóis e estão envolvidos em muitos processos na atmosfera.

A reação bioquímica em sistemas vivos ocorre em soluções aquosas contendo pequenas moléculas orgânicas, conhecidas como osmólitos. Essas moléculas afetam a

estabilidade de diferentes estruturas celulares [3]. Por exemplo, os osmólitos desnaturantes (por exemplo, ureia e sais) favorecem o estado desdobrado das proteínas enquanto que os osmólitos estabilizadores (por exemplo, Tmao e betaína) favorecem o estado dobrado [4], [5]. Os efeitos deste último podem ser comparados com os íons no lado esquerdo da série Hofmeister, que ajudam a estabilizar as estruturas nativas dobradas de proteínas. A regulação dos osmólitos pelos organismos vivos permite que eles sobrevivam a condições extremas que, de outro modo, seriam responsáveis por estruturas celulares instáveis. Conseqüentemente, verificou-se que os níveis de Tmao (N-óxido de Trimetilamina) nos músculos dos organismos do fundo do mar aumentam com a profundidade em que são capturados, possivelmente para neutralizar o efeito desestabilizador da pressão nas estruturas moleculares. Apesar dos estudos intensivos nesse assunto, os mecanismos atômicos do comportamento dos osmólitos ainda não são bem compreendidos.

Neste trabalho, fizemos também medidas de seções de choque de fotoabsorção e fotoionização para a molécula de ozônio na região do ultravioleta de vácuo. A interação de radiação ionizante com moléculas de ozônio, apesar de grande interesse, é um problema ainda em aberto. A compreensão da fotoquímica do ozônio acima do limite de ionização é de grande importância no entendimento da formação e destruição do ozônio na alta atmosfera. Tais estudos são fundamentais para modelagens mais realistas da atmosfera Terrestre e de grande interesse para a sociedade já que a camada de ozônio é um dos principais elementos que bloqueiam os raios ultravioleta nocivos aos seres vivos.

O ciclo de gases nitrogenados na atmosfera, diminui a concentração de ozônio através do processo de desnitrificação, isto é, o óxido nitroso (N_2O) na estratosfera se transforma em gás de óxido nítrico (NO). Esta mudança está relacionada a oxidação de N_2O pela radiação solar. Em seguida, o NO reage com O_3 , neste processo de reações químicas temos como produto o gás de óxido de nitrogênio [6].

O comportamento das interfaces aquosas de compostos químicos biológicos ou atmosféricos são relevantes em solução aquosa, tem sido estudado usando espectroscopia de fotoelétrons de raios-X sensíveis à superfície (XPS).

O presente trabalho tem como objetivo estudar soluções aquosas de quatro aminoácidos, glicina, alanina, valina e metionina, nas suas formas zwitteriônica através da técnica de XPS [7]. Compreender o osmólito Tmao em soluções aquosas, e fornecer conhecimentos básicos de como a vida se desenrola. Apresentar dados da seção de choque de fotoabsorção e fotoionização do ozônio não existentes na literatura.

Para interpretar os dados encontrados para os aminoácidos utilizamos os resultados de simulações de Dinâmica Molecular (MD) de seis aminoácidos, Serina (SER), Glicina (GLY), Alanina (ALA), Valina (VAL), Metionina (MET) e Fenilalanina (PHE), encontrados na literatura [7]–[9]. Os dois estudos indicam a influência de aminoácidos sobre a tensão superficial de líquidos e que a propensão superficial dos aminoácidos varia de acordo com o equilíbrio entre as partes hidrofóbicas e hidrofílicas [9]. Fornecer estimativas da concentração relativa, bem como a orientação de diferentes osmólitos na interface vapor-água. Comparar mecanismos de ação de diferentes osmólitos protetores; Tmao, betaína e glicina, bem como osmólitos desnaturantes; uréia e sais. Com base em medições recentes da tensão superficial da água de vapor, o mecanismo de estabilização do Tmao pode ser diferente do da betaína e da glicina. Além disso, nossa medida será útil para testar modelos computacionais de osmólitos.

Os aminoácidos foram medidos no Laboratório do Síncrotron Max II, em Lund, na Suécia, na linha de luz de Undulator [10], [11], equipado com um analisador de energia de elétrons hemisférico, Scienta R4000, anexado a uma câmara experimental projetada para estudos de micro-jato líquidos em XPS. Os dados experimentais dos osmólitos e ozônio foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP. Utilizamos as linhas de luz PGM (*Plane Grating Monochromator*) e TGM (*Toroidal Grating Monochromator*). Na linha PGM medimos os aminoácidos e os osmólitos em solução aquosa com a técnica de Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS). Para essas medidas usamos a câmara do SCIENTA que é equipada com um espectrômetro semi-esférico de XPS para alta pressão da Scienta e com um sistema de microjatos para amostras líquidas. Na linha TGM, fizemos as medidas de seção de choque do ozônio com a câmara de ionização. No caso da PGM usamos fótons de energia entre 300 e 1000 eV promovendo a ionização simples e medindo os fotoelétrons da camada interna das moléculas. Na TGM usamos fótons de mais baixa energia, da ordem de 11 a 30 eV causando a ionização de elétrons das camadas de valência da molécula de ozônio e medimos os íons positivos.

Para as soluções aquosas utilizamos a Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X que é uma ferramenta que nos dá informação sobre a estrutura eletrônica de amostras gasosas, líquidas ou sólidas. Esta técnica combina a seletividade química dos elementos e a sensibilidade a superfície das amostras. Esta técnica requer o sistema em vácuo tornando-a muito difícil de ser aplicada a líquidos dentro dos procedimentos convencionais. Contudo, o desenvolvimento da técnica de microjato por Manfred Faubel *et al.* [12] em 1988, permitiu que líquidos com

alta pressão de vapor (p_v), que é o caso da água ($p_v=4.6Torr$), tivessem suas propriedades de superfície estudadas via espectroscopia de elétrons.

A espectroscopia de amostras líquidas é uma espectroscopia bastante recente que surgiu a partir do desenvolvimento da técnica de micro jatos [2]. Onde a amostra líquida é introduzida na câmara experimental com um jato de aproximadamente 15 μm a alta velocidade que é congelado logo após interagir com a luz. Isso faz com que o vácuo na câmara experimental seja o suficiente para permitir as medidas. Paralelo a isso, é necessário colocar os espectrômetros em sub-câmaras da câmara principal permitindo um alto vácuo na região de detecção. Isso permite que possamos medir espectros de elétrons e íons de amostras líquidas [4].

Essa tese está dividida em 6 capítulos. O capítulo 1 - Introdução. No capítulo 2 - Fundamentos Teóricos e Experimentais; são apresentados os aspectos teóricos, incluído a água líquida, interações em soluções, quatro tipos de estrutura de proteínas, desnaturação e renaturação de proteínas, micro-jato, modelo simplificado, seção de choque de fotoabsorção e decaimento neutro. No capítulo 3 - Aminoácidos; nesse capítulo apresentamos uma introdução geral dos aminoácidos estudados, resultados/discussões e conclusão. No capítulo 4 - Tmao; apresentamos uma introdução geral dos osmólitos estudados, método experimental, efeito da concentração do soluto em soluções aquosas de Tmao, Uréia e Betaína, efeito da mudança do pH da solução no deslocamento químico e as diferentes espécies iônicas, efeito da mistura dos solutos e a influência na propensão a superfície e conclusão. No capítulo 5 - Ozônio; apresentamos a molécula de ozônio, método experimental, produção de ozônio, resultados/discussões e conclusão. No capítulo 6 – Conclusões Gerais. Referências Bibliográficas e Apêndice.

Capítulo 2

2.1 Fundamentos Teóricos e Experimentais

2.1.1 A água Líquida

A água é encontrada na natureza na forma: líquida, sólida e gasosa. Boa parte de nossa crosta terrestre é coberta por água no estado líquido. Sem ela não seria possível vida na Terra, portanto, a água líquida, é essencial para todos os processos da vida. O líquido mais precioso de nosso planeta é o maior solvente universal que conhecemos, é uma molécula composta de um átomo de oxigênio e dois átomos de hidrogênio, que possui algumas anomalias extraordinárias que distinguem esse líquido de outros. A água expande quando congelada, mas é mais densa a baixa temperatura do que na sua forma sólida, razão pela qual o gelo flutua na superfície de lagos. A origem microscópica de muitas de suas propriedades macroscópicas ainda não está totalmente explicada e os cientistas de hoje tentam conceber uma imagem detalhada dos papéis e propriedades da água.

Raramente encontramos água em sua forma pura, mesmo com a quantidade abundante que temos em nosso planeta. Ela é encontrada em soluções aquosas em nosso meio ambiente, nas nuvens, mares, oceanos, nos lençóis freáticos ou em organismos vivos. A água controla os padrões de enovelamento das proteínas e orienta o transporte através das membranas celulares. Na atmosfera, a água existe como vapor e em pequenas gotículas de aerossol, que têm uma alta relação superfície-volume. Isso significa que a superfície é importante, especialmente para esses pequenos sistemas, mudanças na superfície das partículas pode levar a variações substanciais de suas propriedades. A água na região da superfície serve como mediador de transições entre a fase gasosa e a fase líquida. Assim, a água interfacial dos sistemas ambientais produz características essenciais para os processos de transição e ciclo natural da água.

2.1.2 A molécula de água

A molécula de água é formada por um átomo de oxigênio (O) que está ligada a dois átomos de hidrogênio (H) de maneira covalente. Dependendo do estado físico da água, os ângulos e as distâncias formados entre o oxigênio e os dois hidrogênios podem ser diferentes. No estado gasoso, o ângulo (α) é de $104,5^\circ$ e comprimento da ligação O-H é de 0.957854 \AA , de acordo com os cálculos atuais[13], resultados experimentais nos mostram $\alpha_{Exp} =$

104,474° e $HO_{Exp} = 0.95718 \text{ \AA}$ [14]. A configuração eletrônica da molécula de água no estado fundamental pode ser expressa da seguinte forma:

$$(1a_1)^2(2a_1)^2(1b_2)^2(3a_1)^2(1b_1)^2$$

O orbital molecular mais interno ($1a_1$) apresenta um aspecto bem aproximado do orbital $O1s$ do oxigênio, que é ligeiramente perturbado. Dependendo dos orbitais moleculares eles podem estar envolvidos relativamente ou totalmente em ligações, ou não participar de ligações, isto é, os orbitais ($2a_1$) e ($3a_1$) estão ligeiramente envolvidos em ligações, já ($1b_2$) é completamente presente em ligações sendo que o ($1b_1$) não tem participação em ligações [15].

2.1.2.1 Interações em soluções

A carga nuclear do oxigênio presente na molécula de água é +8. Em razão do oxigênio ser mais eletronegativo atrai mais elétrons ficando relativamente com carga negativa, enquanto o hidrogênio fica com carga positiva, aparecendo assim um dipolo elétrico. As interações eletrostáticas entre solutos e espécies de solvente em misturas podem ocorrer da seguinte forma: íon-dipolo, dipolo-dipolo, ionização induzidas. Nas espécies não-polares são regidas predominantemente pelas forças mais fraca de Van der Waals. As interações mais fortes são formadas entre espécies iônicas e água.

A molécula de água é formada por duas ligações covalentes O - H, sendo H - O - H sua fórmula estrutural. O átomo de oxigênio possui seis elétrons na camada de valência, portanto são necessários mais dois elétrons para que ele atinja estabilidade eletrônica. O átomo de hidrogênio possui apenas um elétron, sendo necessário para sua estabilidade mais um elétron (camada K = dois elétrons). Portanto, na molécula de água há o compartilhamento de um par de elétrons entre cada átomo de hidrogênio com o átomo de oxigênio.

O átomo de oxigênio possui quatro orbitais. Dois deles estão "envolvidos" com as ligações O - H, e dois estão "livres". Existe uma repulsão entre os orbitais livres, que causa uma aproximação entre as ligações O - H.

O átomo de oxigênio é mais eletronegativo que o de hidrogênio, ou seja, o núcleo do oxigênio atrai os elétrons envolvidos na ligação O - H mais fortemente que o núcleo do hidrogênio. Essa propriedade é decisiva na polaridade da molécula de água, uma vez que

torna o oxigênio mais negativo (com os elétrons mais próximos) e o hidrogênio mais positivo (com os elétrons mais afastados). Ou seja, a molécula de água é polar, sendo o oxigênio seu pólo negativo ($2\delta^-$, já que são dois elétrons a mais) e os hidrogênios seus pólos positivos (δ^+ , um elétron a menos para cada átomo).

Como a água é uma molécula polar, o pólo positivo de uma molécula atrai o pólo negativo de outra, o que resulta em uma atração eletrostática. Essa atração é chamada ligação de hidrogênio (ou ponte de hidrogênio), e ocorre entre átomos de hidrogênio com oxigênio, nitrogênio ou fluor.

Outra característica das ligações de hidrogênio é a rapidez com que elas se formam e são quebradas. A todo instante moléculas de água estão interagindo entre si, formando ligações de hidrogênio que duram de um a vinte picos segundos ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$). Quando uma ligação se quebra, imediatamente outra se forma.

Uma molécula de água pode fazer ligações de hidrogênio com até outras quatro moléculas, mas isso só ocorre quando a água está solidificada. No estado líquido, cada molécula faz, em média, três ligações de hidrogênio, devido ao aumento da entropia (grau de desordem do sistema), ver Figura 1, mostra as ligações de hidrogênio para as moléculas de água. As ligações de hidrogênio, portanto, influenciam nos estados físicos da água. A água seria gasosa em temperatura ambiente se não fossem as ligações de hidrogênio que causam uma maior organização entre suas moléculas, conferindo-a estado líquido na temperatura ambiente e alto ponto de ebulição.

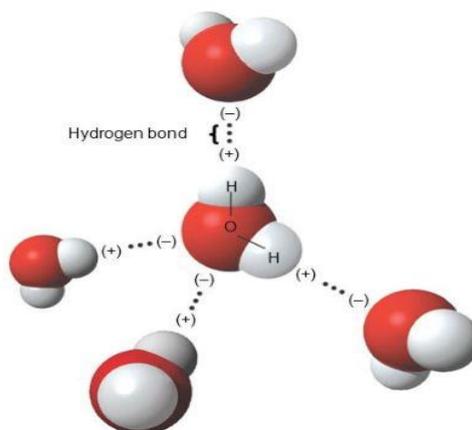


Figura 1: Ligações de hidrogênio de moléculas de água. Cada molécula de água liga outras quatro moléculas de água.

A água é um solvente polar que possui afinidade por moléculas polares. Isto quer dizer que tais moléculas se dissolvem com facilidade no meio aquoso porque podem substituir

as interações pré-existentes entre as moléculas de água (interações “água-água”) por outras entre a água e o soluto (interações “água-soluto”) que são energeticamente mais favoráveis que as primeiras. Se, entretanto, as moléculas a serem dissolvidas forem apolares, elas interferirão nas interações água-água mas não formarão interações água-soluto energeticamente favoráveis. As interações água-água e água-soluto, responsáveis por esse e outros fenômenos, podem ser, principalmente, ligações de hidrogênio [16], [17].

Vale ressaltar que esse tipo de interação não é exclusiva entre moléculas de água, e ocorrerá sempre entre um átomo eletronegativo (chamado aceitador de hidrogênio; como oxigênio e nitrogênio) e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo (chamado doador de hidrogênio) na mesma molécula ou em outra, como por exemplo, ver Figura 2 que mostra ligações de hidrogênio entre grupos funcionais e moléculas de água.

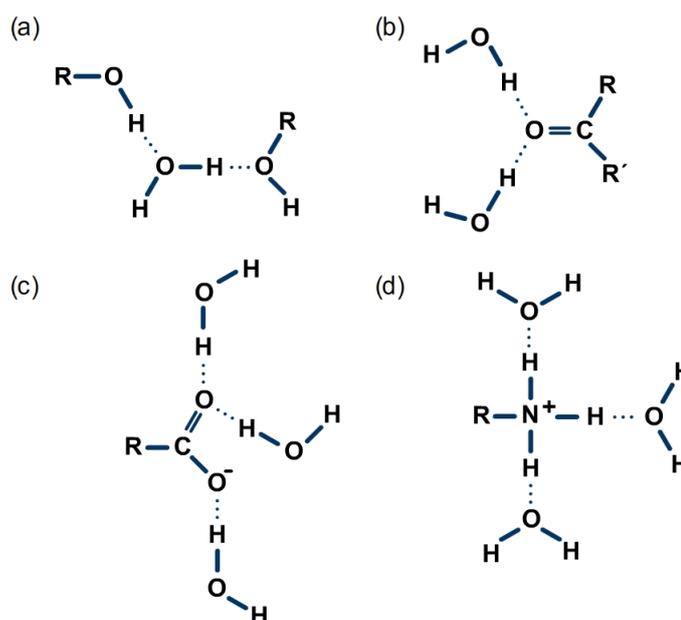


Figura 2: Ligações de hidrogênio por grupos funcionais.

Portanto, um soluto polar ou carregado forma uma mistura homogênea com a água, já que todas as suas moléculas (ou quase todas, dependendo do coeficiente de solubilidade) interagem com a água e ficam separadas umas das outras, “cercadas” pela água [16].

Quando um composto apolar - como o óleo, por exemplo - é misturado à água, forma-se uma solução heterogênea. Isso ocorre porque tais compostos não possuem carga nem pólos, ou seja, não têm regiões que possam interagir com a molécula de água, pois a água

não forma ligações de hidrogênio com moléculas apolares. A fim de fazer o maior número de ligações de hidrogênio possível, as moléculas de água orientam-se em volta da substância apolar e a envolvem, de modo que uma rede de ligações de hidrogênio é formada ao redor de um soluto apolar. As moléculas de água “forçam” as apolares a se agruparem. Dessa forma, a superfície de contato entre soluto e água é menor e, portanto, a rede de ligações de hidrogênio formada também. Membranas celulares e grandes compostos moleculares, como proteínas, por exemplo, adotam sua forma em função dessa relação entre a água e os compostos apolares: as membranas organizam-se em bicamada para “esconder” a cauda dos seus fosfolipídeos; as proteínas organizam-se para “esconder” seus aminoácidos apolares [18]. Contudo, como essa configuração é energeticamente desfavorável, seja porque água não possui afinidade pelas porções apolares, seja porque a entropia do sistema diminui devido à estruturação das moléculas do solvente, há a tendência das partes apolares se aproximarem com a conseqüente expulsão das moléculas de água da camada de solvatação. Neste processo conhecido como dessolvatação, a entropia do sistema aumenta e, como as partes polares tendem a maximizar o contato com o solvente por causa da afinidade, o resultado é a formação de aglomerados mais estáveis numa configuração agora energeticamente favorável. As “forças” que mantêm as porções apolares juntas resultam das chamadas interações hidrofóbicas, que têm sua origem associada à estabilização termodinâmica [19].

Associadas também a interações eletrostáticas estão as interações iônicas, que acontecem necessariamente entre grupos carregados, e as interações de van der Waals, que ocorrem entre átomos neutros. A força de Van der Waals é bastante fraca e existe entre qualquer molécula que esteja próxima de outra Aminoácidos e Proteínas.

As proteínas são polímeros biológicos compostos por aminoácidos. A ligação entre os aminoácidos é denominada ligação peptídica, do tipo covalente, e ocorre entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino de outro, com liberação de água (Figura 3B). Devido a essa alteração química, os aminoácidos que participam da ligação peptídica passam a ser chamados de resíduos. Além da ligação peptídica existe também a ligação dissulfeto, que ocorre particularmente entre dois α - aminoácidos cisteína originando o dímero cistina (Figura 3 C) e é muito importante na estrutura de várias proteínas já que é cerca de 10 vezes mais forte do que as interações fracas mencionadas abaixo.

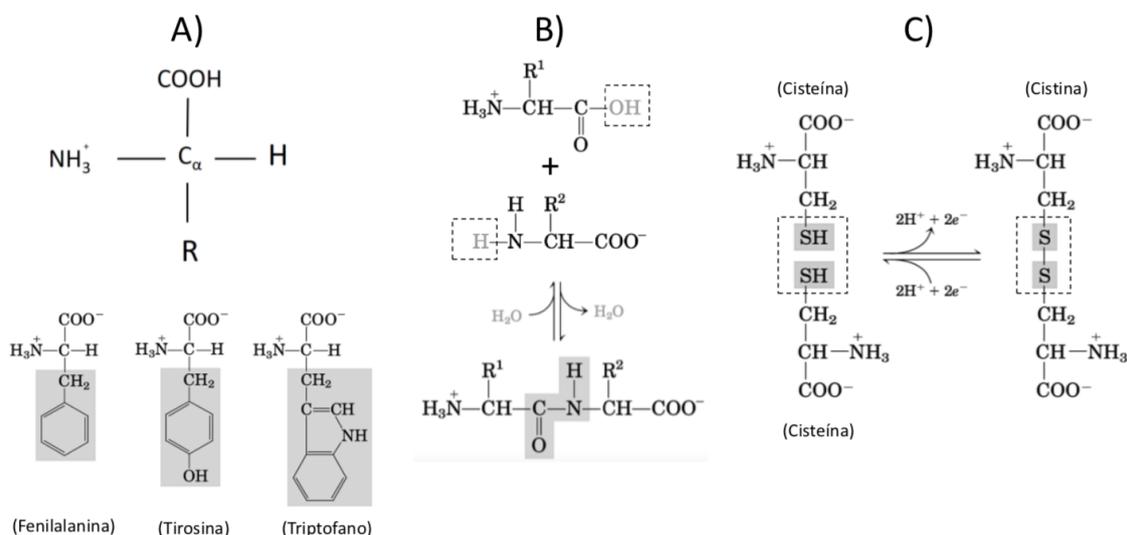


Figura 3: A) Superior, estrutura genérica de um α -aminoácido (com exceção da prolina, um aminoácido cíclico). Abaixo, exemplos de α -aminoácidos com grupos laterais contendo anéis aromáticos. B) Esquema da ligação peptídica. C) Esquema da ligação dissulfeto. Adaptado de [16], [17].

Uma ou mais cadeias polipeptídicas torcidas na forma 3-D formam uma proteína. As proteínas têm formas complexas que incluem várias dobras, loops e curvas. A dobragem de proteínas acontece espontaneamente. A ligação química entre porções da cadeia polipeptídica ajuda a manter a proteína unida e a dar sua forma.

2.1.3 Quatro tipos de estrutura de proteínas

Os quatro níveis de estrutura da proteína são diferenciados um do outro pelo grau de complexidade na cadeia polipeptídica. Uma única molécula de proteína pode conter um ou mais dos tipos de estrutura proteica: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária [20].

2.1.3.1 Estrutura Primária

Descreve a ordem única na qual os aminoácidos estão ligados para formar uma proteína. As proteínas são construídas a partir de um conjunto de 20 aminoácidos. Geralmente, os aminoácidos têm as seguintes propriedades estruturais:

Um carbono central (o carbono alfa) ligado aos quatro grupos abaixo:

- Um átomo de hidrogênio (H)

- Um grupo carboxil (-COOH)
- Um grupo Amino (-NH₂)
- Um grupo "variável" ou um grupo "R", chamado de cadeia lateral ou radical

Todos os aminoácidos têm o carbono alfa ligado a um átomo de hidrogênio, a um grupo carboxila, a um grupo amino e a um grupo "R". O grupo "R" varia entre os aminoácidos e determina as diferenças entre esses monômeros de proteínas. A sequência de aminoácidos de uma proteína é determinada pelas informações encontradas no código genético celular. A ordem dos aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é única e específica para uma proteína específica. Alterar um único aminoácido causa uma mutação genética, que geralmente resulta em uma proteína que não funciona.

Do ponto de vista de uma organização hierárquica, serão formadas, num primeiro momento, organizações locais denominadas estrutura secundária da proteína Figura 4. A partir da interação dessas estruturas locais com o solvente, via principalmente interação hidrofóbica/van der Waals e ligações de hidrogênio, serão formadas organizações de um nível maior que recebem o nome de estrutura terciária da proteína, Figura 4. Proteínas com mais de duas sequências de resíduos, como insulina (duas sequências) e hemoglobina (quatro sequências) possuem ainda a estrutura quaternária, Figura 4.

2.1.3.2 Estrutura Secundária

Refere-se ao enrolamento ou dobragem de uma cadeia polipeptídica que confere à proteína sua forma 3-D. Existem dois tipos de estruturas secundárias observadas nas proteínas. Um tipo é a estrutura da hélice alfa (α). Essa estrutura se assemelha a uma mola espiralada e é protegida por ligação de hidrogênio na cadeia polipeptídica. O segundo tipo de estrutura secundária nas proteínas é a folha plissada beta (β). Esta estrutura parece estar dobrada ou pregueada e é mantida unida por ligação de hidrogênio entre as unidades polipeptídicas da cadeia dobrada que ficam adjacentes uma à outra.

2.1.3.3 Estrutura terciária

Refere-se à estrutura 3-D abrangente da cadeia polipeptídica de uma proteína. Existem vários tipos de ligações e forças que mantêm uma proteína em sua estrutura terciária.

- As interações hidrofóbicas contribuem muito para o dobramento e modelagem de uma proteína. O grupo "R" do aminoácido é hidrofóbico ou hidrofílico. Os aminoácidos com grupos hidrofílicos "R" buscarão contato com seu ambiente aquoso, enquanto os aminoácidos com grupos hidrofóbicos "R" buscarão evitar a água e se posicionar em direção ao centro da proteína.
- A ligação de hidrogênio na cadeia polipeptídica e entre os grupos de aminoácidos "R" ajuda a estabilizar a estrutura da proteína mantendo a proteína na forma estabelecida pelas interações hidrofóbicas.
- Devido ao dobramento de proteínas, a ligação iônica pode ocorrer entre os grupos "R" com carga positiva e negativa que entram em contato próximo.
- A dobragem também pode resultar em ligação covalente entre os grupos "R" de aminoácidos cisteína. Esse tipo de ligação forma o que é chamado de ponte dissulfeto. Interações chamadas forças de van der Waals também ajudam na estabilização da estrutura da proteína. Essas interações pertencem às forças atrativas e repulsivas que ocorrem entre moléculas que se polarizam. Essas forças contribuem para a ligação que ocorre entre as moléculas.

2.1.3.4 Estrutura quaternária

Refere-se à estrutura de uma macromolécula de proteína formada por interações entre várias cadeias polipeptídicas. Cada cadeia polipeptídica é referida como uma subunidade. As proteínas com estrutura quaternária podem consistir em mais de um do mesmo tipo de subunidade proteica. Elas também podem ser compostas de diferentes subunidades.

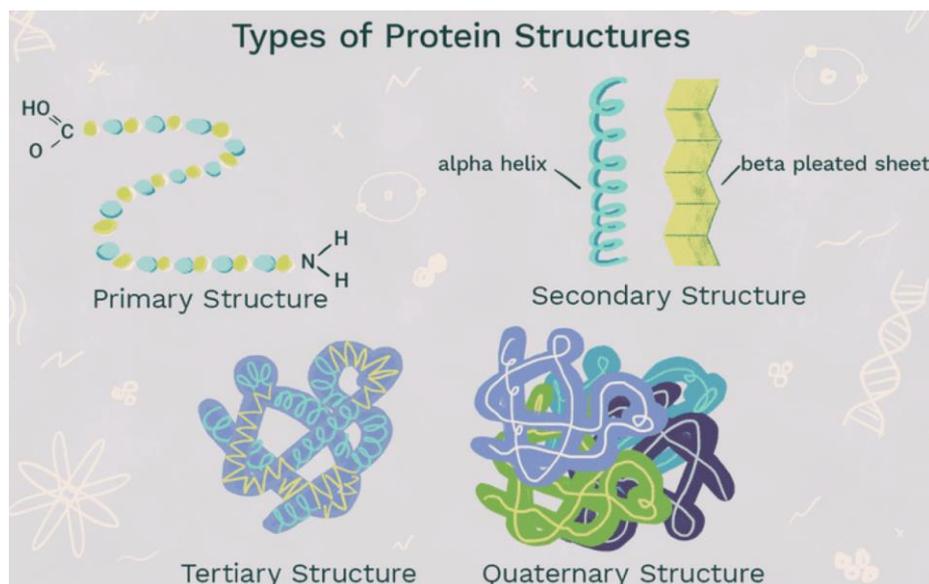


Figura 4: Mostra os quatro possíveis tipos de estrutura das proteínas [20]

2.1.3.4.1 Desnaturação e renaturação das proteínas

Desnaturação e renaturação são fenômenos físicos fundamentais para os processos de replicação, transcrição e recombinação da molécula de DNA. A desnaturação ocorre quando as pontes de hidrogênio entre as cadeias complementares se rompem e as fitas se separam. O inverso é chamado de renaturação, e permite que todas as propriedades originais da molécula sejam restabelecidas.

A função e atividade da proteína são ditadas pelo sequenciamento de aminoácidos (estrutura primária) e por sua forma (estrutura secundária e terciária), oriunda do processo de enovelamento. A desnaturação proteica, que pode ser influenciado por diversos fatores, ocorre quando há a perda da função da proteína devido à alteração de sua forma tridimensional. Solventes orgânicos miscíveis em água (como álcool), solutos (como ureia) e surfactantes atuam principalmente rompendo as interações hidrofóbicas que mantêm o núcleo de proteínas estável. A ureia, assim como a elevação de temperatura, é capaz de romper as ligações de hidrogênio. A alteração do pH da solução promove mudança na carga líquida da proteína, causando desestabilização eletrostática da estrutura, o que também faz romper as ligações de hidrogênio.

A desnaturação da estrutura secundária do DNA pode ser obtida em solução por aumento da temperatura, por titulação com ácidos ou bases e por agentes desnaturantes, com a formamida, dimetil-sulfóxido (DMSO) e ureia.

Em altas temperaturas ou pH extremos o DNA sofre desnaturação, isto porque ocorre ruptura das pontes de hidrogênio entre os pares de bases. Durante a desnaturação nenhuma ligação covalente é desfeita, ficando, portanto, as duas fitas de DNA separadas. Quando o pH e a temperatura voltam ao normal, as duas fitas de DNA espontaneamente se enrolam formando novamente o DNA dupla fita. Este processo envolve duas etapas: uma mais lenta, pois envolve o encontro casual das fitas complementares de DNA, formando um curto segmento de dupla hélice; e outra mais rápida, envolvendo a formação das pontes de hidrogênio entre as bases complementares, reconstruindo a conformação tridimensional.

Podemos variar o pH da água líquida adicionando um ácido ou uma base. Para alterar o pH das amostras fizemos os seguintes procedimentos; adicionamos ácido clorídrico (HCl) para aumentar a concentração de (H^+), e a adição de hidróxido sódio (NaOH) para diminuir a concentração de (H^+). A constante de ionização (k_a) de uma solução aquosa pode ser definida como:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}, \quad (2.1)$$

onde os valores entre colchetes representam as concentrações de (H^+), da base conjugada de HA , A^- e do próprio HA . Com o auxílio da constante ionização podemos definir o pK_a como:

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]}. \quad (2.2)$$

2.1.4 Métodos Experimentais

2.1.4.1 Radiação Síncrotron

A luz síncrotron foi observada pela primeira vez de um feixe de luz proveniente do anel de armazenamento em um laboratório da General Electric em 1947 [21]. Após esse período, surgiram muitas pesquisas e avanços tecnológicos que destacaram a radiação síncrotron como uma ferramenta eficaz para as diversas áreas do conhecimento. Devido a sua grande importância, foram criados laboratórios exclusivos entre as décadas de 1960 e 1970. Estes laboratórios tinham como base ímãs de dipolo para produção de luz síncrotron, chamados de segunda geração. Já os laboratórios mais modernos, isto é, os de terceira

geração, utilizam dispositivos de inserção mais modernos, tais como onduladores e wigglers, com esses dispositivos o feixe de elétrons fica altamente colimado e tem alto brilho.

A radiação síncrotron é produzida a partir da aceleração de partículas carregadas, tais como elétrons e outras partículas em orbitas circulares. Esses elétrons viajam com velocidades próximas a da luz ($v/c \leq 1$). Estas partículas tem a sua trajetória curvada por campos magnéticos produzidos pelos ímãs de dipolo, durante essa curvatura, elas emitem radiação eletromagnética, ver Figura 5. A radiação emitida está entre a faixa do infravermelho e de raios-X.

O formato do feixe é de um cone muito estreito na direção de propagação dos elétrons. Sendo que seu ângulo de abertura é de aproximadamente $2\gamma^{-1}$ onde,

$$\gamma = \frac{E}{m_0 c^2} \quad (2.3)$$

o termo E representa energia total e o termo $m_0 c^2$ a energia da massa de repouso dos elétrons. Na prática, pacotes de elétrons viajam pelo anel de armazenamento, assim, podemos escrever a potência total radiada como sendo:

$$P_{tot}[kW] = 8.85 \cdot 10^{-2} \frac{E^4[GeV]}{R[m]} \cdot I[mA] \quad (2.4)$$

esta não é a potência total emitida em uma energia por comprimento de onda, e sim, a espalhada por todo espectro emitido.

A partir das equações da eletrodinâmica clássica podemos obter as equações que caracterizam a radiação síncrotron, relacionado a partículas carregadas em movimento relativístico circular. A potência total radiada (P_{tot}) é um importante parâmetro do anel de armazenamento. Podemos assumir que para N elétrons a intensidade de radiação é igual a N vezes a de um único elétron. Temos que, a potência total radiada de cada elétron, quando desviado por um campo magnético B , é dada por:

$$P = \frac{2e^2}{3R^2} (\beta\gamma)^4 \quad (2.5)$$

o termo e representa a carga do elétron, c a velocidade da luz e R o raio de curvatura do magneto de dipolo, já o termo β , é igual a (v/c) onde v representa a velocidade do elétron e c a velocidade da luz, que é aproximadamente 1.

Chamamos de radiação síncrotron a energia eletromagnética emitida por partículas carregadas com velocidades relativísticas. As principais características da radiação síncrotron são:

- sua alta intensidade e a ampla faixa espectral de energia, indo do infravermelho até os raios-X duros;
- a radiação síncrotron é extremamente colimada, linearmente polarizada no plano da órbita e elipticamente polarizada abaixo e acima do plano;
- pode ser emitida de modo pulsado (estrutura temporal formada por pulsos bem curtos com intervalos da ordem de aproximadamente 311 ns para o LNLS) a partir da aceleração periódica de pacotes de elétrons.

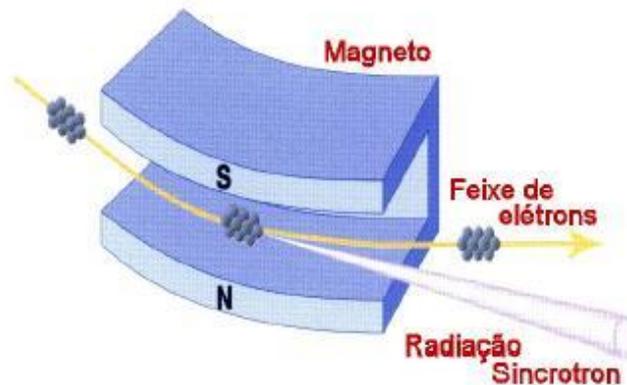


Figura 5: Esquema do processo de emissão de radiação síncrotron por elétrons relativísticos na presença de um campo magnético.

2.1.4.2 Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), inaugurado em 1997, é considerado um laboratório de segunda geração. Este laboratório é aberto a usuários do Brasil e do exterior. A boa infraestrutura dá condições aos cientistas realizarem pesquisas com alto nível de competitividade internacional. O laboratório é mantido por recursos federais. O LNLS possui 16 linhas de luz com estações experimentais instaladas na fonte de luz síncrotron. Na

Figura 6, podemos observar hall experimental, onde são realizados os experimentos, que contribuem para o conhecimento em Física, Química, Biologia e Engenharia de Materiais, etc [22].



Figura 6: Foto do Hall Experimental do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), fica em Campinas, suas linhas de luz são utilizadas por diversos pesquisadores brasileiros e estrangeiros em busca de novos conhecimentos sobre átomos e moléculas [22].

O LNLS possui um canhão de elétrons, estes são injetados em um acelerador linear chamado de (LINAC) até a uma energia de 120 MeV. Depois de acelerados pelo LINAC, eles são injetados em um acelerador circular (BOOSTER), neste acelerador estas partículas atingem 500 MeV, após alcançarem essa energia eles são injetados no anel de armazenamento. No anel de armazenamento os elétrons são novamente acelerados, até atingir a energia de operação 1,37 GeV.

Neste ano de 2019, o LNLS foi fechado e desativado para os usuários, para o término da construção do novo síncrotron brasileiro de quarta geração, sendo o segundo no mundo deste tipo, o SIRIUS. O SIRIUS está previsto para entrar em operação parcialmente em 2020.

2.1.4.3 Linha PGM

A estação experimental PGM (Planar Grating Monochromator), ver Figura 7. Ela é a primeira linha de feixe baseada em ondulator do LNLS e cobre a faixa de energia de cerca de 100 a 1000 eV. O Ele é um monocromador de grade planar baseado em uma geometria ótica (PGM), é composta por duas linhas que oferecem uma variedade de estações finais para a comunidade de usuários. Nesta contribuição, apresentamos o layout óptico da linha de feixe, com alguns detalhes sobre seus componentes. Essa linha é utilizada para diversos estudos, por exemplo: o estudo das propriedades eletrônicas, magnéticas e estruturais dos materiais. A PGM conta com, instrumentação para microscopia e fotoemissão em líquidos.

A Figura 7 é um esboço do layout da linha de viga. A fonte é um ondulator elipticamente polarizador (EPU) produzido no próprio LNLS. Ele é um ondulator do tipo APPLE II de 2,7 m de comprimento e 50 mm de comprimento, instalado em uma seção reta do anel de armazenamento de 1,37 GeV UVX do LNLS [23].

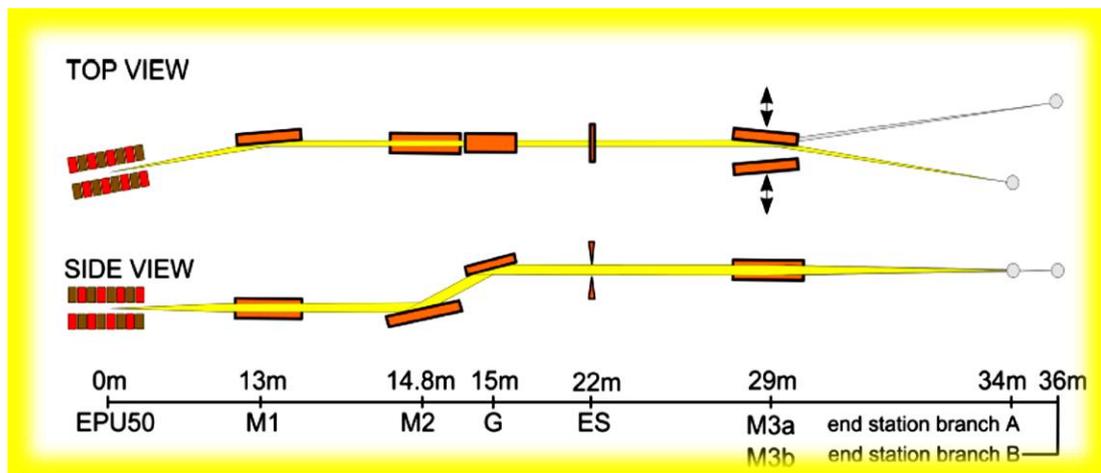


Figura 7: Esboço do layout da linha de viga. EPU50: ondulator APPLE II de período de 50 mm; M1: espelho toroidal colimador; M2: espelho plano monocromador; G: grade plana VLS; ES: fenda de saída; M3a, M3b: espelhos de focagem toroidais para cada linha de ramificação [23].

2.1.4.4 Linha TGM

A radiação sincrotron tem um amplo intervalo espectral que permite a seleção de uma determinada faixa do espectro emitido. Isso só é possível, devido ao conjunto de instrumentos óticos, tais como: monocromadores, espelhos e grades de difração que compõem

a linha de luz. Estes instrumentos além de selecionar a energia dos fótons, eles filtram e focalizam uma faixa de energia de fótons desejada.

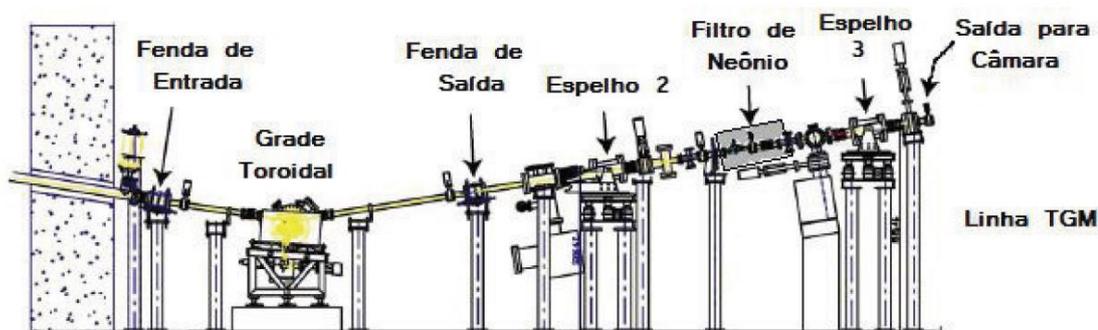


Figura 8: Esquema de configuração da linha TGM, adaptada da referência [24].

No Laboratório Nacional Luz Síncrotron (LNLS) a linha de luz TGM foi a primeira a ser colocada em operação. Essa linha de luz opera na faixa do ultravioleta aos raios X moles. Ela fornece fótons com energia variando de 7,4 a 310 eV (os valores atualizados no período da redação do presente texto, nas medidas realizadas a energia mínima era de 10,8 eV).

A linha TGM mostrada de esquemática na Figura 8, possui espelhos toroidais, utilizados para focalizar o feixe, e um monocromador composto de três grades de difração toroidais, que tornam possível selecionar três faixas distintas de energia. Dois espelhos E2 e E3 que focalizam o feixe no centro da câmara experimental. Nessa linha de luz se construiu um filtro de harmônicos entre os espelhos E2 e E3. Na próxima seção falaremos com mais detalhes sobre o filtro de harmônicos [24].

Na Figura 9, temos a câmara rotativa, nessa câmara temos um espectrômetro de massa por tempo de voo (TOF) acoplado a ela, também podemos ver na figura o nariz dela, na parte superior o manipulador da agulha, do lado o controle de válvula solenoide com as controladoras e um filtro de harmônicos.

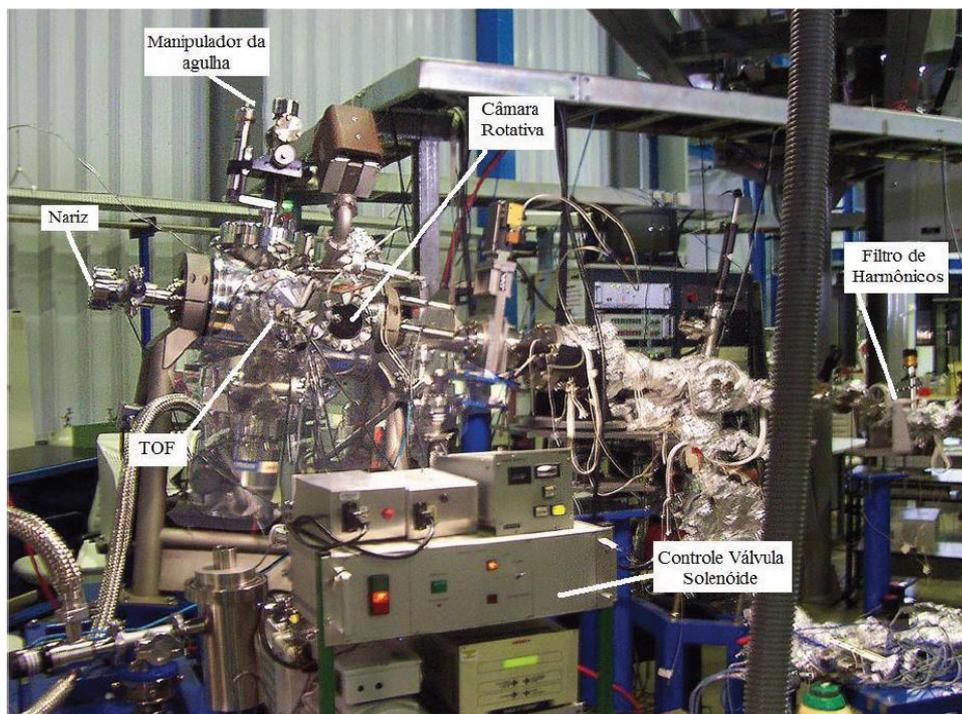


Figura 9: Câmara Experimental da linha de Luz TGM: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

2.1.4.5 Filtro de Harmônicos

A radiação síncrotron tem vários comprimentos de ondas. Quando um feixe de luz com diversos comprimentos de onda atravessa uma grade de difração, esse feixe pode emergir em alguns ângulos com energias $h\nu$, $2h\nu$, $3h\nu$ e assim por diante. A linha de luz TGM possui um filtro de gás, no caso o gás neônio, que consiste de uma seção reta preenchida de gás e separada das outras partes da linha de luz por bombeamento diferencial. Assim que a radiação passa pelo filtro, fótons de energias superiores a 21,54 eV são absorvidos, já os que possuem energias mais baixas que atravessam o filtro e chegam a estação experimental. Essa energia de 21,54 eV corresponde a borda de absorção do gás Ne. Com esse filtro, obtemos medidas mais confiáveis, pois não existem os harmônicos superiores de energia no feixe de fótons.

2.1.4.6 Câmara Experimental

Utilizamos a técnica experimental de Espectroscopia de elétrons da linha PGM para medir as nossas amostras. Na Figura 10, temos a câmara Experimental Scienta, ela pode ser usada para estudos tanto de amostras gasosas ou líquidas sob condições de altas pressões. Na parte esférica superior da câmara fica o analisador de elétrons de alta resolução (SCIENTA) que pode ser observada na Figura 10. Também na mesma figura podemos ver uma armadilha

de nitrogênio líquido acoplada no seu lado direito, já no seu lado esquerdo temos o micro-jato e seu sistema de bombeamento.



Figura 10: Câmara Experimental da linha de Luz PGM: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

2.1.5 Microjato para Líquidos

As técnicas espectroscópicas requerem sistemas em vácuo, tornando-as muito difíceis de serem aplicadas a líquidos dentro dos procedimentos convencionais. Contudo, desenvolvimentos da técnica de microjato têm tornado estes estudos factíveis, ver Figura 11. Na técnica de microjato o líquido é pressurizado (pressões de aproximadamente 50 bar) e direcionado por um bico de quartzo com diâmetro interno da ordem de poucos microns, que o injeta no interior de uma câmara de vácuo. O líquido é expelido a uma velocidade muito alta, permitindo que as medidas sejam feitas em fase líquida próximas a saída do bico. A alta pressão é dada por uma bomba de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Precisão), com pressões da ordem de 0 a 6.000 psi (0 a 41,37 MPa). A bomba HPLC utilizada é o modelo Waters 510 da marca Millipore. Um pouco mais distante do bico, o jato se separa em pequenas gotas que são congeladas devido ao resfriamento por evaporação, possibilitando estudos em misturas congeladas.



Figura 11: Foto do microjato líquido que já está em funcionamento com um espectrômetro de elétrons e está montado no LNLS, [25].

2.1.5.1 Espectroscopia de Líquidos

Compreender a natureza das reações químicas que ocorrem em superfícies líquidas constitui uma área de pesquisa que desperta interesse em diversos campos, incluindo geologia, química atmosférica, catálise, e biologia. Para a compreensão da química de superfície de um líquido é necessário um conhecimento detalhado da própria superfície deste líquido. No entanto, apesar da enorme quantidade de dados termodinâmicos acumulados para superfícies líquidas de solventes puros e soluções binárias, uma descrição microscópica abrangente de interfaces líquido/vapor permanece indefinida [26].

Uma condição muito importante que deve ser satisfeita para que a espectroscopia de líquidos seja possível, é que para que os fotoelétrons consigam sair da superfície e alcançar o espectrômetro o produto da pressão de vapor, P , pela espessura da camada de vapor, d , deve satisfazer a seguinte equação:

$$Pd = \int_{R_{jato}}^{R_{espec}} P(r) dr = P_0 R_{jato} (\ln R_{espec} - \ln R_{jato}), \quad (2.6)$$

onde R_{jato} é o raio do jato, R_{espec} é a posição radial da entrada do espectrômetro medido do centro do jato, e P_0 é a pressão de vapor de equilíbrio local correspondente na superfície do jato. Para evitar o espalhamento inelástico no vapor em medidas de espectroscopia UPS, a espessura efetiva da camada de vapor deve satisfazer a condição $P \cdot d \leq 0,10 \text{ Torr} \cdot \text{mm}$ ($1,3 \times 10^1 \text{ Pa} \cdot \text{mm}$). Isso corresponde a $R_{espec} < 1 \text{ mm}$ e $R_{jato} < 5 \text{ } \mu\text{m}$. Estes valores equivalem a

limitar a pressão de vapor da superfície do líquido a $P_0 \leq 0,30$ Torr ($4,0 \times 10^1$ Pa), o que é muito menor que o valor de pressão de vapor da água, por exemplo, que é igual a 4,6 Torr ($6,1 \times 10^2$ Pa) a 273K.

Para amostras livres de colisão em superfícies líquidas o diâmetro do jato d_{jato} deve ser menor que o livre caminho médio, λ_{gas} , das moléculas de gás no equilíbrio térmico correspondente:

$$d_{jato} < \lambda_{gas} \quad (2.7)$$

Jatos de líquido da ordem de poucos microns de diâmetro são necessários para conseguir manter a pressão de trabalho da ordem de 1×10^{-6} mbar (1×10^{-3} Pa), fazendo com que uma área relativamente pequena do líquido esteja exposta ao vácuo. Jatos muito pequenos (10 μ m) permitem ter uma quantidade de vapor de líquido pequena dentro da câmara experimental e então ser possível fazer vácuo. A vazão ou quantidade de água por segundo colocada no vácuo, V_{liq} , é dada pelo produto da velocidade pela área [25]:

$$V_{liq} = v \cdot A = v \pi r^2 \quad (2.8)$$

Pelo princípio de Bernoulli, a velocidade de um líquido escoando em fluxo contínuo é dada por:

$$v = \sqrt{\frac{2p}{\rho}} \quad (2.9)$$

A quantidade de vapor saindo do micro-jato com o tempo, V_{evap} , pode ser estimada considerando-se a quantidade de calor transferida na mudança de fase de água para vapor, Q_{evap} :

$$Q_{evap} = \alpha V_{evap} \quad (2.10)$$

onde α é o calor de vaporização.

O calor total retirado do líquido, ao esfriá-lo, Q_{liq} , é dado por:

$$Q_{liq} = c_p V_{liq} (T_f - T_i), \quad (2.11)$$

onde c_p é a capacidade térmica. Como as quantidades de calor são iguais, $Q_{evap} = Q_{liq}$, podemos escrever a partir das expressões do calor, para uma variação de 20 K na temperatura da água, e usando os valores tabelados de α e c_p da água, $V_{evap}/V_{liq} = 4\%$.

Podemos usar as expressões 2.8 e 2.9 para estimar a quantidade de água colocada no vácuo por tempo. Para um jato de água ($\rho = 1,00 \times 10^3 \text{ Kg/m}^3$) de 10 μm pressurizado a 725 psi (5,00 MPa), obtém-se $v = 100 \text{ m/s}$ e a quantidade de água colocada no vácuo será $V_{liq} = 28,3 \text{ cm}^3/\text{h}$ (28,3 ml/h). Então a quantidade de vapor saindo do micro-jato com o tempo, $V_{evap} = 1,13 \text{ cm}^3/\text{h}$ (1,13 ml/h), que é uma quantidade mínima tornando possível a espectroscopia de amostras líquidas.

A pressão alta de injeção do líquido, da ordem de megaPa, e o diâmetro muito pequeno do capilar são necessários para se ter um espaço para medidas, depois que o líquido sai do capilar, da ordem de 1 mm, depois disso o líquido forma gotículas e se esfria muito devido à baixa pressão. Também, é necessário para que a quantidade de vapor ao redor do jato de líquido seja pequena para que se possa fazer espectroscopia sem interferência do vapor, ou seja, para que o elétron não sofra espalhamento inelástico.

2.1.6 Fundamentos Teóricos

2.1.6.1 Espectroscopia de Fotoelétrons (XPS)

A (PES) Espectroscopia de fotoemissão (Photo Emission Spectroscopy), também conhecido como espectroscopia de Fotoelétrons [27], são usadas para medir a energia cinética de elétrons ejetados a partir de sólidos, líquidos ou gases, e assim, determinar as energias de ligação dos elétrons em uma substância. A técnica de PES tem outros nomes como, XPS (Espectroscopia de Fotoemissão de Raios X) e UPS (Espectroscopia de Fotoemissão de Ultra

Violeta) dependendo da energia do fóton utilizada na ionização do sistema. A espectroscopia de fotoelétrons analisa os elétrons ejetados da superfície da amostra estudada.

Kai Siegbahn em 1957 [27], [28] desenvolveu a Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X (XPS) usada para estudar os níveis de energia dos elétrons mais internos, principalmente em sólidos. Ele chamou esta técnica de ESCA, *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*, espectroscopia de elétrons para análise química, que permite a determinação da estrutura química do material, devido aos pequenos deslocamentos químicos da vizinhança do átomo ionizado.

A Espectroscopia de Fotoelétrons por Ultravioleta (UPS) é usada para estudar os níveis de energia de valência e ligação química, especialmente os orbitais moleculares.

2.1.6.2 Princípios Físicos

Para qualquer tipo de radiação eletromagnética a energia de um fóton é dada pela seguinte equação:

$$E = h\nu \quad (2.12)$$

onde h é a constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34} J \cdot s$) e ν a frequência em (Hz) da radiação.

Na técnica de espectroscopia de fotoelétrons usam-se fontes monocromáticas. Tanto a técnica XPS quanto UPS tem como base o efeito fotoelétrico, que pode ser escrito por:

$$E_K = h\nu - W \quad (2.13)$$

onde E_K é a energia cinética do fotoelétron emitido e W é a função trabalho. Podemos fazer uma abordagem do efeito fotoelétrico para átomos e moléculas, basta apenas introduzirmos a energia de ligação para expressão:

$$h\nu = E_B + E_K \quad (2.14)$$

Neste caso assume-se que a energia total do fóton foi absorvida pelo átomo ou molécula no processo de fotoionização. Os fotoelétrons só serão produzidos caso $h\nu \geq E_B$. Essa expressão nos diz também que o excesso de energia será carregado pelo fotoelétron

ejetado na forma de energia cinética e que esse excesso de energia é dado pela diferença entre a energia do fóton e a energia de ligação desse elétron no sistema.

2.1.6.3 As Transições Eletrônicas

2.1.6.4 Elétron de Caroço e de Valência

A estrutura eletrônica de átomos ou moléculas podem ser divididas em elétrons de orbitais de valência (orbitais mais externos) e orbitais de caroço (orbitais mais internos). Os elétrons dos orbitais de valência são aqueles que ficam nas camadas mais externas dos átomos ou moléculas e são eles responsáveis pelas ligações químicas, devido as interações entre dois ou mais átomos, que podem ocorrer por doação ou compartilhamento de elétrons.

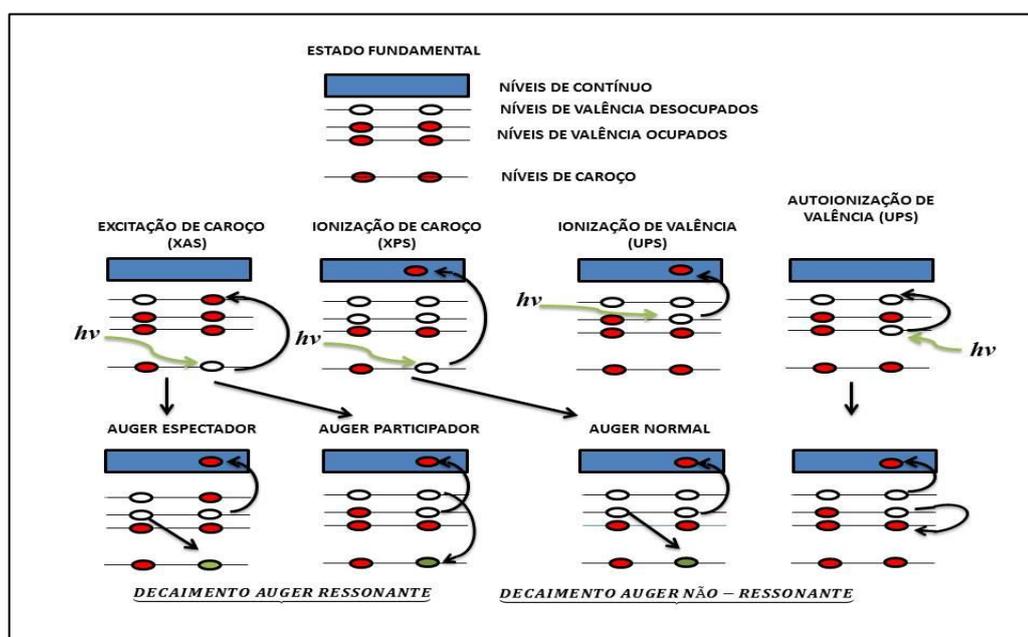


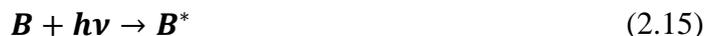
Figura 12: Principais processos de excitação e relaxação eletrônica: Decaimento Auger ou Autoionização.

No texto abaixo explicaremos cada um dos processos de fotoabsorção e relaxação representados na Figura 12, assim, proporcionando um melhor entendimento ao leitor.

2.1.6.5 Fotoexcitação

Se durante um processo de fotoabsorção a energia do fóton for suficiente para promover a excitação de um elétron de um orbital ocupado para um desocupado ou

parcialmente desocupado, o sistema B ficará em um estado excitado. Pode ser representado pela expressão:



o símbolo (*) representa que o estado está excitado.

Após este processo, é emitido um fóton de energia igual a transição realizada, ou convertendo o excesso de energia em energia cinética de um elétron arrancado, devido a relaxação da molécula.

2.1.6.6 Fotoionização

Quando um fóton interage com um átomo ou molécula, pode ocorrer a ionização dos mesmos, caso a energia do fóton seja maior ou igual à energia de ligação do elétron no átomo ou molécula, um elétron será ejetado e ocorrerá a relaxação do sistema. Podemos escrever esse processo da seguinte forma:



Na Figura 12 podemos ver que pode ocorrer a ionização tanto de elétrons dos níveis de caroço quanto dos níveis de valência, pelo processo de fotoionização. A ionização dos elétrons de orbitais de valência ocorrem em menores energias, por possuírem menor energia de ligação e por estarem mais afastados dos núcleos dos átomos ou moléculas. Já os elétrons de caroço tem maior energia de ligação, por eles estarem mais próximos dos núcleos dos átomos ou moléculas. Portanto, se encontram mais fortemente ligados, então é necessário uma energia do fóton maior.

2.1.6.7 Decaimento Auger

No processo de ionização ou excitação de elétrons de camadas internas o sistema vai se encontrar num estado eletrônico altamente excitado. Assim ocorrerá um rearranjo eletrônico que chamamos de decaimento Auger. Neste processo o estado intermediário é uma vacância de um orbital de camada interna.

Podemos ver Figura 12, que o processo de decaimento, acontece da seguinte forma; a vacância deixada pelo elétron de caroço é preenchida pelo decaimento de um elétron de valência. O excesso de energia devido ao processo de decaimento é liberada por emissão de fótons com a energia característica da transição (fluorescência) ou em um decaimento não radiativo na emissão de elétron Auger de uma camada de valência. Com o decaimento Auger o sistema ficará num estado de dupla ou de simples ionização, isso vai depender se o sistema foi inicialmente ionizado ou excitado, respectivamente.

Após o processo de fotoionização ocorrerá o decaimento de um elétron Auger normal conhecido como Não-Ressonante, esse elétron irá preencher a vacância de camada interna deixada pelo elétron que foi ionizado. Se olharmos a Figura 12, iremos entender melhor o que ocorre. Explicaremos aqui então, após a ionização do elétron, um outro elétron decai do sistema para preencher a vacância deixada pelo elétron que foi ionizado, em seguida um segundo elétron é emitido deixando o sistema num estado de dupla ionização com duas vacâncias, o excesso de energia na forma de energia cinética, é levada pelo elétron Auger no contínuo, ver Figura 12. Dada pela equação:



a energia cinética do elétron Auger é dada pela diferença de energia do estado ionizado no caroço com uma vacância e o estado final com duas vacância de valência.

2.1.6.8 Decaimento Auger Ressonante

No processo de excitação de caroço temos o decaimento Auger ressonante que pode ser descrito a partir da equação (2.15):



onde a energia cinética do elétron Auger ressonante é a diferença de energia entre o estado excitado de caroço e o estado final simplesmente ionizado.

No decaimento Auger Participador, o elétron que foi excitado tem participação direta no processo de relaxação preenchendo a vacância do estado excitado e deixando o sistema

num estado final de um buraco. Já, no processo Auger Espectador, o decaimento ocorre via outro elétron de valência e o elétron inicialmente excitado permanece no mesmo orbital, resultando em um estado final de duas vacâncias de valência. Ambos os processos estão esquematizados na Figura 12.

2.1.6.9 Livre Caminho Médio Inelástico

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 $e^{-x/IMFP}$, onde x 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.

2.1.7 Modelo simplificado

Para determinar o enriquecimento dos aminoácidos na superfície, podemos usar um modelo simplificado com uma camada superficial e um *bulk*, ver Figura 13. A intensidade total dos picos de aminoácidos, adequadamente normalizados (isto é, fluxo de fótons, tempo de medição, concentração e número de átomos contribuintes) é uma soma das contribuições de moléculas/íons no *bulk* e na superfície:

$$I_{Total} = I_{Superficie} + I_{Bulk} \quad (2.19)$$

As intensidades do *bulk* e superfície observadas dependem das respectivas concentrações, c , e fatores de sensibilidade, n (descrevendo o aumento da sensibilidade para a camada superficial) e uma constante comum k (contendo seção choque, fatores geométricos, etc., que desaparecerá abaixo):

$$I_{Total} = k(n_s c_s + n_b c_b) \quad (2.20)$$

A concentração do *bulk*, c_b , é conhecida e queremos determinar o enriquecimento relativo da superfície, c_s / c_b .

A contribuição do *bulk*, $kn_b c_b$, pode ser estimada usando uma amostra de referência de uma espécie quimicamente similar com contribuição de superfície insignificante, isto é $c_s \approx 0$, para esse propósito podemos usar a glicina:

$$I_{Total,glicina} = kn_b c_{b,glicina} \quad (2.21)$$

Nós, assim, aproximamos a contribuição do *bulk* de qualquer aminoácido com a contribuição do *bulk* da glicina:

$$kn_b c_b = I_{Total,glicina} \quad (2.22)$$

Ao combinar (2.19) e (2.21) obtemos uma expressão para o sinal da superfície:

$$kn_s c_s = I_{Total} - I_{Total,glicina} \quad (2.23)$$

Agora, temos expressões relacionadas com as intensidades totais observadas experimentalmente para separar as contribuições do *bulk* (2.22) e da superfície (2.23). Fazendo a razão entre (2.22) e (2.23), obtemos a expressão para o enriquecimento superficial relativo c_s / c_b :

$$c_s / c_b = n_b / n_s (I_{Total} / I_{Total,glicina} - 1) \quad (2.24)$$

Para estimar a relação dos fatores de sensibilidade n_b / n_s , usamos um modelo simples com uma camada superficial de espessura D e um caminho livre médio inelástico, λ , para os fotoelétrons.

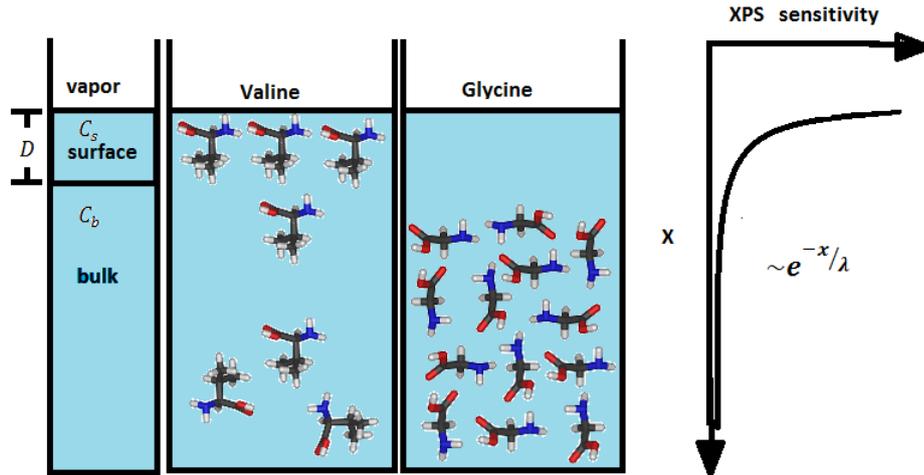


Figura 13: Esquema de um modelo simples do lado esquerdo e direito usados para estimar os fatores de enriquecimento superficial para soluções de aminoácidos a partir de concentrações conhecidas. Devido ao espalhamento inelástico, o sinal a uma profundidade x é atenuado por $e^{-x/\lambda}$.

n_b é então proporcional à integral,

$$n_b = \int_D^{\infty} e^{-x/\lambda} dx = \lambda^{-1} e^{-D/\lambda} \quad (2.25)$$

n_s é então proporcional à integral ,

$$n_s = \int_0^D e^{-x/\lambda} dx = \lambda^{-1} [1 - e^{-D/\lambda}] \quad (2.26)$$

Ao combinar as equações (2.24), (2.25) e (2.26), obtemos a seguinte relação entre a concentração de moléculas na superfície pela do bulk:

$$\frac{c_s}{c_b} = \frac{\left(\frac{I_{Total}}{I_{Total, glicina}} - 1 \right) e^{-D/\lambda}}{\left(1 - e^{-D/\lambda} \right)} \quad (2.27)$$

Podemos determinar a concentração superficial de cada aminoácido, desde que façamos algumas suposições sobre a relação D/λ .

2.1.8 Seção de Choque de Fotoabsorção

A probabilidade de a luz ser absorvida está vinculada diretamente com a seção de choque de fotoabsorção σ_a . Imagine a luz incidente I_x passando por uma camada de espessura infinitesimal de uma área A cuja espessura é dx , e a densidade do número de moléculas por unidade de volume n , sendo assim podemos expressar o número de moléculas irradiadas pela luz incidente de intensidade I_x com $nAdx$. Então a área efetiva total das moléculas presentes é $\sigma_a n dx$. Podemos agora expressar através de uma expressão matemática a possibilidade de a luz ser absorvida por uma espessura dx é dada por [29]:

$$-\frac{dI_x}{I_x} = \frac{\sigma_a n A}{A} dx \quad (2.28)$$

onde dI_x é a variação na intensidade através da espessura dx . Aplicando a integral e resolvendo ela em ambos os lados, temos:

$$\int_{I_0}^I \frac{dI_x}{I_x} = -\int_0^x \frac{\sigma_a n A}{A} dx \quad (2.29)$$

$$\frac{I}{I_0} = \exp[-\sigma_a n L] \quad (2.30)$$

A equação (2.30), é a equação de Beer-Lambert que mostra uma relação de decaimento exponencial entre a luz incidente de intensidade, I_0 que quando passa em um material de concentração molar n e de espessura L , e é absorvido, sendo a intensidade I , a intensidade da luz transmitida.

Utilizamos a técnica da câmara dupla de ionização para determinar a seção de choque fotoabsorção, σ_a proposta por Samson et. al [30] e a câmara adaptada por Homem et al. [31] e utilizada para este trabalho, consiste num ambiente de interação de fótons com moléculas. Este método nos permite obter as medidas das intensidades dos fluxos I e I_0 , sem a necessidade de fazer a medida direta da intensidade desses fluxos. Neste procedimento, duas câmaras de íons semelhantes posicionadas uma atrás da outra, elas coletam ao mesmo

tempo as medidas das correntes de íons feitas com o gás na célula. Esta câmara é formada por três placas. Duas placas de coletas de íons, C_1 e C_2 , e uma placa refletora com potencial negativo para garantir que todos os íons formados possam ser capturados pelas duas placas coletoras. As correntes de íons coletados, i_1 e i_2 , conforme o esquema na Figura 14, são monitoradas por eletrômetros independentes para uma dada pressão do gás na célula em função das energias dos fótons. Desse modo, podemos usar a câmara dupla de ionização para definir as seções de choque de fotoabsorção e fotoionização, e a eficiência quântica de fotoionização γ [29].

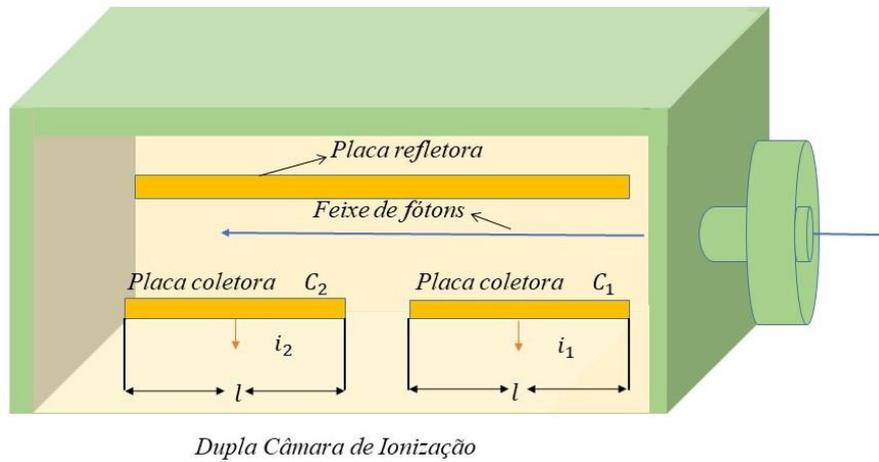


Figura 14: Esquema da Câmara dupla ionização usada no trabalho.

A razão do número de partículas criadas por fótons absorvidos é chamada de eficiência quântica, γ . Fazendo a relação das intensidades com as correntes coletadas nas placas coletoras e com a carga do elétron, e , pela equação:

$$i = e\gamma(I_0 - I) \quad (2.31)$$

Dividimos a equação (2.31) por I_0 temos a equação (2.32).

$$i = eI_0\gamma\left(1 - \frac{I}{I_0}\right) \quad (2.32)$$

Fazendo a substituição da equação (2.30) em (2.32), teremos as correntes coletadas nas placa C_1 e C_2 , dada por:

$$i_1 = eI_0\gamma \left[1 - \frac{I_0 \exp(-\sigma_a nL)}{I_0} \right] = eI_0\gamma [1 - \exp(-\sigma_a nL)] \quad (2.33)$$

Somando as correntes i_1 e i_2 coletadas nas placas C_1 e C_2 teremos a equação (2.34) que podemos colocá-la em função da corrente i_2 como:

$$i_1 + i_2 = eI_0\gamma \left[1 - \frac{I_0 \exp(-2\sigma_a nL)}{I_0} \right] = eI_0\gamma [1 - \exp(-2\sigma_a nL)] \quad (2.34)$$

$$i_2 = eI_0\gamma [1 - \exp(-2\sigma_a nL)] - eI_0\gamma [1 - \exp(-\sigma_a nL)]$$

$$i_2 = eI_0\gamma \exp(-\sigma_a nL) [1 - \exp(-\sigma_a nL)] \quad (2.35)$$

Dividindo a equação (2.33) pela equação (2.35), temos:

$$\frac{i_1}{i_2} = \frac{eI_0\gamma [1 - \exp(-\sigma_a nL)]}{eI_0\gamma \exp(-\sigma_a nL) [1 - \exp(-\sigma_a nL)]} \quad (2.36)$$

$$\frac{i_1}{i_2} = \frac{1}{\exp(-\sigma_a nL)} = \exp(\sigma_a nL) \quad (2.37)$$

A seção de choque de fotoabsorção, σ_a , para uma dada energia, é obtida tomando o logaritmo em ambos os lados desta equação. Fazendo isso, obtemos a seguinte expressão:

$$\sigma_a(E) = \frac{1}{nL} \ln \left(\frac{i_1}{i_2} \right) \quad (2.38)$$

Sabemos que n é a densidade molecular do gás que está interagindo com o feixe. Em condições de gás ideal, e a partir da equação geral dos gases nobres, podemos determinar o n :

$$n = \frac{PN_a}{RT} \quad (2.39)$$

$$\sigma_a(E) = \frac{RT}{PN_a L} \ln\left(\frac{i_1}{i_2}\right) \quad (2.40)$$

Nos experimentos realizados, as pressões foram obtidas por um medidor capacitivo, modelo Baratron 622B com as seguintes características: mede pressões absolutas entre 1 mbar a 1 bar, com a precisão de 0,05%. As correntes foram medidas por 02 eletrômetros Keithley, modelo 6514, que medem correntes elétricas de 100pA até 21 mA usando 10 faixas de medição.

Aplicando o mesmo método da câmara dupla de ionização, conseguiremos obter a seção de choque de fotoionização σ_i , que é definida como sendo [29]:

$$\sigma_i = \gamma\sigma_a \quad (2.41)$$

O rendimento quântico (γ) é a porcentagem de íons formados pelo número de fótons absorvidos. Para átomos, o rendimento quântico é de 100% ou 1, ou seja, cada fóton absorvido forma um íon. Para as moléculas, o rendimento quântico é menor que 100%, e cresce em função da energia do fóton podendo chegar a 100%.

Podemos definir a eficiência quântica de fotoionização, γ de maneira análoga que fizemos nas equações anteriores, mas com um único passo diferente, isto é, em vez de somarmos as equações faremos a diferença entre as equações (2.33) e (2.34).

$$i_1 - i_2 = eI_0\gamma(1 - \exp[-\sigma_a nL]) - eI_0\gamma \exp[-\sigma_a nL](1 - \exp[-\sigma_a nL])$$

$$i_1 - i_2 = eI_0\gamma(1 - \exp[-\sigma_a nL])(1 - \exp[-\sigma_a nL])$$

$$i_1 - i_2 = eI_0\gamma(1 - \exp[-\sigma_a nL])^2 \quad (2.42)$$

Elevando a equação (2.33) ao quadrado, temos:

$$i_1^2 = (I_0 e \gamma)^2 (1 - \exp[-\sigma_a nL])^2 \quad (2.43)$$

Dividindo a equação (2.43) pela equação (2.42), temos:

$$\frac{i_1^2}{i_1 - i_2} = \frac{(I_0 e \gamma)^2 (1 - \exp[-\sigma_a n L])^2}{e I_0 \gamma (1 - \exp[-\sigma_a n L])^2} \quad (2.44)$$

O resultado da razão entre a equação (2.43) pela equação (2.42), nos dá uma relação entre as correntes coletadas nas placas no interior da câmara de dupla ionização e o fluxo incidente, que é dada por:

$$\frac{i_1^2}{i_1 - i_2} = e I_0 \gamma \quad (2.45)$$

Agora podemos escrever a equação (2.45) em função da energia, como:

$$\gamma(E) = \frac{i_1^2}{e I_0 (i_1 - i_2)} \quad (2.46)$$

Para determinarmos a eficiência quântica de fotoionização de uma determinada molécula é necessário conhecer o fluxo de fótons, $e I_0$. Neste caso, para encontrarmos o valor de $e I_0$ usamos os gases nobres, Argônio e Xenônio para os quais podemos considerar a eficiência quântica igual a 1 [29]. O primeiro potencial de ionização do xenônio é de 12,13 eV, porém na região entre 12,9 a 13,4 eV o gás apresenta estruturas auto ionizantes fortes que atrapalha a obtenção da seção de choque de fotoabsorção/fotoionização. As medidas foram feitas no LNLS e a corrente do anel decresce exponencialmente com o tempo. Para minimizar os efeitos devido à variação da corrente do anel em função do tempo fizemos tanto medidas rápidas quanto lentas das correntes. As medidas rápidas das amostras, em função da energia, foram feitas com passo de 0,1 eV e tempo de aquisição de 0,1 segundos. As medidas rápidas servem para normalizar a intensidade das medidas lentas. As medidas lentas das correntes das amostras, em função da energia, foram feitas com passo de 0,01 eV e tempo de aquisição de 0,1 segundos, com isto obtemos o perfil da seção de choque de fotoabsorção da amostra. Medidas rápidas dos gases nobres imediatamente após as medidas das amostras foram realizadas, com essas medidas obtêm-se o fluxo de fótons ($e I_0$), pela equação (2.45).

2.1.9 A seção de choque de decaimento neutro

O fragmento não ionizado pelo fóton é conhecido como seção de choque de decaimento neutro (σ_n), representado pela seguinte equação

$$\sigma_n = \sigma_a - \sigma_i \quad (2.47)$$

Ou

$$\sigma_n(E) = [1 - \gamma(E)]\sigma_a(E) \quad (2.48)$$

Capítulo 3

3.1 Aminoácidos

3.1.1 Introdução

Embora existam centenas de aminoácidos encontrados no meio interestelar [32], todas as proteínas que compõem o corpo humano são formadas por apenas 20 deles. Uma das hipóteses para a criação da vida na Terra, do ponto de vista molecular, inclui, em seu primeiro passo, a combinação de moléculas mais simples com fontes de energia dando origem a outras moléculas mais complexas.

Devido a grande importância dos aminoácidos, as suas propriedades físico-químicas se tornaram objeto de estudos, e são de interesse da bioquímica, astroquímica e astrofísica [33].

Todos os aminoácidos contêm (pelo menos) um grupo funcional amina ($-\text{NH}_2$) e um carboxílico ($-\text{COOH}$). Em um ambiente aquoso de baixo pH, tipicamente abaixo de 2,2, a forma predominante tem um grupo carboxílico neutro e um grupo amônia positivo ($-\text{NH}_3^+$), resultando em uma carga líquida na molécula de +1, enquanto que a pH elevado, tipicamente acima de 9,4, terá um carboxilato negativo ($-\text{COO}^-$) e um grupo amina neutro, resultando em uma carga líquida de -1, ver Figura 16. Em um pH intermediário, os aminoácidos geralmente têm tanto um carboxilato negativo quanto um grupo amônia positivo, formando um zwitterion com carga líquida zero, ver Figura 15 e Figura 16.

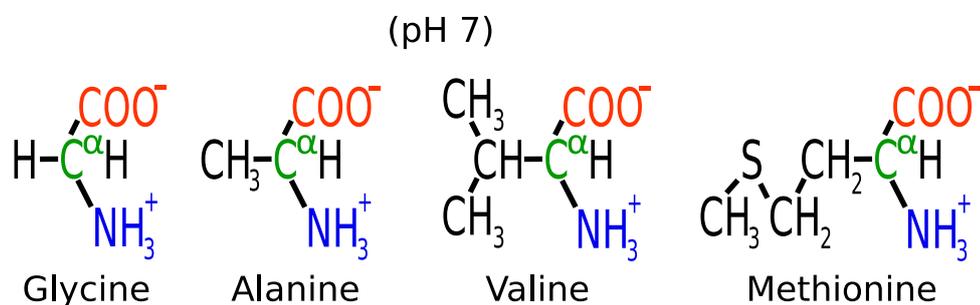


Figura 15: Estruturas químicas dos quatro aminoácidos investigados nas formas zwitteriônicas. O carbono COO é indicado em vermelho, a letra α está perto do carbono alfa, $\text{C}\alpha$, mostrado em verde. Todos os outros carbonos são identificados como cadeia lateral ou CCR

Os aminoácidos constituem uma fração importante dos compostos nitrogenados orgânicos solúveis em água em aerossóis e estão envolvidos em muitos processos na atmosfera. Descobrimos que os aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas e tamanho menor, GLY e ALA, tendem a permanecer no *bulk* do líquido, enquanto os aminoácidos hidrofóbicos e maiores, VAL e MET, se concentram mais na superfície. Encontramos evidências experimentais de que os aminoácidos têm orientação preferencial em relação à superfície, sendo que a cadeia lateral hidrofóbica fica mais próxima a superfície do que o grupo carboxílico hidrofílico. A propensão a superfície observada nos aminoácidos tem implicações na ciência atmosférica, uma vez que a interação na superfície desempenha um papel fundamental na formação de gotas nas nuvens e elas devem ser consideradas nos modelos climáticos.

As interfaces aquosas são cruciais em, por exemplo, ciências ambientais, biologia e tecnologia. Um exemplo disso são biointerfaces, isto é, interfaces entre células, tecido biológico ou material orgânico com outro biomaterial ou material inorgânico/orgânico. A estrutura e as propriedades dessas interações biológicas dependem das interações entre biomoléculas e superfícies, que são importantes em campos como biologia, biotecnologia, diagnóstico e medicina. Um segundo exemplo é a interface líquido-vapor da água (doravante denominada de superfície da água) que é de grande importância na atmosfera. Os aerossóis atmosféricos afetam o equilíbrio radiativo global, diretamente pela dispersão da luz solar e, assim, aumentando o albedo da Terra, e indiretamente por ser uma fonte importante de núcleos de condensação para a formação de nuvens. Estima-se que os aerossóis neutralizam o efeito estufa em $\approx 1/3$, mas os efeitos dos aerossóis são identificados pelo IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Changes*) como uma fonte de incertezas na previsão das mudanças climáticas [34]. A superfície é importante para os aerossóis devido ao seu tamanho pequeno, mas os efeitos de superfície geralmente não são considerados nos modelos climáticos atuais. Para incluir efeitos de superfície nesses modelos, é fundamental melhorar a compreensão em nível molecular dos fenômenos e processos de superfície atmosférica [35], [36]

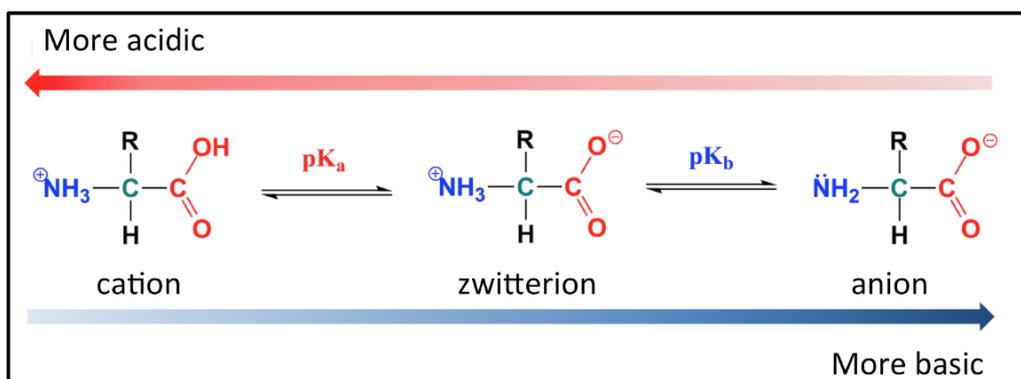


Figura 16: Estrutura molecular dos aminoácidos em função do pH do líquido.

Os aminoácidos, os blocos de construção das proteínas, são de importância fundamental para as interações biológicas, mas, como discutido acima, eles também desempenham um papel importante nos aerossóis atmosféricos, onde ocorrem devido a decomposição de biomaterial. Os aminoácidos constituem uma fração importante dos compostos WSON (*water soluble organic nitrogen*), compostos orgânicos nitrogenados solúveis em água, em aerossóis marinhos e continentais e estão envolvidos em muitos processos na atmosfera, conforme revisado na Ref. [37] Como componentes de microgéis marinhos, eles foram sugeridos como fazendo parte do material de núcleos de condensação de nuvens (*CCN- cloud condensation nuclei*) no alto Ártico [34]. Essa sugestão é apoiada por investigações feitas em laboratórios e por simulação de dinâmica molecular (MD). As investigações laboratoriais mostram partículas contendo aminoácidos, em proporções de mistura relevantes atmosféricamente, como sendo bons núcleos de condensação de nuvens [38]. As simulações de MD sugerem que a influência de aminoácidos pode estar conectada aos seus efeitos sobre a tensão superficial, um parâmetro importante para a formação da gota da nuvem [8], [9]. Esses efeitos sobre a tensão superficial dependem da densidade superficial dos aminoácidos, que por sua vez depende da sua estrutura molecular microscópica.

Além desses grupos tituláveis e hidrofílicos, a maioria dos aminoácidos também contém uma cadeia lateral, ou também chamada radical, específica para cada aminoácido. A natureza hidrofílica ou hidrofóbica das cadeias laterais afeta a solvatação dos aminoácidos. As simulações de dinâmica molecular (MD) preveem que também a propensão superficial dos aminoácidos varia de acordo com o equilíbrio entre as partes hidrofóbicas e hidrofílicas [9]. Nas referências [8], [9], Li et al. fizeram estudos de dinâmica molecular (MD) em seis aminoácidos, três pequenos e hidrofílicos; Serina (SER), Glicina (GLY), Alanina (ALA) e três com cadeias laterais maiores e anfifílicas; Valina (VAL), Metionina (MET) e

Fenilalanina (PHE), ver Figura 17. Eles simularam as interfaces líquido-vapor na forma planar e esférica, e os três primeiros aminoácidos foram encontrados preferencialmente no *bulk* do líquido devido à sua forte hidrofiliçidade decorrente do carácter zwitteriônico da estrutura fundamental do aminoácido e da cadeia lateral menor, enquanto que os outros três aminoácidos foram encontrados concentrados preferencialmente na superfície, devido a um efeito anfifílico dependente de suas cadeias laterais maiores e não-polares. Para as interfaces planares, eles verificaram que os aminoácidos hidrofílicos aumentavam ligeiramente a tensão superficial, enquanto que os anfifílicos tinham a capacidade de diminuir a tensão superficial. Para as gotículas esféricas, os aminoácidos hidrofílicos induziram pequenas perturbações na tensão superficial, enquanto que os aminoácidos anfifílicos aumentaram a tensão superficial.

A Figura 17, mostra os instantâneos das gotículas esféricas de água contendo 5000 moléculas de água e diferentes aminoácidos: SER, GLY, ALA, VAL, MET e PHE, simuladas por MD pelo grupo do prof. Hans Agren [9]. Entre estes aminoácidos, os três primeiros são hidrofílicos e permanecem dentro das gotículas, como pode ser visto na figura, enquanto os três últimos são hidrófobicos e tendem a se concentrar na superfície das gotículas. Apesar da ALA ter um grupo metílico hidrofóbico como cadeia lateral, a molécula inteira ainda mostra hidrofiliçidade devido à presença dos íons $-NH_3^+$ e $-COO^-$. Além disso, eles observaram que as moléculas de PHE são capazes de formar uma estrutura ordenada na superfície da gotícula, que é muito estável durante a simulação. Uma visão mais ampliada é mostrada na Figura 17b, em que a rede de ligação de hidrogênio entre as moléculas de fenilalanina é apresentada.

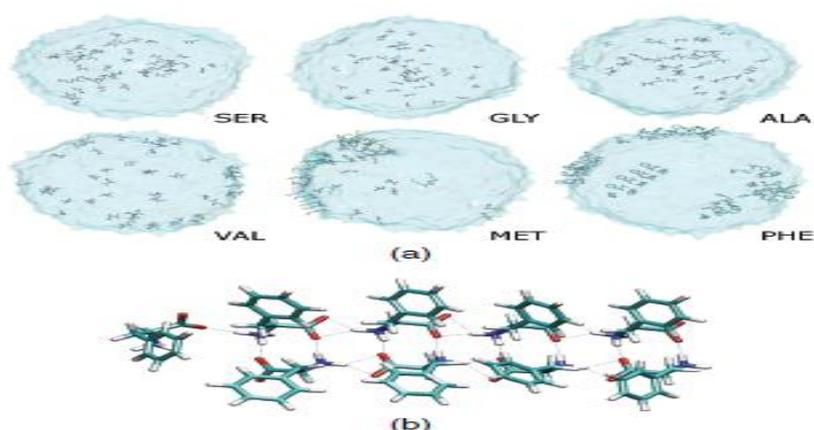


Figura 17: (a) Instantâneos para gotículas de água contendo diferentes aminoácidos. (b) Ligação de hidrogênio em moléculas de fenilalanina na superfície das gotas, figura retirada da Ref. [9].

Uma ferramenta poderosa para estudar a propensão superficial de moléculas solvatadas é a espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS). Esta técnica combina a seletividade química e a sensibilidade a superfície. Para aminoácidos, o XPS foi aplicado anteriormente a soluções aquosas de Glicina, revelando uma alta seletividade para os diferentes estados de carga dependendo do pH [39]. Recentemente, também foi demonstrado que a Cisteína, na qual -SH constitui um terceiro grupo titulável, exibe estados de protonação diferentes na superfície aquosa em comparação com o *bulk* [40]. Devemos também mencionar uma literatura geral de surfactante/colóide, na qual a acumulação de moléculas anfifílicas na interface gás/líquido está bem estabelecida, incluindo estudos explícitos das estruturas por espalhamento de raios X de incidência rasante [41], [42]

3.1.1.1 Materiais

As medidas XPS foram realizadas no Laboratório do Síncrotron Max II , em Lund, na Suécia, na linha de luz de Undulator I411 [10], [11],equipado com um analisador de energia de elétrons hemisférico, Scienta R4000, anexado a uma câmara experimental projetada para estudos de microjato líquidos em XPS.

Apenas uma breve descrição sobre a instalação experimental é dada aqui, mais detalhes podem ser encontrados em outro lugar [43]. A câmara experimental está equipada com um microjato líquido criado por um bico de quartzo com um diâmetro interno de cerca de 20 μm . A radiação do síncrotron atinge o jato de líquido a 90 graus muito perto do bico de quartzo (2-4 mm) porque, depois desta distância, o jato se quebra em uma linha de gotículas e depois se congela. Para manter um vácuo bom para as medidas, as gotículas são capturadas em uma armadilha fria de nitrogênio líquido, LN₂, que é colocado após a região de interação do líquido com os fótons. A temperatura do microjato na região de medida é estimado em $5 \pm 5^\circ\text{C}$. Os fotoelétrons que atravessam um *skimmer* situado a 2 mm do microjato, entram no analisador de elétrons montado em 54.7 graus em relação à direção de polarização linear horizontal SR, isto é, no chamado ângulo mágico para evitar variações de intensidades dependentes do ângulo.

Uma das características mais importantes do XPS é a alta sensibilidade a superfície devido ao curto livre caminho médio inelástico dos elétrons. Ao usar uma energia dos fótons de 360 eV para o C1s e 480 eV para o N1s, os espectros XPS são todos medidos com a mesma energia cinética do elétron, de aproximadamente 70 eV. Isso corresponde ao mais

curto livre caminho médio inelástico dos elétrons, 0,5-1,0 nm, garantindo assim que todos os espectros de XPS foram medidos com a mesma sensibilidade de superfície.

A resolução experimental total pode ser estimada a partir da largura do pico correspondente ao estado HOMO 1b₁ das moléculas da água na fase gasosa em torno do jato de líquido de aproximadamente 0,4 eV, isto é, muito inferior à largura observada dos picos C1s e N1s para o líquido, de aproximadamente 1 eV.

Antes, entre, e após o espectro de aminoácidos de solução aquosa, espectros de referência do estado HOMO 1b₁ da água líquida pura foi registrado. Este procedimento permitiu monitorar a calibração de energia e a intensidade de normalização. A energia de ligação foi calibrada para o estado 1b₁ da água líquida [25]. As intensidades dos espectros foram normalizadas pela corrente do anel, o tempo de contagem e a concentração da amostra; a gravação dos espectros da banda de valência da água demonstrou a estabilidade do sistema. A intensidade dos picos dos espectros dos aminoácidos aquosos normalizados desta forma, refletem as propriedades das amostras, como discutiremos mais adiante.

Os espectros foram analisados usando a rotina de regressão de mínimos quadrados *SPANCF* [21] para o programa IGOR Pro [44]. Os espectros do N1s e do C1s foram fitados usando formas de linha do tipo *Voigt*, onde as respectivas larguras de tempo de vida foram fixas aos valores experimentais da fase gasosa da literatura [25], [45], enquanto a largura de cada gaussiana ficou livre para cada pico.

Durante o procedimento de ajuste, todos os parâmetros foram mantidos constantes com algumas exceções, sobre as quais discutiremos mais adiante. A posição final de energia do N1s e do grupo COOH do C1s é quase a mesma nos diferentes casos como esperado. Para a *FWHM*, largura a meia altura, inicialmente restringimos todos os C1s-COOH e todos os picos C1s-CN₃ para serem idênticos em cada grupo. Após a convergência, esses valores foram soltos e uma nova otimização foi realizada. Como resultado final, observamos apenas uma pequena diferença entre a *FWHM* em cada grupo (cerca de 100 meV). As contribuições de assimetria não foram permitidas. O ruído de fundo foi automaticamente removido pelo procedimento de ajuste.

As amostras foram preparadas utilizando amostras de aminoácidos de alta pureza, da *Sigma-Aldrich*, pureza superior a 98%, dissolvidos em água ultrapura desmineralizada (18.2 M Ω , *Millipore Direct-Q*). Utilizamos uma concentração de 0,45 M para amostras de valina, alanina e glicina e 0,209 M para a amostra de metionina, para a qual não conseguimos atingir

uma concentração maior devido à sua menor solubilidade. Para todas as amostras, adicionamos 50 mM de NaCl às soluções para evitar o carregamento elétrico do microjato. O pH foi ajustado para 7,0 para todas as amostras por adição de pequenas quantidades de solução de NaOH 1 M, garantindo que todos os quatro aminoácidos estavam em suas formas zwitterônicas. O ponto isoelétrico, pI, dos quatro aminoácidos estudados é de cerca de 6; isso significa que em pH 7, na prática, todas as moléculas do *bulk* da amostra estão na forma zwitteriônica. Após preparadas as amostras e ajustados os pH's, as amostras são filtradas com um filtro de membrana de nylon de 0.22 μm de poros para retirar todas as partículas existentes nas soluções, e com isso evitar que o microjato fique entupido.

3.1.2 Resultados e Discussões

Os espectros de XPS na borda do C1s e N1s dos quatro aminoácidos em água a pH 7,0 são mostrados na Figura 18, juntamente com os resultados do ajuste. Nos espectros N1s, podemos ver apenas um pico, atribuído ao NH_3^+ . No espectro do C1s, no entanto, existem vários picos, refletindo o número de átomos de carbono não equivalentes e seu ambiente químico local. Para GLY, são observados dois picos distintos para o C1s, decorrentes da ionização do carbono do grupo carboxílico (CCOO) e do carbono alfa ($\text{CC}\alpha$), respectivamente. O pico do C1s carboxílico é encontrado em energias de ligação, BE, maiores devido à maior eletronegatividade dos átomos de oxigênio. A BE desses picos está de acordo com o trabalho publicado por N. Ottosson et al.[46]. Os espectros de ALA, MET e VAL exibem mais um pico, localizado em menor energia de ligação. Este pico corresponde aos carbonos na cadeia lateral dos aminoácidos (CCR). A intensidade relativa dos picos está relacionada ao número de carbonos na cadeia lateral; na ALA, a cadeia lateral possui apenas um átomo de carbono, enquanto que a MET e a VAL têm três carbonos cada, veja Figura 15.

Tendo entendido a relação entre os espectros e a estrutura molecular, podemos proceder a discussão das intensidades relativas. Supondo que a seção de choque de fotoionização seja a mesma para locais quimicamente equivalentes nas diferentes espécies, as intensidades de pico devidamente normalizadas dependerão da distribuição em relação à superfície das diferentes espécies.

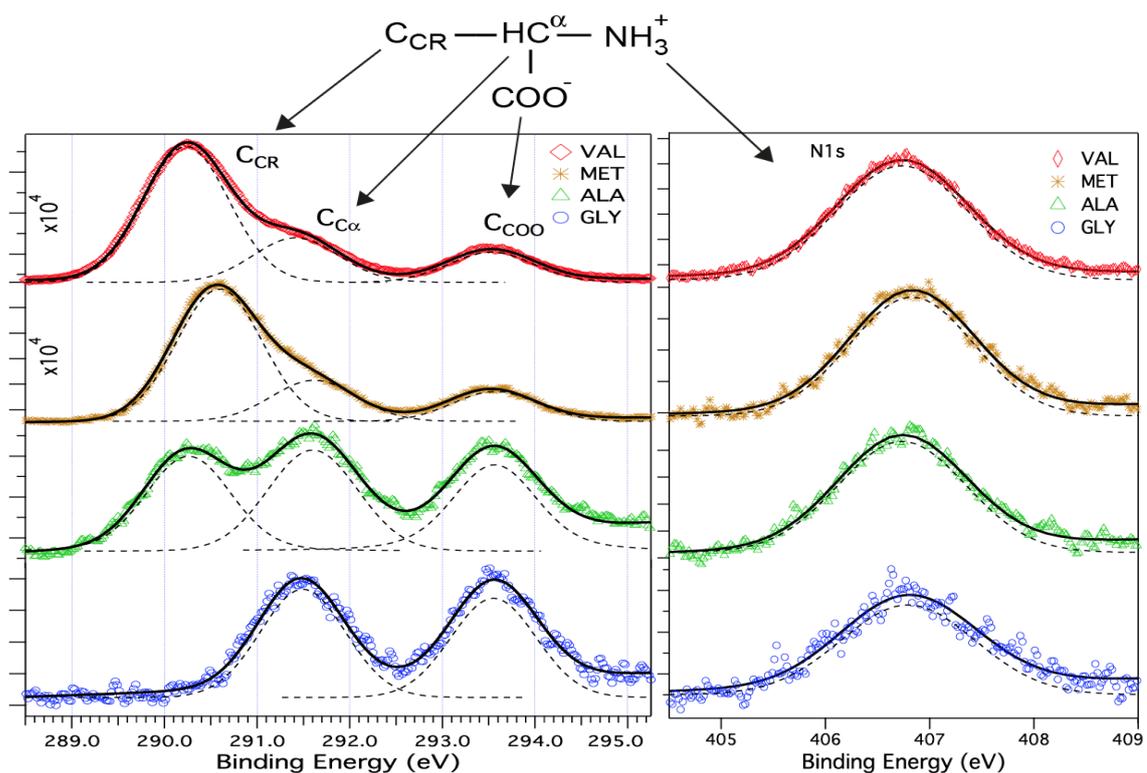


Figura 18: Espectros de fotoelétrons na borda do C1s (esquerda) e N1s (direita) de aminoácidos em solução aquosa, Glicina (GLY, azul), Alanina (ALA, verde), Metionina (MET, castanho) e Valina (VAL, vermelho). Os símbolos são os dados experimentais, as linhas contínuas são o ajustes total resultante e as linhas tracejadas são as componentes de ajuste individuais.

As áreas para os diferentes picos de C 1s e N 1s obtidos a partir do ajuste dos picos estão plotadas na Figura 19 e apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Energias de ligação (BE) em eV, e as áreas relativas (Area) para os diferentes C1s e para o N1s da solução aquosa dos quatro aminoácidos investigados, obtidos a partir da regressão.

	N1s		C1s _{COO}		C1s _α		C1s _{radical}	
	BE	Area	BE	Area	BE	Area	BE	Area
VAL	405.46	3557	292.16	3377	290.05	5006	288.87	5092
MET	405.56	2824	292.20	2667	290.25	3688	289.23	3973
ALA	405.50	642	292.18	555	290.24	710	288.90	647
GLY	406.79	346	293.41	362	291.32	394	-----	-----

Três pontos devem ser observados: Primeiro, a escala de intensidade absoluta das áreas é arbitrária, mas a escala relativa está bem determinada. Em segundo lugar, a

intensidade da cadeia lateral foi escalada com o número de átomos para facilitar a comparação. Em terceiro lugar, a intensidade da MET foi ampliada para compensar a menor concentração da amostra investigada. Da Figura 19, é então evidente que, para todos os picos diferentes, os quatro aminoácidos formam dois grupos, com VAL e MET tendo aproximadamente dez vezes maior intensidade do que ALA e GLY. Como a profundidade de sondagem é a mesma para todos casos, as áreas maiores para VAL e MET mostram que estes dois os aminoácidos estão mais concentrados na superfície do que os aminoácidos ALA e GLY. Isto está em acordo qualitativo com as simulações de dinâmica molecular do grupo do Prof. Ågren [8], [9].

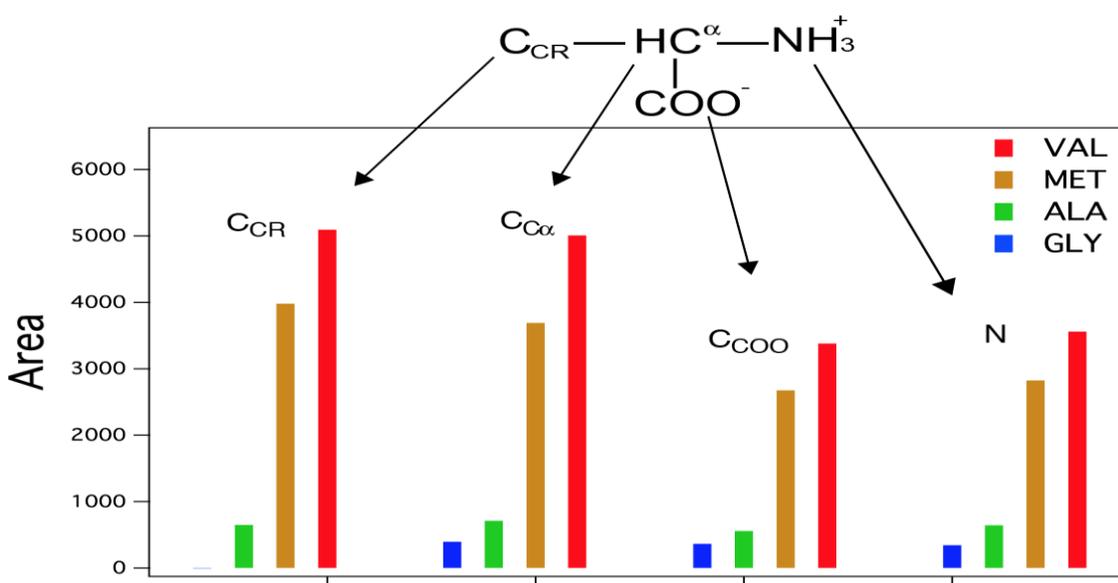


Figura 19: Áreas dos espectros de XPS para C1s e N1s dos quatro aminoácidos, respectivamente. O eixo x é representado graficamente começando com os carbonos da cadeia lateral, seguido pelo carbono alfa e o carbono do grupo carboxílico da molécula, e no lado direito da Figura, a área do N1s. As cores correspondem ao aminoácido: Glicina (GLY, azul), Alanina (ALA, verde), Metionina (MET, marrom) e Valina (VAL, vermelho).

Podemos aprender mais sobre a solvatação superficial de aminoácidos das áreas relativas dos picos do C_{COO} e do C_{CR} originados da parte hidrofílica e hidrofóbica das moléculas, respectivamente. Para ALA, a relação de intensidade entre o C_{CR} e C_{COO} é 1,2, enquanto é 1,5 para VAL. Para ambos os casos, a proporção é portanto >1, o que pode ser interpretado como sendo causada pela cadeia lateral hidrofóbica estando mais próxima a superfície do que o grupo carboxilato hidrofílico, isto é, há uma orientação preferencial das

moléculas de aminoácidos em relação à superfície. A razão mais elevada para VAL em relação a ALA pode ser interpretada então, como devido à cadeia lateral ser mais longa e mais hidrofóbica para VAL do que para ALA, tornando a orientação preferencial do VAL mais notável.

Para determinar o enriquecimento dos aminoácidos na superfície, podemos usar um modelo simplificado com uma camada superficial e um *bulk*, como apresentado na seção 2.1.7.

Podemos determinar a concentração superficial de cada aminoácido, desde que façamos algumas suposições sobre a relação D/λ . A partir de cálculos de dinâmica molecular, a espessura D da camada superficial pode ser estimada em 0,5 nm [8], [9], enquanto que o livre caminho médio inelástico λ dos fotoelétrons está na faixa de 0,5-1 nm. Escolhendo um valor de 0,75 nm para λ nós obtemos que a concentração dos aminoácidos na camada superficial é 0.9 (ALA), 7.6 (MET) e 9.8 (VAL) vezes maior do que no *bulk*.

A propensão superficial de um soluto depende dos efeitos de entalpia e de entropia ligados ao equilíbrio entre o soluto no *bulk*, onde ele perturba o padrão de ligação de hidrogênio da água mais do que na superfície, e na superfície, onde o soluto perde a solvatação. Este equilíbrio está ligado à estrutura molecular microscópica dos aminoácidos zwitteriônicos e as suas interações intermoleculares com a água circundante. A glicina não tem cadeia lateral, consiste apenas na estrutura vertebral zwitteriônica hidrofílica com dois grupos carregados, os quais formam ligações fortes com as moléculas de água polares, resultando numa solvatação forte, o que prejudica a glicina estar na superfície. A alanina tem uma cadeia lateral constituída por um grupo metílico hidrofóbico ($-\text{CH}_3$). Esta pequena cadeia lateral altera tanto o equilíbrio entre as interações hidrofóbicas e hidrofílicas, que a alanina está presente na superfície com aproximadamente a mesma concentração que no *bulk*. Para a metionina e a valina, com cadeias laterais hidrofóbicas cada vez maiores, o equilíbrio é alterado ainda mais, resultando em um enriquecimento na superfície com o aumento do tamanho da cadeia lateral.

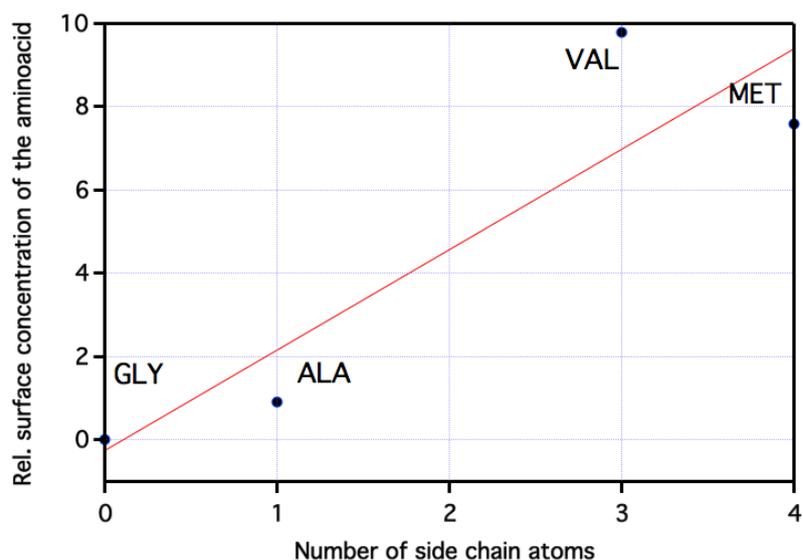


Figura 20: Correlação entre o número de átomos na cadeia lateral e a concentração superficial para os aminoácidos estudados.

Na tentativa de separar qual propriedade é mais importante para determinar a concentração na superfície, fizemos a suposição bem simples de que apenas o tamanho da cadeia lateral seria importante. Como se vê na Figura 20, existe certamente uma correlação entre a concentração da superfície e o tamanho da cadeia lateral. Entretanto, não é uma relação linear simples, pois VAL com uma cadeia lateral menor está mais presente na superfície do que MET. Esse efeito é bem reproduzido pelas simulações mostradas na Ref.[9] e qualitativamente atribuímos esse comportamento à diferença na estrutura molecular das cadeias laterais VAL e MET. A cadeia lateral de valina consiste apenas em C e H, tornando-se um grupo bastante não polar, com uma baixa capacidade de formar ligações de hidrogênio com a água circundante. A cadeia lateral da MET, embora maior, contém um átomo de S, em torno do qual se formam ligações parcialmente polares, o que aumenta um pouco a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com a água ao redor.

Deve-se notar que ambos os estudos de MD (Dinâmica Molecular) [8], [9], [47] e o nosso estudo de XPS foram feitos para as espécies zwitteriônicas. Embora esta seja a espécie relevante para sistemas biológicos, valores de pH muito mais altos e mais baixos existem em aerossóis atmosféricos. Em tais condições, os aminoácidos não terão mais uma espinha dorsal zwitteriônica, mas pode ser catiônica ou aniônica em vez disso. Isso altera o equilíbrio entre as interações hidrofóbicas e hidrofílicas, provavelmente com alterações da propensão superficial, o que ainda precisa ser investigado.

A propensão à superfície de aminoácidos observada nesse trabalho tem implicações na ciência atmosférica. Em primeiro lugar, os aminoácidos podem tanto aumentar como diminuir a tensão superficial da solução, dependendo da natureza da sua cadeia lateral, como discutido na introdução. A tensão superficial é um parâmetro fundamental para o processo no qual o vapor de água condensa e forma gotas de nuvem líquida, conforme descrito pela teoria de Köhler e teorias mais avançadas. Em segundo lugar, a acomodação da água pode ser afetada pelas cadeias laterais hidrofóbicas, que apontam para fora da superfície. Numa gotícula de aerossol forma uma camada hidrofóbica exterior, o que pode reduzir a probabilidade de uma molécula de água na fase gasosa ser acomodada na gotícula. Em terceiro lugar, a propensão superficial afetará o desenvolvimento químico dos aminoácidos, uma vez que as moléculas na superfície são muito mais acessíveis para reações com radicais em fase gasosa do que as enterradas no *bulk*.

3.1.3 Conclusão

Estudamos a propensão superficial de quatro aminoácidos usando espectroscopia de fotoelétrons XPS e a técnica de microjato líquido. Estes aminoácidos foram selecionados porque têm um tamanho e cadeias laterais bastante diferentes. Os aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas e tamanho menor, GLY e ALA, tendem a permanecer no *bulk* do líquido, enquanto que os aminoácidos hidrofóbicos e maiores, VAL e MET, se encontram concentrados na superfície. Encontramos evidências experimentais de que os aminoácidos têm orientação preferencial em relação à superfície com a cadeia lateral hidrofóbica mais próxima da superfície do que o grupo carboxilato hidrofílico. A partir de um modelo simplificado estimamos que a concentração dos aminoácidos na camada superficial é 0,9 (ALA), 7,6 (MET) e 9,8 (VAL) vezes maior do que no *bulk*. Apesar do MET possuir uma cadeia lateral mais longa, ele está menos presente na superfície do que VAL, o que é bem reproduzido por simulações publicadas anteriormente

Capítulo 4

4.1 Osmólitos

4.1.1 Introdução

Os organismos celulares usam uma variedade de osmólitos, que são pequenas moléculas, para neutralizar os efeitos do estresse osmótico, desidratação ou altas temperaturas, preservando a estabilidade molecular de proteínas e RNA. Em todas as espécies, as concentrações dos osmólitos são reguladas de tal maneira que as funções das moléculas biológicas não são comprometidas. Osmólitos, que diminuem a estabilidade dos estados dobrados de proteínas ou RNA, são classificados como desnaturantes, enquanto aqueles que aumentam a estabilidade do estado nativo são considerados protetores. Nessa parte do trabalho, discutiremos as propriedades de dois osmólitos que protegem as proteínas, o Tmao e betaína; e outro desnaturante, a uréia. A ideia é tentar obter informações em nível molecular de como essa interação acontece e como o Tmao anula o efeito desnaturante da uréia quando os dois estão presentes na solução. Para isso começaremos descrevendo a parte experimental e abaixo disso separamos os resultados em três tópicos. O primeiro discute os resultados obtidos para o Tmao, betaína e uréia em diferentes concentrações, para resolvermos se essas moléculas estão na superfície ou se concentram mais no *bulk* da solução. O segundo discute os resultados para o Tmao e uréia em diferentes pH, para resolvermos a protonação ou desprotonação das moléculas e o que isso influencia na propensão à superfície dessas moléculas. No terceiro e último, discutiremos as misturas de Tmao e uréia em água, para tentarmos elucidar como elas interagem com a água em si e entre elas.

4.1.2 Método experimental

A espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS) é uma técnica poderosa para estudar a propensão superficial de moléculas solvatadas em amostras líquidas, uma vez que essa técnica combina a seletividade química e a sensibilidade à superfície. Os experimentos com XPS foram realizados na linha de luz PGM do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil, com o espectrômetro de elétrons R4000 Scienta. Alguns detalhes da configuração experimental do espectrômetro Scienta foram relatados na seção (2.1.4.6). A solução aquosa foi inserida na câmara experimental, inicialmente mantida em condições de alto vácuo, utilizando um bico de microjato com 20 μm de diâmetro. O conjunto de microjato foi adquirido da empresa *Microliquids GmbH* [48]. Os fotoelétrons detectados fazem um

ângulo reto com a direção da polarização da luz síncrotron. Esses fotoelétrons emitidos a partir das soluções aquosas entram no analisador de elétrons por meio de um *skimmer* com uma abertura de entrada de 0,9 mm, posicionada a cerca de 1,0 mm do microjato. Os espectros de fotoelétron (PE) de valência e do C1s foram registrados usando uma energia de fóton de 360 eV, enquanto os espectros de PE do N1s foram registrados com uma energia de fóton de 480 eV. Ao usar essas energias de fótons para os espectros de nível de caroço do XPS, a energia cinética eletrônica é ≈ 70 eV. Isso garante que esses espectros sejam medidos com a mesma sensibilidade superficial, correspondendo ao menor livre caminho médio inelástico dos elétrons, em torno de 0,5 a 1,0 nm, ver seção (2.1.6.9). O sinal de fotoelétron é então uma medida da abundância dos íons correspondentes na superfície. A resolução total em energia foi melhor que 360 meV para os espectros de carbono C1s e 480 meV para os de N1s, pois a potência de resolução ($E/\Delta E$) é de 1000 para esta faixa de energia [23]. A resolução experimental total pode ser estimada a partir da largura do pico correspondente ao estado 1b₁ HOMO das moléculas da fase gasosa em torno do jato líquido a aproximadamente 0,8 eV, ou seja, menor do que a largura observada dos picos de C1s e N1s, aproximadamente 1,2 eV. Usamos um passo em energia de 0,05 eV em todos os espectros.

4.1.2.1 Materiais

Soluções aquosas de uréia (pureza > 98%), Tmao (pureza > 99,0%), misturas de uréia e Tmao, betaína (pureza > 99%) e alanina (pureza > 98%) foram preparadas a partir de produtos químicos obtidos comercialmente (Sigma Aldrich). Todas as amostras foram preparadas com água desmineralizada pura (18,2 MΩ, Millipore Direct-Q) e filtradas por membranas de nylon de 0,22 μm. O ajuste do pH ácido e neutro da amostra foi realizado com soluções de NaOH (97% Sigma Aldrich) ou de HCl. As medições de pH foram realizadas usando um medidor de pH calibrado com amostras tampão.

Antes e após os espectros das soluções aquosas, espectros de referência do estado 1b₁ HOMO da água líquida pura foram registrados. Este procedimento permitiu monitorar a calibração de energia e a normalização da intensidade. A energia de ligação foi calibrada para o estado 1b₁; 11,16 eV, da água líquida [49]. As intensidades espectrais foram normalizadas pela área do 1b₁ e pelo número de repetições dos espectros. O registro dos espectros da banda de valência da água demonstrou a estabilidade das medidas experimentais. As intensidades espectrais dos espectros de soluções aquosas normalizadas dessa maneira refletem as

propriedades das amostras. Fizemos medidas também da uréia 1M nos diferentes turnos do sincrotron para garantir a estabilidade. E de fato, os picos da uréia em diferentes situações normalizadas tanto pelo I_0 (corrente de fótons) como pela área 1b1, se mantiveram iguais. Fizemos a normalização dos espectros pelo I_0 e também pelo 1b1, comparando-se esses espectros normalizados de forma diferente, percebemos que diferiam ligeiramente. Optamos pela normalização pelo 1b1, pois foi a que resultou em áreas iguais dos picos da uréia estudados.

Os espectros foram analisados usando o ajuste de múltiplos picos (*multipeak fitting*) da rotina de mínimos quadrados do programa IGOR Pro [50]. Todos os parâmetros espectrais foram extraídos usando ajustes de mínimos quadrados usando o perfil de linha Gaussiana. As posições de energia, intensidades e larguras gaussianas foram mantidas como parâmetros livres, tomando-se o cuidado de manter a largura da gaussiana sempre a mesma para picos iguais.

4.1.3 Efeito da concentração do soluto em soluções aquosas de Tmao, Uréia e Betaína.

Nessa seção apresentaremos os resultados obtidos na medida de espectros de XPS na borda do C1s em pH neutro (em torno de 7) de amostras em água de Tmao, Uréia e Betaína nas concentrações de 0.1, 0.5, 1, 2 e 4 M (ou frações molares de 0.0018, 0.0089, 0.018, 0.035, 0.067). Os espectros foram normalizados pelo fluxo de fótons e pelo número de repetições dos espectros. As áreas totais dos espectros de XPS do Carbono destas moléculas foram obtidas fazendo-se um ajuste com Gaussianas e removendo-se o sinal de fundo (background). A área total foi dividida pelo número de carbonos em cada amostra, pois o Tmao e a Betaína têm três carbonos e a Uréia apenas 1, ver. Figura 21

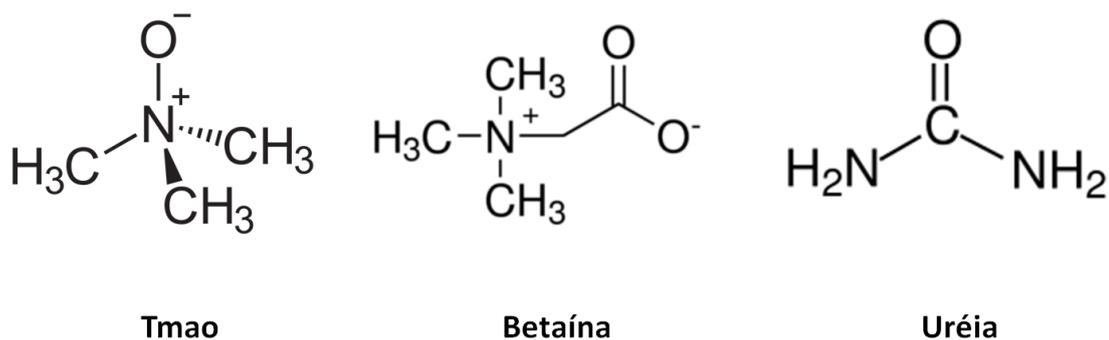


Figura 21: Representação esquemática das moléculas estudadas para o pH neutro da solução.

Na Figura 22, apresentamos as áreas normalizadas no eixo y e a fração molar de concentração no eixo x. Vemos nessa figura que as três moléculas tem um crescimento linear da área em função da intensidade, mesmo para concentrações de 4 M, não há uma saturação na intensidade.

Usualmente, espera-se um crescimento linear da intensidade em função da concentração, para concentrações pequenas; e uma saturação no sinal para concentrações maiores, significando que a região da superfície está saturada de moléculas de soluto [51]. As moléculas que estudamos não chegam a formar uma camada de saturação na superfície, a intensidade cresce linearmente mesmo até a concentração de 4 M. Isso significa que essas moléculas de alguma forma estão menos na superfície e se concentram mais no *bulk* da solução, ou seja, essas amostras não tem boa propensão a superfície, preferem ficar no *bulk*.

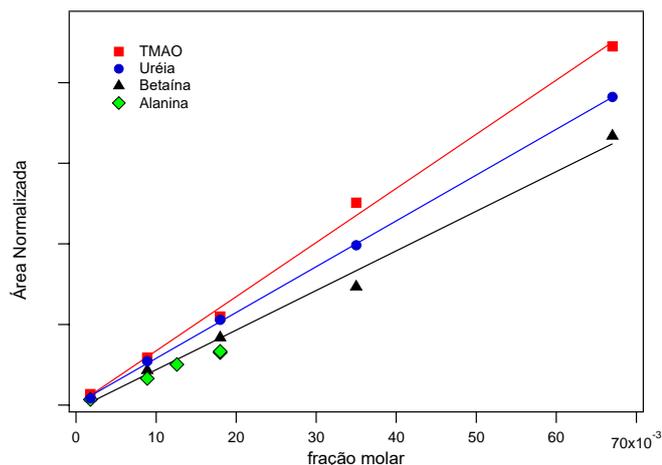


Figura 22: Área normalizada para as amostras aquosas de Tmao, Betaína e Uréia em diferentes concentrações. Os espectros de XPS foram medidos na borda do C1s e as áreas totais foram normalizadas pelo número de átomos de C na molécula.

Podemos observar que o Tmao tem o maior sinal, a uréia tem um sinal intermediário e a betaína tem o menor sinal. Comparando-se a molécula de Tmao com a da betaína vemos que elas têm estruturas bem similares, Figura 21. As duas têm três grupos metil, mas a betaína está menos concentrada na superfície. A propensão a superfície parece ser muito mais influenciada pela distribuição de carga na parte do óxido das moléculas do que pela solvatação do grupo metil. Veja a Figura 23, retirada do artigo [52], em que eles calculam as interações do Tmao com a água e mostram as ligações de hidrogênio entre o O⁻ do Tmao com três H da água.

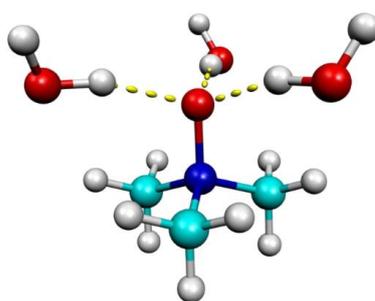


Figura 23: Mostra as ligações de hidrogênio entre o O do Tmao e 3H da água. Figura retirada da referência [52].

Cremer et al. [4], mediram que a tensão superficial da água aumenta para a betaína e a glicina e decresce para o Tmao com o aumento da concentração do soluto. Esse resultado sugere que o Tmao é mais enriquecido nas interfaces hidrofóbicas, que é o caso para a

interface líquido-vapor. Isso está em acordo com os nossos resultados que mostram que o Tmao tem um sinal maior que o da betaína.

Usando um modelo simplificado apresentado na seção 2.1.7 e no artigo Mocellin et al. [53], podemos estimar a relação entre a concentração de moléculas na superfície (c_s) e no bulk (c_b). Nesse artigo, nós estimamos a concentração das moléculas de alanina como sendo a mesma na superfície e no *bulk*. Como nós medimos a alanina nessa série de medidas, vamos usar essa informação e usar a intensidade da alanina como o sinal de *bulk*, e então calcular a concentração na superfície das outras moléculas. Podemos determinar a concentração na superfície das outras moléculas, desde que façamos algumas suposições sobre a razão d/λ . Dos cálculos de dinâmica molecular a espessura d da camada de superfície pode ser estimada como 0.5 nm [8], [9], [54], [55], enquanto o livre caminho médio inelástico dos fotoelétrons, λ , para energia cinética em torno de 70 eV, no intervalo de 0.5-1 nm. Escolhendo o valor de 0.75 nm para λ , obtemos que a concentração da molécula na camada de superfície é aproximadamente 1.5 (Betaína), 2.2 (Uréia) e 2.5 (Tmao) vezes maior do que no *bulk*, para 1M.

Esses achados podem ter implicações no efeito estabilizador do Tmao nas proteínas. Especificamente, a forte hidratação necessária para os grupos metil, bem como a parte do óxido, deve ser responsável pela depleção do osmólito nas interfaces hidrofóbicas / aquosas. Tais efeitos de depleção devem ajudar a estabilizar as proteínas em suas conformações nativas e enoveladas.

A fase de vapor fora do líquido atua efetivamente como uma superfície hidrofóbica, a interface água-vapor é um modelo útil para interfaces hidrofóbicas e, portanto, os resultados também podem ter significado para as biointerfaces hidrofóbicas.

4.1.4 Efeito da mudança do pH da solução no deslocamento químico e as diferentes espécies iônicas.

Nessa seção apresentaremos os resultados obtidos na medida de espectros de XPS na borda do C1s Figura 24, e do N1s Figura 25, em pH neutro (em torno de 7) e ácido (pH 3.8 para o Tmao e mix, e 2.7 para a uréia) de amostras em água de Tmao, Uréia e mistura de Tmao e uréia; 1:1; respectivamente. Os espectros foram normalizados pela área do pico *1b1* da valência da água e pelo número de repetições dos espectros. As áreas dos espectros de XPS do carbono e do nitrogênio destas moléculas foram obtidas fazendo-se um ajuste com

Gaussianas e removendo-se o sinal de fundo (*background*). A área total foi dividida pelo número de carbonos em cada amostra, pois o Tmao têm três carbonos e a Uréia apenas 1, e a Uréia tem 2 nitrogênios e o Tmao apenas 1, ver Figura 21. A razão da área dos picos no pH neutro pela área dos picos no pH ácido para as diferentes soluções e na borda do C1s e N1s são mostradas na Tabela 2. Na Tabela 3, mostramos os parâmetros experimentais ajustados pelas Gaussianas para as bordas C1s e N1s do Tmao, uréia e mix aquosa nos dois diferentes pH.

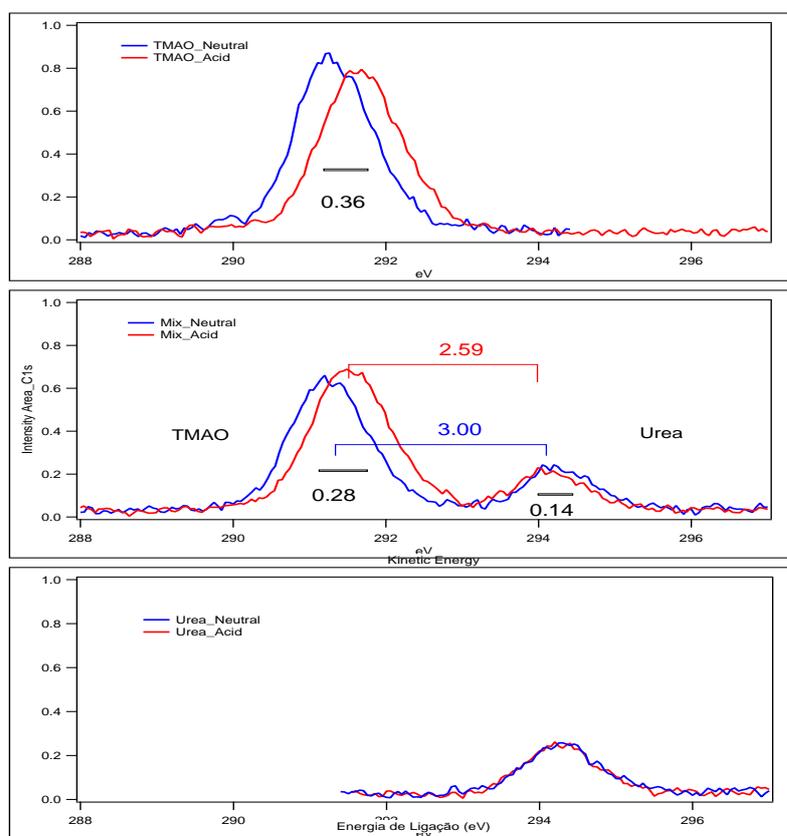


Figura 24: Espectros na borda do C1s para o Tmao (superior), mix (meio) e uréia (inferior) nos pH's neutro (em azul) e ácido (em vermelho). O Tmao tem três átomos de carbono e a uréia um. Em pH neutro (em torno de 7) e ácido (pH 3.8 para o Tmao e mix, e 2.7 para a uréia)

Na Figura 24 na parte superior a comparação entre o Tmao em pH neutro (azul) e ácido (vermelho). Observamos que há um deslocamento em energia para maior energia de ligação para o Tmao em meio ácido, de 0.36 eV, ver Tabela 3. Esse deslocamento é pequeno comparado com resultados anteriores em aminoácidos, que a protonação leva a shift de energia da ordem de 1 eV [40]. O que está acontecendo é que no pH de 3.8 a solução está

abaixo do pKa do Tmao que é 4,7 [56], então parte das moléculas; mais de 50% delas, devem estar protonadas, ligando um átomo de H do ácido *HCl* adicionado a solução, ao átomo de O do Tmao, $(CH_3)_3NOH$. Como esses espectros foram medidos na borda do C1s, se olharmos a representação da molécula de Tmao, Figura 21 e Figura 26 que mostra o Tmao e o Tmaop protonado, vemos que os carbonos dos grupos metil estão relativamente afastados do oxigênio, que é o átomo que está sendo protonado, e esse é o motivo para observamos um deslocamento pequeno. Se observarmos o mesmo espectro na Figura 25, parte superior, agora para a borda do N1s vemos um shift de 0.75 eV, mais do que o dobro do anterior, pois o N está bem mais próximo do O e esse efeito é mais sentido nessa borda de ionização.

Continuando a análise dos deslocamentos químicos podemos observar nas Figura 24 na parte inferior, que os espectros da uréia na borda do C1s e do N1s não apresentam nenhum deslocamento em energia. Isso implica que a uréia nos pH's utilizados não protona nem desprotona, sendo estável nessa região de pH's, o pKa da uréia é extremamente baixo, 0.1 à 21 °C .

Analisando os espectros do meio das Figura 24 e Figura 25, que correspondem aos espectros do mix 1:1 de Tmao e uréia em água nos pH neutro e ácido, nas bordas do C1s e N1s, respectivamente, observamos que o deslocamento químico acontece tanto para o Tmao quanto para a uréia, sendo bem menor para a uréia. Vemos que na borda do C1s o pico do Tmao desloca 0.28 eV para energia de ligação maior e a uréia desloca em sentido oposto 0.14 eV, para menor energia de ligação. A separação em energia do pico do Tmao para o da uréia, é de 3.00 eV no pH neutro e de 2.59 no pH ácido, uma diferença de 0.41 eV. Ou seja, há um deslocamento em energia no sentido de diminuir a diferença em energia no pH ácido.

Se olharmos para a borda do N1s, vemos o mesmo sentido de deslocamento químico que para a borda do C1s, mas com valores ligeiramente maiores. Para o Tmao o átomo de N é um átomo central, então ele tem uma energia de ligação maior, enquanto que na uréia eles não são átomos centrais, e a energia de ligação é menor. Temos um shift em energia de 0.71 eV para o pico do Tmao e 0.18 eV para o pico da uréia. A separação em energia entre os picos do Tmao para o da uréia para o pH neutro é de 3.46 eV e para o pH ácido de 4.35 eV, ou seja uma diferença de 0.89 eV. Aqui também o deslocamento químico vai no mesmo sentido, de diminuir a BE da uréia e aumentar a do Tmao.

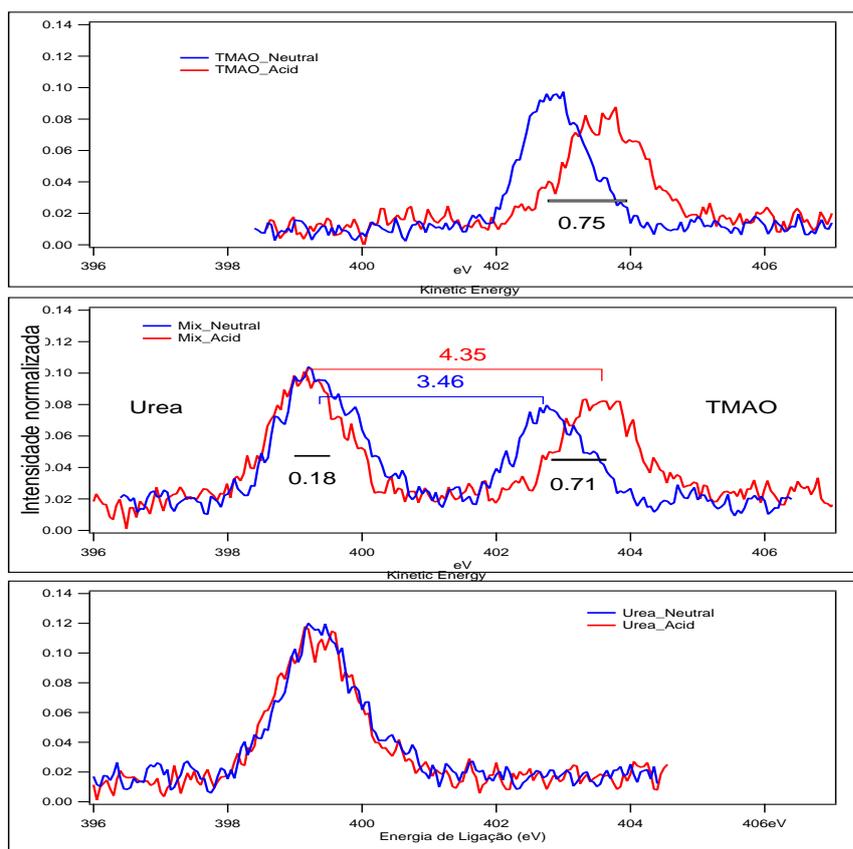


Figura 25: Espectros na borda do N1s para o Tmao (superior), mix (meio) e uréia (inferior) nos pH's neutro (em azul) e ácido (em vermelho). O Tmao tem um átomo de N e a uréia tem dois. Em pH neutro (em torno de 7) e ácido (pH 3.8 para o Tmao e mix, e 2.7 para a uréia)

Resumindo, vemos que o Tmao na amostra binária tem um deslocamento químico para maiores BE, e a uréia na amostra binária não tem deslocamento químico. Quando olhamos as amostras terciárias, ou seja as misturas de Tmao e uréia, para o pH neutro tanto o Tmao quanto a uréia no mix não apresentam deslocamento em energia comparados a forma binária. Eles ficam na mesma posição em energia, dentro de ± 0.05 eV. Mas, quando olhamos os espectros das amostras ácidas, o Tmao continua deslocando e a uréia também apresenta um deslocamento, em direções opostas. A uréia desloca para menores BE e o Tmao para maiores. O shift da uréia no mix pH ácido é muito pequeno e poderia ser até um efeito da calibração em energia dos espectros. O melhor é considerar a diferença em energia entre os picos do Tmao e da ureia para os pH neutro e ácido, com isso eliminamos qualquer efeito de calibração. O shift para a borda do carbono é o mesmo dentro de uma barra de erro, 0.41 ± 0.05 eV. Para a borda do N1s o shift vai de 0.75 para a amostra de Tmao sozinho para 0.89 para a

mistura. Essa diferença poderia indicar que não está somente acontecendo a protonação do Tmao na mistura; como na amostra binária, mas talvez o Tmao e a uréia estejam interagindo de alguma forma, ligando o 'O' do Tmao com a amina NH_2 da uréia, como sugerido por Zetterholm et al. [52], veja Figura 27.

Tabela 2: Mostra a razão da área do pH neutro pela área do pH ácido para as diferentes soluções e na borda do C1s e N1s. As áreas dos picos foram obtidas por fitting com gaussiana e tem um erro relativo associado entre 1 e 3 %.

Área Neutro / Área ácido (\pm o erro propagado)				
	Tmao	Mix (Tmao)	Mix Uréia	Uréia
C1s	1.02 (0.01)	0.88 (0.01)	1.04 (0.04)	1.00 (0.03)
N1s	1.06 (0.02)	0.92 (0.04)	1.13 (0.03)	0.97 (0.03)

Analisando-se as áreas obtidas nos espectros das Figura 24 e Figura 25 apresentadas as razões entre a área dos picos neutro pela área dos picos em pH ácido, na Tabela 2, observamos que o Tmao e uréia, dentro da barra de erro apresentaram as razões igual a 1, ou seja tem a mesma área, para as amostras binária, que são as amostras com somente um soluto, colunas 2 e 4 da Tabela 2. Já para as amostras com dois solutos misturados, Tmao+uréia, no caso chamado mix, observamos que o Tmao no mix, ficou 10 ± 2 % maior no pH ácido do que no pH neutro, coluna 3 da Tabela 2. Isso significa que o Tmao na mistura ácida tem um sinal de fotoelétron maior, ou seja, está mais presente na superfície do que o Tmao na mistura neutra. A uréia não deveria apresentar diferenças significativas, pois as espécies são as mesmas, na solução neutra e na ácida, mas observamos na Tabela 2 coluna 4, que na borda do N1s a área do pico no pH ácido é 10% menor que no pH neutro. Ou seja, tem um comportamento contrário ao do Tmao na mesma amostra. A uréia na mistura tem um comportamento diferente que na amostra simples, de uréia + água, isso pode ser um indicativo que a uréia está se ligando de forma diferente na presença do Tmao, possivelmente fazendo ligações com o Tmao, como discutido acima, ou então que existe um efeito coletivo no sentido de a uréia empurrar as moléculas de Tmao protonadas mais para a superfície e com isso ir mais para a *bulk*, já que o sinal de fotoelétrons de Tmao aumenta e o de uréia diminui.

Tabela 3: Parâmetros experimentais ajustados para as bordas C1s e N1s do Tmao, uréia e mix aquosa em dois diferentes pH. O erro associado a BE e a FWHM, obtido a partir do fitting é menor que ± 0.01 .

Borda	Amostra	Nível	BE (eV)	FWHM (eV)	ΔBE (eV)*
C1s	Tmao	Neutro	291.31	1.20	0
		Ácido	291.67	1.27	0.36
	Mix Tmao	Neutro	291.26	1.20	0
		Ácido	291.54	1.27	0.28
	Mix Uréia	Neutro	294.27	1.11	0
		Ácido	294.13	1.11	-0.14
	Uréia	Neutro	294.29	1.11	0
		Ácido	294.26	1.11	-0.03
N1s	Tmao	Neutro	402.86	1.12	0
		Ácido	403.61	1.36	0.75
	Mix Tmao	Neutro	402.81	1.12	0
		Ácido	403.53	1.35	0.72
	Mix Uréia	Neutro	399.35	1.35	0
		Ácido	399.18	1.35	-0.17
	Uréia	Neutro	399.37	1.35	0
		Ácido	399.32	1.35	-0.05

* $\Delta BE = BE - BE$ (pH neutro)

Na literatura encontramos relatos de experimentos que mostraram que o efeito estabilizador do Tmao nas proteínas depende do pH [57]. Parece que apenas em pH neutro, o Tmao estabiliza os estados dobrados e, em valores mais baixos de pH, há uma diminuição nesta estabilidade. Em valores de pH abaixo do pKa do Tmao, os estados nativos são desestabilizados, embora a extensão do efeito dependa da proteína. Sabe-se que as proteínas normalmente desnaturam em condições ácidas e, portanto, pode-se supor que a diminuição observada na estabilidade seja puramente devida ao pH ácido, com o Tmao não desempenhando nenhum papel. No entanto, os resultados dos experimentos relatados dizem que o Tmao não é apenas incapaz de aumentar a estabilidade a $pH < pKa$, mas também contribui para uma instabilidade adicional [58]. A propensão do Tmaop (Tmao protonado)

para a superfície hidrofóbica da solução observada por nós acima, pode ser a explicação do porque as proteínas não mantêm a sua forma mais compacta, enovelada em solução ácida com Tmao. O Tmaop tem mais afinidade às partes hidrofóbicas das proteínas, responsáveis por parte dos efeitos que levam ao enovelamento, enfraquecendo essa atração hidrofóbica entre as duas proteínas.

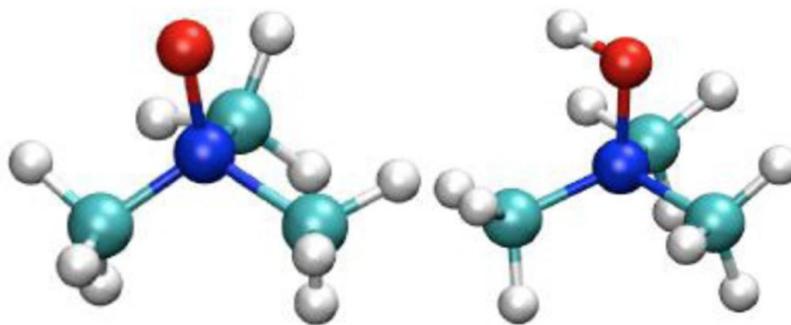


Figura 26: Na esquerda representação da molécula de Tmao e na direita a molécula de Tmao protonada, Tmaop, do artigo Elizabeth et al. [55]. O átomo de oxigênio está representado em vermelho, os nitrogênios em verde, o carbono em azul e os hidrogênios em branco.

No futuro, uma possível continuação da análise desses dados seria analisar a largura dos picos e fazer um fitting nos picos no pH ácido levando em consideração as espécies protonadas e não protonadas. Com isso, conseguiríamos estimar a porcentagem de cada espécie presente para o pH estudado. Também, precisamos dos resultados de cálculos de dinâmica molecular, que estão sendo feitos pelo grupo do prof. Cristiano Dias, do New Jersey Institute of Technology, New Jersey, [59] para confirmarmos os resultados apresentados acima.

4.1.5 Efeito da mistura dos solutos e a influência na propensão a superfície

Quando ambos os osmólitos estão juntos em solução, o Tmao neutraliza os efeitos desestabilizadores da uréia nas proteínas. De fato, foi demonstrado, na literatura, que o Tmao pode efetivamente neutralizar o efeito de desnaturação de proteínas da uréia em proporções de concentração tão baixas quanto 1: 2 de Tmao para uréia [58], [60], [61]. O mecanismo em nível molecular pelo qual essa neutralização ocorre ainda não está claro, embora tenha se tornado um *hot topic* nos últimos anos [62]–[72]. Uma hipótese bem aceita é que a estabilização da proteína pelo Tmao supera a desestabilização pela uréia. Embora as

interações favoráveis do Tmao com as cadeias laterais da proteína promovam a desnaturação da proteína, as interações altamente desfavoráveis do Tmao com o *backbone* da proteína, compensam as interações favoráveis do Tmao com a cadeia lateral. A uréia, por outro lado, interage favoravelmente com a cadeia principal do peptídeo proteico e com as cadeias laterais da proteína. Como as interações da cadeia lateral para o Tmao e a uréia favorecem o estado desdobrado, a exclusão do Tmao do backbone da proteína pode ser a única origem da proteção de proteínas. Esse mecanismo também seria responsável pela capacidade do Tmao de combater os efeitos da uréia em todas as proteínas, independentemente das cadeias laterais.

Embora muitas pesquisas tenham focado em como o Tmao e a uréia interagem de forma independente ou coletiva com proteínas, até muito recentemente, poucos estudos se concentraram nas interações em nível molecular entre os dois osmólitos presentes juntos na solução. Em um estudo de difração de nêutrons, Meerman et al. [66], sugeriram que o átomo de oxigênio no Tmao interage preferencialmente com os grupos amina da uréia, e não com a água, quando os dois osmólitos estão juntos em solução. Essa interação direta de Tmao-uréia, juntamente com os efeitos de exclusão do Tmao do *backbone* da proteína, explicaria a capacidade do Tmao de neutralizar a desnaturação da uréia em soluções de proporção de concentração de 1: 2 Tmao-uréia. Essa hipótese foi recentemente apoiada por Ganguly et al. [30], que mostraram, usando modelos teóricos, que há um delicado equilíbrio nas interações Tmao-água, Tmao-Tmao e Tmao-uréia. Sahle et al. [73], estudaram a estrutura da água em soluções concentradas de Tmao-uréia usando espalhamento de raios-X inelástico e concluíram que a estrutura de ligação de hidrogênio da água permanece intacta se ambos os osmólitos estiverem presentes em baixas concentrações, e que o Tmao e a água interagem muito mais fortemente que a uréia e a água.

Recentemente, as interações entre Tmao e uréia em soluções aquosas saturadas foram investigadas por Zetterholm et al. [52], usando espectroscopia Raman e cálculos de estrutura eletrônica. Nesse artigo eles sugerem que a uréia e o Tmao interagem diretamente na solução aquosa, pelo menos em altas concentrações. Eles determinaram que as conformações de aglomerados moleculares, com moléculas de uréia no centro, são mais baixas em energia do que aquelas que mantêm uma rede de ligações de hidrogênio com a água. Esses resultados sugerem que, pelo menos em altas concentrações, (1:4), o Tmao neutraliza diretamente o efeito desestabilizador da uréia nas proteínas por meio de interações diretas com os grupos amina da uréia, veja Figura 27 retirada desse artigo. Nessas estruturas, o átomo de oxigênio do Tmao interage com um dos átomos de hidrogênio do grupo amina da uréia e um

hidrogênio de uma molécula de água. Esses dados sugerem que o Tmao interage diretamente com a uréia em altas concentrações, o que está de acordo com estudos de Meersman et al. [66], [67]. Isso contrasta com outros estudos que sugerem que essa interação não está presente nas concentrações fisiológicas [67], [71], [73].

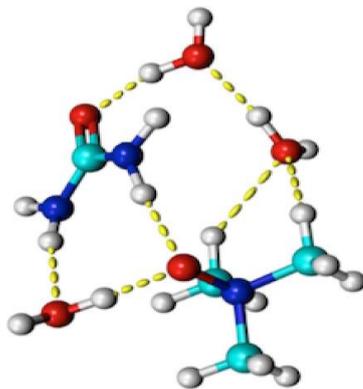


Figura 27: Interação entre a uréia e o Tmao com três moléculas de água. Figura retirada do artigo [37].

Mais recentemente, Oprzeska-Zingrebe e Smiatek [74], fizeram um estudo teórico usando simulações de dinâmica molecular em misturas binárias; de Tmao + água e uréia + água, e também em misturas terciárias; de Tmao+uréia+água em várias concentrações. Nesses cálculos eles determinaram que ambos os co-solutos devem ser considerados como estabilizadores de estruturas de água. Estes resultados contrastam acentuadamente com os efeitos compensatórios observados experimentalmente do Tmao e da uréia combinados em soluções, em relação às estruturas proteicas. Embora o Tmao tenha um impacto maior na estrutura e na dinâmica da água em comparação à uréia, os resultados para ambos os co-solutos mostram propriedades kosmotrópicas, não perturbam a estrutura do solvente, o que desafia a validade dos efeitos mediados pela água para mecanismos de estabilização ou desestabilização da estrutura. Por exemplo, foi demonstrado que uma exclusão preferencial de co-solutos de superfícies macromoleculares induz um comportamento preferencial de hidratação, que geralmente era interpretado como uma marca registrada dos efeitos estabilizadores.

Como visto no texto acima, muita controvérsia há em torno de como o Tmao e a uréia estabilizam ou desestabilizam as proteínas. Procuramos aqui obter mais informação acerca dos efeitos das interações de nível molecular de Tmao e uréia em solução usando espectroscopia eletrônica de soluções aquosas. Para tanto vamos analisar as áreas dos picos que aparecem nas Figura 28 e Figura 29. Na Figura 28 e Figura 29 apresentamos os espectros

do C1s e do N1s, respectivamente, para os pH's neutro (superior) e ácido (inferior), esses espectros já foram apresentados na seção anterior, mas de outra forma. Aqui iremos comparar as misturas binárias, Tmao+água (azul) e uréia+água (vermelho), com a mistura terciária Tmao+uréia+água (preto). Com isso poderemos determinar o comportamento das soluções em que o Tmao e a uréia estão presentes comparado as soluções em que eles estão sozinhos. Na Tabela 4, apresentamos a razão das áreas do Tmao/uréia para as amostras binárias e para as terciárias (mix) e também a diferença em porcentagem entre elas.

Tabela 4: Razão entre as áreas do Tmao pela da Uréia para as amostras binárias, ou seja, Tmao+água e uréia+água, e para as amostras terciárias, que são os mix, Tmao+uréia+água.

		Área Tmao/Área Uréia (\pm o erro propagado)		
		Binária	Terciária (Mix)	Diferença (%)
C1s	neutro	1.33 (0.02)	1.17 (0.03)	-12 (3)
C1s	ácido	1.30 (0.02)	1.39 (0.04)	+6 (3)
N1s	neutro	1.46 (0.02)	1.28 (0.03)	-12 (4)
N1s	ácido	1.34 (0.03)	1.57 (0.04)	+15 (3)

Podemos observar que para as amostras no pH neutro, tanto para a borda do C1s quanto para N1s, linhas amarelas na Tabela 4, a razão nas amostras simples são maiores que na mistura, tendo uma diferença de 12%. Isso indica que a mistura de Tmao com uréia no pH neutro vai mais para o *bulk*, pois a razão das áreas decresce. Isso porque a área do Tmao nas amostras binárias são maiores que o Tmao no mix, a área da uréia é aproximadamente igual, como discutido na seção anterior. Essa diminuição do sinal na mistura, diminuindo a propensão da mistura a superfície, vai na direção de que o Tmao anula os efeitos da uréia na estabilização/desestabilização das proteínas. Se eles estão mais no *bulk*, indica que eles se afastam da superfícies hidrofóbicas.

Observando agora o pH ácido, vemos que a razão das áreas do Tmao/uréia se inverte, o mix tem razão maior que a amostra binária, aumenta 6% no C1s e 15% no N1s. Isso indica que no pH ácido, quando o Tmao é protonado, a mistura de Tmao+uréia tende a ir mais para a superfície do que a mistura neutra, aumentando o sinal de elétrons para a mesma energia do fóton. Isso mostra que a mistura ácida se acumula mais na interface hidrofóbica, o que pode propiciar o desdobramento das proteínas, como discutido na seção anterior.

Resultados anteriores mostram que moléculas neutras vão mais para a superfície, enquanto moléculas carregadas ficam mais no bulk da solução [75], [76]. Isso está de acordo com nosso resultado que mostra que na solução ácida, protonada, as razões são maiores que nas soluções neutras.

Na Figura 30, apresentamos os espectros do C1s e do N1s para o pH neutro, para as misturas 1 M:1 M (preto) e 1 M:2 M (azul) de Tmao e uréia, respectivamente. A razão da área do Tmao/uréia, normalizadas pelo número de átomos na borda de absorção, é de 1,17 para o C1s e de 1,28 para o N1s. Observamos que não há uma mudança muito significativa quando se aumenta a concentração de uréia na mistura.

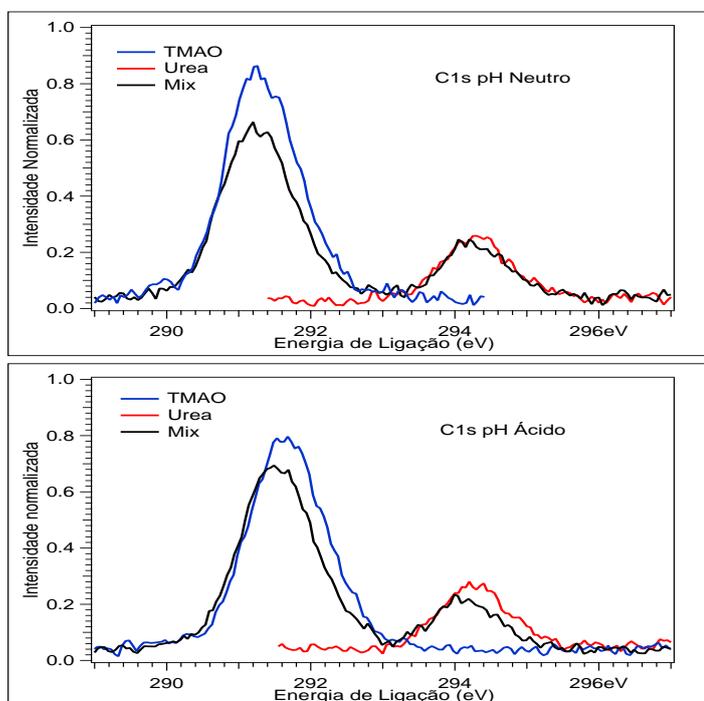


Figura 28: Espectros na borda do C1s, comparando o Tmao, mix e uréia no mesmo espectro, para os pH's neutro (superior) e ácido (inferior). Em pH neutro (em torno de 7) e ácido (pH 3.8 para o Tmao e mix, e 2.7 para a uréia)

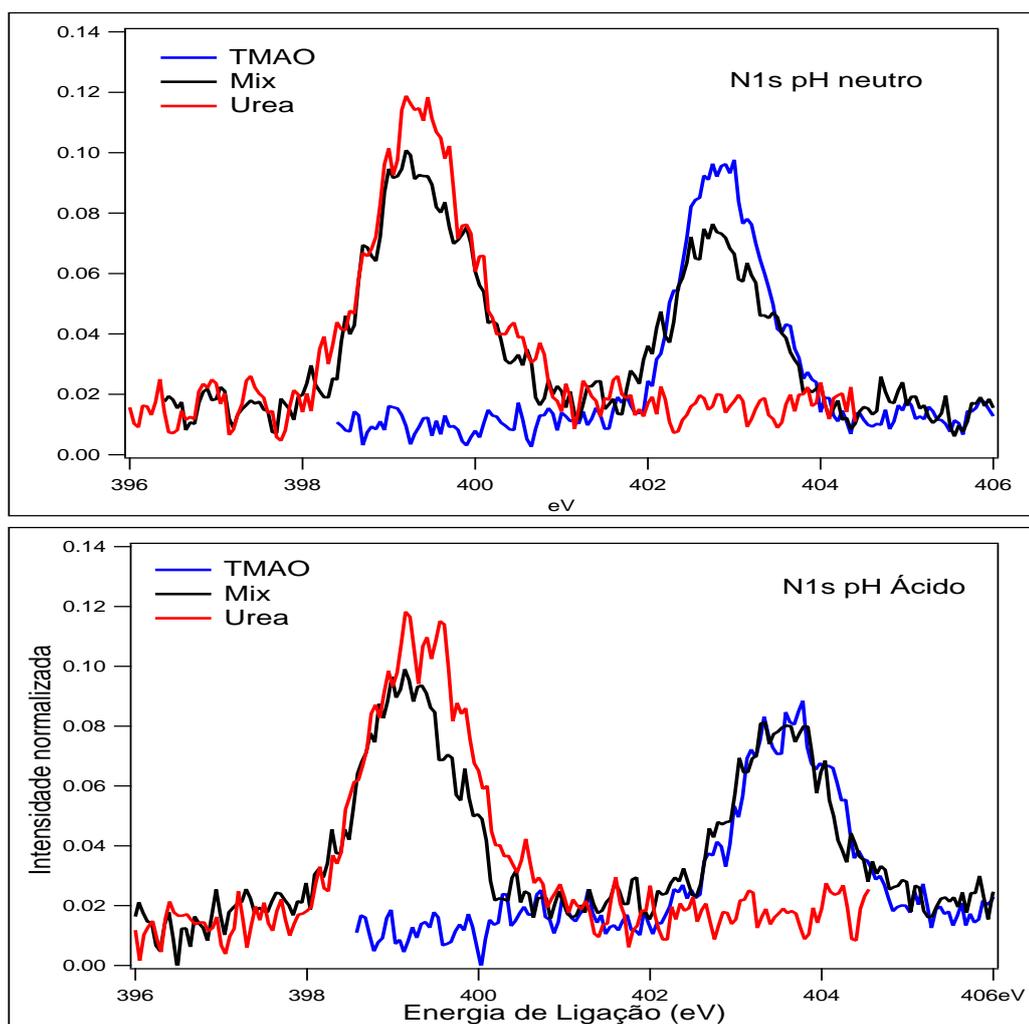


Figura 29: Espectros na borda do N1s, comparando o Tmao, mix e uréia no mesmo espectro, para os pH's neutro (superior) e ácido (inferior).

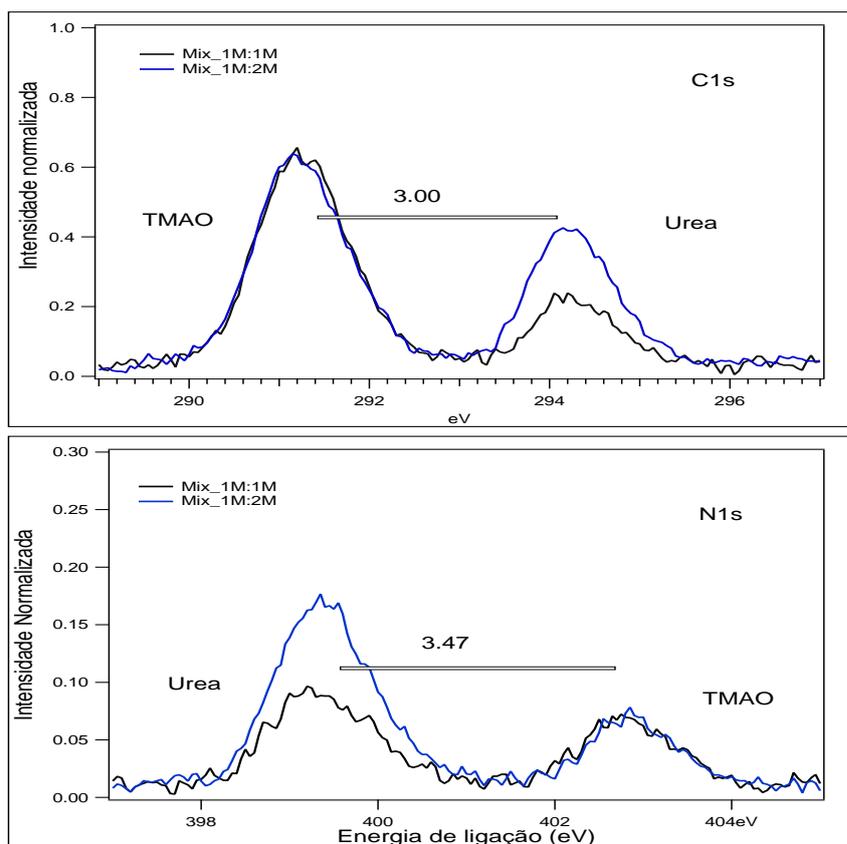


Figura 30: Espectros na borda do C1s (superior) e N1s (inferior), para a mistura em duas proporções 1:1 e 1:2 de Tmao e uréia, respectivamente para os pH neutro.

4.1.6 Conclusões

Os efeitos dos osmólitos resultam da porção relativa dessas moléculas entre a solução no *bulk* e na interface proteína-água. A estabilização deve ocorrer quando os osmólitos não estão na interface proteína-água, mas as proteínas se desdobram quando osmólitos se acumulam nessa interface. A interface água-vácuo é uma interface hidrofóbica e pode ser comparada com a interface hidrofóbica proteína-água. Reportamos que as amostras ácidas vão mais para a superfície comparada com as neutras, isso pode implicar no desdobramento das proteínas para pH's ácidos. Já para pH neutro, ou pH fisiológico, as amostras tanto do Tmao quanto da mistura tendem a ficar mais no bulk, ou seja afastadas da interface hidrofóbica, podendo explicar a contribuição do Tmao para o enovelamento das proteínas.

Capítulo 5

5.1 Ozônio

5.2 Introdução

Um dos pontos críticos para que modelagens mais realistas da camada de ozônio sejam implementadas está conectado com a disponibilidade de seções de choque confiáveis de fotoionização e produção iônica foto induzida na faixa de 11,2 a 21,2 eV. Berkowitz [77] publicou em 2008, dados de seção de choque parciais para processos de fotoionização para essa molécula. Em seu artigo, os dados foram obtidos indiretamente através da renormalização de medidas anteriormente publicadas de produção parcial de íons [78], [79]. Entre esses dados, encontram-se resultados de produção parcial de íons obtidos por nosso grupo de pesquisa [78]. Sabemos que esses dados estão contaminados por harmônicas de ordem superiores presentes na energia dos fótons na época da realização das medidas. Tal contaminação pode, em muitos casos, produzir resultados não só quantitativamente incorretos como até qualitativamente inexatos. Além disso, para a renormalização dos resultados, Berkowitz utilizou dados de seções de choque totais muito antigos, não confiáveis, obtidos por diferentes grupos [80]. Por fim, em seu artigo, ele escreve: “To the best of our knowledge, there have been no reported measurements on the energy dependence of the partial cross sections or branching ratios corresponding to the ionic states ...”. Esta frase e a necessidade de corrigir informações sobre as seções de choque potencialmente incorretas nos motivou a fazer essas medidas, apesar das dificuldades em se obter amostras com bom grau de pureza de ozônio e em quantidade suficiente. Em face ao exposto, o presente estudo tem por finalidade obter valores absolutos de seções de choque para processos de fotoabsorção e fotoionização para a molécula de ozônio na região de valência (11,2-21,2 eV). Medidas dessa natureza (seções de choque), somente são possíveis atualmente com o uso de um filtro de gás [81], instalado na linha de luz TGM, que garante a eliminação do alto grau de contaminação de harmônicas de ordens superiores na região de energia acima mencionada. Para a realização dos experimentos será usada uma câmara de absorção, baseado na técnica de câmara dupla de ionização, associada a um espectrômetro de massa. Essa câmara de absorção já foi utilizada em experimentos anteriores [82] mostrando excelente desempenho na obtenção de resultados de seções de choque absolutas para processos de fotoabsorção e fotoionização totais. Além disso, uma das grandes vantagens dessa técnica é que ela também permite obter seções de choque para processos de decaimento neutro, de grande importância para o estudo de

processos de decaimento de estados super-excitados [83], particularmente na região de energias que temos interesse. Por outro lado, as medidas acima citadas, associadas a medidas de produção parcial de íons obtidos com um espectrômetro de massa, podem ser usadas para gerar seções de choque parciais para a produção de cada fragmento iônico. Assim sendo, o presente trabalho tem por finalidade contribuir para sanar a carência de resultados precisos de seções de choque para a interação de radiação ultravioleta com moléculas de ozônio.

5.2.1.1 Método experimental

O ozônio é de grande importância para os seres vivos, pois de todos os gases que temos na atmosfera somente ele filtra a radiação ultravioleta proveniente do Sol nocivo aos seres humanos, animais e plantas. A camada de ozônio tem um papel fundamental de filtro natural da Terra. A exposição à radiação ultravioleta de pessoas, pode trazer consequências, tais como, catarata nos olhos, envelhecimento acelerado e câncer de pele. Embora, muitos estudos tenham sido feitos a respeito desta molécula, não temos conhecimento da seção de choque de fotoabsorção e fotoionização na região de valência. Nesse trabalho medimos a seção de choque de fotoabsorção e fotoionização das moléculas de oxigênio, nitrogênio e ozônio. Para o estudo do ozônio tivemos que produzir as amostras na linha de luz e o processo é descrito abaixo na seção (5.2.1.2) e para medidas das seções de choque utilizamos a câmara de dupla ionização cuja teoria e princípios de funcionamento são descritos na seção (2.1.8).

5.2.1.2 Produção de ozônio

Em nosso trabalho produzimos ozônio utilizando um aparelho chamado de ozonizador. Podemos descrever o processo de produção de ozônio da seguinte forma: após o gás de O_2 entrar no aparelho ozonizador, ele é submetido a uma descarga elétrica forte na qual a molécula se fragmenta. Os átomos de oxigênio decorrentes da fragmentação reagem com O_2 e formam o O_3 . O ozônio produzido vem misturado com uma grande concentração de oxigênio e precisa ser purificado. Portanto, a mistura passa por um procedimento de purificação, onde é reduzido significativamente a concentração de O_2 .

Na Figura 31, temos o conjunto de produção de ozônio que é composto de um cilindro de O_2 comercial de alta pureza acoplado ao ozonizador, que também está conectado por tubos de teflon ao sistema de purificação que pode ser observado no desenho esquemático na Figura 31, abaixo.

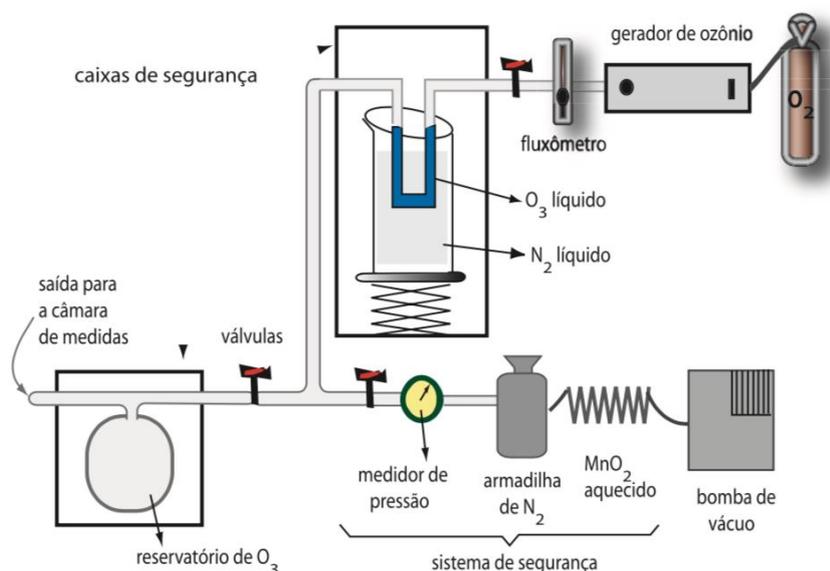


Figura 31: Desenho esquemático de produção e purificação do ozônio.

Utilizamos vidro pirex, teflon e viton em nosso sistema de produção do ozônio, pois essas matérias são resistentes a forte oxidação do ozônio.

Na montagem do sistema mostrado na Figura 31, aquecemos os tubos de teflon para facilitar as conexões das válvulas. Entre o sistema de purificação e ozonizador é usado um controlador de fluxo (0.2-2.5 lpm de ar). Conectado ao conjunto temos uma bomba que mantém o sistema sob vácuo, e um medidor de vácuo primário, que serve para monitorar a pressão no sistema que é ≈ 20 mbar durante a produção do ozônio. No processo de purificação do ozônio, o tubo de pirex em formato de U mostrado na Figura 31, fica dentro de um bequer de vidro com nitrogênio líquido a uma temperatura de (-196°C) . Este pode ser movimentado vertical por um pequeno macaco, já o tubo em forma de U é fixo. Após o resfriamento do O_2 e O_3 no interior do tubo, abaixamos e levantamos lentamente o reservatório de N_2 líquido com o macaco, este procedimento faz com que o oxigênio dentro do tubo evapore aos poucos e é bombeado para fora da amostra, restando apenas o O_3 dentro do tubo. Isso ocorre porque o O_2 evapora a uma temperatura de $(-182,8^\circ\text{C})$, que é bem menor do que ponto de fusão do ozônio que é de $(-111,8^\circ\text{C})$ [84]. Mais detalhes da produção do ozônio são reportados no artigo de A. Mocellin et al. [85].

5.3 Resultados e discussões

Nesta seção apresentaremos os resultados de medidas da seção de choque de fotoabsorção e fotoionização do ozônio. Esses dados foram obtidos usando-se uma câmara de dupla ionização, na linha TGM do LNLS, com amostras gasosas de ozônio produzidas a partir de um equipamento desenvolvido por nós para produção de ozônio.

Medimos o ozônio porque a interação de radiação ionizante com moléculas de ozônio, apesar de grande interesse, é um problema ainda em aberto. A compreensão da fotoquímica do ozônio acima do limite de ionização é de grande importância no entendimento da formação e destruição do ozônio na alta atmosfera. Tais estudos são fundamentais para modelagens mais realistas da atmosfera Terrestre e de grande interesse para a sociedade já que a camada de ozônio é um dos principais elementos que bloqueiam os raios ultravioleta nocivos aos seres vivos. Um dos pontos críticos para que modelagens mais realistas da camada de ozônio sejam implementadas está conectado com a disponibilidade de seções de choque confiáveis de fotoionização e produção iônica foto induzida na faixa de 11,2 a 21,2 eV.

Para a determinar a seção de choque de fotoabsorção, σ_a , dada pela equação (2.30), é necessário conhecer as intensidades dos fluxos I e I_0 . A equação mencionada acima correlaciona exponencialmente as intensidades de radiação medidas antes de passar pela amostra gasosa, I_0 e após ser absorvida pela amostra I – dependente da concentração de amostra [29].

5.3.1 Resultados e Discussões

Medimos as seções de choque de fotoionização dos gases nobres argônio e xenônio, e a partir da equação (2.45), calculamos o fluxo I_0 de fótons, isso só foi possível porque a eficiência quântica desses gases é de 100%.

Pode-se observar na Figura 32, uma curva de generalização para o fluxo I_0 para os gases nobres. Para gerarmos essa curva, usamos as medidas lentas da seção de choque do argônio e xenônio assim utilizamos também uma função para o ajuste da curva geral.

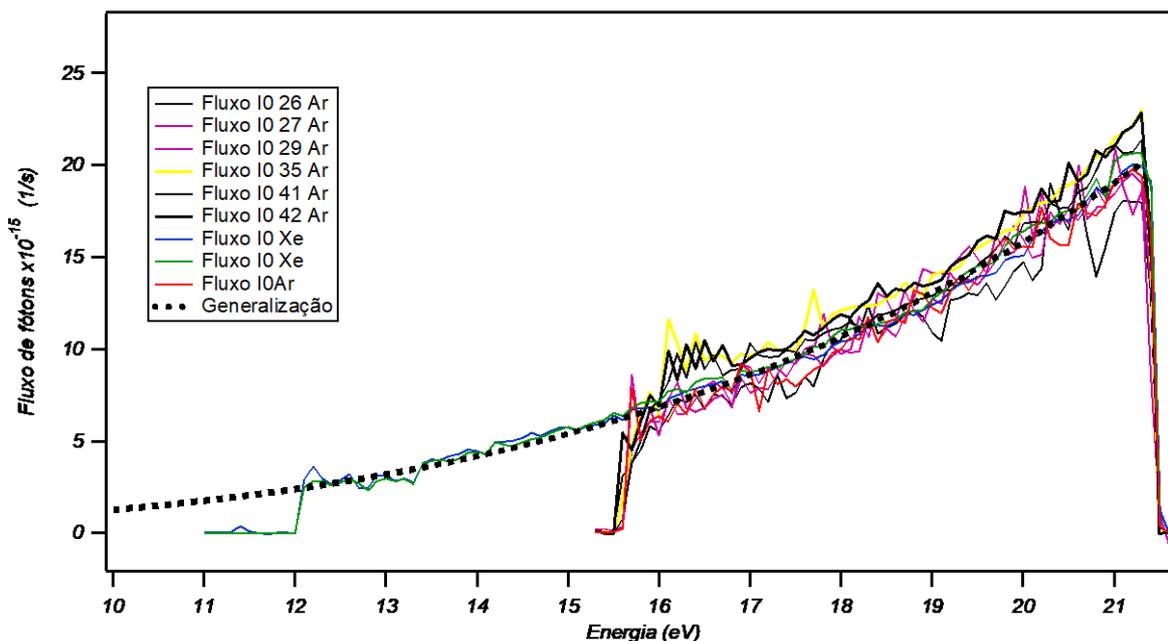


Figura 32: Curva de generalização para o fluxo I_0 para os gases nobres.

Utilizamos a técnica da câmara dupla de ionização para determinar a seção de choque de fotoionização do nosso trabalho, por já ter sido usada em muitos estudos dessa natureza e apresentado bons resultados.

Na Figura 33, apresentamos as medidas das seções de choque de fotoionização absoluta do argônio do limiar de 15,3 eV (810,4 Å) a 21,3 eV (582,16 Å) num passo de 0,1 eV e com uma pressão de gás de 0.3495 mbar. Observamos que as curvas do espectro de fotoionização do argônio exibida no nosso trabalho apresenta uma boa concordância ao Samson et al [86], essa convergência fica bem evidente a partir da energia de 17 até 21 eV, veja a Figura 33.

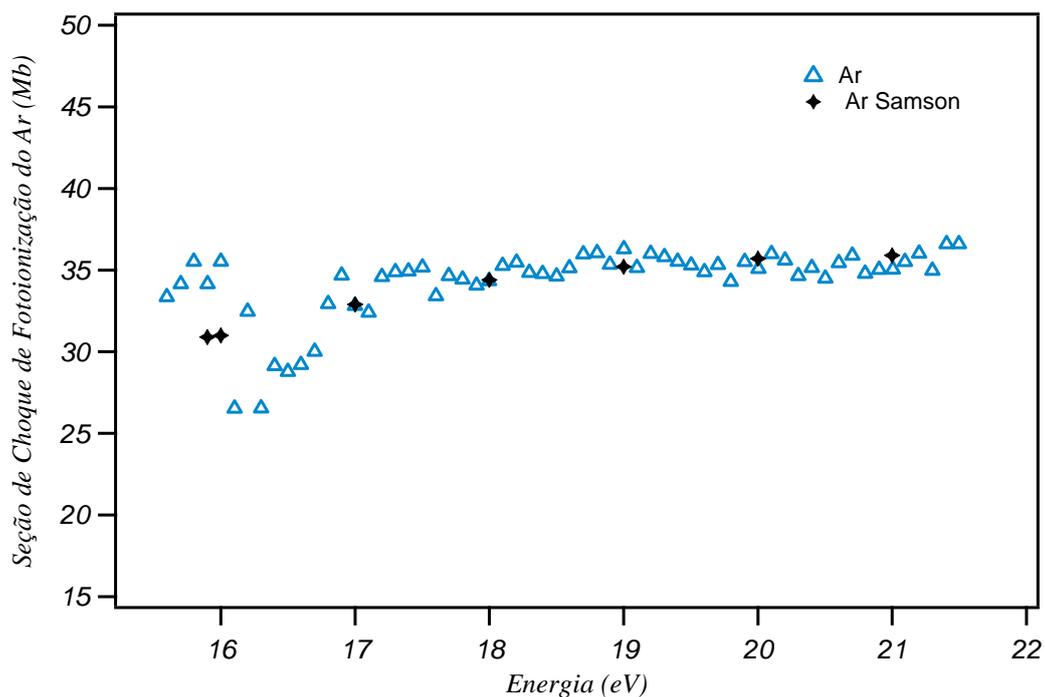


Figura 33: Seções de Choque de fotoionização do Argônio do limiar de 15,3 eV a 21,3 eV.

Similarmente à análise do Argônio, as seções de choque de fotoionização absoluta do xenônio foram medidas com um passo em energia diferente (0,01 eV), do limiar de 13,44 eV (922,62 Å) a 21,3 eV (582,16 Å) e pressão de 0,487 mbar. Observamos que as curvas mostradas na Figura 34, apresentam um bom comportamento com os existentes na literatura, por exemplo: com as Samson et al [86], os quais foram obtidos sob condições de energia de 14,66 eV a 125 eV, e passos nos valores de 0,2 e 0,5 eV.

Nessa figura observa-se que no limiar de 13,8 eV é o ponto de maior intensidade que corresponde $\cong 66 Mb$, já para valores de maiores energia as intensidades são menores. Nas Figura 33 e Figura 34 as curvas das seções de choque de fotoionização absoluta do argônio e xenônio apresentam um erro de $\cong 10\%$.

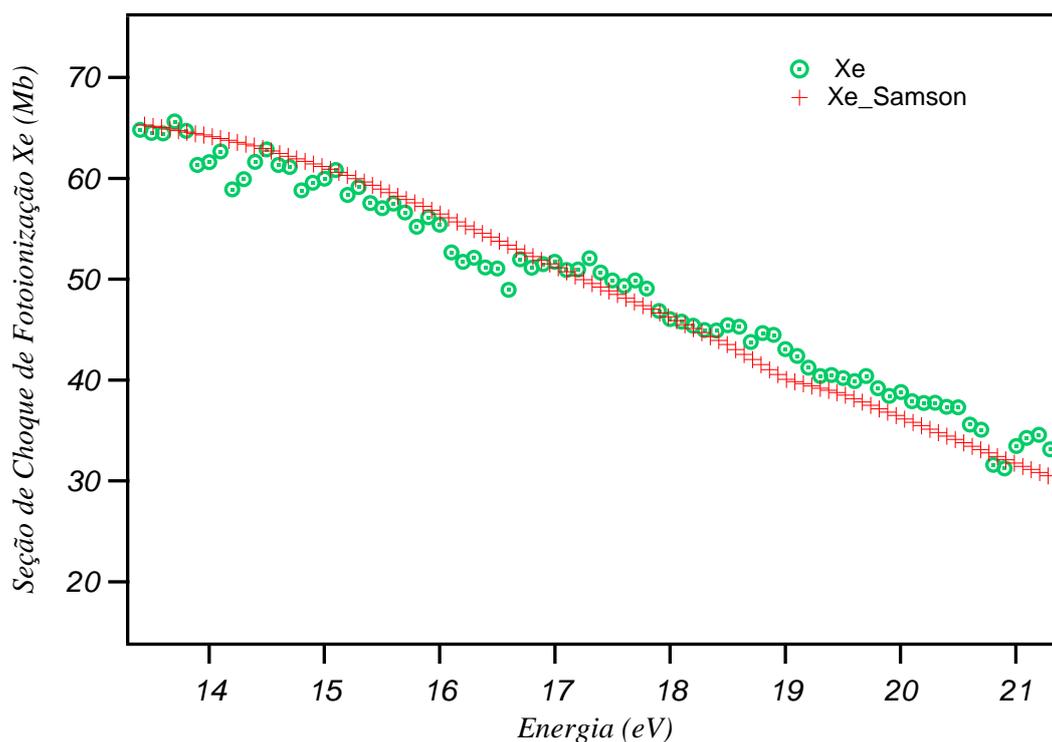


Figura 34: Seções de Choque de fotoionização do Xenônio do limiar 13,44 eV a 21,3 eV

Nas medidas das seções de choque de fotoabsorção absoluta do oxigênio exibidas na Figura 35, viu-se a necessidade de se fazer referência à outras literaturas. Para fins de comparação, utilizou-se Fennelly et al.[87] na qual é obtida uma boa concordância com os nossos resultados de fotoabsorção. A geração das curvas de seus artigos – para a descrição de ambos Oxigênio e Nitrogênio, este último trabalhado mais à frente – baseou-se na digitalização dos gráficos ali presentes.

Podemos observar nessa figura que a seção de choque de fotoabsorção do oxigênio apresentado por Fennelly et al.[87], apresentam maior intensidade em alguns pontos em comparação ao nosso trabalho, mas em boa parte das curvas, elas batem muito bem. Isso indica que nossos dados atuais são bons comparados ao da literatura Fennelly et al.[87].

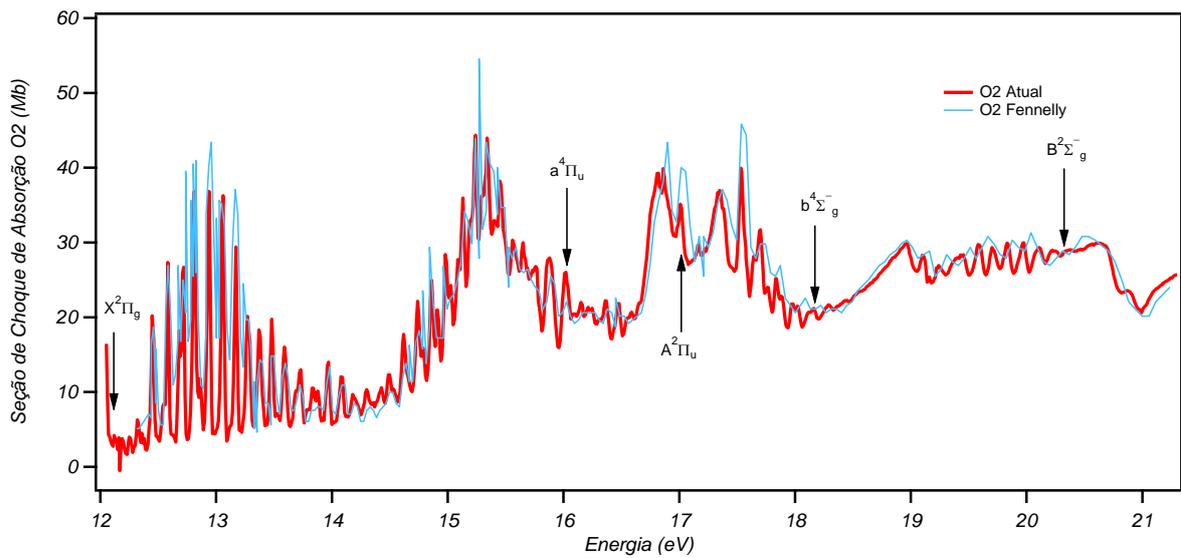


Figura 35: Seção de choque de fotoabsorção do oxigênio. Curvas em vermelho dados atuais e em azul os dados de Fennelly. Estados eletrônicos do O_2^+ do artigo de K. Wiesner et al. [88].

Medimos as seções de choque de fotoabsorção absoluta do nitrogênio. Os resultados atuais de nosso trabalho de fotoabsorção do nitrogênio exibido na Figura 36, apresenta um boa concordância relacionado aos de Cook et al. [89]. Ao analisar as curvas geradas pelo método da câmara dupla de ionização aplicado em nossa pesquisa, pela literatura de Cook et al. [89], ficam evidentes valores de ambos os trabalhos apresentados na Figura 36, são bem parecidos.

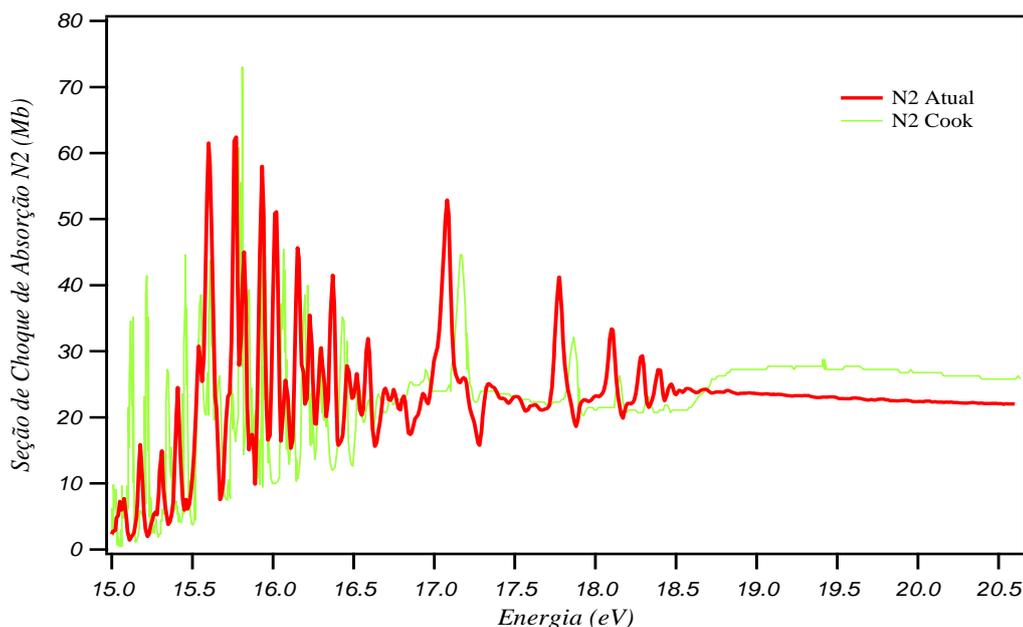


Figura 36: Seção de Choque de Absorção, a curva em vermelho nosso resultado e a em verde a de Cook.

Na Figura 37, temos as medidas das seções de choque absorção absoluta do ozônio, nitrogênio e oxigênio. Pode-se observar na Figura 37, que as curvas do N_2 e O_2 coincidem com estruturas presentes no espectro do O_3 . Isso indica que o espectro do O_3 contém uma contaminação com N_2 e O_2 , que está relacionada ao momento de produção do O_3 . Não é uma tarefa fácil produzir ozônio sem que haja contaminação de outros gases. O O_2 faz parte da produção do ozônio e sempre resta um percentual de mais ou menos 10% de O_2 após o processo de purificação. O N_2 entra no sistema devido a pequenos vazamentos nas conexões do teflon com o pirex, e também no ozonizador, feitas somente com encaixe entre esses dois materiais. Avaliamos as contaminações pelo tamanho das estruturas do O_2 e N_2 , presentes nos espectros do O_3 , em 25 % de O_2 e 12 % de N_2 . Os espectros multiplicados por esses fatores podem ser vistos na Figura 38.

Para determinar a posição em energia de cada estado eletrônico e a sua nomenclatura, utiliza-se o espectro de fotoelétrons (PES), e a partir da evolução vibracional no espectro PES é factível estabelecer quais estados que estão conectados dentro da região de Franck-Condon [90].

Na Tabela 5, temos as comparações entre os espectros de *TPES* H. Couto [91] e os de *PES* de Wiesner [88] e Katsumata [92].

Tabela 5: Potenciais de ionização determinados no espectro de TPES do O₃ e sua designação, na região de 11,50 a 21,00 eV comparados com os dados de PES de Wiesner [88] e Katsumata [90], [92]

<i>Banda</i>	<i>TPES I_v (eV) Ref.[91]</i>	<i>Estado</i>	<i>PES Ref. [88]</i>	<i>PES Ref. [92]</i>
	$\pm 10 \text{ meV}$	<i>Iônico</i>	$\pm 35 \text{ meV}$	$\pm 25 \text{ meV}$
1	12.73	1^2A_1	12.73	12.73
2	13.00	1^2B_2	13.00	13.00
3	13.54	1^2A_2	13.54	13.54
4		2^2B_2	15.54	15.60
5	16.57	2^2B_1	16.38	16.50
6	17.30	3^2A_1	17.60	17.60
		4^2B_2		
		5^2B_2		
7	19.60	5^2A_1	19.40	19.40
		6^2A_1		
8	20.00	6^2B_2	20.10	20.00
		5^2B_1		
9	20.40	7^2B_2	20.90	20.80
		7^2A_1		

Para a investigação do ozônio, consideraram-se as seções de choque de absorção absoluta do nitrogênio e oxigênio, conforme expresso na Figura 37. Nessa figura apresentamos os espectros do ozônio, oxigênio e nitrogênio medidos com energia do fóton 11 a 21,54 eV. Podemos observar na Figura 38, a partir da energia de 12,65 eV há o surgimento do O₂⁺ no espectro do ozônio, essa energia de 12,65 eV está abaixo do potencial de ionização do O₂⁺ que é oriundo do ozônio [90]. Observamos um aumento da fotoabsorção do O₃ a partir da energia 12,5 eV, esse aumento está relacionado a abertura do canal de ionização da molécula de ozônio que coincide com seu limiar de ionização, que corresponde o potencial de ionização adiabático para o estado 2A_1 , que está em acordo com um valor espectrométrico de massa de fotoionização de 12,519 eV de Weiss et al.) [79]. Toda vez que um novo estado iônico é atingido haverá o surgimento de um degrau, e o seu tamanho dependerá da seção de choque do estado. Quando o primeiro estado é atingido ocorre o início da fotoabsorção do O₃ que corresponde ao primeiro estado. Veja Figura 38.

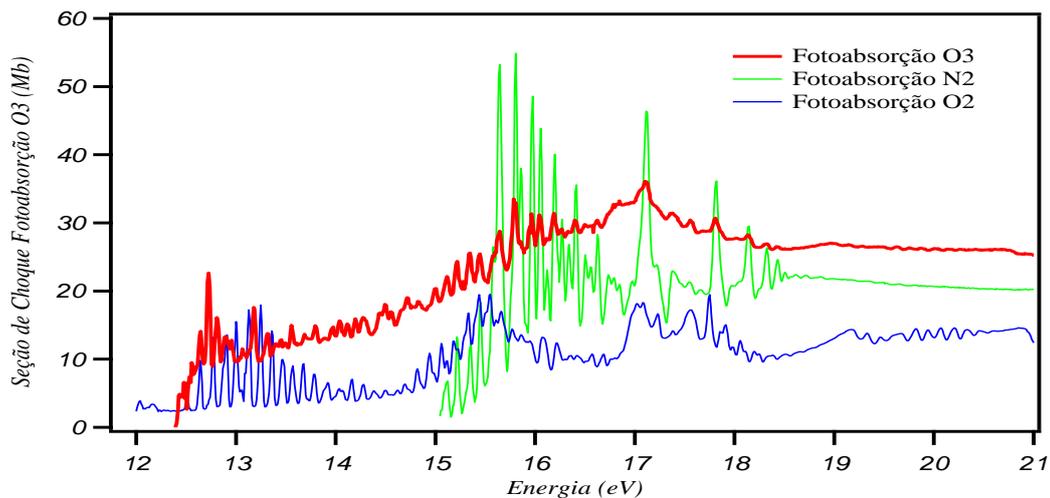


Figura 37: Seção de Choque Absorção do O₃, O₂ e N₂. A curva em vermelho temos o espectro do Ozônio, em verde o do Nitrogênio e a em azul o Oxigênio.

Podemos observar na Figura 38, o aumento da fotoabsorção a partir 12,5 até 14,0 eV. Entre essa região temos dois degraus, o primeiro em 12,5 eV e o segundo em 13,5 eV. A partir de 14,0 até 15,0 eV, percebemos um crescimento suave na fotoabsorção do ozônio, e de 15,0 até 17,0 eV notamos que o crescimento na seção de choque é mais acentuado. Nessa figura notamos que para a faixa de energia entre 17,0 e aproximadamente 18,4 eV a um decréscimo na fotoabsorção, mas depois dessa zona espectral ela é praticamente constante em 27,2 Mb.

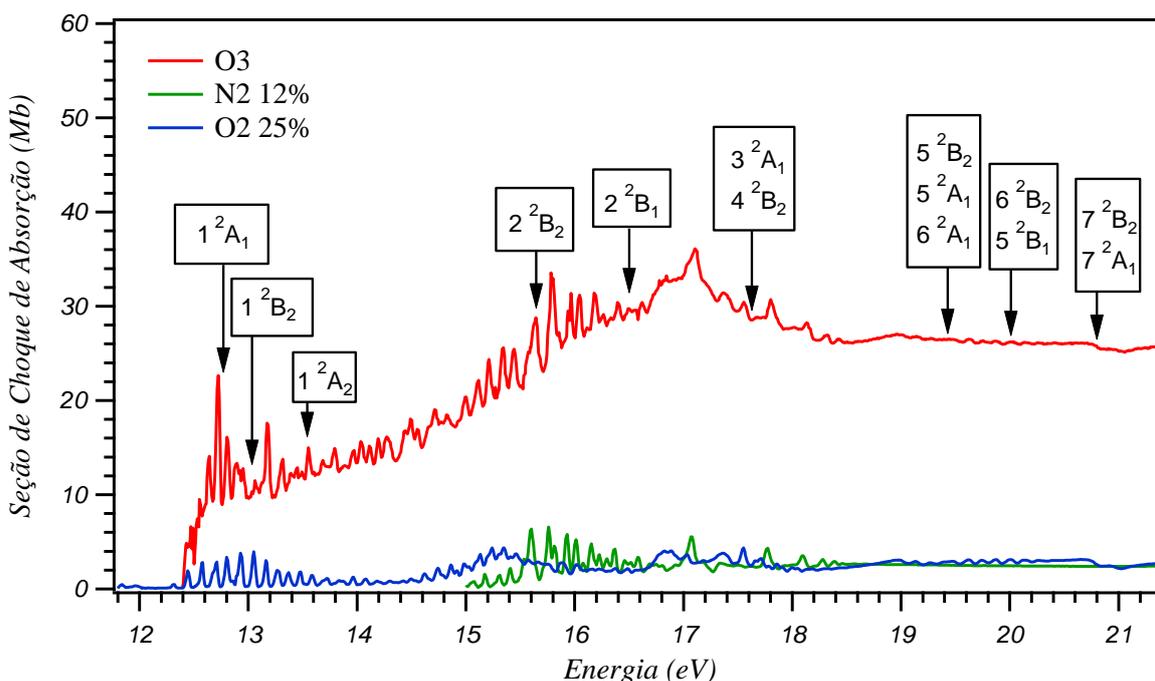


Figura 38: Seção de choque de Fotoabsorção do O₃, O₂ e N₂. O espectro do N₂ foi multiplicado à 12%, já o do O₂ à 25%.

Na Figura 39, temos as medidas das seções de choque de fotoabsorção e fotoionização absoluta do ozônio. Observa-se nessa figura, que a partir da energia de 12.5 até 17.1 eV, o espectro de fotoabsorção e o de fotoionização de nosso trabalho e o de Cook et al. [89], apresentam uma boa concordância, já acima desta região eles diferem um pouco. Uma possível explicação para o que está ocorrendo acima da região do limiar de 17,1 eV, pode estar relacionado às correntes dos íons coletados nas placas da câmara de dupla ionização. Baseados na equação (2.45), notamos que, se as correntes i_1 e i_2 forem muito próximas, a seção de choque de fotoionização cresce muito. As correntes terem valores muito próximos pode estar ocorrendo por dois motivos, ou pela pressão de gás de ozônio muito baixa ou o fluxo de fótons muito grande devido à abertura da fenda da linha de luz. Quando a energia do fóton aumenta as curvas de fotoabsorção e fotoionização deveriam coincidir, pois a eficiência quântica aumenta e fica próxima de um. Vemos na Figura 39 que a fotoionização fica maior que a fotoabsorção acima de 17 eV, o que implica que esses dados não estão confiáveis acima deste valor.

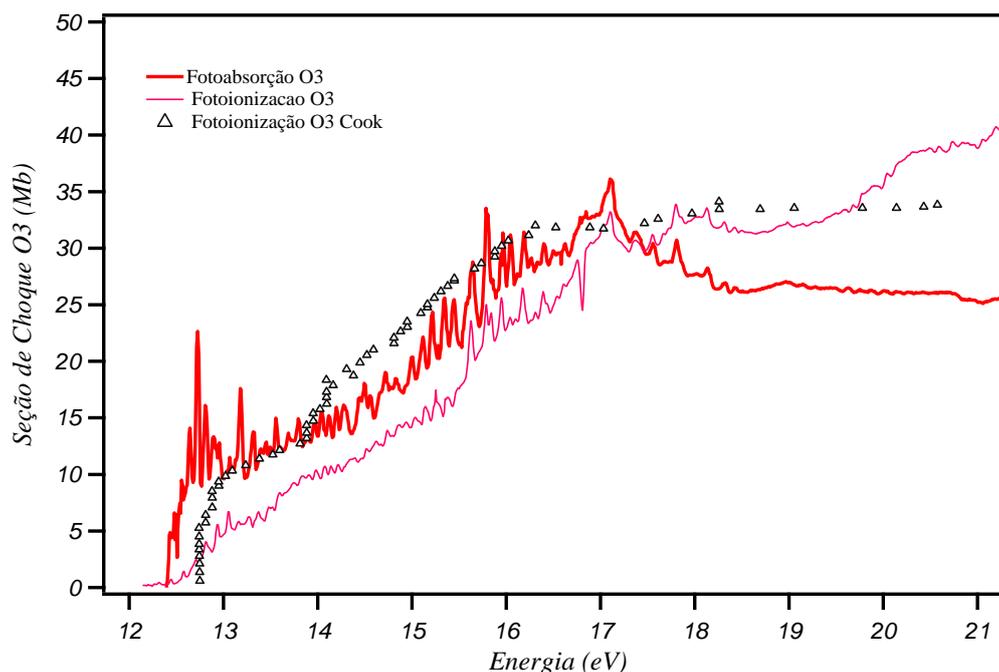


Figura 39: Seção de choque de Fotoabsorção e Fotoionização do O₃. O espectro em vermelho é o de Fotoabsorção do O₃ (—) de nosso trabalho, a curva em rosa é o espectro de Fotoionização do O₃ (—), a curva em preto de Fotoionização da literatura referente ao de Cook (Δ).

Na Figura 40, apresentamos as medidas das seções de choque de fotoionização do O₃, as seções de choque parciais absolutas do O₃⁺, O₂⁺ e decaimento neutro O₃, na região de 12 a 14,5 eV. Para obtermos as curvas dessa figura utilizamos as equações (2.43) e (2.45). As linhas nas cores azul e rosa são as seções de choque de fotoionização parcial absoluta do O₃⁺ (Yield O₃) e O₂⁺ (Yield O₂), já as nas cores vermelho, preta e verde são as seções de choque de fotoabsorção, fotoionização absoluta e decaimento neutro do ozônio (O₃). Observamos nessa figura que acima do limiar de ionização do ozônio, de 12,5 eV, surge a seção de choque de fotoionização parcial do O₃⁺, curva azul. A seção de choque de fotoionização parcial do O₂⁺ começa a surgir a partir de 13.1 eV. Nessa faixa de energia encontram-se os três primeiros estados eletrônicos do ozônio, que apresentam progressões vibracionais; o primeiro estado 1²A₁ em 12,73 eV, e o segundo 1²B₂ em 13,00 eV. Já o segundo degrau corresponde à ionização do terceiro estado eletrônico 1²A₂ em 13,54 eV. Na Figura 40, podemos observar que a produção O₃⁺ do ozônio está relacionada a ionização do primeiro estado eletrônico. O início da produção do íon O₂⁺ está associado a abertura do segundo estado eletrônico e na curva desse íon podemos observar um degrau maior na abertura do terceiro estado eletrônico, em 13,5 eV [78], [90].

Comparando os resultados publicados por Berkowitz com os obtidos aqui, vemos que os dados publicados estão com valores um pouco acima dos nossos medidos. Por exemplo, em 13,6 eV a seção de choque de fotoionização para o O_3^+ e O_2^+ , do Berkowitz é, aproximadamente, 9 e 3 Mbarn, e a nossa é 6 e 2 Mbarn, respectivamente. Essa diferença deve aparecer devido aos diferentes processos de obtenção das curvas, a seção de choque de fotoionização de Cook utilizada por Berkowitz na normalização dos dados é um pouco maior que a nossa, e o fato de haver energias de ordem superior dos fótons, também contribui para um aumento na intensidade. Esses são os únicos dados publicados de seções de choque de absorção e fotoionização do ozônio nessa faixa de energia. Com os nossos dados apresentados aqui podemos contribuir para essa informação mais exata acerca das seções de choque do ozônio.

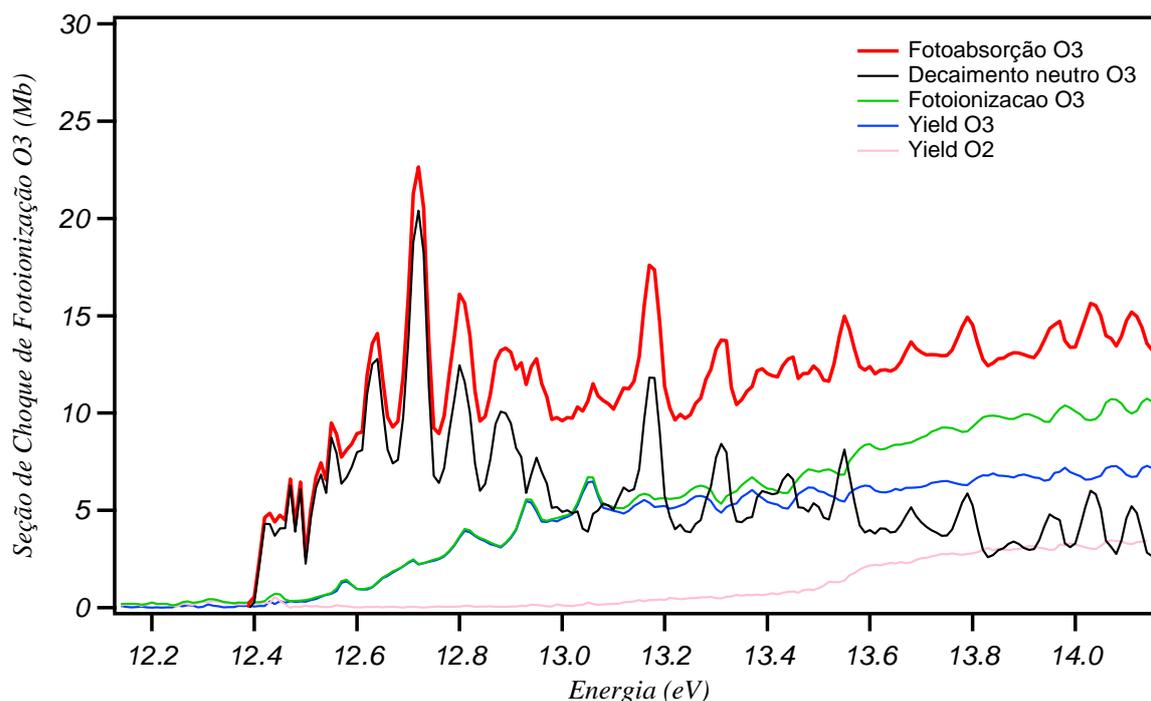


Figura 40: Seção de choque de fotoionização do ozônio e Seção de choque parcial absoluta do O_3^+ , O_2^+ e decaimento neutro.

5.3.1.1 Conclusão

Estudamos o ozônio para tentarmos compreender como esta molécula interage com a radiação ionizante, apesar de muitos estudos, é um problema ainda em aberto. A compreensão da fotoquímica do ozônio acima do limite de ionização é de grande importância no

entendimento da formação e destruição do ozônio na alta atmosfera. O ozônio é o filtro natural da Terra, que filtra os raios ultravioletas do Sol nocivos aos seres vivos.

Utilizamos uma curva de generalização para o fluxo I_0 , para os gases nobres. Para gerarmos essa curva, usamos as medidas lentas da seção de choque do argônio e xenônio utilizamos também uma função para o ajuste da curva geral. A partir da curva generalizada, fizemos os cálculos para da eficiência quântica dos gases estudados nessa tese.

Observamos que as curvas da seção de choque de fotoionização do argônio e xenônio, apresentam um bom comportamento relacionado ao de Samson et al [86]. Também observamos que as nossas medidas da seção de choque de fotoabsorção do oxigênio e nitrogênio, apresentam bons resultados comparados aos da literatura. Notamos o aumento da fotoabsorção do O_3 a partir 12,5 até 14,0 eV, e o surgimento de dois degraus entre essa região, o primeiro em 12,5 eV e o segundo em 13,5 eV. A partir de 14,0 até 15,0 eV, percebemos um crescimento suave na fotoabsorção do ozônio, e de 15,0 até 17,0 eV notamos que o crescimento na seção de choque é mais acentuado. Nessa figura notamos que para a faixa de energia entre 17,0 e aproximadamente 18,4 eV a um decréscimo na fotoabsorção mas, depois dessa zona espectral ela é praticamente constante em 27,2 Mb.

Percebemos que a partir da energia de 12,5 até 17,1 eV, o espectro de fotoabsorção/fotoionização de nosso trabalho e o de Cook et al. [89], apresentam uma boa concordância, já acima desta região eles diferem um pouco. Observamos na Figura 40, que o fragmento produzido pelo ozônio tem ação direta no aumento na inclinação da intensidade da curva do O_2^+/O_3 , que o fragmento do O_2^+ surge a partir da energia de 13,1 eV. Podemos observar nessa figura que a produção parcial do íon O_3^+ ocorre mais na região de energia de 12,0 a 14,0 eV.

Baseado nos resultados das seções de choque de fotoabsorção/fotoionização de nosso trabalho apresentado nesse capítulo, apresentam dados relevantes de ótima qualidade.

Capítulo 6

6.1 Conclusões Gerais

Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que a fotoemissão pode ser aplicada com sucesso a alvos altamente voláteis que, em combinação com a radiação síncrotron, permite acessar diretamente as energias de ligação de elétrons de íons solvatados, seções de choque de fotoionização, deslocamentos químicos, estados de carga e outras informações. Com base nas mudanças espectrais observadas e nas intensidades relativas de fotoemissão dos íons, vários aspectos dos processos fundamentais que ocorrem em soluções aquosas podem ser abordados. Com essa experiência agora alcançada, pode-se investigar sistemas mais complexos. Obviamente, moléculas biológicas e de interesse ambiental estão entre os sistemas interessantes. Este trabalho apresenta medidas de fotoelétrons de soluções aquosas de aminoácidos e osmólitos, bem como medidas de fotoabsorção de amostra gasosa do ozônio.

Estudamos a propensão superficial de quatro aminoácidos usando espectroscopia de fotoelétrons XPS e a técnica de microjato líquido. Estes aminoácidos foram selecionados porque têm um tamanho e cadeias laterais bastante diferentes. Os aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas e tamanho menor, glicina (GLY) e alanina (ALA), tendem a permanecer no *bulk* do líquido, enquanto que os aminoácidos hidrofóbicos e maiores, valina (VAL) e metionina (MET), se encontram concentrados na superfície. Encontramos evidências experimentais de que os aminoácidos têm orientação preferencial em relação à superfície com a cadeia lateral hidrofóbica mais próxima da superfície do que o grupo carboxilato hidrofílico. A partir de um modelo simplificado estimamos que a concentração dos aminoácidos na camada superficial é 0,9 (ALA), 7,6 (MET) e 9,8 (VAL) vezes maior do que no *bulk*. Apesar da metionina possuir uma cadeia lateral mais longa, ela está menos presente na superfície do que a valina, o que é bem reproduzido por simulações teóricas publicadas anteriormente.

Obtemos neste estudo os valores absolutos das seções de choque para processos de fotoabsorção e fotoionização para a molécula de ozônio na região de valência. Medidas dessa natureza (seções de choque) são possíveis com o uso de um filtro de gás Ne, instalado na linha de luz TGM, que garante a eliminação do alto grau de contaminação de harmônicas de ordens superiores na região de energia acima mencionada. Para a realização dos experimentos usamos uma câmara de absorção, baseado na técnica de câmara de dupla ionização, associada a um espectrômetro de massa. Essa câmara de absorção já foi utilizada em experimentos

anteriores mostrando excelente desempenho na obtenção de resultados de seções de choque absolutas para processos de fotoabsorção e fotoionização totais e parciais. Além disso, uma das grandes vantagens dessa técnica é que ela também permite obter seções de choque para processos de decaimento neutro, de grande importância para o estudo de processos de decaimento de estados superexcitados, particularmente na região de energias que estudamos. Por outro lado, as medidas acima citadas, associadas as medidas de produção parcial de íons obtidos com um espectrômetro de massa, foram usadas para gerar seções de choque parciais para a produção de cada fragmento iônico. Com esse estudo contribuimos para sanar a carência de resultados precisos de seções de choque para a interação de radiação ultravioleta com moléculas de ozônio.

Estudamos também com XPS em amostras líquidas, moléculas de interesse biológico chamadas de osmólitos. Para estudarmos os efeitos da concentração do soluto em soluções aquosas de Tmao, Uréia e Betaína, medimos o sinal de fotoelétron para concentrações de soluto de 0,1 a 4 M. Observamos um crescimento linear da intensidade em função da concentração, mesmo para concentrações de 4 M. A molécula de Tmao apresenta a maior intensidade, seguida da uréia e da betaína. As moléculas estudadas não chegam a formar uma camada de saturação na superfície, isso significa que essas moléculas de alguma forma estão menos na superfície e se concentram mais no bulk da solução, ou seja, essas amostras não tem boa propensão a superfície. Usando um modelo simplificado, estimamos que a concentração da molécula na camada de superfície é aproximadamente 1.5 (Betaína), 2.2 (Uréia) e 2.5 (Tmao) vezes maior do que no bulk.

Estudamos os deslocamentos químicos e as diferentes espécies iônicas em função do pH da solução. Para isso medimos os espectros de XPS para amostras em pH fisiológico e em pH ácido, abaixo do pKa do Tmao, de amostras em água de Tmao, uréia e mistura de Tmao e uréia. Observamos que há um deslocamento para maiores energias de ligação para as amostras de Tmao em pH ácido, sendo de 0,36 eV para a borda do C1s e de 0,75 eV para a do N1s. O Tmao no pH ácido sofre a protonação do átomo de oxigênio que está ligado diretamente com o átomo de N1s, por isso o deslocamento químico é maior para a borda de absorção do N1s. As amostras de uréia não sofrem deslocamento químico, indicando que não há protonação nem desprotonação dessa molécula para esses pH's estudados.

Para as amostras misturadas com uma solução de 1:1 de moléculas de Tmao e uréia, vemos que há um deslocamento em energia para maiores BE para o Tmao e para menores BE para a uréia. O espaçamento em energia do pico do Tmao para o da uréia, é de 3.00 eV no pH

neutro e de 2.59 no pH ácido, uma diferença de 0.41 eV na borda do C1s. E para o N 1s temos um deslocamento químico entre os picos do Tmao para o da uréia para o pH neutro é de 3.46 eV e para o pH ácido de 4.35 eV, ou seja uma diferença de 0.89 eV. Observamos que há um deslocamento em energia no sentido de diminuir a diferença em energia no pH ácido. Esses resultados indicam que na mistura não está somente acontecendo a protonação do Tmao; como na amostra binária, mas talvez o Tmao e uréia estejam interagindo de alguma forma.

Analisando-se as áreas, observamos que o Tmao no mix, ficou 10 ± 2 % maior no pH ácido do que no pH neutro, enquanto que a uréia no mix tem um comportamento contrário, diminuindo a intensidade no pH ácido em comparação com o neutro. A uréia na mistura tem um comportamento diferente que na amostra simples, de uréia + água, isso pode ser um indicativo que a uréia está se ligando de forma diferente na presença do Tmao, possivelmente fazendo ligações com o Tmao, como discutido acima, ou então que existe um efeito coletivo no sentido de a uréia empurrar as moléculas de Tmao protonadas mais para a superfície e com isso ir mais para o bulk.

Analisando-se as amostras binárias com relação as misturas terciárias, observamos que para as amostras no pH neutro, tanto para a borda do C1s quanto para N1s, a razão nas amostras simples são maiores que na mistura, tendo uma diferença de 12%. Isso indica que a mistura de Tmao com uréia no pH neutro vai mais para o bulk. Essa diminuição do sinal na mistura, diminuindo a propensão da mistura a superfície, vai na direção de que o Tmao anula os efeitos da uréia na estabilização/desestabilização das proteínas. Se eles estão mais no bulk, indica que eles se afastam da superfícies hidrofóbicas, podendo favorecer o estado enovelado das proteínas. Já para as amostras no pH ácido vemos que a razão das áreas do Tmao/uréia se inverte, a mistura tem razão maior que a amostra binária, aumenta 6% no C1s e 15% no N1s. Isso indica que no pH ácido, quando o Tmao é protonado, a mistura de Tmao+uréia tende ir mais para a superfície do que a mistura neutra, aumentando o sinal de elétrons para a mesma energia do fóton. Isso indica que a mistura ácida se acumula mais na interface hidrofóbica, o que pode propiciar o desnovelamento das proteínas.

Os efeitos dos osmólitos resultam da porção relativa dessas moléculas entre a solução no bulk e na interface proteína-água. A estabilização deve ocorrer quando os osmólitos não estão na interface proteína-água, mas as proteínas se desdobram quando osmólitos se acumulam nessa interface. A interface água-vácuo é uma interface hidrofóbica e pode ser comparada com a interface hidrofóbica proteína-água. Observamos que as amostras ácidas vão mais para a superfície comparadas com as neutras, isso poder implicar no

desnovelamento das proteínas para pH's ácidos. Já para pH neutro, ou pH fisiológico, as amostras tanto do Tmao quanto da mistura tendem a ficar mais no bulk, ou seja afastadas da interface hidrofóbica, podendo contribuir para o enovelamento das proteínas.

A fase de vapor fora do líquido atua efetivamente como uma superfície hidrofóbica, a interface água-vapor é um modelo útil para interfaces hidrofóbicas e, portanto, os resultados também podem ter significado para as biointerfaces hidrofóbicas. Esses achados podem ter implicações no efeito estabilizador do Tmao nas proteínas. Especificamente, a forte hidratação necessária para os grupos metil, bem como a parte do óxido, deve ser responsável pela depleção desse osmólito nas interfaces hidrofóbicas / aquosas. Tais efeitos de depleção devem ajudar a estabilizar as proteínas em suas conformações nativas e enoveladas.

Referências Bibliográficas

- [1] “A Água no Planeta - Só Biologia.” [Online]. Available: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Agua/>. [Accessed: 26-Jun-2019].
- [2] J. Werner, “Exploring the Surface of Aqueous Solutions: X-ray photoelectron spectroscopy studies using a liquid micro-jet,” Uppsala Universitet, Sweden., 2015.
- [3] A. Fiore, V. Venkateshwaran, and S. Garde, “Trimethylamine N-oxide (TMAO) and tert -butyl alcohol (TBA) at hydrophobic interfaces: Insights from molecular dynamics simulations,” *Langmuir*, vol. 29, pp. 8017–8024, 2013.
- [4] Y.-T. Liao, A. C. Manson, M. R. DeLyser, W. G. Noid, and P. S. Cremer, “Trimethylamine N -oxide stabilizes proteins via a distinct mechanism compared with betaine and glycine ,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2017.
- [5] L. B. Sagle *et al.*, “Methyl Groups of Trimethylamine N -Oxide Orient Away from Hydrophobic Interfaces,” pp. 18707–18712, 2011.
- [6] “O Ciclo do Nitrogênio e a Camada de Ozônio.” [Online]. Available: <https://www.webartigos.com/artigos/o-ciclo-do-nitrogenio-e-a-camada-de-ozonio/16477>. [Accessed: 05-Jul-2019].
- [7] A. Mocellin, Anderson Herbert de Abreu Gomes, O. C. Araújo, A. N. de Brito, and O. Björneholm, “Surface Propensity of Atmospherically Relevant Amino Acids Studied by XPS,” *J. Phys. Chem. B* 2017, 121, 4220–4225., 2017.
- [8] X. Li, T. Hede, Y. Tu, C. Leck, and H. Ågren, “Cloud droplet activation mechanisms of amino acid aerosol particles: insight from molecular dynamics simulations.,” *Tellus B*, vol. 65, pp. 1–13, 2013.
- [9] X. Li, T. Hede, Y. Tu, C. Leck, and H. Ågren, “Amino acids in atmospheric droplets: perturbation of surface tension and critical supersaturation predicted by computer simulations.,” *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, vol. 11, pp. 30919–30947, 2011.

- [10] M. . Bäessler *et al.*, “Soft X-Ray Undulator Beam Line I411 at MAX-II for Gases, Liquids and Solid Samples,” *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, vol. 953, pp. 101–103, 1999.
- [11] M. . Bäessler *et al.*, “Beam Line I411 at MAX II - Performance and First Results,” *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A*, vol. 469, no. 3, pp. 382–393, 2001.
- [12] M. A. Brown, M. Faubel, and B. Winter, “X-Ray photo- and resonant Auger-electron spectroscopy studies of liquid water and aqueous solutions,” *Annu. Reports Prog. Chem. Sect. C*, vol. 105, pp. 174–212, 2009.
- [13] A. G. Császár *et al.*, “On equilibrium structures of the water molecule,” *J. Chem. Phys.*, vol. 122, no. 21, 2005.
- [14] F. Franks, *Volume 1: The Physics and Physical Chemistry of Water*, 1^a ed., vol. 1. New York: Plenum Press, London, 1972.
- [15] M. A. Henderson, “The interaction of water with solid surfaces: Fundamental aspects,” *Surf. Sci. Rep.*, vol. 7, no. 6–8, pp. 211–385, 1987.
- [16] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger - Princípios de bioquímica*, 3^a edição. Porto Alegre, 2002.
- [17] P. L. Oseliero Filho, “Caracterização estrutural de sistemas biológicos de diferentes classes: um estudo pela técnica de SAXS.” Universidade de São Paulo, 2018.
- [18] D. Daltin, *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*, 1^a ed. São Paulo: Editora Blucher, 2011.
- [19] C. Tanford, *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes 2d ed.* J. Wiley., 1980.
- [20] R. Bailey, “Learn About the 4 Types of Protein Structure,” 2019.

- [21] F. R. Elder, A. M. Gurewitsch, R. V Langmuir, and H. C. Pollock, “Radiation from Electrons in a Synchrotron,” *Phys. Rev.*, vol. 71, no. 11, pp. 829–830, Jun. 1947.
- [22] Laboratory Brazilian Synchrotron Light, “O LNLS – LNLS.” [Online]. Available: <https://www.lnls.cnpem.br/o-lnls/>. [Accessed: 23-May-2019].
- [23] J. C. Cezar *et al.*, “The U11 PGM beam line at the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 425, no. 7, p. 72015, 2013.
- [24] R. L. Cavasso Filho, M. G. P. Homem, R. Landers, and A. Naves De Brito, “Advances on the Brazilian toroidal grating monochromator (TGM) beamline,” *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, pp. 1125–1127, 2005.
- [25] B. Winter and M. Faubel, “Photoemission from Liquid Aqueous Solutions,” *Chem Rev*, vol. 106, pp. 1176–1211, 2006.
- [26] K. R. Wilson *et al.*, “Investigation of volatile liquid surfaces by synchrotron x-ray spectroscopy of liquid microjets,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 75, no. 3, pp. 725–736, 2004.
- [27] C. Nordling, E. Sokolowski, and K. Siegbahn, “Precision Method for Obtaining Absolute Values of Atomic Binding Energies,” *Phys. Rev.*, vol. 105, no. 5, pp. 1676–1677, Mar. 1957.
- [28] C. Nordling, E. Sokolowski, and K. Siegbahn, “Magnetic Analysis Of X-Ray Produced Photo and Auger Electrons,” vol. 12, pp. 301–318, 1957.
- [29] T. Helder Kenj, “Seções de Choque Absolutas de Fotoabsorção e Fotoionização do Formaldeído e do Ácido Fórmico: Uma Abordagem Experimental,” Universidade Federal da Bahia, 2018.
- [30] J. A. R. Samson and L. Yin, “Precision measurements of photoabsorption cross sections of,” vol. 6, no. 12, pp. 2326–2333, 1989.
- [31] M. G. P. Homem, P. Iza, L. S. Farenzena, R. L. Cavasso-Filho, M. T. Lee, and I. Iga,

- “Cross-section measurements of photoabsorption and ionization quantum yields for tetrahydrofuran in the vacuum-ultraviolet energy range,” *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.*, vol. 42, no. 23, 2009.
- [32] L. Stanley Miller, “A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions A Vacuum Microsublimation Apparatus,” *Scienc*, vol. 117, no. 5, pp. 528–529.
- [33] R. Hell, “Planta: Molecular physiology of plant sulfur metabolism,” *Planta*, vol. 202, no. 2, pp. 138–148, 1997.
- [34] M. V. Orellanaa, P. A. Matraib, C. D. Leck, A. M. Rauschenberg, Lee, and E. Coz, “Marine Microgels as a Source of Cloud Condensation Nuclei in the High Arctic,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 33, pp. 13612–13617, 2011.
- [35] B. Noziere, “Don’t forget the surface.,” *Science (80-.)*, vol. 351, 2016.
- [36] C. R. . Ruehl, J. F. . Davies, and K. R. Wilson, “An interfacial mechanism for cloud droplet formation on organic aerosols,” *Science (80-.)*, vol. 351, no. 6280, pp. 1447–1450, 2016.
- [37] X. . Ge, A. S. . Wexler, and S. L. Clegg, “Atmospheric amines - Part I. A review. ,” *Atmosph. Environm.*, vol. 45, no. 3, pp. 524–546, 2011.
- [38] A. Kristensson, T. Rosenørn, and M. Bilde, “Cloud droplet activation of amino acid aerosol particles.,” *J. Phys. Chem. A.*, vol. 114, pp. 379–386, 2010.
- [39] D. Nolting, E. F. Aziz, N. Ottosson, M. Faubel, I. V Hertel, and B. Winter, “pH-Induced protonation of Glysine in aqueous solution causes chemical shifts in X-ray photoelectron spectroscopy,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 45, pp. 14068–14073, 2007.
- [40] A. M. . da Silva *et al.*, “Surface-Altered Protonation Studied by Photoelectron Spectroscopy and Reactive Dynamics Simulations,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 6, pp.

807–811, 2015.

- [41] S. G. Wolf, L. Leiserowitz, M. Lahav, M. Deutsch, K. Kjaer, and J. Als-Nielsen, “Elucidation of the two-dimensional structure of an [alpha]-amino acid surfactant monolayer on water using synchrotron X-ray diffraction. *Nature*,” 1987.
- [42] Y. B. Vysotsky *et al.*, “Quantum-Chemical Analysis of Thermodynamics of Two-Dimensional Cluster Formation of Racemic α -Amino Acids at the Air/Water Interface,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 10, pp. 2264–2281, 2011.
- [43] H. . Bergersen *et al.*, “A photoelectron spectroscopic study of aqueous tetrabutylammonium iodide,” *J. Physics-Condensed Matter*, vol. 19, no. 32, p. 326101, 2007.
- [44] E. Kukk, “SPANCF - Spectral Analysis by Curve Fitting [Curve Fitting Macro Package for Igor Pro],” 2004. [Online]. Available: <http://edwin.kukk@utu.fi>.
- [45] M. . Coville and T. D. Thomas, “Molecular Effects on Inner-shell Lifetimes: Possible Test of the One-center Model of Auger Decay,” *Phys. Rev. A*, vol. 43, pp. 6053–6056, 1991.
- [46] N. Ottosson *et al.*, “On the Origins of Core-Electron Chemical Shifts of Small Biomolecules in Aqueous Solution: Insights from Photoemission and *ab Initio* Calculations of Glycine(aq),” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 9, pp. 3120–3130, 2011.
- [47] A. Mocellin, A. H. de A. Gomes, O. C. Araújo, A. N. de Brito, and O. Björneholm, “Surface propensity of atmospherically relevant amino acids studied by xps,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 16, pp. 4220–4225, 2017.
- [48] “Microliquids GmbH Advanced micro jet technologies for science and industry - Microliquids GmbH / Advanced Microfluidic Systems GmbH.” [Online]. Available: <http://www.microliquids.com/>. [Accessed: 18-Feb-2020].
- [49] B. . Winter and M. Faubel, “Photoemission from liquid aqueous solutions,” *Chem Rev*,

vol. 106, no. 4, pp. 1176–1211, 2006.

- [50] IGOR, “Igor Pro Wavemetrics,” 2013. [Online]. Available: <http://www.wavemetrics.com>.
- [51] M.-M. Walz *et al.*, “Surface behavior of amphiphiles in aqueous solution: a comparison between different pentanol isomers,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 21, pp. 14036–14044, 2015.
- [52] S. G. Zetterholm *et al.*, “Noncovalent Interactions between Trimethylamine N-Oxide (TMAO), Urea, and Water,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 122, no. 38, pp. 8805–8811, 2018.
- [53] A. Mocellin, A. H. de A. G. Gomes, O. C. Araújo, A. N. de Brito, and O. Björneholm, “Surface Propensity of Atmospherically Relevant Amino Acids Studied by XPS,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 16, pp. 4220–4225, 2017.
- [54] L. Sun, T. Hede, Y. Tu, C. Leck, and H. Ågren, “Combined Effect of Glycine and Sea Salt on Aerosol Cloud Droplet Activation Predicted by Molecular Dynamics Simulations.,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 117, pp. 10746–10752, 2013.
- [55] X. Li, T. Hede, Y. Tu, C. Leck, and H. Ågren, “Glycine in aerosol water droplets: a critical assessment of Köhler theory by predicting surface tension from molecular dynamics simulations,” *Atmos. Chem. Phys.*, vol. 11, pp. 519–527, 2011.
- [56] D. Alexander, J. Elizabeth, J. MacKerell, D. Denning, and Thirumalai, “Protonation of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) is required for stabilization of RNA tertiary structure.,” *Biophys Chem*, 2013.
- [57] R. Singh, I. Haque, and F. Ahmad, “Counteracting osmolyte trimethylamine N-oxide destabilizes proteins at pH below its pKa measurements of thermodynamic parameters of proteins in the presence and absence of trimethylamine N-oxide,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 12, pp. 11035–11042, 2005.
- [58] Y. Qu and D. W. Bolen, “Hydrogen exchange kinetics of RNase A and the urea:

- TMAO paradigm,” *Biochemistry*, vol. 42, no. 19, pp. 5837–5849, 2003.
- [59] Z. Su, F. Mahmoudinobar, and C. L. Dias, “Effects of trimethylamine-N-oxide on the conformation of peptides and its implications for proteins,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 119, no. 10, p. 108102, 2017.
- [60] B. J. Bennion and V. Daggett, “The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 9, pp. 5142–5147, 2003.
- [61] A. Wang and D. W. Bolen, “A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 30, pp. 9101–9108, 1997.
- [62] S. Paul and G. N. Patey, “Structure and interaction in aqueous urea– trimethylamine-N-oxide solutions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 14, pp. 4476–4482, 2007.
- [63] S. Paul and G. N. Patey, “The influence of urea and trimethylamine-N-oxide on hydrophobic interactions,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 28, pp. 7932–7933, 2007.
- [64] P. Ganguly, P. Boserman, N. F. A. van der Vegt, and J.-E. Shea, “Trimethylamine N-oxide Counteracts Urea Denaturation by Inhibiting Protein–Urea Preferential Interaction,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 1, pp. 483–492, 2017.
- [65] S. Paul and G. N. Patey, “Hydrophobic Interactions in Urea– Trimethylamine-N-oxide Solutions,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 35, pp. 11106–11111, 2008.
- [66] F. Meersman, D. Bowron, A. K. Soper, and M. H. J. Koch, “Counteraction of urea by trimethylamine N-oxide is due to direct interaction,” *Biophys. J.*, vol. 97, no. 9, pp. 2559–2566, 2009.
- [67] F. Meersman, D. Bowron, A. K. Soper, and M. H. J. Koch, “An X-ray and neutron scattering study of the equilibrium between trimethylamine N-oxide and urea in aqueous solution,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 13, no. 30, pp. 13765–13771, 2011.

- [68] R. Sarma and S. Paul, "Hydrophobic interactions in presence of osmolytes urea and trimethylamine-N-oxide," *J. Chem. Phys.*, vol. 135, no. 17, p. 174501, 2011.
- [69] J. Mondal, G. Stirnemann, and B. J. Berne, "When does trimethylamine N-oxide fold a polymer chain and urea unfold it?," *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 29, pp. 8723–8732, 2013.
- [70] R. Sarma and S. Paul, "Exploring the molecular mechanism of trimethylamine-N-oxide's ability to counteract the protein denaturing effects of urea," *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 18, pp. 5691–5704, 2013.
- [71] J. Hunger, N. Ottosson, K. Mazur, M. Bonn, and H. J. Bakker, "Water-mediated interactions between trimethylamine-N-oxide and urea," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 1, pp. 298–306, 2015.
- [72] P. Ganguly, N. F. A. van der Vegt, and J.-E. Shea, "Hydrophobic association in mixed urea–TMAO solutions," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 15, pp. 3052–3059, 2016.
- [73] C. J. Sahle, M. A. Schroer, I. Juurinen, and J. Niskanen, "Influence of TMAO and urea on the structure of water studied by inelastic X-ray scattering," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 24, pp. 16518–16526, 2016.
- [74] E. A. Oprzeska-Zingrebe and J. Smiatek, "Aqueous Mixtures of Urea and Trimethylamine-N-oxide: Evidence for Kosmotropic or Chaotropic Behavior?," *J. Phys. Chem. B*, vol. 123, no. 20, pp. 4415–4424, 2019.
- [75] D. Bandyopadhyay, Y. Kamble, and N. Choudhury, "How Different Are the Characteristics of Aqueous Solutions of tert-Butyl Alcohol and Trimethylamine-N-Oxide? A Molecular Dynamics Simulation Study," *J. Phys. Chem. B*, vol. 122, no. 34, pp. 8220–8232, 2018.
- [76] Y. S. Blanco, Ö. Topel, É. G. Bajnóczi, J. Werner, O. Björneholm, and I. Persson, "Chemical equilibria of aqueous ammonium–carboxylate systems in aqueous bulk, close to and at the water–air interface," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 21, no. 23, pp.

12434–12445, 2019.

- [77] J. Berkowitz, “Absolute partial photoionization cross sections of ozone O_3 ,” vol. 271, pp. 8–14, 2008.
- [78] A. Mocellin, K. Wiesner, F. Burmeister, O. Björneholm, and A. Naves de Brito, “Experimental study of photoionization of ozone in the 12 to 21 eV region,” *J. Chem. Phys.*, vol. 115, no. 11, pp. 5041–5046, 2001.
- [79] M. J. Weiss, J. Berkowitz, and E. H. Appelman, “Photoionization of ozone: Formation of O_4^+ and O_5^+ ,” *J. Chem. Phys.*, vol. 66, no. 5, pp. 2049–2053, 1977.
- [80] G. R. Cook, “Trans. Am. Geophys.,” *Trans. Am. Geophys.*, vol. 49, p. 736, 1968.
- [81] R. L. Cavasso Filho, M. G. P. Homen, P. T. Fonseca, and A. Naves de Brito, “A synchrotron beamline for delivering high purity vacuum ultraviolet photons,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 78, no. 11, p. 115104, 2007.
- [82] F. Burmeister *et al.*, “Description and performance of an electron-ion coincidence TOF spectrometer used at the Brazilian synchrotron facility LNLS,” *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, vol. 180, no. 1–3, pp. 6–13, 2010.
- [83] J. Berkowitz, “The quantum yield of ionization,” *Phys. Essays*, vol. 13, p. 248, 2000.
- [84] A. Mocellin, “Espectroscopia de Multicoindência Aplicada ao Estudo de Moléculas,” Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- [85] A. Mocellina, M. S. P. Mundima, E. G. alves P. Lopesa, and R. dos Reis Teixeira Marinhob and A. Naves de Britoc, “How to produce a pure ozone sample?,” *Rev. Mex. Física*, vol. 56, no. 2, pp. 97–99, 2010.
- [86] J. A. R. Samson and W. C. Stolte, “Precision measurements of the total photoionization cross-sections of He, Ne, Ar, Kr, and Xe,” *J. Electron Spectrosc.*, 2002.

- [87] J. A. Fennelly and D. G. Torr, "Photoionization and photoabsorption cross sections of O, N₂, O₂, and N for aeronomic calculations," *At. Data Nucl. Data Tables*, vol. 51, no. 2, pp. 321–363, 1992.
- [88] K. Wiesner *et al.*, "Valence photoionization and resonant core excitation of ozone - Experimental and theoretical study of the \tilde{C} -state of O₃⁺," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 375, no. 1–2, pp. 76–83, 2003.
- [89] G. R. Cook and P. H. Metzger, "Photoionization and absorption cross sections of O₂ and N₂ in the 600- To 1000-Å region," *J. Chem. Phys.*, vol. 41, no. 2, pp. 321–336, 1964.
- [90] E. G. P. LOPES, "Espectroscopia de multicoincidência por tempo de voo aplicada ao estudo dos orbitais de valência de moléculas simples," 2008.
- [91] H. Couto, A. Mocellin, C. D. Moreira, M. P. Gomes, A. Naves De Brito, and M. C. A. Lopes, "Threshold photoelectron spectroscopy of ozone," *J. Chem. Phys.*, vol. 124, no. 20, pp. 22–27, 2006.
- [92] S. Katsumata, H. Shiromaru, and T. Kimura, "Photoelectron Angular Distribution and Assignment of Photoelectron Spectrum of Ozone," *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 57, no. 7, pp. 1784–1788, 1984.

Apêndice

“Surface Propensity of Atmospherically Relevant Amino Acids Studied by XPS”

Surface Propensity of Atmospherically Relevant Amino Acids Studied by XPS

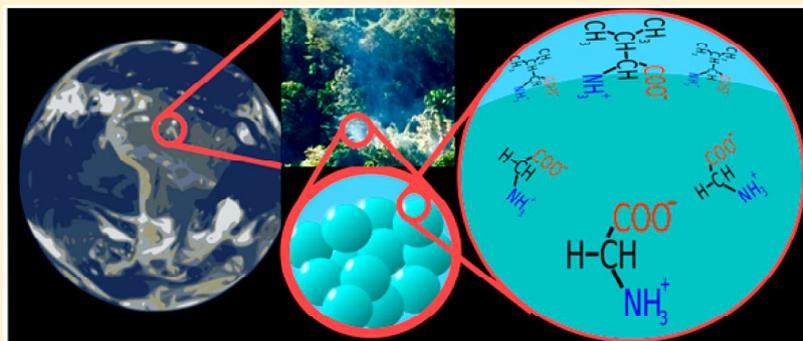
Alexandra Mocellin,[†] Anderson Herbert de Abreu Gomes,[‡] Oscar Cardoso Araújo,[†]
Arnaldo Naves de Brito,^{*,‡} and Olle Björneholm[§]

[†]Institute of Physics, Brasilia University (UnB), Box 4455, Brasília 70910-970, Brazil

[‡]Institute of Physics “Gleb Wataghin”, Department of Applied Physics, University of Campinas (Unicamp), Campinas 13083-859, Brazil

[§]Department of Physics and Astronomy, Uppsala University, 752 36 Uppsala, Sweden

S Supporting Information



ABSTRACT: Amino acids constitute an important fraction of the water-soluble organic nitrogen (WSO) compounds in aerosols and are involved in many processes in the atmosphere. In this work, we applied X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to study aqueous solutions of four amino acids, glycine, alanine, valine, and methionine, in their zwitterionic forms. We found that amino acids with hydrophilic side chains and smaller size, GLY and ALA, tend to stay in the bulk of the liquid, while the hydrophobic and bigger amino acids, VAL and MET, are found to concentrate more on the surface. We found experimental evidence that the amino acids have preferential orientation relative to the surface, with the hydrophobic side chain being closer to the surface than the hydrophilic carboxylate group. The observed amino acid surface propensity has implications in atmospheric science as the surface interactions play a central role in cloud droplet formation, and they should be considered in climate models.

INTRODUCTION

Aqueous interfaces are crucial in, e.g., environmental sciences, biology, and technology. One example of this is biointerfaces, i.e., interfaces between cells, biological tissue or organic material with another biomaterial or inorganic/organic material. The structure and properties of such biointerfaces depend on the interactions between biomolecules and surfaces, which are important in fields such as biology, biotechnology, diagnostics, and medicine. A second example is the liquid–vapor interface of water, henceforth denoted the water surface, which is of tremendous importance in the atmosphere. Atmospheric aerosols affect the global radiative balance, directly by scattering of sunlight and thus increasing Earth’s albedo, and indirectly by being a major source of condensation nuclei for the formation of clouds. It is estimated that the aerosols counteract the green house effect by $\approx 1/3$, but the effects of aerosols are identified by IPCC as a key uncertainty in predicting climate change.¹ The surface is important for aerosols due to their small size, but surface effects are not generally taken into account in current

climate models. To include surface effects in these models, it is paramount to improve our molecular level understanding of atmospheric surface phenomena and processes.²

Amino acids, the building blocks of proteins, are of fundamental importance to biointerfaces, but, as discussed, they also play a role in atmospheric aerosols, where they occur due to, e.g., decomposition of biomaterial. Amino acids constitute an important fraction of the WSO compounds in both marine and continental aerosols, and are involved in many processes in the atmosphere, as reviewed in ref 3. As components in marine microgels, they have been suggested to be part of the cloud condensation nuclei (CCN) material in the high Arctic.⁴ This suggestion is supported by both laboratory investigations and molecular dynamics (organic nitrogen) simulations. The laboratory investigations show

Received: March 7, 2017

Revised: March 24, 2017

Published: March 30, 2017

particles containing amino acids at atmospherically relevant mixture ratios to be good cloud condensation nuclei.⁷ The MD simulations suggest that the influence of amino acids may be connected to their effects on surface tension, an important parameter for cloud drop activation.⁶ These effects on surface tension depend on the surface density of the amino acids, which in its turn depends on their microscopic molecular structure. All amino acids contain (at least) one amine ($-\text{NH}_2$) and one carboxylic acid ($-\text{COOH}$) functional group, giving amino acids amphiprotic properties. In an aqueous environment of low pH, typically below 2.2 the predominant form will have a neutral carboxylic acid group and a positive ammonium group ($-\text{NH}_3^+$), resulting in a net charge of +1, whereas at high pH, typically above 9.4, there will be a negative carboxylate ($-\text{COO}^-$) and a neutral amino group, resulting in a net charge of -1 . At intermediate pH, amino acids usually have both a negative carboxylate and a positive ammonium group, forming a zwitterion with zero net charge, see Figure 1. In addition to

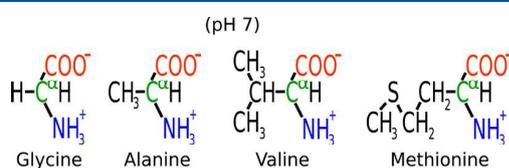


Figure 1. Chemical structures of the four investigated amino acids in the zwitterionic forms. The COO carbon is indicated in red, the α letter is close to the α carbon, C_{COO} shown in green. All other carbons are identified as side chain or C_{CR} for simplicity.

these titratable and hydrophilic groups, most amino acids also contain a side chain specific to each amino acid. The hydrophilic or hydrophobic nature of the side chains affects the solvation of the amino acids. Molecular dynamics (MD) simulations predict that also the surface propensity of amino acids to vary with the balance between hydrophobic and hydrophilic parts.^{6d} In ref 6, Li et al. performed molecular dynamics (MD) study in six amino acids, three small ones and hydrophilic; serine (SER), glycine (GLY), alanine (ALA), and three with bigger side chains and amphiphilic amino acids; valine (VAL), methionine (MET), and phenylalanine (PHE). Both planar and spherical liquid–vapor interfaces were simulated, and the first three amino acids were found to stay in the bulk phase due to their strong hydrophilicity arising from the zwitterionic backbone and smaller side chain, whereas the three latter amino acids were found to be concentrated on the surface due to an amphiphilic effect dependent on their larger and nonpolar side chains. For the planar interfaces, the hydrophilic amino acids were found to slightly increase the surface tension, while the amphiphilic ones were found to have the ability to decrease the surface tension. For spherical droplets, the hydrophilic amino acids were found to induce very small perturbations on surface tension, while the amphiphilic amino acids were found to largely increase the surface tension.

One powerful tool to study the surface propensity of solvated molecules is X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). This probe combines the chemical selectivity and surface sensitivity. For amino acids, XPS has previously been applied to aqueous solutions of glycine, revealing a high selectivity to the different pH-dependent charge states.⁷ Recently, it has also been shown that cysteine, in which $-\text{SH}$ constitutes a third titratable group, exhibits different protonation states at the aqueous surface as compared to the bulk.⁸ We must also mention a general

surfactant/colloid literature, in which the accumulation of amphiphilic molecules at the gas/liquid interface is well established, including explicit structure studies by grazing incidence X-ray scattering.⁹ In this work, we will apply XPS to study aqueous solutions of four amino acids: glycine, alanine, valine and methionine in their zwitterionic forms; see Figure 1. These amino acids were selected as they have quite different side chains, and may therefore have quite different propensities to the water–vapor interface.^{6c} Moreover, as the vapor phase outside the liquid effectively acts as a very hydrophobic surface, the water–vapor interface is a useful model for hydrophobic interfaces, and the results may therefore also have significance for hydrophobic biointerfaces.

EXPERIMENTAL SECTION

The XPS measurements were conducted at the Swedish national synchrotron facility, MAX-lab, in Lund, at the undulator beamline I411,¹⁰ equipped with a Scienta R4000 hemispherical electron energy analyzer attached to an experimental chamber designed for liquid microjet XPS studies. Just a brief description about the experimental setup is given here, more details can be found elsewhere.¹¹

The experimental chamber is equipped with a liquid microjet created by a glass nozzle with an inner diameter of about 20 μm . The synchrotron radiation hits the liquid-jet at 90 deg very close the glass nozzle (2–4 mm) because after this distance the jet breaks into a train of droplets. To maintain a sufficiently good vacuum, the droplets are caught in a LN2 cold trap, which is placed after the experimental region. The temperature of the microjet at the measurement point is estimated to be 5 ± 5 °C. The photoelectrons that pass through a skimmer situated 2 mm from the microjet, enter the electron analyzer mounted at 54.7 degrees with respect to the horizontal SR linear polarization direction, i.e., at the so-called magic angle to avoid angular dependent intensity variations.

One of the most important characteristics of XPS is the high surface sensitivity due to the short inelastic mean free path of the electrons. By using a photon energy of 360 eV for C 1s and 480 eV for N 1s, the XPS spectra are all measured with the same electron kinetic energy, ≈ 70 eV. This corresponds to the shortest inelastic mean free path of the electrons, 0.5–1.0 nm, thus ensuring that all XPS spectra were measured with the same high surface sensitivity.

The total experimental resolution can be estimated from the width of the peak corresponding to the $1b_1$ HOMO state of gas phase molecules surrounding the liquid jet to approximately 0.4 eV, i.e., much less than the observed width of the C 1s and N 1s peaks, approximately 1 eV.

Before, in between, and after the spectra of the aqueous amino acids, reference spectra of the $1b_1$ HOMO state of pure liquid water were recorded. This procedure allowed monitoring the energy calibration and intensity normalization. The binding energy was calibrated to the $1b_1$ state of liquid water.¹² The spectral intensities were normalized by ring current and counting time, and the recording of the water valence band spectra demonstrated the stability of the setup. The spectral intensities of the aqueous amino acids spectra normalized in this way thus reflect properties of the samples, as we will discuss further below.

The spectra were analyzed using the minimum square fitting routine SPANCF¹³ for IGOR Pro program.¹⁴ Measured N 1s and C 1s spectra were fitted using Voigt line shapes where the respective lifetime widths were fixed to the experimental gas

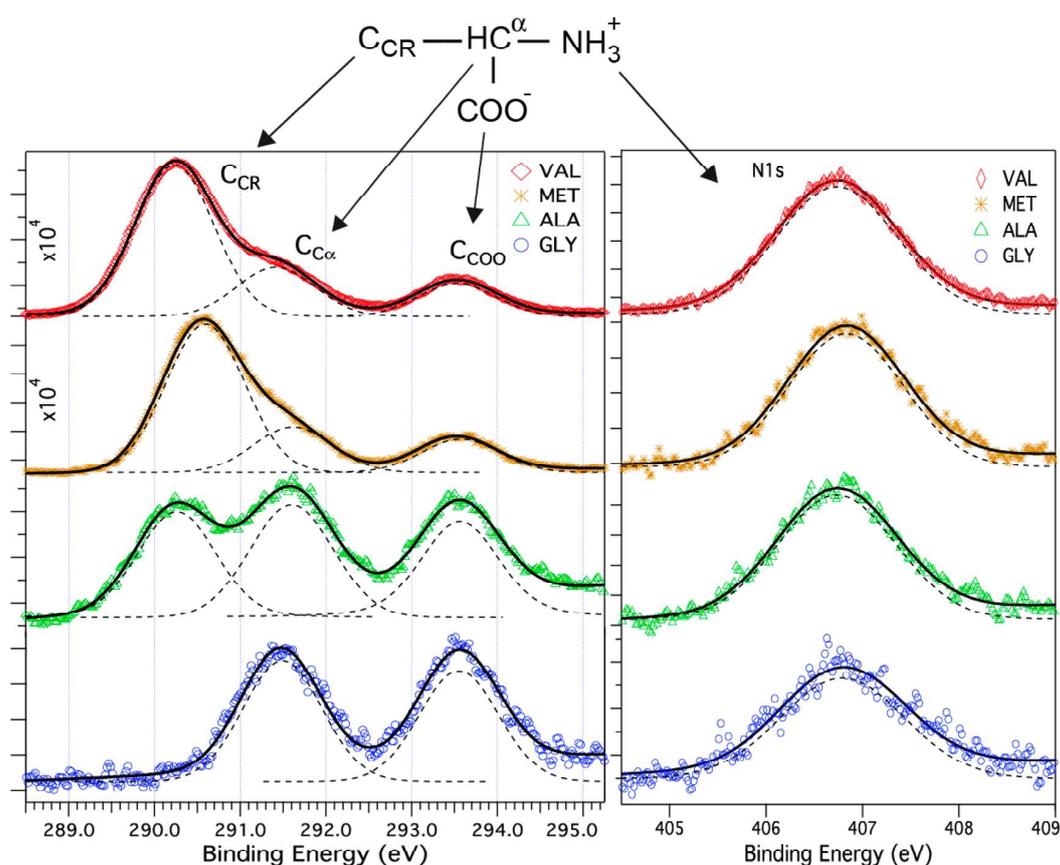


Figure 2. C 1s (left) and N 1s (right) photoelectron spectra of aqueous amino acids, glycine (GLY, blue), alanine (ALA, green), methionine (MET, brown), and valine (VAL, red). Symbols are the experimental data points, the solid lines are the resulting total fit, and dashed lines are the individual components.

phase values from the literature,^{2b,12,15} while the Gaussian width was free for each peak. During the fitting procedure, all parameters were kept constant with a few exceptions, which we will discuss further on. The final energy position of N 1s and C 1s COOH group are almost the same in the different cases as expected. For the fwhm we have initially constrained all C 1s-COOH and all C 1s-CN₃ peaks to be identical within each group. After convergence these links were released and a new optimization performed. As a final result we observed only a small difference between fwhm within each group (around 100 meV). Asymmetry contributions were not allowed. The background was automatically removed by the fitting procedure.

The samples were prepared using high purity amino acids (from Sigma-Aldrich, purity greater than 98%) dissolved in deionized water. We used a concentration of 0.45 M for valine, alanine and glycine samples, and 0.209 M for the methionine sample, for which we could not reach a higher concentration due to its lower solubility. For all samples, 50 mM of NaCl was added to the solutions to prevent charging of the microjet. The pH was adjusted to 7.0 for all samples by addition of small amounts of 1 M NaOH solution, ensuring that all four amino acids were in their zwitterionic forms. The isoelectric point, pI, of the four amino acids studied is around 6; this means that at pH 7 in practice all molecules in the bulk of the sample are in the zwitterion form.

RESULTS AND DISCUSSION

Carbon and Nitrogen 1s XPS spectra of four amino acids in water at pH 7.0 are shown in Figure 2 together with peak fit results. In the N 1s spectra, we can see only one peak assigned to the NH₃⁺. In the C 1s spectra, however, there are several peaks, reflecting the number of inequivalent carbon atoms and their local chemical environment. For GLY, two distinct C 1s peaks are observed, arising from ionization of the carboxyl group (C_{COO}) and the C_{Cα} respectively. The carboxyl C 1s peak is found at higher binding energies due to the higher electronegativity of the oxygen atoms. The BE of these peaks are in agreement with the work reported by N. Ottosson et al.⁷ The spectra of ALA, MET, and VAL exhibit one more peak, located at lower binding energy. This peak originates from the carbons in the amino acid side chain (C_{CR}). The relative intensity of the peaks is related to the number of carbons in the side chain; in ALA the side chain part has only one carbon atom, while MET and VAL have three carbons each, see Figure 1.

Having understood the relation between the spectra and the molecular structure, we can proceed to discuss the relative intensities. Assuming the photoionization cross section to be the same for chemically equivalent sites in the different species, the properly normalized relative peak intensities will depend on the distribution relative to the surface of the different species.

The areas for the different C 1s peaks and the N 1s obtained from the fitting are plotted in Figure 3 and presented in Table

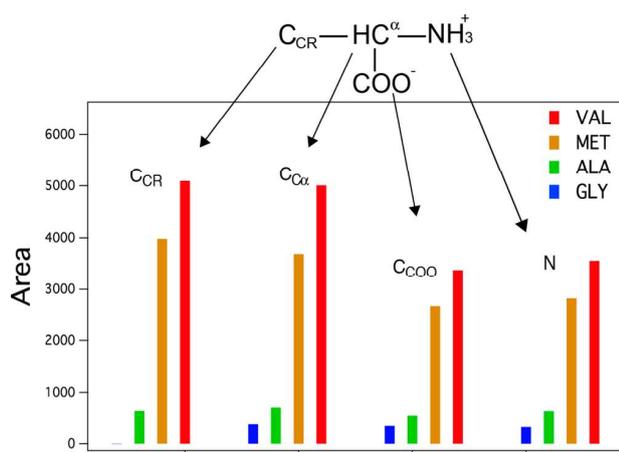


Figure 3. Areas from XPS spectra for C 1s and N 1s of aqueous four amino acids, respectively. The x -axis is plotted starting with the carbons from the side chain, followed by carbon alpha and the carbon from the carboxylic group of the molecule, and in the right side of the figure the N 1s area. The colors correspond to the amino acid: glycine (GLY, blue), alanine (ALA, green), methionine (MET, brown), and valine (VAL, red).

S1 as Supporting Information. Three points should be noted: First, the absolute intensity scale of the areas is arbitrary, but the relative scale is well determined. Second, the intensity of the side chain has been scaled with the number of atoms to facilitate comparison. Third, the intensity of the MET has been scaled up to compensate for the lower concentration of the investigated sample. From Figure 3 it is then apparent that for all different peaks, the four amino acids form two groups, with VAL and MET having approximately ten times higher intensity than ALA and GLY. As the probing depth is the same for all cases, the higher areas for VAL and MET show that these two amino acids are more concentrated in the surface than ALA and GLY amino acids. This is in qualitative agreement with the molecular dynamics simulations of Ågren's group.⁶

We can learn more about the amino acid surface solvation from the relative areas of the C_{COO} and the C_{CR} peaks originate from hydrophilic and hydrophobic part of the molecules, respectively. For ALA, the intensity ratio between the C_{CR} and C_{COO} is 1.2, while it is 1.5 for VAL. For both cases, the ratio is thus >1, which can be interpreted as caused by the hydrophobic side chain being closer to the surface than the hydrophilic carboxylate group, i.e. a preferential orientation of the amino acid molecules relative to the surface. The higher ratio for VAL relative to ALA can then be understood as due to the side chain being the longer and more hydrophobic for VAL than for ALA, making VAL preferential orientation more pronounced.

We can also estimate the surface enrichment of the amino acids using a simplified model with a surface layer of thickness d , in which the concentration is c_s , on top of the bulk, in which the concentration is c_b ; for more details, see the Supporting Information. Due to inelastic scattering, the signal from depth x is attenuated by $e^{-x/\lambda}$, where λ is the photoelectron inelastic mean free path. The total intensity of peak x , appropriately normalized, is then a sum of the contributions from molecules/ions in the bulk and molecules/ions at the surface:

$$I_x \approx c_s(1 - e^{-d/\lambda}) + c_b e^{-d/\lambda}$$

Of the four investigated amino acids, glycine with no hydrophobic side chain, is the most strongly solvated. It will then have the lowest surface propensity of the four, and we here make the approximation that its concentration in the surface is negligible, $c_s = 0$. The bulk contribution of one of the other amino acids can then be approximated with the total contribution of glycine I_g and we obtain the following relation between the surface and bulk concentrations of one of the other amino acids:

$$c_s/c_b = (I_x/I_g - 1)e^{-d/\lambda}/(1 - e^{-d/\lambda})$$

We can then determine the surface concentration of the other amino acids, provided that we make some assumptions about the ratio d/λ . From molecular dynamic calculations the thickness d of the surface layer can be estimated to 0.5 nm,⁶ while the photoelectron inelastic mean free path λ is in the range 0.5–1 nm. Choosing a value of 0.75 nm for λ we obtain that the concentration of the amino acids in the surface layer is 0.9 (ALA), 7.6 (MET) and 9.8 (VAL) times higher than in the bulk.

The surface propensity of a solute depends on enthalpic and entropic effects connected to the balance between the solute being in the bulk, where it disrupts the water hydrogen-bonding pattern more than at the surface, and being at the surface, where the solute loses solvation. This balance is connected to the microscopic molecular structure of the amino acid zwitterions and their intermolecular interactions with the surrounding water. Glycine has no side chain, but consists of only the hydrophilic zwitterionic backbone with two charged groups, which both form strong bonds to the polar water molecules, resulting in a strong solvation, which disfavors glycine being at the surface. Alanine has a side chain consisting of a hydrophobic methyl group ($-\text{CH}_3$). Already this small side chain changes the balance between hydrophobic and hydrophilic interactions so much that alanine is present at the surface with approximately the same concentration as in the bulk. For methionine and valine, with increasingly larger hydrophobic side chains, the balance is changed even more, resulting in a surface enrichment increasing with the size of the side chain.

In an attempt to disentangle which property is most important to determine the surface concentration, we made the simplest assumption that only the side chain size would be important. As seen in Figure 4, there is certainly a correlation between surface concentration and side chain size. It is,

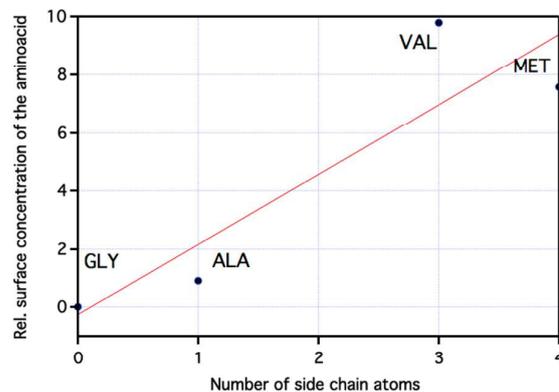


Figure 4. Correlation between number of atoms in the side chain and surface concentration for the studied amino acids.

however, not a simple linear relationship, as VAL with a smaller side chain is more present at the surface than MET, This effect is well reproduced by the simulations shown in ref 6d, and we qualitatively ascribe this behavior to the difference in molecular structure of the VAL and MET side chains. The valine side chain only consists of C and H, making it a quite nonpolar group, with a low ability to form hydrogen bonds with the surrounding water. The MET side chain, although bigger, contains an S atom, around which partly polar bonds are formed, which somewhat increases its ability to form hydrogen bonds with the surrounding water.

It should be noted that both the MD studies⁶ and our XPS study have been done for the zwitterionic species. While this is the relevant species for biological systems, much higher and lower pH values exist in atmospheric aerosols. At such conditions, the amino acids will no longer have a zwitterionic backbone, but a cationic or anionic one instead. This changes the balance between hydrophobic and hydrophilic interactions, probably with consequent changes of the surface propensity, which remains to be studied.

The observed amino acid surface propensity has implications in atmospheric science. First, amino acids can both increase and decrease the solution surface tension depending on the nature of their side chain, as discussed in the Introduction. Surface tension is a key parameter for the process in which water vapor condenses and forms liquid cloud drops, as described by Köhler theory and more advanced theories. Second, water accommodation may be affected by the hydrophobic side chains, which stick out of the surface. On an aerosol droplet these form an outer hydrophobic layer, which may reduce the probability of an incoming gas phase water molecule to be accommodated into the droplet. Third, the surface propensity will affect the chemical development of the amino acids, as molecules at the surface are much more accessible for reactions with gas phase radicals than those buried in the bulk.

CONCLUSIONS

We studied the surface propensity of four amino acids using XPS spectroscopy and liquid microjet technique. These amino acids were selected because they have quite different size and side chains. The amino acids with hydrophilic side chains and smaller size, GLY and ALA, tend to stay in the bulk of the liquid, while the hydrophobic and bigger amino acids, VAL and MET, are found to concentrate on the surface. We found experimental evidence that the amino acids have preferential orientation relative to the surface with the hydrophobic side chain being closer to the surface than the hydrophilic carboxylate group. From a simplified model we estimated that the concentration of the amino acids in the surface layer is 0.9 (ALA), 7.6 (MET) and 9.8 (VAL) times higher than in the bulk. Despite MET having a longer side chain, it is less present at surface than VAL; this fact is well reproduced by previous published simulations.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpccb.7b02174.

Detail of the model to determine surface enrichment of amino acids with a surface layer and bulk; binding energies and normalized areas for amino acids (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: arnaldo.naves@gmail.com.

ORCID

Arnaldo Naves de Brito: 0000-0002-9098-444X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the STINT-CAPES Proc. 99999.009805/2014-01, Swedish Research Council (VR), Swedish Foundation for Strategic Research, and the Carl Tryggers foundation is gratefully acknowledged. MAX-lab, Lund University, Sweden, is acknowledged for the allocation of beamtime and laboratory facilities. We would like to acknowledge the Brazilians funding agencies CNPq-Brazil Projs. 480967-2013, 304142/2015-8 and CAPES-Brazil Proj. A66-2013.

REFERENCES

- (1) Boucher, O.; Randall, D.; Artaxo, P.; Bretherton, C.; Feingold, G.; Forster, P.; Kerminen, V.-M.; Kondo, Y.; Liao, H.; Lohmann, U.; Rasch, P.; Satheesh, S. K.; Sherwood, S.; Stevens, B.; Zhang, X. Y. Climate Change 2013: The Physical Basis. In *Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC - Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*; Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, 2013.
- (2) (a) Noziere, B. Don't forget the surface. *Science* **2016**, *351*, 1396. (b) Ruehl, C. R.; Davies, J. F.; Wilson, K. R. An interfacial mechanism for cloud droplet formation on organic aerosols. *Science* **2016**, *351* (6280), 1447–1450.
- (3) Ge, X.; Wexler, A. S.; Clegg, S. L. Atmospheric amines - Part I. A review. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* (3), 524–546.
- (4) Orellana, M. V.; Matrai, P. A.; Leck, C.; Rauschenberg, C. D.; Lee, A. M.; Coz, E. Marine Microgels as a Source of Cloud Condensation Nuclei in the High Arctic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (33), 13612–13617.
- (5) Kristensson, A.; Rosenørn, T.; Bilde, M. Cloud droplet activation of amino acid aerosol particles. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 379–386.
- (6) (a) Li, X.; Hede, T.; Tu, Y.; Leck, C.; Ågren, H. Cloud droplet activation mechanisms of amino acid aerosol particles: insight from molecular dynamics simulations. *Tellus, Ser. B* **2013**, *65*, 20476. (b) Sun, L.; Hede, T.; Tu, Y.; Leck, C.; Ågren, H. Combined Effect of Glycine and Sea Salt on Aerosol Cloud Droplet Activation Predicted by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 10746–10752. (c) Li, X.; Hede, T.; Tu, Y.; Leck, C.; Ågren, H. Glycine in aerosol water droplets: a critical assessment of Köhler theory by predicting surface tension from molecular dynamics simulations. *Atmos. Chem. Phys.* **2011**, *11*, 519–527. (d) Li, X.; Hede, T.; Tu, Y.; Leck, C.; Ågren, H. Amino acids in atmospheric droplets: perturbation of surface tension and critical supersaturation predicted by computer simulations. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* **2011**, *11*, 30919–30947.
- (7) Ottosson, N.; Børve, K. J.; Spangberg, D.; Bergersen, H.; Sæthre, L. J.; Faubel, M.; Pokapanich, W.; Ohrwall, G.; Bjørneholm, O.; Winter, B. On the Origins of Core-Electron Chemical Shifts of Small Biomolecules in Aqueous Solution: Insights from Photoemission and ab Initio Calculations of Glycineaq. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3120–3130.
- (8) da Silva, A. M.; Mocellin, A.; Monti, S.; Li, C.; Marinho, R. R. T.; Medina, A.; Ågren, H.; Carravetta, V.; de Brito, A. N. Surface-Altered Protonation Studied by Photoelectron Spectroscopy and Reactive Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 807–811.
- (9) (a) Wolf, S. G.; Leiserowitz, L.; Lahav, M.; Deutsch, M.; Kjaer, K.; Als-Nielsen, J. Elucidation of the two-dimensional structure of an [alpha]-amino acid surfactant monolayer on water using synchrotron

X-ray diffraction. *Nature* **1987**, 328 (6125), 63–66. (b) Enami, S.; Fujii, T.; Sakamoto, Y.; Hama, T.; Kajii, Y. Carboxylate Ion Availability at the Air–Water Interface. *J. Phys. Chem. A* **2016**, 120 (46), 9224–9234. (c) Vysotsky, Y. B.; Fomina, E. S.; Belyaeva, E. A.; Aksenenko, E. V.; Fainerman, V. B.; Vollhardt, D.; Miller, R. Quantum-Chemical Analysis of Thermodynamics of Two-Dimensional Cluster Formation of Racemic α -Amino Acids at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115 (10), 2264–2281.

(10) (a) Bäessler, M.; Ausmees, A.; Jurvansuu, M.; Feifel, R.; Forsell, J.-O.; de Tarso Fonseca, P.; Kivimäki, A.; Sundin, S.; Sorensen, S. L.; Nyholm, R.; Björneholm, O.; Aksela, S.; Svensson, S. Beam Line I411 at MAX II - Performance and First Results. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **2001**, 469 (3), 382–393. (b) Bäessler, M.; Forsell, J. O.; Björneholm, O.; Feifel, R.; Jurvansuu, M.; Aksela, S.; Sundin, S.; Sorensen, S. L.; Nyholm, R.; Ausmees, A.; Svensson, S. Soft X-Ray Undulator Beam Line I411 at MAX-II for Gases, Liquids and Solid Samples. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1999**, 101-103, 953–957.

(11) Bergersen, H.; Marinho, R. R. T.; Pokapanich, W.; Lindblad, A.; Björneholm, O.; Saethre, L. J.; Ohrwall, G. A photoelectron spectroscopic study of aqueous tetrabutylammonium iodide. *J. Phys.: Condens. Matter* **2007**, 19 (32), 326101.

(12) Winter, B.; Faubel, M. Photoemission from liquid aqueous solutions. *Chem. Rev.* **2006**, 106 (4), 1176–211.

(13) Kukk, E. SPANCF - Spectral Analysis by Curve Fitting [Curve Fitting Macro Package for Igor Pro].

(14) Igor Pro Wavemetrics. <http://www.wavemetrics.com>.

(15) Coville, M.; Thomas, T. D. Molecular Effects on Inner-shell Lifetimes: Possible Test of the One-center Model of Auger Decay. *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.* **1991**, 43, 6053–6056.