UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"CONTRIBUIÇÃO DA TÉCNICA DE RPE NO ESTUDO DE TRÊS DIFERENTES SISTEMAS: COMPLEXOS DE Cu(II)--ALIINA; Cu(II)-bdfpo E HEMOPROTEÍNAS COM DIFERENTES GRAUS DE HIDRATAÇÃO".

LADISLAU MARTIN NETO

[redacted]

Dissertação apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

Departamento de Física e Ciência dos Materiais

São Carlos - 1985

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ____

Ladislau Martin Neto

APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM *12* DE *fevereiro* DE 198*5*.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. *Otaciro Rangel Nascimento* - Orientador

Rosemary Sanches

Dr. *Rosemary Sanches*

Dr. *Antonio Carlos Massabni*

Dedico

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Otaciro Rangel Nascimento, pelo apoio e estímulo que recebí desde o meu ingresso na Pós-Graduação, pelos muitos ensinamentos transmitidos e também pela confiança e amizade demonstrada.

À Profª Rosemary Sanches pelas sugestões, discussões, incentivos e auxílio na preparação das amostras e pela amizade.

Ao Prof. Marcel Tabak pelo apoio, sugestões e pela amizade.

Ao Prof. Sérgio Mascarenhas pelo esforço realizado em prol do desenvolvimento da Biofísica.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica Molecular e Dosimetria: IGNEZ, WASHINGTON, BAFFA, ANTONIO, LAURA, JANICE, MÁRCIO, ANA, JOÃO, SILVÉRIO e APARECIDO pelo apoio inestimável e excelente ambiente de convívio e trabalho.

Ao Sanches e Isabel pelo constante apoio, incentivo, sugestões e pela amizade.

Ao Jorge Honel pela colaboração inicial nas preparações das amostras e pela amizade.

Ao Aldo Tancredo pelo apoio, estímulo e amizade.

Aos Profs. Massabni e Pedrina, do Instituto de Química de Araraquara, pela colaboração, boa vontade em ajudar-me e pela franquia de seu laboratório.

Ao Sr. Trombela e ao Geraldo, Glaucius e Júlio pelas medidas cristalográficas.

Ao Valdeci e ao Valdir pela ajuda no Centro de Computação.

Aos amigos do DFCM pela ajuda e apoio valioso, principalmente quando da minha chegada aqui.

À todos os funcionários do DFCM, pelo carinho e simpatia e pelos serviços prestados.

À Maria Helena pela colaboração, tradução de artigos em alemão e pela amizade.

Ao Augusto e à Isabel pelos excelentes desenhos.

Ao Walter pela datilografia perfeita e à Marta pela colaboração.

Ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro.

Aos Professores do Colégio "Benedito Gebara" em Duartina, da Fundação Educacional de Bauru e do IFQSC, responsáveis pela minha formação acadêmica.

Aos amigos Diniz, Manoel e Ricardo pelo apoio e incentivo constante e pelo excelente ambiente de convívio no dia-a-dia em São Carlos.

Aos amigos de Duartina pelo estímulo da amizade sincera e de muitos anos.

À Mitze, minha namorada, pelo apoio, estímulo e pela

compreensão nos momentos difíceis.

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio, estímulo e confiança durante toda minha vida.

ÍNDICE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... i

LISTA DE TABELAS..... vi

RESUMO..... vii

ABSTRACT..... viii

INTRODUÇÃO..... 1

CAPÍTULO I - PROTEÍNAS CONTENDO COBRE

1.1- Descrição Geral..... 7

1.2- Complexos de Cobre com Aminoácidos e pequenos Peptídios..... 11

CAPÍTULO II - HEMOGLOBINA E MIOGLOBINA

2.1- Características Gerais..... 13

2.2- Propriedades Fisiológicas..... 17

2.3- Mioglobina..... 19

2.4- Hemoglobina..... 21

2.5- Hidratação de Hemoproteínas..... 24

2.5.1- Importância da Água..... 24

2.5.2- Água na Mb e Hb..... 25

CAPÍTULO III - TEORIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

3.1- Introdução..... 28

3.2- Interações..... 30

3.2.1- Interação Spin-Órbita..... 30

3.2.2- Efeito do Campo Cristalino - - Interação Fina..... 31

3.2.3- Interação Hiperfina..... 34

3.2.4- Interação de Spins Eletrônicos. 35

3.2.5- Outras Interações..... 36

3.3- RPE do Íon Cu(II)..... 36

3.3.1- Características do Íon Cu(II)... 36

3.3.2- Espectro de RPE..... 38

3.3.2.1- Hamiltoniana de Spin.. 38

3.3.2.2- Espectro de Solução... 41

3.3.2.3- Variação Angular em um Cristal Simples. 47

3.3.2.4- Espectro de Policristais..... 50

3.4- RPE em Hemoproteínas..... 52

3.4.1- Hamiltoniana de Spin e Níveis de Energia..... 52

CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Complexos Cu(II) - Aliina..... 57

4.1.1- Preparação das Amostras..... 57

4.1.1.1- Obtenção do Aminoácido Aliina..... 57

4.1.1.2- Caracterização da aliina - Reação com ninidrina..... 60

4.1.1.3- Preparação de complexos..... 60

4.1.2- Medidas de absorção óptica.. 61

4.1.3- Medidas de RPE..... 61

4.1.4- Medidas cristalográficas.... 62

4.2- Complexo dicloro bis (benzil difenil fosfinóxido) cobre (II)..... 62

4.2.1- Obtenção do monocristal..... 62

4.2.2- Medidas de RPE..... 63

4.3- Hidratação de hemoproteínas..... 66

4.3.1- Preparação das amostras..... 66

4.3.2- Medidas de RPE..... 66

4.3.3- Medidas de absorção óptica.. 67

CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Complexos Cu(II) - Aliina..... 68

5.1.1- Resultados..... 68

5.1.1.1- Espectros de absorção eletrônica no visível..... 68

5.1.1.2- Espectros de RPE... 73

5.1.1.3- Medidas Cristalográficas..... 75

5.1.2- Discussão..... 75

5.2- Complexo dicloro bis (benzil difenil fosfinóxido) cobre (II)..... 88

5.2.1- Resultados..... 88

5.2.1.1- Cristalografia..... 88

5.2.1.2- RPE..... 90

5.2.1.3- Absorção Eletrônica 92

5.2.1.4- Determinação do estado fundamental do íon cobre(II)..... 101

5.2.1.5- Cálculos dos fatores de redução orbital. 106

5.2.2- Discussão..... 109

5.3- Hidratação de hemoproteínas..... 111

5.3.1- Resultados..... 111

5.3.1.1- Medidas de RPE..... 111

5.3.1.2- Meta hemoglobina bovina..... 112

5.3.1.3- Meta mioglobina equina..... 116

5.3.2- Discussão..... 117

CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO

6.1- Complexos Cu(II)-Aliina..... 132

6.2- Complexo dicloro bis (benzil defenil fosfinóxido) cobre(II)..... 133

6.3- Hidratação de Hemoproteínas..... 133

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 136

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Gráfico de $A_{//}$ versus $g_{//}$ para 2 tipos de complexos biológicos com o cobre..... 10

FIGURA 2-a) Grupo heme..... 18

FIGURA 2-b) Grupo heme ligado a parte proteica..... 16

FIGURA 3-a) Ocupação dos orbitais d pelos elétrons dos íons Fe(II) e Fe(III)..... 17

FIGURA 3-b) Efeito do campo cristalino Δ no estado de spin para o íon Fe(III)..... 17

FIGURA 4 - Curvas de oxigenação para a Hb nos pHs= 7,6; 7,4 e 7,2 e para a Mb..... 18

FIGURA 5 - Molécula de mioglobina..... 19

FIGURA 6 - Molécula de oxi-hemoglobina..... 22

FIGURA 7 - Molécula de desoxi-hemoglobina..... 23

FIGURA 8-a) Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético..... 29

FIGURA 8-b) A forma da linha de absorção de energia do campo de microondas..... 29

FIGURA 8-c) Derivada da linha de absorção..... 29

FIGURA 9-a) Simetria octaédrica dos ligantes..... 33

FIGURA 9-b) Dependência angular da parte real do orbital..... 33

FIGURA 9-c) Desdobramento dos níveis de energia a várias geometrias de ligação..... 33

FIGURA 10-a) Exemplo de estereoquímica para um complexo do íon Ni(II)..... 38

FIGURA 10-b) Exemplo de estereoquímica para um complexo do íon Cu(II)..... 38

FIGURA 11 - Espectro típico de RPE de complexo de cobre (II) em solução à T-ambiente 42

FIGURA 12 - Representação geométrica do fator g no plano "ab"..... 50

FIGURA 13 - Espectro típico de RPE de complexo de cobre (II) em uma solução congelada..... 51

FIGURA 14 - Níveis de energia de um íon com S= 5/2..... 53

FIGURA 14-a) Íon livre em um campo magnético externo... 53

FIGURA 14-b) Íon em um campo cristalino axial com o campo magnético externo Ho z..... 53

FIGURA 14-c) Íon em um campo cristalino axial com o campo magnético externo Ho z..... 53

FIGURA 15 - Espectro de RPE do íon Fe(III) em campo cristalino axial fraco..... 54

FIGURA 16 - Representação vetorial da orientação do eixo de quantização do heme..... 55

FIGURA 17 - Valores de g efetivo em função de λ= E/D... 55

FIGURA 18-a) Fórmula estrutural do complexo dicloro bis (benzil difenil fosfinóxido) cobre(II)..... 64

FIGURA 18-b) Arranjo espacial do complexo dicloro bis (benzil difenil fosfinóxido) cobre(II)..... 65

FIGURA 19 - Espectros de absorção eletrônica dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções..... 70

FIGURA 20 - Gráfico do comprimento de onda correspondente ao máximo da banda de absorção dos espectros eletrônicos dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções..... 71

FIGURA 21 - Gráfico do comprimento de onda correspondente ao máximo da banda de absorção dos espectros eletrônicos dos complexos Cu(II)-aliina (4L:1M) em função do pH das soluções..... 72

FIGURA 22 - Espectros de RPE dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções, medidas à T--ambiente..... 76

FIGURA 23 - Gráfico dos parâmetros g e A_0 dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T-ambiente..... 77

FIGURA 24 - Espectro de RPE dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T= = -140 ^{o}C..... 78

FIGURA 25 - Gráficos dos parâmetros $g_{//}$ (*) e $g_{\perp}$ (✡) dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T= 140 ^{o}C..... 79

FIGURA 26 - Gráficos dos parâmetros g e A_0 dos complexos Cu(II)-aliina (4L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T-ambiente..... 80

FIGURA 27 - Gráficos dos parâmetros $g_{//}$ (*) e $g_{\perp}$ (✡) dos complexos Cu(II)-aliina (4L:1M) em função do pH das soluções, medido à T= -140 °C..... 81

FIGURA 28 - Diagramas de pó de 3 amostras..... 85

FIGURA 28-a) Aliina-$CuC\ell_2$ (2L:1M) pH= 10,4..... 85

FIGURA 28-b) Aliina-$CuSO_4$ (2L:1M) pH= 7,4..... 85

FIGURA 28-c) Aliina-$CuSO_4$ (3L:1M) pH= 10,7..... 85

FIGURA 29 - Estereoquímica do sítio de ligação do íon Cu(II) no complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$. 90

FIGURA 30 - Espectros de RPE do complexo dicloro bis (benzil difenil fosfinóxido) cobre(II) para 4 direções diferentes de aplicação do campo magnético Ho..... 93

FIGURA 31-a) Variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ no plano ab, do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$..... 94

FIGURA 31-b) Variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ no plano ac, do complexo $|CuC_2(bdfpo)_2|$..... 95

FIGURA 31-c) Variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ no plano bc, do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$..... 96

FIGURA 32-a) Variação angular da largura de linha (ΔH) no plano ab, do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$..... 97

FIGURA 32-b) Variação angular da largura da linha (ΔH) no plano ac, do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$..... 98

FIGURA 32-c) Variação angular da largura de linha (ΔH) no plano bc, do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$.. 99

FIGURA 33 - Espectro de absorção eletrônica do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$ em solução..... 100

FIGURA 34 - Espectro de absorção de amostra policristalina do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$ em suspensão com fluorlube..... 101

FIGURA 35 - Espectros de RPE para metahemoglobina bovina em diferentes graus de hidratação..... 113

FIGURA 36-a) Espectros de RPE para a metamioglobina equina em diferentes graus de hidratação, em campo baixo.. 114

FIGURA 36-b) Espectros de RPE para a meta Mb equina em diferentes graus de hidratação, em campo alto..... 115

FIGURA 37 - Gráfico de $I_3/(I_1 + I_2)$ em função do grau de hidratação para a meta Hb bovina..... 118

FIGURA 38 - Gráfico de S_2/S_1 em função do grau de hidratação para a meta Hb bovina..... 119

FIGURA 39 - Gráfico de $g_\perp$ em função do grau de hidratação para a meta Mb equina..... 120

FIGURA 40 - Gráfico de ΔH_1 em função do grau de hidratação para a meta Mb equina..... 121

FIGURA 41 - Gráfico de $I_3/(I_1 + I_2)$ em função do grau de hidratação para a meta Mb equina..... 122

FIGURA 42 - Gráfico de S_2/S_1 em função do grau de hidratação para a meta Mb equina..... 123

LISTA DE TABELAS

TABELA I - Alguns exemplos representativos de metalo--proteínas..... 1

TABELA II - Exemplos de algumas "Cu-proteínas"..... 8

TABELA III - Ligantes que podem ocupar a 6ª coordenação do ferro no heme e o efeito sobre a valência e o estado de spin do composto resultante..... 14

TABELA IV - Valores dos parâmetros espectroscópicos de RPE e absorção eletrônica para os complexos Cu(II)--aliina (2OL-1M)..... 82

TABELA V - Valores dos parâmetros espectroscópicos de RPE e absorção eletrônica para os complexos Cu(II)--aliina (4L-1M)..... 83

TABELA VI - Dados de RPE de amostras policristalinas dos complexos Cu(II)-aliina..... 84

TABELA VII - Operação do momento angular nos orbitais d.. 104

RESUMO

Neste trabalho são apresentados estudos em três diferentes sistemas utilizando-se as técnicas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e absorção eletrônica.

No primeiro estudou-se a formação dos possíveis complexos entre o aminoácido aliina, extraído do alho, e o íon cobre(II). Os dados de RPE e absorção eletrônica no visível (400-1100 nm) foram utilizados para caracterizar os diferentes complexos obtidos.

No segundo utilizou-se o monocristal do complexo diclo ro bis(benzil difenil fosfinóxido) Cobre(II) e efetuaram-se medidas de RPE variando-se a direção de aplicação do campo magnético no monocristal. Os auto-valores encontrados para as componentes do tensor $\bar{\bar{g}}$ foram: g_1= 2,0891; g_2= 2,4554 e g_3= 2,0767. Com base nos dados de RPE e cristalográficos e usando teoria de campo cristalino foi proposto d_{xy} como estado fundamental para o íon cobre(II) neste complexo.

Fez-se também um estudo preliminar observando-se as variações no centro ativo de hemoproteínas moduladas pelo grau de hidratação. Metahemoglobina bovina e metamioglobina equina liofilizadas foram usadas e o sinal de RPE do íon ferro(III) monitorado. Dos espectros de RPE das duas proteínas são observadas pelo menos duas simetrias para o íon ferro(III), uma axial caracterizada por um valor de g próximo de 6 e outra caracterizada por g= 4,3 correspondendo a simetria rômbica. A intensidade dos sinais mostraram-se muito sensíveis ao grau de hidratação. Metahemoglobina e metamioglobina apresentaram comportamentos distintos dos sinais de RPE e sugeriu-se serem eles devido as diferenças estruturais entre as duas proteínas.

ABSTRACT

In this work studies in three different systems using Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and eletronic absorption tecniques are presented.

The formation of possible complexes between the amino acid aliin, extracted of garlic, and the copper(II) ion was studied in the first work. EPR and visible eletronic absortion (400-1100 nm) data were utilized to characterize the different complexes obtained.

In the second work a crystal of the complex dichloro bis (benzyl diphenyl phosphinoxide) copper(II) was used and the EPR measures were made for different directions of application of the magnetic field in the crystal. The eigenvalues obtained for the $\bar{\bar{g}}$ tensor components were: $g_1 = 2.0890$; $g_2 = 2.4554$ and $g_3 = 2.0767$. Using EPR and crystallografic data and crystal field theory d_{xy} was proposed as the ground state of the copper(II) ion in this complex.

A preliminary study was also made observing changes at the active center of the hemeproteins modulated by the hydration degree. Lyophilized bovine methemoglobin and equine metmyoglobin were used and the EPR signal of the iron(III) ion monitored. For both proteins the EPR spectra corresponding to at least two iron symmetries were observed, one axial characterized by a g value near 6.0 and another characterized by g= 4.3 corresponding to rhombic symmetry. The intensity of these signals were very sensitive to the hydration degree. Metmyoglobin and methemoglobin showed distint behaviours of the EPR signals and it was suggested that they were due to structural differences between the two proteins.

INTRODUÇÃO

Metalo-enzimas e outras metalo-proteínas ocupam uma posição proeminente nas discussões modernas sobre a evolução de proteínas. A razão deste destaque não é, naturalmente, que a evolução de metalo-proteínas exige qualquer princípio específico diferente daqueles que governam o aparecimento de outras proteínas, mas sim pelo fato que metalo-proteínas têm sido objeto atrativo para investigação de estrutura e função de proteína.

A explicação mais simples para esse fato, é que um terço (1/3) de todas as enzimas tem íons metálicos como grupos prostético ou ativadores e que uma grande parte de proteínas não catalíticas também dependem dos íons metálicos para realizar sua função fisiológica. O papel de metalo-proteínas é essencial em muitos processos biológicos e na tabela I apresenta-se alguns exemplos para dar uma idéia das diferentes funções e íons metálicos envolvidos.

TABELA I - Alguns exemplos representativos de Metalo-Proteínas(1).

PROTEÍNA	METAL	FUNÇÃO
concavalina A	Mn	ligação sacarídeo-proteína
hemoglobina	Fe	transporte de oxigênio
mioglobina	Fe	armazenamento de oxigênio
ferritina	Fe	armazenamento de ferro
proteínas enxofre-ferro	Fe	transporte de elétrons
hemocianina	Cu	transporte de oxigênio
ceruloplasmina	Cu	transporte de cobre
proteínas azuis	Cu	transporte de elétrons
álcool dehidrogenase	Zn	catalisa a oxidação de etanol ou a redução de acetaldeído
nitrogenase	Mo e Fe	catalisa a redução de N_2

Outro aspecto importante que deve ser mencionado é a de que alguns bioquímicos perceberam, há várias décadas, que muitos processos específicos de metalo-enzimas fazem-nas particularmente conveniente para a elucidação do tipo de relação entre estrutura química e atividade catalítica.

Quando o metal está diretamente envolvido no mecanismo catalítico ele mesmo pode ser usado como um repórter natural do sítio ativo porque muitas vezes tem propriedades físicas, tais como cor ou paramagnetismo, permitindo um estudo direto de eventos químicos no sítio ativo. De fato, a interpretação de propriedades espectroscópicas tem muitas vezes tornado possível fazer hipóteses de aspecto estruturais no mecanismo catalítico de metalo-enzimas bem antes da determinação de sua estrutura completa (2).

Investigações em anos recentes tem tornado óbvio que uma combinação de dados espectroscópicos e cinéticos detalhados para metalo-enzimas e metalo-proteínas com informação estrutural extensiva (tais como cristalográficas ou proveniente de microscopia eletrônica) podem dar conhecimentos profundos para o entendimento das funções biológicas destas proteínas.

Estudos dessa natureza tornaram-se possíveis com o desenvolvimento de métodos analíticos e técnicas de separação que permitiram o isolamento e caracterização de uma grande quantidade de metalo-proteínas. Também o progresso da mecânica quântica no período entre as duas guerras mundiais produziram, no início dos anos 60, uma base teórica geral para a interpretação de propriedades espectroscópicas e estruturais dos íons metálicos de transição em diferentes compostos. Contribuições neste sentido foram dadas por Van Vleck e sua escola e posteriormente o advento das teorias de campo cristalino e de campo ligante permitiram um entendimento mais completo dos compostos de metais de transição.

Sobre essas bases foram feitas uma quantidade imensa

de investigações sobre compostos de coordenação, na década de 60. Este fato permitiu, na década seguinte, uma extensão maciça de resultados obtidos para complexos metálicos para a interpretação do comportamento de sítios ativos em metalo-proteínas, já que podem ser considerados, em uma primeira aproximação, como um composto comum de coordenação circundado por uma parte proteica. Sem dúvida esta super-simplificação é útil quando as propriedades espectroscópicas são investigadas, mas falha quando tenta-se examinar efeitos cooperativos, mecanismos de reação e, em geral, quando o acoplamento entre o sítio ativo e a parte proteica e o solvente é importante.

Pode parecer muito limitante concentrar todas as propriedades espectroscópicas de uma metalo-proteína no sítio ativo contendo o metal, o qual é somente uma parte pequena da molécula toda. Contudo, é justamente no sítio ativo que as reações principais ocorrem e, conseqüentemente, qualquer informação concernente ao íon metálico e seus vizinhos é da maior importância para o entendimento da estrutura eletrônica e os mecanismos da reação. Sem dúvida esta é a justificativa principal para efetuar-se estudos utilizando complexos modelos, onde se utilizam aminoácidos e pequenos peptídios como ligantes para íons metálicos, já que constituem um sistema muito mais simples que uma metalo-proteína mas que podem reproduzir as propriedades espectroscópicas do sítio ativo dessa. Muitas vezes, no entanto, metalo-proteínas são caracterizadas por geometrias não comuns, comportamento espectroscópicos e potencial de redução, os quais são encontrados com dificuldades em compostos modelos sintetizados em laboratório.

Várias técnicas têm sido utilizadas nesses estudos, tais como: titulação potenciométrica, "stopped-flow" e relaxação na obtenção de constantes de equilíbrios químicos, absorção eletrônica, Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), dicroísmo circu-

lar magnético, espectroscopia Mössbauer, susceptibilidade magnética e outras.

Dentre os estudos apresentados nesta dissertação está o de formação de complexos do íon cobre (II) com o aminoácido aliina, extraído do alho, em função do pH na faixa de 2,0 até 13,0. O estudo foi feito utilizando as técnicas de absorção eletrônica no visível (absorção óptica), em diferentes pHs, e de RPE das mesmas em temperatura ambiente e nitrogênio líquido. A escolha do aminoácido aliina como ligante para o íon Cu (II) deveu-se, principalmente, ao fato deste apresentar um grupo sulfóxido em sua constituição e assim o enxofre (S) poderia ser um dos átomos ligantes do íon metálico simulando dessa forma o sítio ativo ativo de proteínas azuis.

Um trabalho prévio feito por Silva, G.P.(3) mostrou que a aliina forma complexos com os íons de Cu(II), Ni(II) e Zn(II), e de um dos complexos obtidos foi sugerido, a partir de dados de espectroscopia no infravermelho e de RPE, a possível coordenação do átomo de oxigênio, do grupo sulfóxido ao aminoácido do íon Cu(II). No entanto os dados não são conclusivos e pretendeu-se neste trabalho verificar esta hipótese bem como fazer um estudo sistemático deste sistema em função do pH e tentar obter monocristais para estudos cristalográficos e de RPE.

É apresentado também um estudo de RPE utilizando um monocristal do complexo dicloro bis (benzil difenil fosfinóxido) cobre(II) $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$ obtido por Mattioli, M.P.D.(4) do Instituto de Química de Araraquara-UNESP. Mattioli, M.P.D.(4) efetuou estudos, utilizando espectroscopia no infravermelho e de absorção eletrônica, do complexo em solução, em acetonitrila, e no estado sólido (pó). A partir da comparação do espectro eletrônico do complexo com aqueles de compostos de estruturas ou geometrias conhecidas procurou, de maneira qualitativa, determinar a geometria existen-

te ao redor do íon metálico.

Este procedimento comparativo nem sempre possibilita a determinação exata da simetria existente e normalmente recorre-se a utilização de outras técnicas para resolver o problema. Devido ao fato do complexo apresentar o íon metálico |Cu(II)| num estado paramagnétido uma alternativa foi a utilização da técnica de RPE. Por outro lado a obtenção de monocristais possibilitou também a determinação da estereoquímica do complexo por métodos cristalo - gráficos que foi realizado pelo grupo de cristalografia no Departamento de Química e Física Molecular - USP - São Carlos.

Assunto de interesse fundamental também em biofísica é o conhecimento do papel da água na vida, a nível molecular, onde muito ainda está por ser feito e entendido.

Sabe-se que a água interage com macromoléculas biológicas basicamente de dois modos, através de interações hidrofílica e hidrofóbica. A interação da água determina sua ligação com moléculas biológicas importantes. Ao se pensar nessas moléculas, a estrutura seca não é suficiente para explicar sua ação biológica; a existência de moléculas de água ligada deve ser levada em conta , isto porque a água interage com os resíduos hidrofílicos e polares mudando sua conformação que por sua vez é determinante na sua função.

Tem sido previamente mostrado usando condutividade protônica (5), propriedades dielétricas (6,7,8), efeito Hall (9), técnicas de relaxação NMR (10), etc., que propriedades físicas e químicas de proteínas são fortemente dependentes do nível de hidratação. A adsorção de água em várias proteínas liofilizadas tem sido estudada, e foi admitido que a forma de isoterma de adsorção pode ser descrita para baixa hidratação usando teoria de BET (11) enquanto para alta hidratação a teoria de Flory (12) é satisfatória.

Foi também claramente mostrado a existência de um valor de hidratação crítica que é necessário para observar uma notável variação no comportamento de diferentes parâmetros experimentais. Este fato parece estar relacionado à uma quantidade mínima de adsorção de moléculas de água necessária para induzir uma variação conformacional em direção a estrutura nativa. Esta quantidade mínima está relacionada à medida exata do conteúdo de água, o tipo de técnica e parâmetro físico utilizado, e também da composição e conformação específica de diferentes proteínas consideradas (6).

Todas as técnias mencionadas medem diretamente ou indiretamente as propriedades das moléculas modificadas pela água.

Nesta dissertação apresenta-se, também, um estudo preliminar onde tentou-se observar as variações no centro ativo de hemoproteínas moduladas pelo grau de hidratação. Metahemoglobina bovina e metamioglobina equina liofilizadas foram usadas e o sinal de RPE do íon ferro (III) monitorado.

CAPÍTULO I

PROTEÍNAS CONTENDO COBRE

1.1- Descrição Geral

Juntamente com hemoproteínas as proteínas contendo cobre ("Cu-Proteínas") são as mais amplamente espalhadas na natureza (1). Estão envolvidas em muitos processos biológicos tais como transporte de cobre e oxigênio, transferência de elétrons, hidroxilação e catálise oxidativa.

Os sítios contendo cobre são geralmente classificados em três tipos, a saber: tipo 1 ou centro "azul", tipo 2 ou centro não azul e tipo 3.

O tipo 1 ou centro "azul" é caracterizado por uma combinação de propriedades que não têm sido ainda obtido em complexos modelos, isto é uma banda de absorção intensa em torno de 600 nm, uma constante de acoplamento hiperfino do cobre ($A_{//}$ ou A_z) pequena e um alto potencial redox positivo para a reação Cu(II):Cu(I). Centros deste tipo estão situados em regiões hidrofóbicas de proteínas e não são acessíveis a água de um modo geral. O tipo 2 ou centro "não azul" tem propriedades comparáveis a aqueles complexos de baixo peso molecular. O tipo 3 consiste de um par de Cu(II) acoplado antiferromagneticamente. Na tabela II está apresentado alguns exemplos dos três tipos de sítios de Cu(II) em proteínas.

Assim "proteínas azuis" são as que apresentam as propriedades espectroscópicas especiais citadas e algumas destas proteínas têm vários íons de cobre, por exemplo: a ceruloplasmina,ou ferroxidase, tem sete ou oito, a lacase, quatro, plastocianina têm dois e azurina, estelaciana e umecianina tem apenas um íon de co-

bre. O peso molecular, por íon de cobre, varia entre 11.000 e 30.000 dáltons.

TABELA II - Exemplos de algumas Cu-Proteínas (1).

Cu-PROTEÍNA	FUNÇÃO	TIPO DE CENTRO DO COBRE
plastocianina	transferência de elétron	1
azurina	transferência de elétron	1
estelacianina	transferência de elétron	1
dopamina β hidroxilase	hidroxilação	2
galactose oxidase	oxidação de álcoois primários para o correspondente aldeido	2
tirosinase	hidroxilação de monofenóis e oxidação de O-difenóis	3
lacase	oxidação de p-difenóis	1,2,3
ceruloplasmina	atividade oxidase genérica, mobilização do ferro e transporte de cobre.	1,2,3
hemocianina	transporte de oxigênio	3

A hemocianina, pigmento transportador de oxigênio em invertebrados marinhos, é azul também, mas não é considerada uma "proteína azul", porque a absortividade molar, por íon de cobre, é baixa em comparação com as azuis e, além disto, a valência dos íons metálicos nos cromóforos é discutida.

As verdadeiras proteínas azuis são coloridas quando o cobre é cúprico, e clara quando cuproso.

O comportamento experimental que mais é salientado nestas proteínas, é a intensidade relativamente alta das bandas de absorção, o forte dicroísmo circular associado com estas bandas,

e o baixo valor da interação hiperfina de campo baixo do íon de cobre. A absortividade máxima da banda em 600 nm é duas ordens de grandeza maior que aquela apresentada por pequenos complexos de íon Cu(II) (sulfatos, aminoácidos, etc.), e uma ordem de grandeza maior que na maioria das apresentadas por pequenos peptídios Em pH neutro, o parâmetro de interação hiperfina $|A_z|$ para estas proteínas azuis, está entre $30 \times 10^{-4} cm^{-1}$ a $60 \times 10^{-4} cm^{-1}$ (menor que 100 gauss), enquanto que para os íons cúpricos em proteínas não azuis e em pequenos complexos, este valor varia entre $140 \times 10^{-4} cm^{-1}$ e $220 \times 10^{-4} cm^{-1}$ (maior que 140 gauss).

Como apresentado na tabela II algumas proteínas contém mais de um tipo de centro de cobre ou seja alguns azuis e outros não. Por exemplo, existe uma lacase de fungo que tem um sítio de Cu(II) com $|A_z| = 90 \times 10^{-4} cm^{-1}$ e um segundo íon Cu(II) com $|A_z| = 194 \times 10^{-4} cm^{-1}$, e dois outros íons de cobre, que não são detectaveis por RPE. Na discussão de cobres detectáveis por RPE, é conveniente classificá-los em dois grupos: tipo 1, com $|A_z| < 100 \times 10^{-4} cm^{-1}$ e, tipo 2 com $|A_z| > 140 \times 10^{-4} cm^{-1}$ (13). O gráfico da figura 1 mostra claramente a razão desta classificação.

os fatores que influem sobre os parâmetros magnéticos e os de absorção ótica (absortividade e comprimento de onda), estão de algum modo relacionados (14,15 e 16). Tanto na estelacianina como na umecianina, mudanças na atividade ótica ocorrem concomitante com mudanças em absorção ótica e RPE. Os dados sugerem fortemente que, alterações no espectro de RPE são, necessariamente , acompanhados por alterações nas propriedades óticas e que, há uma relação íntima entre a estrutura que origina a absorção não usual em 600 nm e o espectro do cobre tipo 1.

Recentemente estruturas cristalinas de plastocianina (17) e azurina (18) foram obtidas e os dados cristalográficos confirmaram para o centro tipo 1 uma geometria pseudotetraédrica,a

qual têm sido postulada como sendo a base das propriedades espectroscópicas e magnéticas (19). Os estudos cristalográficos dessas proteínas mostraram cromóforos CuN_2S_2, surgidos de ligações entre o átomo de cobre e resíduos de uma cisteína, uma metionina e duas histidinas. O tetraedro é distorcido e assume uma estereoquímica intermediária entre as formas tetraédrica e quadrada planar.

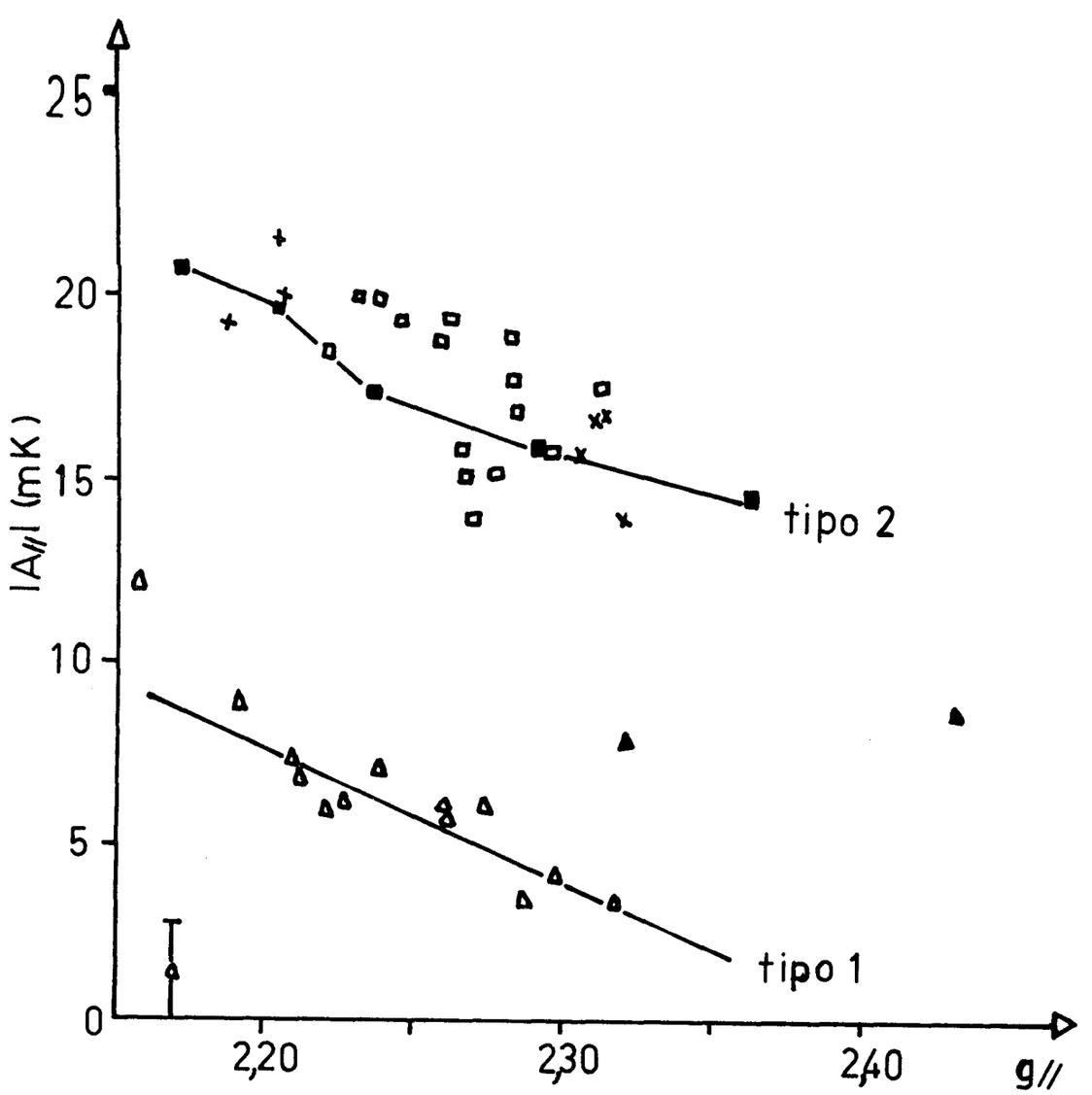


FIGURA 1 - Gráfico da constante hiperfina $A_{//}$ versus $g_{//}$ mostrando os dois tipos de complexos biológicos com o íon Cu(II). A linha quebrada no tipo 2 liga os polipeptídeos sintéticos. (Vänngard, 1972) (19).

Uma vez que centros azuis funcionam como transportadores de elétrons no qual o íon cobre oscila entre Cu(II) e Cu(I), a estrutura intermediária acima requereria menos energia no processo de redução, porque a geometria típica de coordenação para o Cu(I) é tetraédrica, enquanto a mais favorável para o Cu(II) é quadrada planar.

A origem das bandas de absorções dos centros tipo 1, em particular o pico intenso em 600 nm, há muito tempo era motivo de discussões sendo alternativamente atribuído à transições d-d ou a transições por transferência de carga. Contudo, através de medidas espectroscópicas de absorção, dicroísmo circular e dicroísmo circular magnético feitas por Solomon e colaboradores (20, 21, 22) mostrou-se que as transições d-d ocorrem na região do infravermelho próximo, abaixo de 12.000 cm^{-1} (ou acima de 800 nm), enquanto as outras bandas em maior energia são devido a transferência de carga do ligante para o cobre (enxofre da cisteína → Cu(II) para a banda perto de 600 nm) (22, 23). Embora o espectro de absorção d-d- pode ser bem interpretado adotando campos ligantes pseudotetraédrico (D_{2d} ou melhor C_{3v} (22)), um entendimento compreensivo de ambas propriedades, espectrocópica e magnética, não foi ainda atingido. De fato, o simples tratamento de campos ligantes não é muito satisfatório para explicar os valores de $g_{//}$ e $A_{//}$, e as discussões ainda permanecem abertas sobre a regra de covalência, hibridização d-p de orbitais do metal, acoplamentos vibrônicos e contribuições de acoplamento spin-órbita dos ligantes (24).

1.2- Complexos de Cobre com Aminoácidos e pequenos Peptídios

O estudo com complexos metálicos formados com aminoácidos e peptídios têm permitido muitos esclarecimentos sobre a complexação de metais de transição com proteínas. O íon Cu(II) têm

sido alvo de atenção especial.

Um número muito grande de possibilidades de coordenação é apresentado pelos aminoácidos e peptídios, dependendo dos resíduos de aminoácidos participantes, do pH e da relação estequiométrica.

Os aminoácidos complexam com Cu(II), geralmente formando complexos CuL_2, onde os nitrogênios do grupo amina e os oxigênios do grupo carboxila participam como átomos ligantes. A simetria mais comum existentes nestes complexos é a quadrada planar, com pequenas distorções. Geralmente, os complexos apresentam uma banda de absorção ótica ao redor de $16 \times 10^3 cm^{-1}$ (600 nm), com absortividade molar de $50M^{-1}cm^{-1}$ e espectro de RPE com simetria axial $g_{//} > g_{\perp}$ e $|A_{//}|$ da ordem de 160 gauss. Complexos de dipeptídio com estequiometria 1:1 em pHs tais que os nitrogênios peptídicos tenham seus prótons ionizados, são coordenados pelos nitrogênios amina e peptídico e pelo oxigênio carboxilato sendo o quarto ligante uma água. A absortividade máxima destes complexos é cerca de $80M^{-1}cm^{-1}$, perto de 640 nm, com espectros de RPE semelhantes àqueles apresentados por aminoácido.

Ultimamente, um esforço maior tem sido colocado em complexos de pequenos peptídios com íons de Cu(II), com objetivo de reproduzir os dados espectroscópicos apresentados pelas proteínas azuis. Nesse sentido tem-se os trabalhos de Sugiura (25, 26, 27 e 28), onde ele e seus colaboradores exploram a presença do enxofre do grupo tiol, como ligante do íon de Cu(II). Espectros de RPE de alguns complexos de Cu(II), foram caracterizados por valores de A pequenos, como aqueles encontrados nas proteínas azuis.

CAPÍTULO II

HEMOGLOBINA E MIOGLOBINA

Tanto a Hb como a Mb são duas proteínas amplamente estudadas e vários livros textos trazem informações que são citadas neste capítulo, como por exemplo: The structure and Action of Proteins (29).

2.1- Características Gerais

Dentre as mais abundantes proteínas de vertebrados estão a hemoglobina e a mioglobina. Na corrente sanguínea existe algo como 5 bilhões de células vermelhas ou eritrócitos por mililitro e cada um deles é empacotado com 280 milhões de moléculas de hemoglobina (Hb), de peso molecular 64.500 dáltons e com 4 grupos heme por molécula.

A mioglobina (Mb), proteína do músculo, é semelhante à hemoglobina mas tem somente um grupo heme e uma cadeia polipeptídica semelhante às da Hb, seu peso molecular é 17.800 dáltons.

O papel da Hb é ligar o oxigênio molecular (O_2), nos ferro do heme, nos pulmões e entregá-lo nos tecidos para a ação metabólica. Nos tecidos musculares, que contém mioglobina, o oxigênio é armazenado no grupo heme até ser requerido para a oxidação metabólica. Uma segunda tarefa da hemoglobina é ligar o dióxido de carbono (CO_2), produto da oxidação, e trazê-lo de volta aos pulmões a fim de ser liberado e prevenir assim a formação de ácidos nos músculos. Aqui vale a pena citar que o CO_2 não é transportado ligado ao ferro dos grupo heme da Hb mas sim ao nitrogênio das aminas terminais e também como íon bicarbonato em solução.

O centro ativo dessas moléculas é o grupo heme: um átomo de ferro circundado por um anel porfirínico* (figura 2a).

---

* O anel porfirínico tem a habilidade para ligar um íon metálico em seu centro No caso das hemoproteínas é o ferro mas na clorofila ele tem o magnésio e na vitamina B_{12} o cobalto, sendo portanto capaz de realizar funções biológicas diversas a qual depende em grande parte do átomo central (metal).

O anel porfirínico é insaturado em relação ao benzeno e tem muito elétrons π deslocalizados. Somente uma das possíveis estruturas ressonantes é apresentada na figura 2a e o esqueleto tem exatamente uma simetria de ordem 4, com as ligações a e a', b e b', c e c', d e d' sendo equivalentes.

O grupo heme se coordena às proteínas (Hb e Mb) através de ligações iônicas com os grupos carboxilatos nas posições 6 e 7 (figura 2a) e por um nitrogênio do grupo imidazol do resíduo histidina F8 na 5ª coordenação do ferro (figura 2b). O sítio da 6ª coordenação é ocupado por O_2, no caso fisiológico normal. Incidentalmente, a alta toxicidade do monóxido de carbono e cianeto é devido ao fato que eles ligam irreversivelmente no sítio da 6ª coordenação. Na tabela III é apresentado alguns ligantes que podem ocupar este sítio e seus efeitos sobre o estado de spin e valência do ferro.

TABELA III - Ligantes que podem ocupar a 6ª coordenação do ferro no heme e o efeito sobre a valência e estado de spin do composto resultante (30).

LIGANTE	VALÊNCIA	SPIN
O_2	2+	0
nenhum (desoxi)	2+	2
NO	2+	2
CO	2+	0
H_2O	3+	5/2
$(OH)^-$	3+	1/2
F^-	3+	5/2
CN^-	3+	1/2
N_3^-	3+	1/2

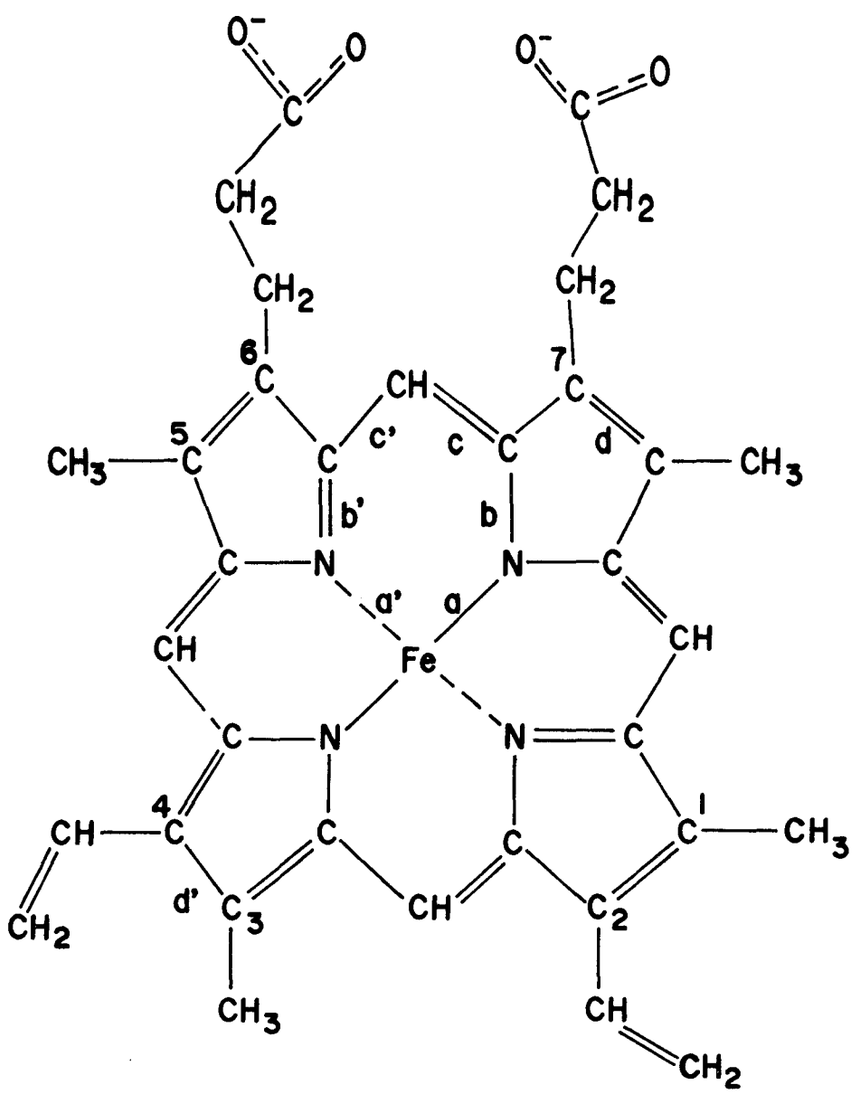


FIGURA 2a - Grupo heme (29).

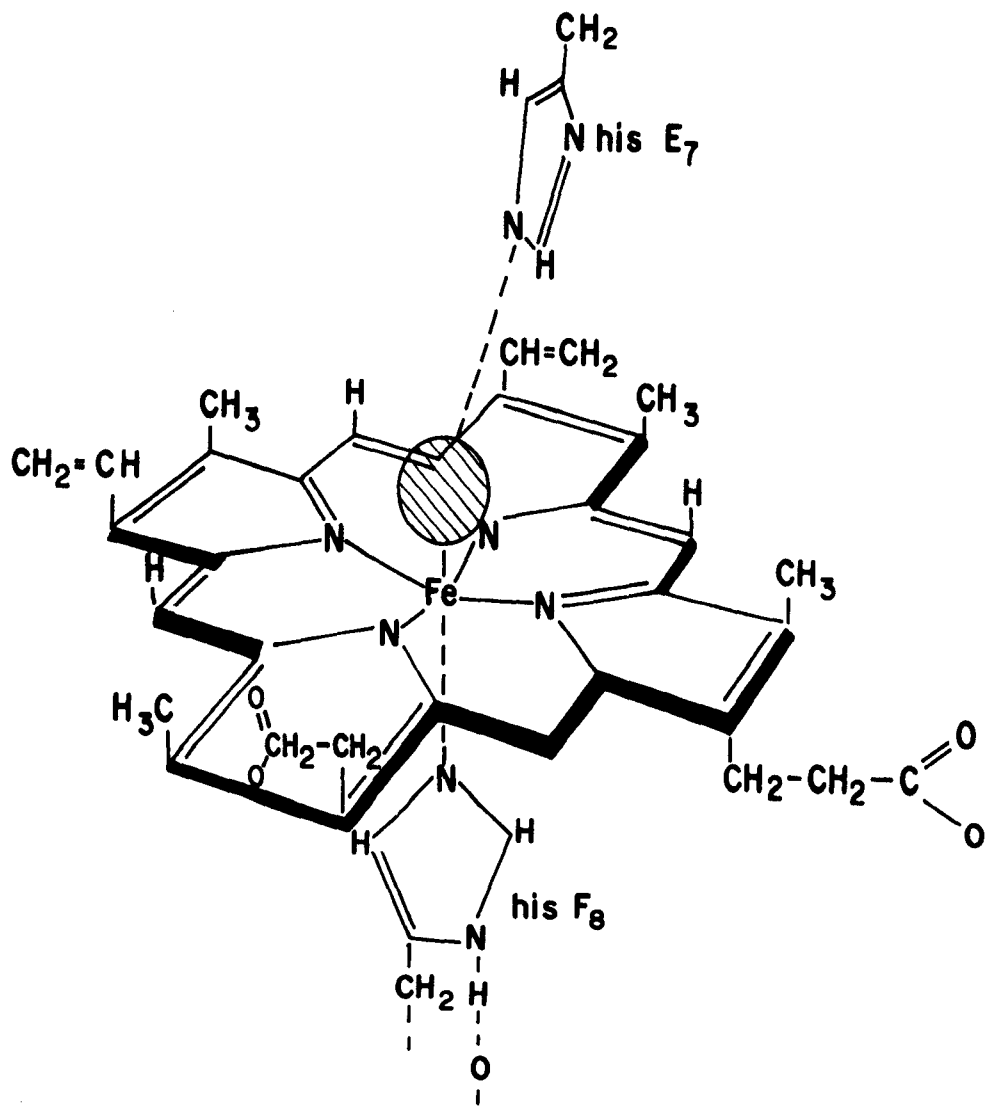


FIGURA 2b - Estrutura do grupo heme, mostrando as histidinas proximal F8 e distal E7; a esfera hachurada representa a posição do 6º ligante (31).

O íon ferro no heme está num campo cristalino de simetria octaédrica. Dependendo da intensidade do desdobramento do campo cristalino Δ, que levanta a degenerescência dos orbitais d, pode-se ter uma configuração baixo spin ou alto spin. Assim ligantes fortes, Δ intenso, como o cianeto (CN), fornecem uma configuração de baixo spin (S = 1/2) e ligantes fracos como o fluoreto (F^-) fornecem uma configuração de alto spin (S = 5/2). Na figura 3 mostra-se a ocupação dos orbitais d pelos elétrons dos íons Fe(II) e Fe(III) e o efeito do campo cristalino Δ no estado de spin para o Fe(III).

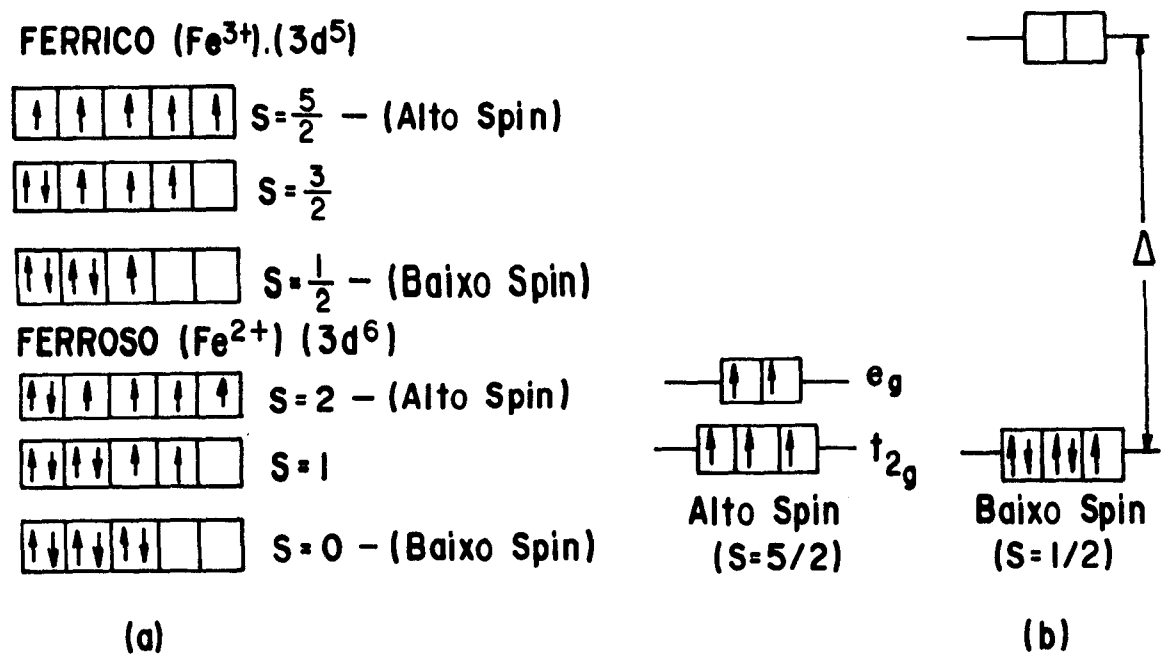


FIGURA 3 -
(a) Ocupação dos orbitais d pelos elétrons do Fe(II) e Fe(III)(32).
(b) efeito do campo cristalino Δ no estado de spin para o Fe(III)(33).

2.2- Propriedades Fisiológicas

As propriedades que são desejáveis em um sistema transportador de oxigênio podem ser resumidas em:

a) No transportador (hemoglobina), uma alta afinidade pelo oxigênio na presença de quantidade razoável, e uma afinidade diminuída em um meio "pobre" de oxigênio.

b) No armazenador (mioglobina), uma alta afinidade pelo oxigênio sob condições onde o transportador está entregando o oxigênio.

c) No transportador deve ter também habilidade para transportar de volta com ele para os pulmões o dióxido de carbono e

manter o pH dos tecidos

d) No transportador uma perda de afinidade pelo oxigênio em pH baixo (efeito Bohr), influenciando a transferência do oxigênio nos tecidos.

Estas propriedades são garantidas pelo imenso arranjo atômico (globina) que envolve o heme visto que o heme isoladamente não consegue ligar reversivelmente o O_2, como ocorre na proteína.

A maior parte das propriedades citadas são mostradas nas curvas de oxigenação da Figura 4.

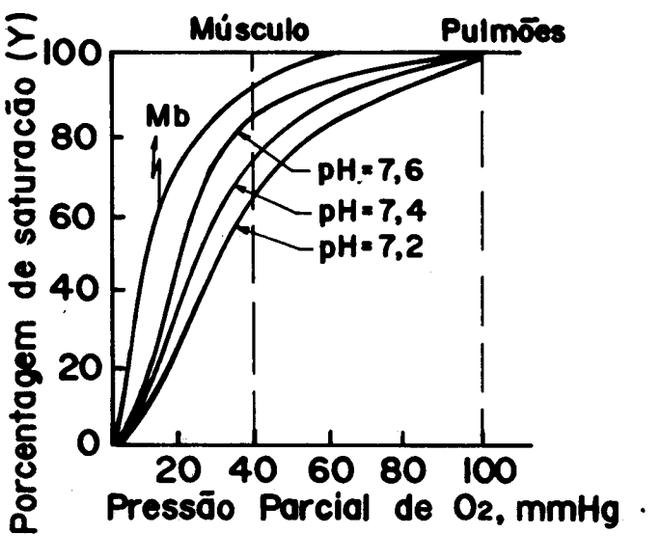


FIGURA 4 - Curvas de oxigenação para a Mb e para Hb em pH = 7,6; pH = 7,4 e 7,2 (29).

A saturação Y é definida pela fração de ocupação dos sítios de ligação do O_2. Os valores variam de 0-100 (todos os sítios vazios até todos os sítios cheios). A forma da curva de oxigenação da Hb é sigmoidal, mostrando que a ligação é cooperativa, ou seja, a união de um O_2 ao heme facilita a união do O_2 aos outros hemes. Para a Mb a curva de oxigenação é hiperbólica.

O ferro na atividade fisiológica de hemoproteínas, como Fe(II), pode se mover dentro e fora do plano da porfirina na oxigenação. Este movimento é transladado, possivelmente com alta amplificação pela histidina rigidamente ligada e isto é acompanhado por mudanças conformacionais na estrutura terciária da proteína. Na Hb, que é um tetrâmero, há também mudanças na estrutura quaternária que são provavelmente providenciais para a cooperatividade no processo de oxigenação (36).

2.3- Mioglobina

A mioglobina é constituída de um grupo heme e uma cadeia polipeptídica de 153 aminoácidos, arranjados em oito extensões de hélices α que formam uma fenda para o grupo heme (figura 5). Todas as hélices são dextrógiras e variam em comprimento de 7 a 26 resíduos. Ao todo, 121 dos 153 resíduos estão em região helicoidal. A molécula é um esferóide achatado nos polos, aproximadamente com 44 x 44 x 25 Å (Mb de cachalote). É extremamente compacta sendo que existe pouco espaço vazio em seu interior. A Mb é semelhante em constituição e estrutura à subunidade β da Hb.

As fontes mais ricas de mioglobina são os músculos de mamíferos aquáticos tais como focas, baleias e porcos marinhos que devem estocar O_2 por períodos relativamente longos. Foi do cachalote que John Kendrew, em 1962 obteve a Mb para a primeira estrutura de raios X de proteína (29).

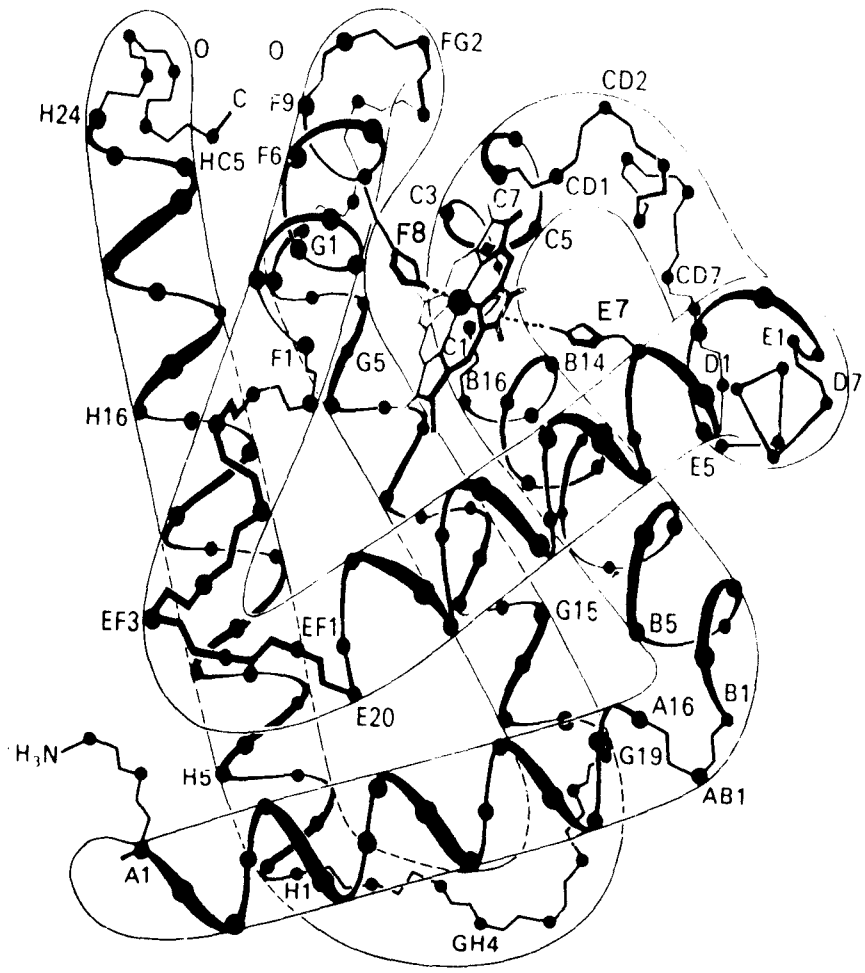


FIGURA 5 - Molécula de mioglobina (34).

A Mb cristaliza-se pela adição de sulfato de amônio 3Molar, pH= 7. Os cristais assim produzidos podem ter vários milímetros de comprimento. Há diversas evidências que as estruturas em solução e no estado cristalino são muito semelhantes.

A cadeia lateral dos 20 aminoácidos tem uma grande variedade de propriedades. Alguns são muito polares e outros são hidrofóbicos, influenciando assim as regiões da cadeia em que eles ocorrem para formar dobras assumindo aspecto de uma proteína globular. Os grupos laterais não polares dispõem-se no interior da molécula. Os resíduos que possuem tanto uma parte apolar quanto outra polar são orientados de modo que suas porções não polares dirijam-se para dentro. Os únicos resíduos polares dentro da Mb são duas histidinas, que têm uma função muito importante no centro ativo. O exterior da molécula contém tanto resíduos polares quanto não polares. Esta disposição deve, certamente, ter uma forte in-

fluência na solubilidade da Mb. O grupo heme está localizado em uma fenda na molécula de Mb, um local apolar, que protege o estado ferroso, do heme, da oxidação.

A estrutura tridimensional da molécula de mioglobina é a mesma para as diferentes espécies estudadas até o presente. Isto sugere que apesar da microheterogeneidade na composição dos aminoácidos alguns resíduos devem ter suas composições conservadas na estrutura primária (seqüência) de modo a determinar a estrutura terciária da proteína.

2.4- Hemoglobina

A hemoglobina é constituída por 4 grupos hemes e 4 cadeias polipeptídicas, sendo duas de 141 resíduos (cadeias α) e duas com 146 (cadeias β), num total de 574 aminoácidos. Cada uma dessas cadeias tem estrutura semelhante à da mioglobina. É uma molécula aproximadamente esférica, com uma cavidade central, e dimensões 64 x 50 x 50 Å (oxi Hb de cavalo). Os grupos heme de cadeias α_2 e β_1 são particularmente próximo, como são aqueles de α_1 e β_2 (figura 6).

O empacotamento de cadeias na molécula de Hb é tal que o contato entre cadeias laterais existe entre subunidades diferentes, mas há pequeno contato entre as de mesmo nome. Segundo Perutz, os pontos de contato entre as cadeias diferentes (α e β) são hidrofóbicos, enquanto entre as cadeias semelhantes são polares.

Os contatos $\alpha\ \beta$ são de dois tipos. Os $\alpha_1\ \beta_1$ ou $\alpha_2\ \beta_2$ são chamados contatos de empacotamento por representarem o empacotamento das subunidades que não mudam quando a molécula Hb vai da configuração desoxi para oxi. Os contatos $\alpha_1\ \beta_2$ ou $\alpha_2\ \beta_1$ são chamados contatos de deslisamento, uma vez que sofrem as principais mudanças quando há alteração no estado de ligação do ferro do he-

me. Ligações de hidrogênio e pontes salinas também são importantes na manutenção das subunidades juntas.

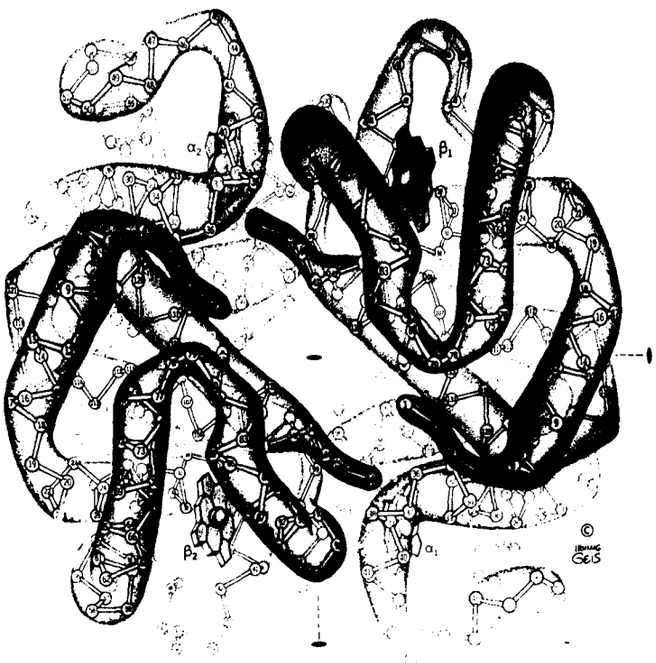


FIGURA 6 - Molécula de oxi-hemoglobina (35).

A distância entre os dois íons de ferro mais próximo é 25 Å. Cada um deles se acha parcialmente envolto em uma bolsa forrada por resíduos laterais não polares. Existe uma cavidade central dentro da molécula de Hb, forrada por resíduos polares. 2,3--Difosfoglicerato (DPG), um produto do metabolismo da glicose, ocupa esta cavidade central quando a molécula está no estado desoxigenado estabilizando esta forma (figura 7).

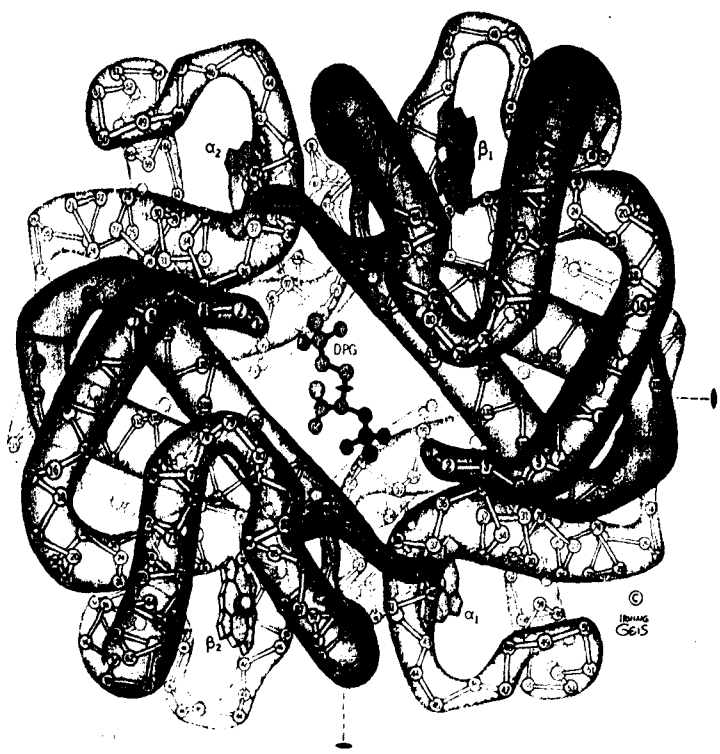


FIGURA 7 - Molécula de desoxi-hemoglobina (35).

Como mostrado na tabela III outros ligantes que o O_2 podem coordenar-se ao ferro do heme alterando eventualmente a valência e o estado de spin do ferro. No caso do ligante ser a água o composto resultante é chamado Meta Hb (ou Meta Mb) e a valência do ferro é alterada para +3 e o estado de spin para 5/2. A ligação da água, e conseqüente oxidação do ferro, pode ser induzida adicionando à solução proteica o composto ferrocianeto de potássio ($K_3 Fe(CN)_6$) em quantidade molar superior à da solução proteica, o que garante a oxidação de todos os "hemes". O excesso de ferrocianeto de potássio pode ser retirado, por exemplo, através de diálise contra água. A molécula de água ocupando a 6ª coordenação do ferro, forma ponte de hidrogênio com a histidina distal E7 da globina (36).

2.5- Hidratação de Hemoproteínas

2.5.1- Importância da Água

A quantidade de água nos seres vivos pode variar desde 97% de água em alguns invertebrados marinhos a 50% em algumas bactérias.

O ser humano adulto contém de 65 a 70% de água. Os tecidos nervosos são constituídos por 84% de água enquanto os adiposos tem somente 30%. Um adulto consome cerca de 900 litros de água por ano. Apesar destes números, o conhecimento do papel da água na vida, a nível molecular, é muito pequeno.

Até recentemente muitos biólogos tinham a água como um meio de suspensão para as moléculas ativas ou um mero preenchimento de espaço nos organismos vivos.

No entanto, a nível molecular, a água interage entre si, formando água líquida ou vários tipos de gelos; é possível também ocorrer sua interação com outras moléculas. Estas podem ser desde pequenos íons (Na^+, K^+, $C\ell^-$, etc.) até macromoléculas.

As macromoléculas que são essencialmente de 4 tipos ou seja, proteínas, polinucleotídeos, lipídios e polissacarídeos, interagem com a água basicamente de dois modos:

a) Interação hidrofílica - através de pontes de hidrogênio ou solvatação das cargas da macromolécula.

b) Interação hidrofóbica - a água, sendo repelida pela molécula, é obrigada a se auto-organizar formando por exemplo dodecaedros pentagonais e estruturas altamente organizadas tipo clatratos.

No caso de proteínas globulares (conformação esferoidal), pode-se explicar tal forma como devido à interação com a

água. Para que a proteína seja solúvel, os aminoácidos hidrofílicos devem ficar na parte externa para a solvatação e os aminoácidos hidrofóbicos preferem o interior da molécula.

2.5.2- Água na Mb e Hb

A Mb e a Hb são duas proteínas globulares típicas e assim apresentam os aminoácidos polares no exterior e os apolares no interior, exceção feita, conforme já citado, às duas histidinas (no caso da Mb ou oito para a Hb) que aparecem no interior das moléculas e tem função importante no centro ativo.

Nenhuma molécula de água fixada internamente é encontrada na Mb ou nas subunidades da Hb. No entanto na Hb, água ligada internamente é encontrada entre as subunidades e formam uma parte essencial do conjunto de ligações de hidrogênio que ajudam a manter o tetrâmero junto.

O conteúdo de água em cristais de Hb pode variar dentro de largos limites. Nos cristais úmidos normais de meta Hb de cavalo, 52,4% do volume da célula unitária é constituído por líquido de cristalização (37). Na secagem, parecem existir dois tipos de encolhimentos do cristal: a) uma série de estágios para cristais "úmidos" no qual as moléculas de proteína tem dimensões constante; e b) uma passagem do estado "úmido" para o "seco" no qual as dimensões das moléculas são reduzidas (38).

As dimensões da rede de cristais úmidos podem ser explicadas assumindo que as moléculas hidratadas empacotam como se fossem de forma aproximadamente esferoidal com diâmetros 53 x 53 x 71 Å, mas se o empacotamento é novamente considerado como de esferóides no cristal seco, o maior esferóide que se ajustaria nas dimensões da célula unitária ocuparia uma proporção consideravelmente menor do volume total que é observado (39). A forma da

molécula no cristal seco deve, conseqüentemente, ser mais poliedral que na forma úmida.

Outras evidências para a diferença entre as estruturas de Hb anidro e hidratada vêm de medidas de susceptibilidade magnética e de espectro de absorção. Haurowitz (1951) (40) relatou que anidro Hb dá bandas de absorção características de hemocromogenos e o trabalho de Keilin e Hartree (1952) (41) confirmou que o efeito era também mostrado por meta Hb. Tratando as formas anidro com água o espectro retorna a ter aquelas características de cristais hidratados. Em contraste a este comportamento, o espectro derivado de fluoreto, azoteto e cianeto não mostram dependência do grau de hidratação. As observações espectrais podem ser entendidas se, na desidratação, a molécula de água, a qual normalmente ocupa a posição de 6º ligante do átomo de ferro é trocado por um átomo de nitrogênio pertencente ao resíduo da histidina distal E7. Com a coordenação de um nitrogênio da globina na 6ª ligação (hemocromogeno) seria esperado uma redução no paramagnetismo do átomo de ferro. Este resultado foi verificado por Haberditzl, Havemann e Felgentreu (1961) (42) que acharam que anidro meta Hb era diamagnética. Do paramagnetismo residual do grupo heme estimaram que o momento magnético efetivo do Fe (III) era 2,91 magnetons de Bohr.

Um número de propriedades de cristais de Hb exibem descontinuidades em conteúdo de água entre 10 e 20% (porcentagem de peso de água adsorvida por peso de proteína seca) sugerindo que hidratação é completada neste intervalo. Por exemplo, existe um aumento agudo na tangente de perda dielétrica de cristais de meta Hb acima de uma hidratação de 14,4% (43) a qual é próxima à concentração crítica de 18% no qual condutividade protônica pode ser observada (5). O desvio do gráfico de B.E.T. para isotermas de adsorção em uma hidratação em torno de 12% tem também sido atribuído à condições idênticas à solução obtidas acima deste nível

crítico (6,44). De outra maneira, Chai e Vogelhut (1967) (9) acharam que o ângulo de rotação de Faraday de microondas em água adsorvida à Hb aumenta até 13% de hidratação, e então decresce acima deste valor. Isto foi interpretado em termos de dipolos de água rodando inteiramente livre até o valor de 13%, com o subseqüente decréscimo devido a perda de rotação com a formação de camadas tipo gelo, no entanto outra interpretação é possível. Esta considera a proteína como um semicondutor orgânico, o qual é do tipo N como resultado da injeção de elétrons pela água para dentro da proteína, até algum valor aproximando uma monocamada física completa, isto é quase 3 "monocamadas de B.E.T. de água", acima da qual conjuntos de condução protônica com comportamento tipo P prevalece e um decréscimo na rotação de Faraday tipo N é observada (5 45 e 46). Um resultado semelhante para rotação de Faraday de albumina de plasma bovino foi observado por Eley e Pething (1971) (47).

CAPÍTULO III

TEORIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

No resumo de RPE apresentado neste capítulo foram utilizados vários livros textos de ressonância magnética (33,48,49,50).

3.1- Introdução

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é o fenômeno de absorção de energia dos elétrons não emparelhados de um átomo, molécula ou íon quando estes se encontram sujeitos a um campo magnético $\vec{H}$. O momento magnético $\vec{\mu}$ de um elétron livre pode ser expresso em termos de seu spin como:

$$\vec{\mu} = - g \beta \vec{S} \qquad (1)$$

onde β é o magnéton de Bohr e g é o fator giromagnético para o elétron.

Na presença de um campo magnético $\vec{H}$ a interação deste elétron com o campo magnético será dada pela hamiltoniana:

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (2) \quad \text{ou} \quad = g \beta \vec{S} \cdot \vec{H} \qquad (3)$$

Esta hamiltoniana descreve o efeito Zeeman e a sua solução fornece as possíveis energias para o sistema.

Para o caso de um campo magnético Ho aplicado na direção z tem-se:

$$\mathcal{H} = g \beta Ho \cdot S_z \qquad (4)$$

e

$$E(M_s) = g \beta Ho \cdot M_s \qquad (5)$$

onde M_s são as possíveis projeções do spin ao longo do eixo de

quantização z. No caso de um elétron as projeções possíveis são $M_s = \pm 1/2$ e as energias de cada um dos estados serão:

$$E(+1/2) = +\frac{1}{2} g \beta Ho$$
$$E(-1/2) = -\frac{1}{2} g \beta Ho \qquad (6)$$

A transição entre os dois níveis se dará quando uma energia $\Delta E = g \beta Ho$ for fornecida ao sistema. Esta energia faz com que o momento magnético transicione de uma posição paralela ao campo magnético Ho para uma posição antiparalela a este. A energia ΔE normalmente é fornecida ao sistema através da exposição a um campo de microondas de freqüência fixa perpendicular ao campo Ho que é adiabaticamente variado, até que ocorra a transição. Quando ocorre a transição o sistema absorve energia do campo de microondas e esta absorção ou geralmente a sua derivada pode ser detectada por um sistema eletrônico apropriado que faz parte dos espectrômetros de RPE. A figura 8 ilustra estas informações (48).

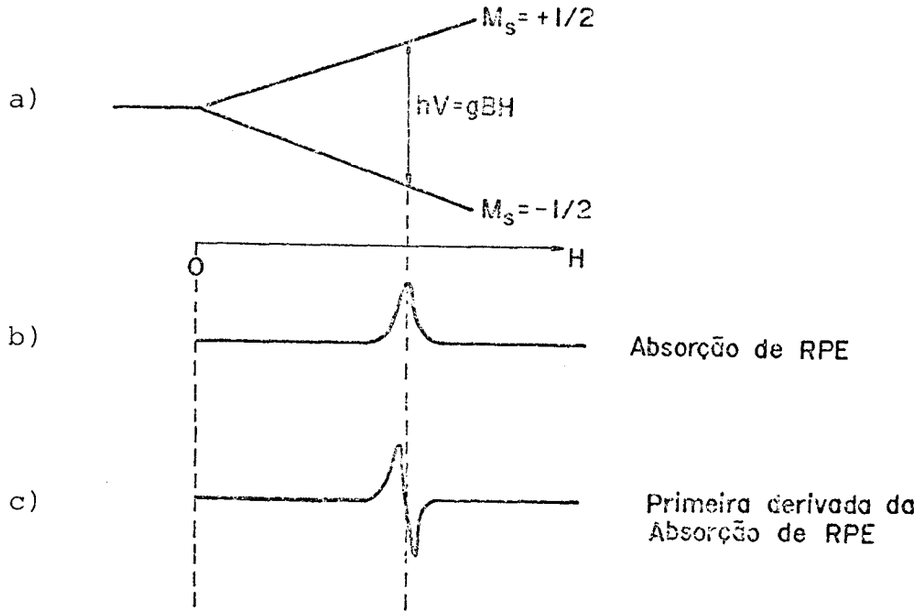


FIGURA 8-a) Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético;
b) A forma da linha de absorção de energia do campo de microondas;
c) Derivada da linha de absorção.

As considerações feitas, até agora, são válidas para o caso do elétron livre para o qual o fator g vale 2,0023, no entanto estuda-se casos mais complexos, onde o elétron não emparelhado não se encontra livre, mas sujeito a interações no átomo ou íon.

3.2- Interações

3.2.1- Interação Spin-Órbita

Este efeito surge da interação entre o momento magnético orbital $\vec{\mu}_L$ e o momento magnético de spin $\vec{\mu}_S$ do elétron e pode ser descrito pela hamiltoniana:

$$H = \lambda \vec{L} . \vec{S} \tag{7}$$

Quando a hamiltoniana spin-órbita atua no estado fundamental $3d^{n*}$ (com S e ℓ definidos) $\vec{\mu}_L$ e $\vec{\mu}_S$ são acoplados para formar um novo estado fundamental caracterizado pelo momento angular total $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$. Este nível será (2 J + 1) vêzes degenerado, e será desdobrado pela interação Zeeman dada pela expressão:

$$H = \beta(\vec{L} + g_e \vec{S}) . H \tag{8}$$

que difere da equação (3) por levar em conta o momento magnético orbital $\beta \vec{L}$.

Os valores de energia correspondentes a (8) serão:

$$E = g_L \beta H M_J \tag{9}$$

---

* escolheu-se este estado pois é característico dos íons de transição do grupo do ferro.

com $M_J = -J, -J + 1, \ldots, +J$

onde $g_L = \dfrac{3J(J + 1) + S(S + 1) - L(L + 1)}{2J(J + 1)}$ é o fator de Landé.

3.2.2- Efeito do Campo Cristalino - Interação Fina

Os elétrons em um átomo ou íon livre encontram-se sujeitos a um campo elétrico central, com interações descritas pela hamiltoniana:

$$H = \frac{-\hbar^2}{2m} \sum_k \nabla_k^2 + V \qquad (10)$$

onde V é o potencial elétrico que inclui a atração entre os elétrons e o núcleo e a repulsão entre elétrons.

Quando o íon está ligado, a presença dos ligantes na vizinhança próxima ao íon livre cria sobre os elétrons um potencial eletrostático adicional e $\underline{V}$ da equação (10) tem duas contribuições:

$$V = V_{íon} + V_L$$

onde $V_{íon}$ é o potencial esférico

V_L é o potencial dos ligantes

Para os casos em que o potencial dos ligantes (V_L) é maior que a interação spin-órbita (por exemplo para os íons dos metais de transição do grupo do ferro) o campo elétrico que atua sobre os elétrons perde a simetria esférica do íon livre; o nível fundamental a ser desdobrado por $\vec{H}$ não é mais caracterizado por $\vec{J}$ e o fator giromagnético medido não é o previsto pela equa-

ção (8)*.

Assim para $V_L >> \lambda \vec{L}\vec{S}$ o potencial será uma perturbação ao nível fundamental $3d^n$. Pelo método de campo cristalino os ligantes são substituídos por cargas pontuais negativas, e seu efeito computado em cada um dos orbitais que compõem $3d^n$. Para tanto suponha os ligantes dispostos nos vértices de um octaedro como mostra a figura (9-a) e o íon metálico no centro deste octaedro. Os orbitais t_{2g} (d_{xy}, d_{yz} e d_{xz}) e e_g ($d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2}) interagem com os ligantes como mostrado na figura (9-b). Devido à simetria dos orbitais, os elétrons nos orbitais e_g sofre maior repulsão, uma vez que as cargas apontam diretamente para seus vértices, e sua energia é incrementada.

O desdobramento de $3d^n$ é mostrado na figura (9-c) para a simetria octaédrica, e octaédrica com distorções tetragonal e rômbica. Nestes níveis os n elétrons do metal são distribuídos.

Para os casos em que o spin eletrônico resultante é maior que 1/2 a contribuição do potencial criado pelos ligantes é introduzida acrescentando um termo adicional na hamiltoniana das interações. Este termo, chamado interação fina, está relacionado aos desdobramentos dos níveis em campo magnético zero. É expresso por:

$$H_f = D(S_z^2 - 1/3\, S(S+1)) + E(S_x^2 - S_y^2) \qquad (11)$$

onde D e E são os parâmetros de desdobramento de campo zero associados ao campo eletrostático ao redor do íon.

---

* A presença do campo cristalino é responsável também pelo "quenching" do momento angular orbital que é de ocorrência comum entre íons do grupo de transição do ferro, e devido a isso os valores de g encontrados, para esses íons, são normalmente próximos de 2 já que a contribuição relevante vem somente do momento angular de spin.

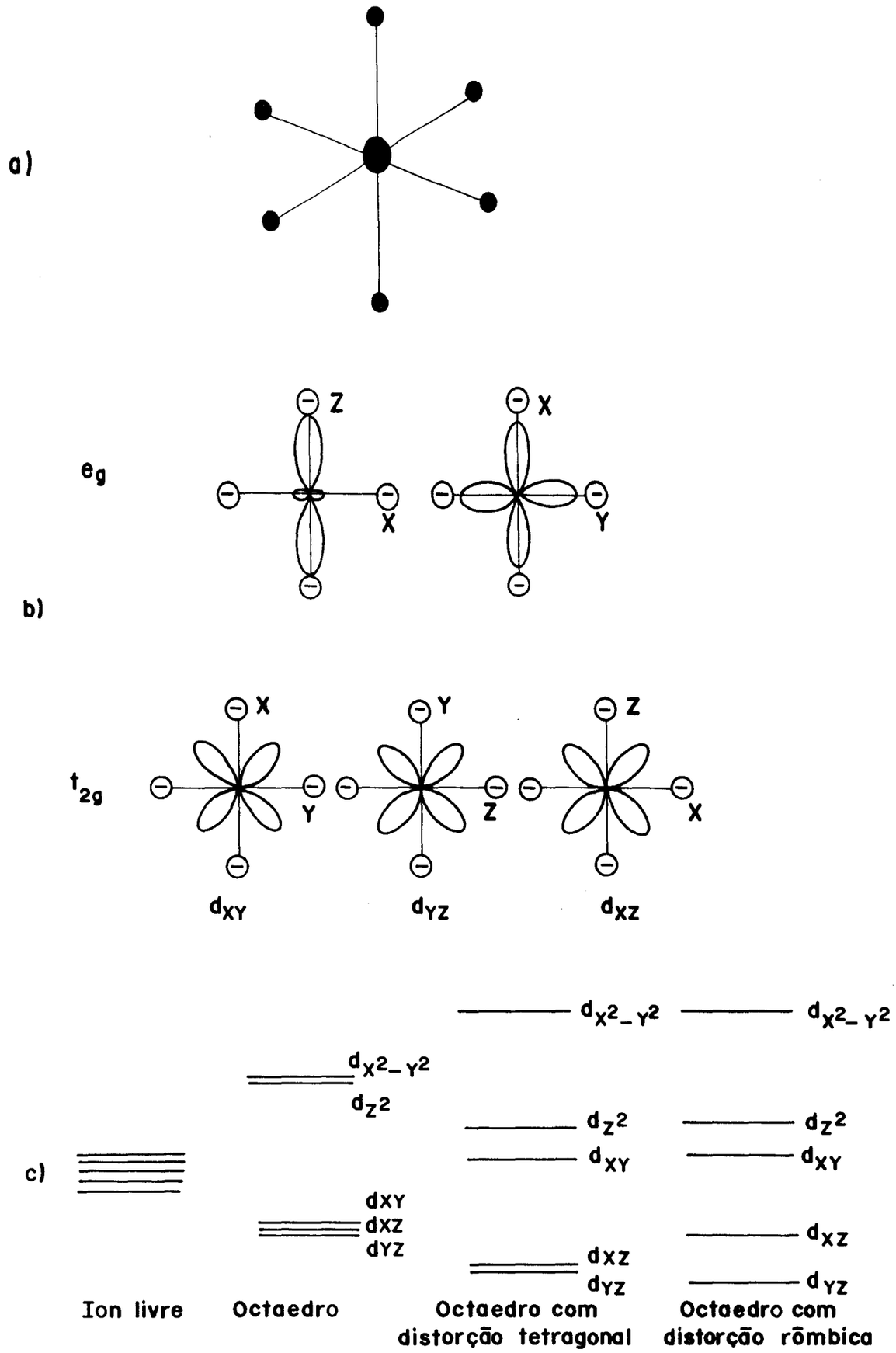


FIGURA 9 - (48)

a) Simetria octaédrica dos ligantes.

b) Dependência angular da parte real do orbital.

c) Desdobramento dos níveis de energia a várias geometrias.

3.2.3- Interação Hiperfina

Por interação hiperfina entende-se a interação do elétron paramagnético com o momento magnético de núcleos vizinhos. Existem essencialmente dois tipos distintos de interações hiperfinas:

A) Interação dipolar ou anisotrópica

É uma interação clássica de dois dipolos $\vec{\mu}_S$ e $\vec{\mu}_I$ separados por uma distância $\vec{r}$. É referida a estados quânticos não s. Esta interação depende do ângulo entre a linha que liga os dois dipolos e o campo magnético externo, podendo ser escrita, em geral, por um tensor de segunda ordem.

Devido a sua natureza direcional, desempenha um papel importante na determinação de orientações de espécies paramagnéticas em sólido e em experimentos com "spin-label". A hamiltoniana que representa esta interação é descrita pela equação (12).

$$\mathcal{H}_{hf} = \frac{\vec{\mu}_S \cdot \vec{\mu}_I}{r^3} - 3\,\frac{(\vec{\mu}_S \cdot \vec{r}) \cdot (\vec{\mu}_I \cdot \vec{r})}{r^5} \qquad (12)$$

onde $\vec{\mu}_S$ é o momento magnético devido ao spin eletrônico, $\vec{\mu}_I$ o momento magnético devido ao spin nuclear, e $\vec{r}$ é o vetor que une os dois dipolos.

B) Interação de contato ou de Fermi

É uma interação não clássica e surge da probabilidade finita de encontrar o elétron na posição do núcleo, isto é, é proporcional ao quadrado da função de onda eletrônica no núcleo. É uma interação isotrópica e referida a estados quânticos s.

É expressa por:

$$H = \left(\frac{8\pi}{3}\right) \vec{\mu}_S \cdot \vec{\mu}_I \, |\psi_{(o)}|^2 \qquad (13)$$

onde $\psi_{(o)}$ é a função de onda do elétron no núcleo.

3.2.4- Interação de Spins Eletrônicos

Quando os centros paramagnéticos de uma amostra estão muito próximos há um aumento na probabilidade de interações entre os spins eletrônicos. Isto pode ocorrer em soluções muito concentradas, e é justamente para evitar este tipo de interação que utiliza-se soluções diluídas em experimentos de RPE, e eventualmente em cristais quando as moléculas ficam muito próximas. No espectro de RPE esta interação reflete-se, normalmente, alargando a linha de absorção.

Existem dois tipos de interações de spins eletrônicos que são representados por dois novos termos na hamiltoniana das interações. A hamiltoniana de interação dipolar eletrônica (H_D) e a hamiltoniana de intercâmbio eletrônico (H_E).

A) Interação dipolar eletrônica

A interação entre dois dipolos magnéticos $\vec{\mu}_1$ e $\vec{\mu}_2$ pode ser escrita como:

$$H_D = \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - 3\frac{(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r}) \cdot (\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} \qquad (14)$$

onde $\vec{r}$ é o vetor que une os dois dipolos magnéticos.

B) Interação de intercâmbio eletrônico

Esta interação resulta do intercâmbio entre dois estados de spins devido a sobreposição das funções de onda dos elétrons desemparelhados.

Se a integral de intercâmbio J_{ij} for definida em termos das funções de onda ψ_A e ψ_B de dois elétrons A e B separados pela distância r_{ij} tem-se:

$$J_{ij} = \iint \psi_{A(r_i)} \psi_{B(r_j)} \left(\frac{e^2}{r_{ij}}\right) \psi_{A(r_j)} \psi_{B(r_i)} d\tau_i d\tau_j \qquad (15)$$

E a expressão para a hamiltoniana de intercâmbio é dada por:

$$H_E = -\Sigma J_{ij} \vec{S}_i \cdot \vec{S}_j \qquad (16)$$

3.2.5- Outras Interações

Existem outros tipos de interações que podem ocorrer num experimento de RPE tais como: interação Zeeman nuclear, interação quadrupolar elétrica, etc., mas que não serão descritas aqui porque suas contribuições não são relevantes nos sistemas estudados neste trabalho.

3.3- RPE do Íon Cu(II)

3.3.1- Características do Íon Cu(II)

Para os íons de transição do grupo do ferro, do qual o Cu(II) faz parte, a configuração de mínima energia é $(1s^2\ 2s^2\ 2p^6\ 3s^2\ 3p^6)3d^n$. A configuração entre colchetes, camada

fechada, é um estado diamagnético, de maneira que o paramagnetismo será determinado pelos n elétrons da subcamada $3d^n$. Para o íon de cobre(II) n é igual a 9.

A primeira fila dos metais de transição são caracterizados por sua habilidade em formar uma ampla variação de coordenação em complexos no qual a estereoquímica octaédrica, tetraédrica e quadrado-planar predominam (51). O íon cobre(II) é um íon de metal de transição típico com respeito a formação de coordenação de complexos, mas menos típico na tendência para apresentar uma estereoquímica regular octaédrica ou tetraédrica. A configuração eletrônica exterior $3d^9$ quebra a simetria cúbica e portanto produz formas distorcidas de estereoquímica básica. Os números de coordenações 4, 5 e 6 predominam, mas variações de cada estrutura ocorre através de distorções do comprimento ou ângulo da ligação.

A configuração d^9 é um sistema simples, teoricamente, podendo ser tratado de outro modo, como um buraco positivo na configuração completa d^{10}.

O modo como o buraco positivo comporta-se em diferentes estereoquímicas pode ser entendido qualitativamente usando teoria de campo cristalino para predizer a ordenação dos níveis orbitais de um elétron*. A magnitude de separação dos níveis eletrônicos nos complexos de cobre(II) tendem a ser maior que para outros metais de transição da primeira linha devido a larga distorção do comprimento da ligação presente, como no exemplo da figura 10. Assim as propriedades eletrônicas dos complexos de cobre(II) são relativamente sensíveis à estereoquímica.

---

* Cálculos de campos cristalinos não pode dar energias precisas ou ordenar detalhadamente os níveis orbitais, mas pode especificar quais dos orbitais tem a maior energia e que, conterá o elétron desemparelhado da configuração d^9.

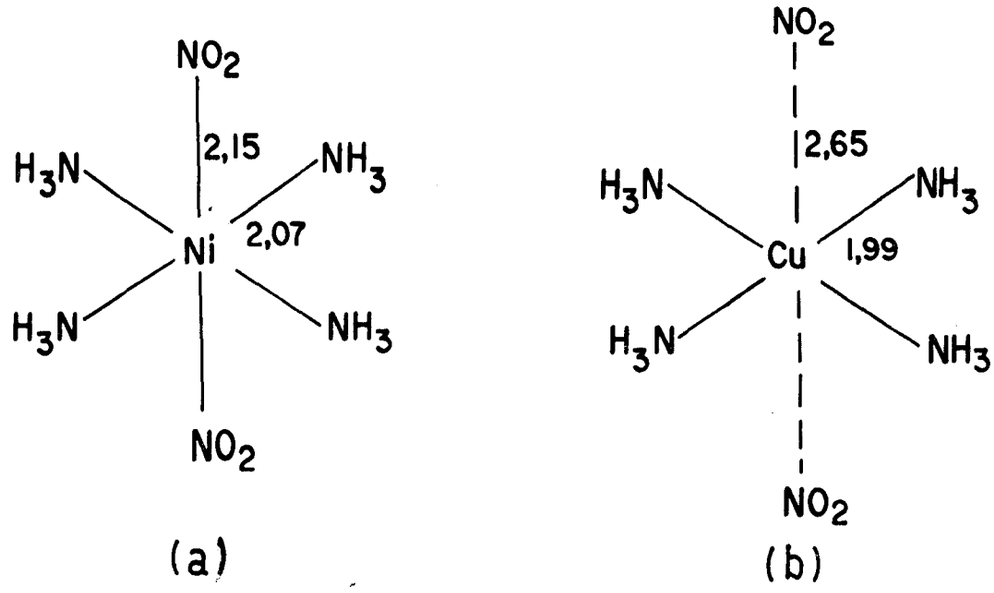


FIGURA 10 - Exemplos de estereoquímica de um complexo do íon Níquel(II) (a) e do íon cobre(II) (b) (51).

3.3.2- Espectro de RPE

3.3.2.1- Hamiltoniana de Spin

As interações existentes num experimento de RPE são várias, e algumas foram descritas na seção 2, mas a relevância das diferentes contribuições não são as mesmas.

A hamiltoniana de spin contém as partes da hamiltoniana total que são relevantes para a proposta de RPE, isto é, somente vetores de spin. Para complexos de cobre(II) é dada por:

$$H = \beta_e \vec{S}\,\bar{\bar{g}}\,\vec{H} + \vec{S}\,\bar{\bar{A}}\,\vec{I} \qquad (17)$$

O primeiro termo descreve a interação Zeeman eletrônica, e o segundo a interação entre o spin eletrônico e o spin nuclear, interação hiperfina, já que o cobre tem spin nuclear(I) igual a 3/2.

As expressões para as diferentes simetrias de campos

cristalinos que o íon pode estar sujeito são dadas por:

- Campo cristalino com simetria cúbica:

$$\mathcal{H} = g\,\beta_e\,\vec{S}\,.\,\vec{H} + A\,\vec{S}\,.\,\vec{I} \qquad (18)$$

- Campo cristalino com simetria axial (z):

$$\mathcal{H} = g_{/\!/}\,\beta_e\,H_z\,S_z + g_{\perp}\beta_e(H_x\,S_x + H_y\,S_y) + A_{/\!/}\,S_z\,I_z +$$

$$+ A_{\perp}(S_x\,I_x + S_y\,I_y) \qquad (19)$$

onde $g_x = g_y = g_{\perp}$ e $g_z = g_{/\!/}$

- Campo cristalino tendo simetria rômbica:

$$\mathcal{H} = \beta_e\,(g_x\,H_x\,S_x + g_y\,H_y\,S_y + g_z\,H_z\,S_z) + A_x\,S_x\,H_x +$$

$$+ A_y\,S_y\,H_y + A_z\,S_z\,H_z \qquad (20)$$

Resolvendo para a simetria cúbica (isotrópica) e supondo o campo magnético Ho aplicado na direção z tem-se:

$$\mathcal{H} = g\,\beta\,Ho\,S_z + Ao\,\vec{S}\,.\,\vec{I} = g\,\beta\,Ho\,S_z + Ao\,(S_x\,I_x + S_y\,I_y + S_z\,I_z) \qquad (21)$$

Considerando só o termo diagonal ($g\,\beta\,Ho \gg Ao$ em geral):

$$\mathcal{H} = g\,\beta\,Ho\,S_z + Ao\,S_z\,I_z \qquad (22)$$

A expressão para a energia será:

$$E = g\,\beta\,Ho\,M_S + Ao\,M_I\,M_S \tag{23}$$

onde $M_S = \pm\frac{1}{2}$ e $M_I = \pm\frac{3}{2}, \pm\frac{1}{2}$

Assim:

$$E(+1/2) = \frac{1}{2}\,g\,\beta\,Ho + \frac{1}{2}\,Ao\,M_I \tag{24}$$

$$E(-1/2) = -\frac{1}{2}\,g\,\beta\,Ho - \frac{1}{2}\,Ao\,M_I \tag{25}$$

$$E(+1/2) - E(-1/2) = \Delta E = h\nu = g\,\beta\,Ho + Ao\,M_I \tag{26}$$

A equação (26) dá a condição de ressonância no experimento de RPE. Pode ser reescrita da seguinte forma:

$$Ho = \frac{h\nu}{g\beta} - \frac{Ao}{g\beta}\,M_I \tag{27}$$

Para as diferentes projeções de M_I tem-se as seguintes situações:

$H_1 = \frac{h\nu}{g\beta} - \frac{3}{2}\frac{Ao}{g\beta}$ p/ $M_I = \frac{3}{2}$

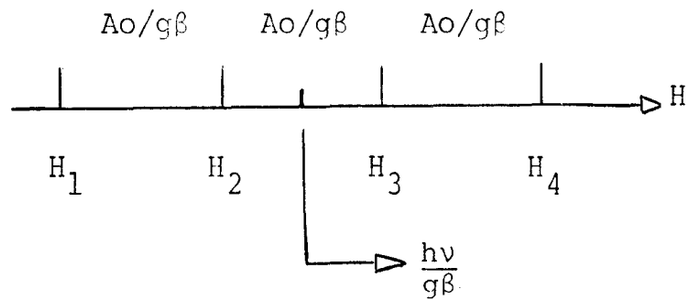
$H_2 = \frac{h\nu}{g\beta} - \frac{1}{2}\frac{Ao}{g\beta}$ p/ $M_I = \frac{1}{2}$

$H_3 = \frac{h\nu}{g\beta} + \frac{1}{2}\frac{Ao}{g\beta}$ p/ $M_I = -\frac{1}{2}$

$$H_4 = \frac{h\nu}{g\beta} + \frac{3}{2}\frac{Ao}{g\beta} \qquad p/\ M_I = -\frac{3}{2}$$

O espectro, portanto, consistirá de quatro linhas de absorção separadas pelo valor $\frac{Ao}{g\beta}$ em Gauss.

Esquematizando tem-se:



3.3.2.2- Espectro de Solução

Se o complexo de cobre(II) está diluído em um solvente líquido os espectros à temperatura ambiente são promediados em suas dependências angulares devido ao movimento de rotação dos complexos observando-se, de um modo geral, as 4 linhas correspondentes à interação hiperfina do spin eletrônico com o spin nuclear do próprio núcleo do íon cobre(II).

A hamiltoniana que descreve o comportamento do espectro da amostra em solução é dada por:

$$\mathcal{H} = g_o\, \beta H\, S_\zeta + A_o\, S_\zeta\, I_\zeta \qquad (28)$$

onde $g_o = \frac{1}{3}(g_x + g_y + g_z)$ e $A_o = \frac{1}{3}(A_x + A_y + A_z)$

e S_ζ e I_ζ são as projeções de S e I, respectivamente, na direção do campo magnético aplicado.

Os níveis de energia serão:

$$E_+(+1/2, M_I) = \frac{1}{2} g_o \beta H + \frac{1}{2} A_o M_I \quad (29)$$

$$E_-(-1/2, M_I) = -\frac{1}{2} g_o \beta H - \frac{1}{2} A_o M_I \quad (30)$$

De acordo com as regras de seleção para as transições de RPE ($\Delta M_S = \pm 1$ e $\Delta M_I = 0$) tem-se as 4 transições comumente observadas, como mostra a figura 11.

FIGURA 11 - Espectro típico de complexo de cobre de peso molecular baixo em solução à temperatura ambiente.

Como pode ser observado do espectro mostrado nem sempre, ou dificilmente, as linhas de absorção são idênticas e isto se deve a diversos efeitos que podem alterar diferentemente as linhas de RPE. Basicamente esses efeitos são três: mecanismos de relaxação, interação dipolar e efeito de "movimento".

A) Mecanismos de relaxação

Os elétrons nos níveis de energia excitados relaxam para o fundamental por dois caminhos; um entregando energia para a "rede" com um tempo característico T_1; e o outro trocando energia no sistema de spin com um tempo característico T_2. T_1 e T_2 estão

relacionados ao tempo que o elétron permanece no estado excitado e pelo Princípio da Incerteza de Heisenberg, em uma primeira aproximação, tem-se:

$$\Delta E \,.\, \Delta t \approx h$$

$$h \,.\, \Delta\nu \,.\, \tau \approx h$$

$$\text{ou} \quad \Delta\nu = \frac{1}{\tau} \tag{31}$$

e dessa maneira quanto menor τ (T_1 e ou T_2) mais larga será a linha de absorção.

B) Interação dipolar

Um spin circundado de dipolos magnéticos "sente" um campo criado por cada um deles. A interação depende da distância e da orientação relativa entre eles. O campo magnético que atua sobre o spin se caracteriza por uma distribuição espectral em torno de um dado valor. Esta distribuição se soma à linha de ressonância alargando-a. A origem mais comum destes dipolos são átomos de hidrogênio e nitrogênio vizinhos ao spin e complexos paramagnéticos próximos, e assim podem ocasionar a dependência da largura de linha dos espectros com a concentração das soluções (não muito diluídas).

C) Efeito de "movimento"

Este efeito é típico de complexos em solução. Supondo-se um complexo com simetria axial de spin eletrônico $\vec{S}$ interagindo com um spin nuclear $\vec{I}$. Esta interação é descrita pela hamiltoniana:

$$\mathcal{H} = \beta \vec{H} \bar{\bar{g}} \vec{S} + \vec{S} \bar{\bar{A}} \vec{I} \tag{32}$$

onde

$$\bar{\bar{g}} = \begin{bmatrix} g_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & g_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & g_{//} \end{bmatrix} \quad e \quad \bar{\bar{A}} = \begin{bmatrix} A_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & A_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & A_{//} \end{bmatrix} \tag{33}$$

Em um dado instante a orientação do campo magnético com os eixos principais dos tensores $\bar{\bar{g}}$ e $\bar{\bar{A}}$ (supostos coincidentes) é dada pelo vetor:

$$\vec{H} = \begin{bmatrix} \text{sen}\,\theta \;\cos\phi \\ \text{sen}\,\theta \;\text{sen}\,\phi \\ \cos\theta \end{bmatrix} . \; H \tag{34}$$

Nessa situação os spins $\vec{S}$ e $\vec{I}$ estarão quantizados ao longo do campo magnético H, sendo

$$\vec{S} = S_{\zeta} \; \hat{H} = S_{\zeta} \; \frac{\vec{H}}{H} \tag{35}$$

$$\vec{I} = I_{\zeta} \; \hat{H} = I_{\zeta} \; \frac{\vec{H}}{H} \tag{36}$$

Substituindo-se as equações (35 e 36) na hamiltoniana (32) tem-se:

$$\mathcal{H} = \beta \; \frac{\vec{H} \bar{\bar{g}} \vec{H}}{H} \; S_{\zeta} + \frac{\vec{H} \bar{\bar{A}} \vec{H}}{H^2} \; S_{\zeta} \; I_{\zeta} \tag{37}$$

Será calculado somente $\frac{\vec{H} \bar{\bar{g}} \vec{H}}{H}$ uma vez que o resultado de

$\frac{\vec{H}\,\bar{\bar{A}}\,\vec{H}}{H^2}$ é semelhante.

$$\frac{\vec{H}\,\bar{\bar{g}}\,\vec{H}}{H^2} = (\text{sen}\,\theta\,\cos\phi,\ \text{sen}\,\theta\,\text{sen}\,\phi,\ \cos\theta)\begin{bmatrix} g_\perp & 0 & 0 \\ 0 & g_\perp & 0 \\ 0 & 0 & g_{/\!/} \end{bmatrix}\begin{bmatrix} \text{sen}\,\theta\,\cos\phi \\ \text{sen}\,\theta\,\text{sen}\,\phi \\ \cos\theta \end{bmatrix}$$

$$\frac{\vec{H}\,\bar{\bar{g}}\,\vec{H}}{H^2} = g_\perp\,\text{sen}^2\theta\,\cos^2\phi + g_\perp\,\text{sen}^2\theta\,\text{sen}^2\phi + g_{/\!/}\cos^2\theta$$

$$\frac{\vec{H}\,\bar{\bar{g}}\,\vec{H}}{H^2} = g_\perp\,\text{sen}^2\theta + g_{/\!/}\cos^2\theta \qquad (38)$$

Fazendo as substituições:

$$\cos^2\theta = 1/3\ (3\cos^2\theta - 1) + 1/3$$

$$\text{sen}^2\theta = -1/3\ (3\cos^2\theta - 1) + 2/3$$

A equação (38) torna-se:

$$\frac{\vec{H}\,\bar{\bar{g}}\,\vec{H}}{H^2} = \frac{(2\,g_\perp + g_{/\!/})}{3} + 1/3\ (g_{/\!/} - g_\perp)(3\cos^2\theta - 1) \qquad (39)$$

e o valor de $\frac{\vec{H}\,\bar{\bar{A}}\,\vec{H}}{H^2}$ é:

$$\frac{\vec{H}\,\bar{\bar{A}}\,\vec{H}}{H^2} = \frac{(2\,A_\perp + A_{/\!/})}{3} + 1/3\ (A_{/\!/} - A_\perp)(3\cos^2\theta - 1) \qquad (40)$$

e a hamiltoniana (37) torna-se:

$$\mathcal{H} = g_a \beta H S_\zeta + a S_\zeta I_\zeta + g_b \beta H S_\zeta (3\cos^2\theta - 1) +$$

$$+ b S_\zeta I_\zeta (3\cos^2\theta - 1) \qquad (41)$$

onde

$$g_a = \frac{1}{3} g_{/\!/} + \frac{2}{3} g_{\perp} \qquad g_b = \frac{1}{3} (g_{/\!/} - g_{\perp})$$

$$a = \frac{1}{3} A_{/\!/} + \frac{2}{3} A_{\perp} \qquad b = \frac{1}{3} (A_{/\!/} - A_{\perp})$$

A expressão resultante para a energia vai conter termos independente da orientação e termos dependente da orientação os quais variam com o ângulo $(3\cos^2\theta - 1)$, ou seja:

$$E = g_a \beta H M_s + a M_s M_I + (g_b \beta H M_s + b M_s M_I) \cdot (3\cos^2\theta - 1) \qquad (42)$$

No líquido o complexo paramagnético descreve um movimento browniano com um tempo característico de movimentação τ_c. Portanto os termos dependente da orientação são dependentes do tempo. Se o complexo gira rapidamente esses termos são mediados a zero e a equação para a energia torna-se:

$$E = g_a \beta H M_s + a M_s M_I \qquad (43)$$

e será ela que definirá os níveis de energia onde as transições de RPE irão ocorrer.

O efeito dos termos dependente da orientação sobre o espectro de RPE do complexo paramagnético em solução é o de alargar diferenciadamente as linhas de ressonância correspondentes às diferentes projeções de M_I. Este alargamento é fortemente dependente do tempo de reorientação τ_c, que caracteriza o quão rápido

os termos são mediados a zero.

3.3.2.3- Variação Angular em um Cristal Simples

No sistema de eixos principais (x, y, z) do tensor, $\bar{\bar{g}}$ é diagonal.

O sistema de laboratório (a, b, c) é geralmente definido por uma base cúbica onde o cristal é assentado. Muitas vezes estes eixos não coincidem com os eixos principais do tensor, e o tensor do cristal com relação a esta base é obtido com uma transformação unitária no sistema principal, isto é:

$$\bar{\bar{g}} = R \cdot \begin{bmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{bmatrix} \cdot \tilde{R} = \begin{bmatrix} g_{aa} & g_{ab} & g_{ac} \\ g_{ba} & g_{bb} & g_{bc} \\ g_{ca} & g_{cb} & g_{cc} \end{bmatrix} \qquad (44)$$

Onde R é a matriz dos cossenos diretores entre o sistema abc e o sistema dos eixos principais xyz.

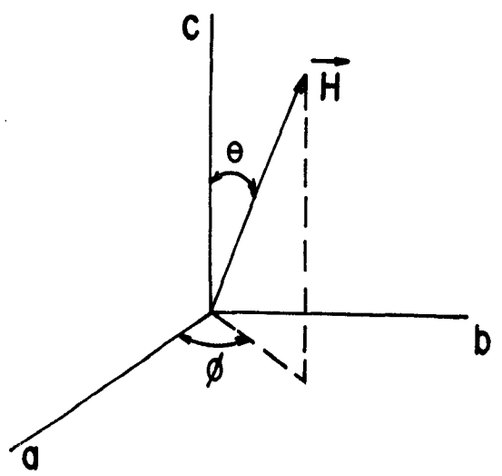
$$R = \begin{bmatrix} \cos\theta_{ax} & \cos\theta_{ay} & \cos\theta_{az} \\ \cos\theta_{bx} & \cos\theta_{by} & \cos\theta_{bz} \\ \cos\theta_{cx} & \cos\theta_{cy} & \cos\theta_{cz} \end{bmatrix} \qquad (45)$$

$\tilde{R}$ é a matriz R transposta, e tem-se $g_{ij} = g_{ji}$ (matriz simétrica).

A determinação experimental de $\bar{\bar{g}}$ se faz rodando o campo magnético em torno das direções x, y, z do laboratório.

As componentes de $\vec{H}$, em relação ao sistema de eixos do laboratório, aplicado na direção mostrada no esquema abaixo, em coordenadas esféricas são:

$$H = (\cos\phi \operatorname{sen}\theta,\ \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\theta,\ \cos\theta)\ H$$



A hamiltoniana de Zeeman é dada por:

$$\mathcal{H} = \beta\ \vec{H}\ \bar{\bar{g}}\ \vec{S}$$

Indicando a direção do vetor $\vec{H}\,.\,\bar{\bar{g}}$ pelo versor $\vec{N}$ e o módulo por $H\,g_N$ pode-se escrever:

$$\vec{H}.\bar{\bar{g}} = Hg_N\ \vec{N}$$

Dessa forma tem-se:

$$(g_N)^2 = (\cos\phi \operatorname{sen}\theta \quad \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\theta \quad \cos\theta) \begin{bmatrix} g^2_{aa} & g^2_{ab} & g^2_{ac} \\ g^2_{ab} & g^2_{bb} & g^2_{bc} \\ g^2_{ac} & g^2_{bc} & g^2_{cc} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\phi \operatorname{sen}\theta \\ \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\theta \\ \cos\theta \end{bmatrix}$$

$$(g_N)^2 = (\cos\phi \operatorname{sen}\theta \ \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\theta \ \cos\theta) \begin{bmatrix} g^2_{aa}\cos\phi \operatorname{sen}\theta + g^2_{ab}\operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\theta + g^2_{ac}\cos\theta \\ g^2_{ab}\cos\phi \operatorname{sen}\theta + g^2_{bb}\operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\theta + g^2_{bc}\cos\theta \\ g^2_{ac}\cos\phi \operatorname{sen}\theta + g^2_{bc}\operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\theta + g^2_{cc}\cos\theta \end{bmatrix}$$

$$(g_N)^2 = \cos\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta\, (g^2_{aa} \cos\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta + g^2_{ab} \,\mathrm{sen}\,\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta + g^2_{ac} \cos\theta) +$$

$$+ \,\mathrm{sen}\,\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta\, (g^2_{ab} \cos\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta + g^2_{bb} \,\mathrm{sen}\,\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta + g^2_{bc} \cos\theta) +$$

$$+ \cos\theta\, (g^2_{ac} \cos\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta + g^2_{bc} \,\mathrm{sen}\,\emptyset \,\mathrm{sen}\,\theta + g^2_{cc} \cos\theta) \qquad (47)$$

1) Fazendo $\theta = \pi/2$ e variando $\emptyset$ obtém-se a expressão que dá a variação do fator g no plano ab

$$g^2(\emptyset) = g^2_{aa} \cos^2\emptyset + g^2_{bb} \,\mathrm{sen}^2\emptyset + 2g^2_{ab} \,\mathrm{sen}\,\emptyset \cos\emptyset \qquad (48)$$

2) Fazendo $\emptyset = 0$ e variando $\underline{\theta}$ obtém-se a expressão no plano ac

$$g^2(\theta) = g^2_{aa} \,\mathrm{sen}^2\theta + g^2_{cc} \cos^2\theta + 2g^2_{ac} \,\mathrm{sen}\,\theta \cos\theta \qquad (49)$$

3) Fazendo $\emptyset = \pi/2$ e variando $\underline{\theta}$ obtém-se a expressão no plano bc

$$g^2(\theta) = g^2_{bb} \,\mathrm{sen}^2\theta + g^2_{cc} \cos^2\theta + 2g^2_{bc} \,\mathrm{sen}\,\theta \cos\theta \qquad (50)$$

Os valores dos elementos diagonais do tensor g^2_{aa}, g^2_{bb} e g^2_{cc} são o quadrado das medidas diretas do fator g nas direções "a", "b" e "c" respectivamente. Para determinar os elementos não diagonais g^2_{ab}, g^2_{bc} e g^2_{ac} é necessário obter as medidas de "g" com variação angular nos planos e determinar o melhor ajuste do valor desses elementos nas equações 48, 49 e 50.

A figura 12 mostra a representação geométrica do fator g no plano ab ilustrando a função do elemento não diagonal.

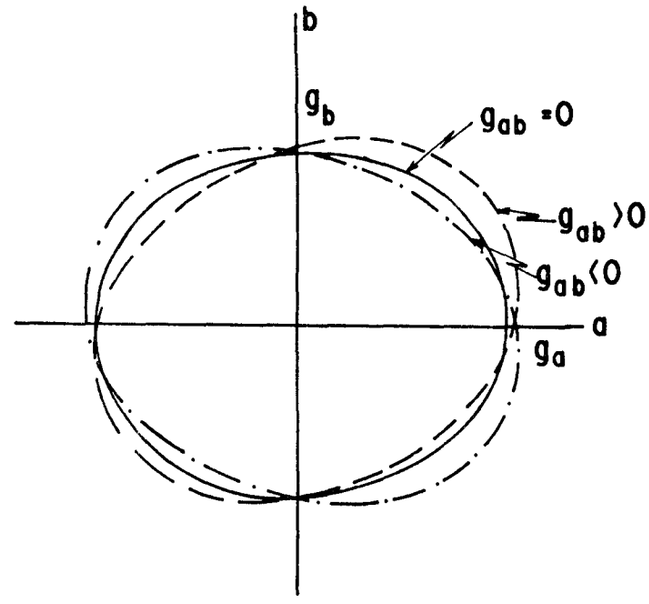


FIGURA 12 - Representação geométrica do fator g no plano "ab" (49).

Para definir o sinal dos elementos não diagonais considerou-se o seguinte sentido dos ângulos positivos nos planos: a → b → c → a.

O processo usual de determinação do tensor $\bar{\bar{g}}$ é compor o tensor $\bar{\bar{g}}^2_{abc}$ (no sistema de laboratório) a partir das medidas experimentais. E diagonalizando o tensor $\bar{\bar{g}}^2_{abc}$, se obtém: o quadrado dos auto-valores na diagonal do tensor $\bar{\bar{g}}_D$ e os auto-vetores são os vetores colunas da matriz de transformação R.

As interações hiperfinas muitas vezes não são "resolvidas". Este fato se deve comumente à interações entre os centros paramagnéticos, que nos monocristais geralmente estão muito próximos (separação menor que 10 Å).

3.3.2.4- Espectro de Policristais

Em uma solução congelada (ou em uma amostra policristalina à temperatura ambiente ou não) a distribuição do complexo paramagnético é aleatória, todas as orientações dos tensores $\bar{\bar{g}}$ e $\bar{\bar{A}}$

com relação ao campo magnético externo são possíveis, e têm o mesmo peso estatístico. Para cada orientação a posição de ressonância é dada pelo fator g e desdobramento A compatíveis com a orientação, e o espectro de pó é a soma de todos os espectros observados.

Na figura 13 é mostrado um espectro típico do íon Cu(II) em uma solução congelada. O método de medir os parâmetros é indicado na figura e tem-se que a distância entre os picos de absorção em campo baixo correspondem à constante de desdobramento hiperfino ($A_{//}$) com o campo magnético paralelo ao eixo de simetria do complexo. O valor de $g_{//}$ é encontrado medindo-se o centro de gravidade destas linhas. A medida de $g_{\perp}$ também é mostrado e $A_{\perp}$ corresponde a distância entre os picos de absorção em campo alto, mas raramente é "resolvido" experimentalmente para os complexos de cobre.

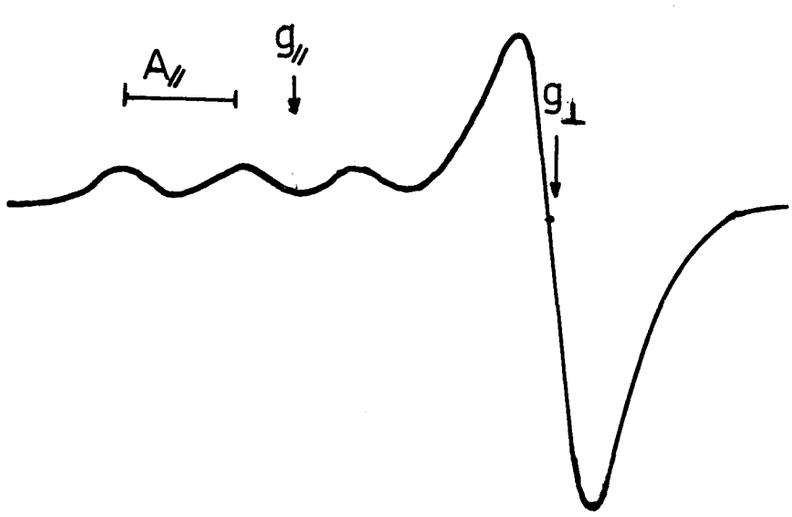


FIGURA 13 - Espectro típico de RPE de complexo de cobre(II) em uma solução congelada (33).

3.4- RPE em Hemoproteínas

O espectro típico do íon Fe(III) em hemoproteínas quando examinada em baixa temperatura exibe duas linhas, uma muito intensa em campo baixo ($g_{\perp} = 6$) e outra de pequena intensidade em campo alto ($g_{//} = 2$), característico de uma simetria axial e de campo cristalino fraco. Mudanças nesse espectro podem ser utilizadas para descrever variações de simetria e de intensidade de campo cristalino na região onde o íon de ferro está inserido na proteína.

3.4.1- Hamiltoniana de Spin e Níveis de Energia

A hamiltoniana de spin para hemoproteínas difere da do cobre em dois aspectos distintos: não apresenta o termo de interação hiperfina já que o isótopo mais abundante do íon Fe(III) não possui momento magnético nuclear, e por outro lado apresenta termos de 2ª ordem de operadores de spin que surgem devido a contribuições relevantes do campo cristalino criado pelos ligantes sobre o íon que caracterizam a chamada interação fina. A hamiltoniana de spin neste caso é:

$$\mathcal{H} = \beta(g_x S_x H_x + g_y S_y H_y + g_z S_z H_z) + D(S_z^2 - 1/3\, S(S+1)) + E(S_x^2 - S_y^2) \qquad (51)$$

onde D e E são parâmetros de desdobramento de campo magnético zero associados ao campo eletrostático ao redor do íon. D e E são associados a desdobramentos axial e rômbico respectivamente.

A hamiltoniana de spin (51) pode ser escrita, de outra maneira, em termos de um fator g efetivo (g_{ef}), onde está contido as contribuições de D e E também, com a seguinte forma:

$$\mathcal{H} = g_{ef}\, \beta\, \vec{S} \cdot \vec{H} \qquad (52)$$

O íon Fe(III) livre apresenta como termo fundamental $^6S_{5/2}$ e quando submetido a um campo magnético desdobra os seus três dubletos de Kramers (± 5/2; ± 3/2 e ± 1/2) como apresentado na figura 14-a.

No heme quando o íon Fe(III) está sujeito a um campo cristalino axial fraco, criado pelos ligantes, os três dubletos de Kramers desdobram-se em três níveis com diferentes energias em campo magnético zero. As figuras 14-b e 14-c mostram os casos de aplicação de um campo magnético paralelo e perpendicular, respectivamente, ao eixo Z do sistema. Os diferentes desdobramentos para os dois casos podem ser entendidos considerando que o eixo de quantização (Z) para o sistema não depende do campo magnético externo mas sim do campo cristalino criado pelos ligantes, ou seja $D >> g \beta H$.

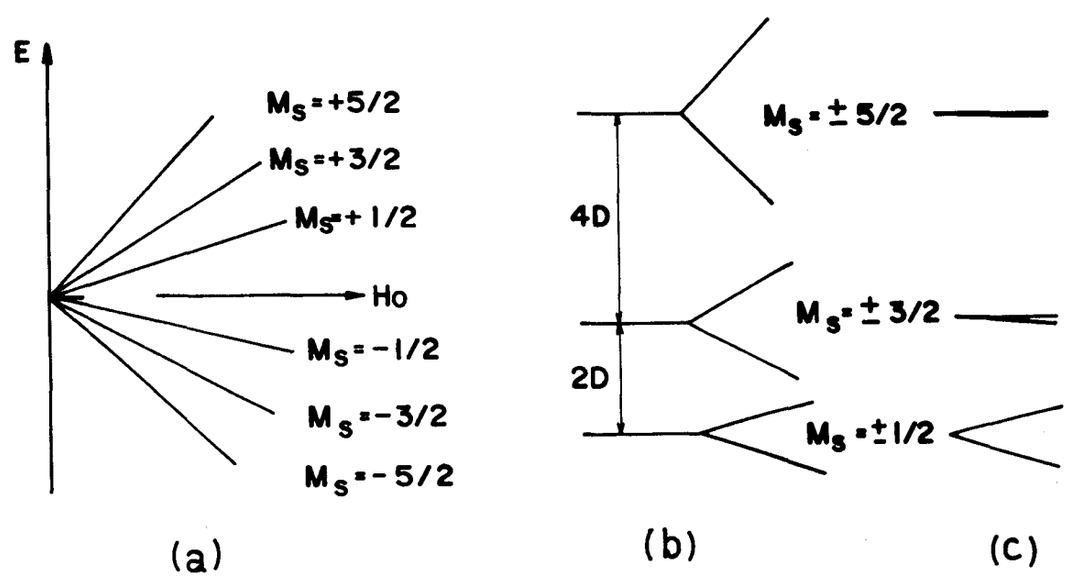


FIGURA 14 - Níveis de energia de um íon com S = 5/2 (32)

a) Íon livre em um campo magnético externo

b) Íon em um campo cristalino axial com Ho // Z

c) Íon em um campo cristalino axial com Ho ⊥ Z

O espectro de RPE para o íon Fe(III) no heme, sujeito a um campo cristalino axial fraco (S = 5/2), é mostrado na figura (15), onde observa-se duas absorções, uma em campo baixo, $g_{\perp}$, e outra em campo alto, $g_{//}$.

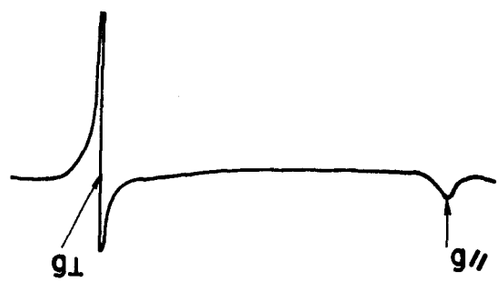


FIGURA 15 - Espectro de RPE do íon Fe(III) em campo cristalino axial fraco(32).

O espectro é interpretado considerando que a transição está ocorrendo entre o dubleto de Kramers de menor energia ($M_s = \pm 1/2$), e como mostra-se na figura (16) o ângulo formado entre as direções de $M_s = \pm 1/2$ e o eixo Z é o mesmo para $H \perp Z$ e $H // Z$ mas a projeção de S na direção perpendicular a Z é muito maior que ao longo de Z e isto leva a uma energia de Zeeman maior para a direção perpendicular que é formalmente explicitada através do valor de $g_{\perp}$ maior que para $g_{//}$.

Nas considerações feitas, até agora, E da equação (51) foi desprezado. Esse termo origina-se devido a uma distorção rômbica do campo cristalino que circunda o íon e leva a uma quebra de simetria no plano do heme fazendo com que as direções x e y não sejam mais magneticamente equivalentes.

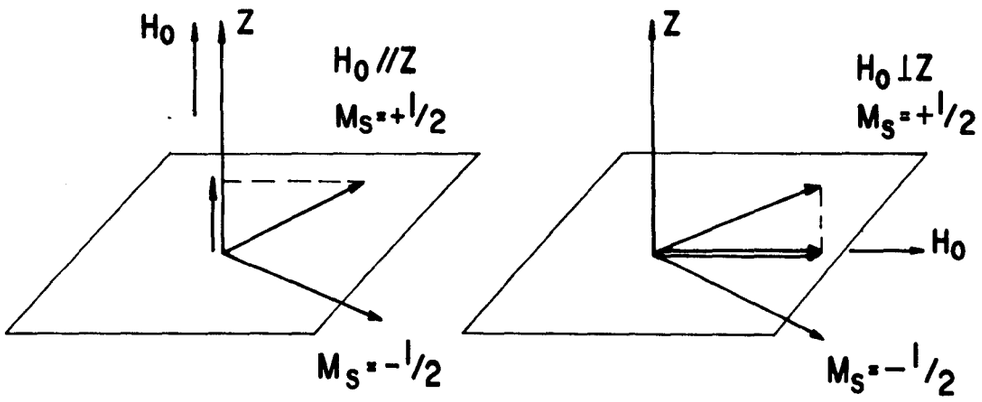


FIGURA 16 - Representação Vetorial da orientação do eixo de quantização do heme.(32).

Convenientemente, define-se o parâmetro $\lambda = \frac{E}{D}$ e a variação dos valores fisicamente distintos é restrito a $\lambda \leq \frac{1}{3}$ e somente valores positivos necessitam ser considerados. Na figura (17) é mostrado a variação do fator g efetivo em função do parâmetro λ para os três dubletos de Kramers, proposto por Wickman e colaboradores (52).

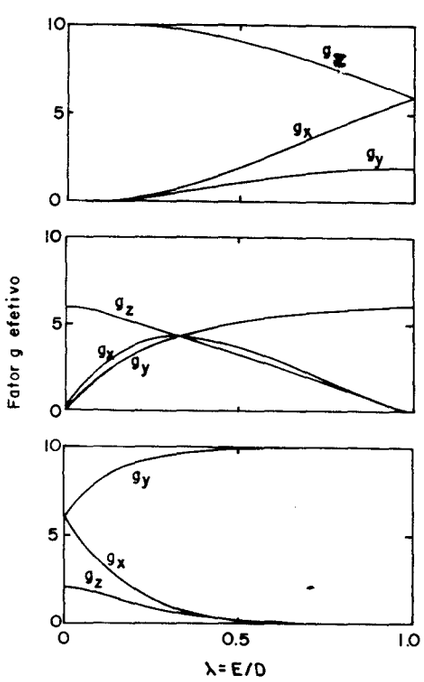


FIGURA 17 - Valores de g efetivo em função de $\lambda = E/D$ para a aplicação da hamiltoniana (51) em J= 5/2, g_J= 2,00, segundo Wickman e colaboradores (52).

Observa-se na figura 17 que:

a) para E = 0, λ = 0, a simetria é axial e para o mais baixo dubleto tem-se as transições em $g_{ef} = 2 (g_z = g_{//})$ e $g_{ef} = 6 (g_x$ e $g_y = g_{\perp})$, como mostrado na figura 15; b) para E grande ou seja, λ = 1/3 (0,333) têm-se para o dubleto do meio uma única transição em g_{ef} = 4,3 (g_x, g_y e g_z), (valores maiores de λ há somente inversão no valor de D; c) para valores intermediários de λ (0 - 1/3) uma série de transições pode ser observada.

Uma situação adicional ocorre para o íon Fe(III) quando ele encontra-se sujeito a um campo cristalino intenso e nessa situação o estado de spin(S) é 1/2. Nestes compostos, portanto, não há a separação de campo zero e a hamiltoniana de spin é dada por:

$$H = \beta \vec{S} \bar{\bar{g}} \vec{H} \qquad (53)$$

Para este caso (S = 1/2) o valor médio de g é próximo de 2.

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Complexos Cu(II) - Aliina

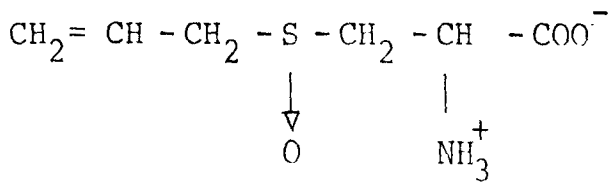
4.1.1- Preparação das Amostras

4.1.1.1- Obtenção do Aminoácido Aliina

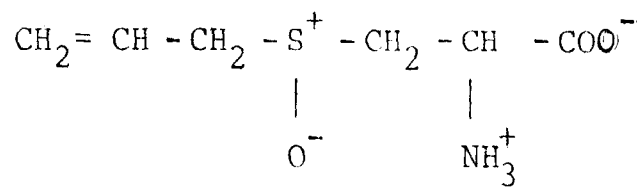
O aminoácido aliina utilizado para a complexação com o íon Cu(II), foi obtido a partir de bulbos de alho seguindo um método descrito por Stoll e Seebeck (53) e levemente modificado por Silva, G.P. (3).

A aliina é um produto natural e quando pura torna-se extremamente interessante, devido às seguintes propriedades: (1) é derivado da cisteína, um aminoácido de importância vital; (2) o átomo de enxofre está presente na aliina na forma quimicamente ativa; (3) a aliina é um sulfóxido e, portanto, um agente oxidante; (4) a decomposição enzimática da aliina resulta na formação de dois produtos interessantes: o ácido pirúvico, que é um composto do metabolismo animal e a alicina, um agente bactericida (53).

A fórmula empírica deduzida para a aliina é $C_6H_{11}O_3N.S.\ 1/2\,H_2O$ onde o meio mol de água de cristalização somente é perdido em alta temperatura onde sua decomposição ocorre simultaneamente. Contudo análises de derivados anidros invariavelmente levam a composição $C_6H_{11}O_3NS$ para a aliina e portanto tem peso molecular de 177 dáltons (peso anidro). A fórmula estrutural proposta é:



ou



O processo de extração da aliina consiste de várias etapas:

a) Separa-se os "dentes" do alho;

b) Congela-se os "dentes" com nitrogênio líquido;

c) Tritura-se o alho congelado com metanol anidro, até formar uma pasta homogênea;

d) Filtra-se a mistura eliminando-se o sólido;

e) Concentra-se a mistura em evaporador rotatório até obter um xarope amarelo escuro, à temperatura de 45 ^{o}C, sob vácuo;

f) Mistura-se o xarope obtido com éter etílico anidro para obter um xarope amarelo mais refinado, eliminando-se impurezas remanescentes. Repete-se o processo até que na última operação o éter colocado permaneça límpido;

g) Com o xarope refinado efetua-se uma extração fracionada com etanol anidro, eliminando principalmente carboidratos, pois sabe-se que extratos aquosos de materiais biológicos contêm além de aminoácidos livres, proteínas, peptídios, carboidra

tos, lipídios e polissacarídeos. Até esta etapa o conteúdo proteico e polissacarídico foram eliminados pela precipitação com metanol;

h) Para a remoção de lipídios trata-se o precipitado com clorofórmio, pois desta maneira a camada aquosa torna-se rica em aminoácidos;

i) Separando o sobrenadante adiciona-se metanol provocando a recristalização formando um precipitado sob a forma de um pó branco;

j) Toma-se o precipitado e adiciona-se acetona para a recristalização final.

Observações:

1) Todo o material químico utilizado deve ser anidro. A água existente no alho é suficiente para a extração. Se o processo não for bem executado na etapa do clorofórmio e acetona, tem-se a formação no fundo de um óleo amarelo, a alicina produto da ação enzimática da aliinase sobre a aliina, produzindo o cheiro característico do dente de alho esmagado. Isto implica em ter uma quantidade suficiente de aliinase na etapa final capaz de decompor a aliina.

2) Na etapa do clorofórmio, nem sempre o aminoácido foi obtido sobrenadante mas em algumas preparações precipitou. Isto deve estar relacionado com o conteúdo de água no material.

Toda amostra obtida era mantida em acetona, à 4 ^{o}C, isto para evitar a ação enzimática de possível resíduo de aliinase

ainda presente, pois de acordo com Stoll e Seebeck (53) o contato com o solvente orgânico ou a temperatura baixa inibem a ação enzimática.

4.1.1.2- Caracterização da aliina - Reação com ninidrina

A aliina preparada deu teste positivo com ninidrina. É uma reação clássica para aminoácidos onde a solução aquosa de aminoácidos a pH= 5,0 em presença de ninidrina produz uma solução de cor lilás.

4.1.1.3- Preparação de complexos

Várias soluções de cloreto de cobre foram preparadas com diferentes molaridades.

A aliina, geralmente, foi dissolvida em uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 molar (ou 0,1 molar) isto para obter os complexos em pH elevado.

Ao adicionar o metal ao ligante formava-se imediatamente uma solução de coloração azul forte, caracterizando a complexação do íon cobre (II). O pH da solução, geralmente, estava próximo de 13.

Utilizando-se de um pH-metro da Corning, modelo 130, o pH da solução foi variado, utilizando alíquotas de uma solução de ácido clorídrico ($HC\ell$), obtendo-se amostras que foram utilizadas para medidas de absorção óptica e RPE.

Preparações utilizando como sal o sulfato de cobre e obtendo-se complexos com aliina foram feitos e resultados idênticos foram obtidos para os espectros de RPE.

Algumas preparações dos complexos foram centrifugadas e obteve-se precipitados que foram secos e efetuou-se medidas de

RPE e cristalográfica (diagrama de pó).

Na tentativa de obter-se monocristais dos complexos cobre(II) aliina várias preparações foram feitas e deixadas em repouso em locais diferentes: dessecador, "meio ambiente", ou ainda efetuando a preparação em "banho maria" à temperatura de 70 ^{o}C e deixando resfriar naturalmente com o "banho". Inicialmente preparou-se os complexos em solução aquosa, e em preparações posteriores tentou-se uma mistura água-solvente apolar. Foram usados: metanol, dioxano, dimetil sulfóxido (DMSO), éter etílico, clorofórmio, acetonitrila e acetona. As misturas água-solvente apolar foram preparadas em diversas proporções.

4.1.2- Medidas de absorção óptica

Utilizou-se para as medidas de absorção eletrônica no visível os espectrofotômetros Beckman DK-2 e Cary 17 medindo as bandas correspondentes às transições d-d dos complexos cobre(II) aliina em função do pH. A faixa de comprimentos de onda varrida foi de 400 nm a 1100 nm. Foi usado água destilada como referência.

4.1.3- Medidas de RPE

Para as medidas de RPE utilizou-se um espectrômetro Varian da linha Century E-109 que trabalha em banda X (9GHz) utilizando uma cavidade retangular (multi-purpose cavity E-231) com o sistema de controle de temperatura da Varian modelo E-257 para as medidas à temperatura de -140 ^{o}C, e em ambas medidas utilizou-se uma célula plana de quartzo como porta amostra. A modulação do sinal foi feita em 100 KHz, e a potência de microondas utilizada foi de 20 mW. Testes variando a amplitude de modulação foram fei-

tos na tentativa de evidenciar linhas super-hiperfinas devido a núcleos de nitrogênios possivelmente coordenados ao íon cobre(II). Também fez-se testes de saturação variando-se a potência de microondas.

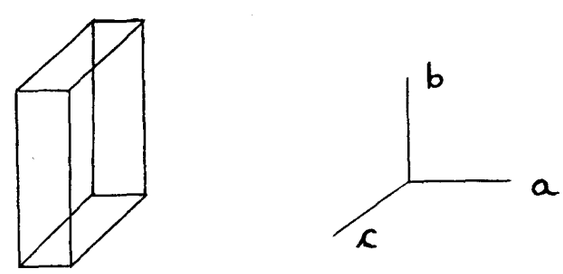
4.1.4- Medidas cristalográficas

O sistema de difratometria de raios X constituído, basicamente, da unidade geradora PW 1130/00 da Phillips, comprimento de onda 1,54 angstrons (tubo de cobre), e do goniômetro horizontal PW 1580/08 foi utilizado para medidas de três amostras policristalinas.

4.2- Complexo dicloro bis(benzil difenil fosfinóxido) cobre(II)

4.2.1- Obtenção do monocristal

O monocristal dicloro bis(benzil difenil fosfinóxido) cobre(II) foi preparado por Mattioli, M.P.D. (4) do grupo de Química Inorgânica de Araraquara-UNESP. A morfologia externa do monocristal é mostrada abaixo:



As fórmulas estrutural e espacial do complexo, obtidas dos estudos cristalográficos efetuados por Gambardella, M.T.P.(54) do grupo de Cristalografia deste Instituto, são mostradas na figura 18.

4.2.2- Medidas de RPE

Inicialmente colocou-se o monocristal sobre um "paralelepípedo" (cristal de cloreto de potássio), para uma melhor precisão na orientação. O cristal de KCℓ com o monocristal foi colocado em um "dedo" de cobre usado para introduzí-los na cavidade de ressonância, a fim de obter-se as medidas de variação angular do campo magnético nos três planos perpendiculares determinados pelos eixos de referência (ou do laboratório).

Os espectros foram obtidos utilizando o espectrômetro Varian operando em banda X e utilizou-se a cavidade cilíndrica Varian modelo E-233. A modulação do sinal foi feita em 100 KHz e a potência de microondas utilizada foi de 50 mW.

Os espectros de variação angular foram obtidos variando a posição do eletroimã (ou a direção do campo) de +100 ^{o} a -100 ^{o} efetuando medidas a cada 5 ^{o}, e assim registrou-se 41 espectros para cada plano do monocristal.

Com a variação angular dos espectros nos três planos (ab, ac, bc) foram construídos os gráficos da posição da linha de ressonância versus ângulo do campo magnético aplicado.

Para ajustar as curvas correspondentes ao tensor $\bar{\bar{g}}_{abc}$ foi utilizado o método dos mínimos quadrados, utilizando-se o computador Vax-11/780. Este método operando com as equações obtidas da hamiltoniana de Zeeman dá o melhor ajuste da curva sobre os pontos experimentais e determina o tensor $\bar{\bar{g}}^{2}_{abc}$.

Uma vez conhecido o tensor $\bar{\bar{g}}^{2}_{abc}$ este foi diagonalizado

e obtido os autovalores e autovetores do tensor $\bar{\bar{g}}^2$ diagonal.

A partir dos dados cristalográficos foi construído um modelo tridimensional do sítio da ligação do íon cobre(II), utilizando "barrinhas" de cobre representando as distâncias das ligações, para melhor visualização da simetria.

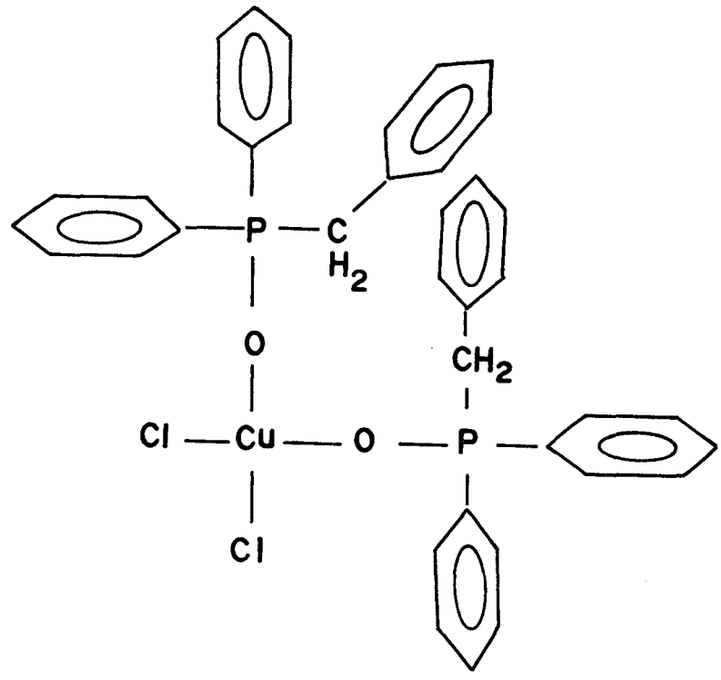
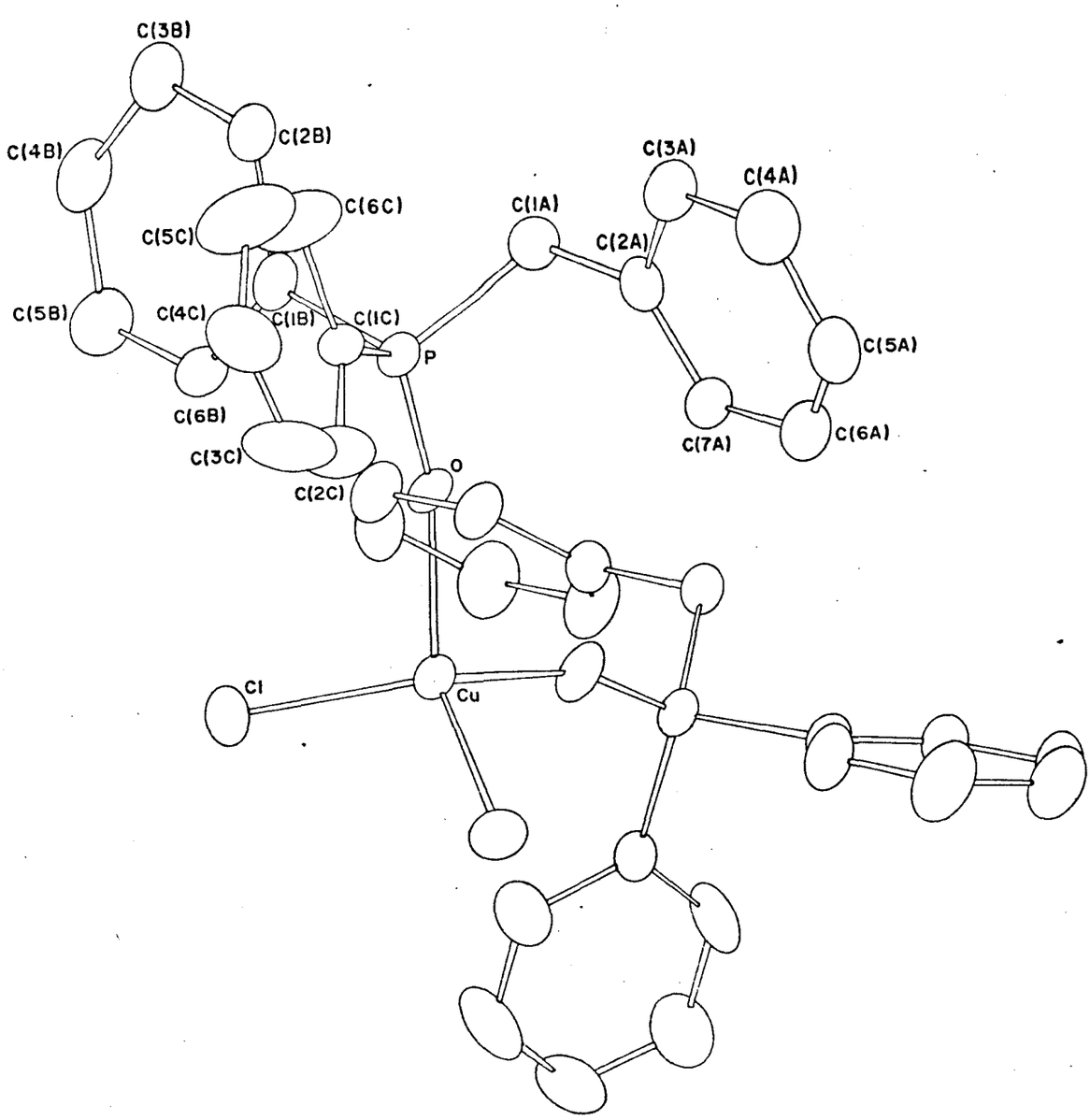


FIGURA 18-a) Fórmula estrutural do complexo $[CuCl_2(bdfpo)_2]$(54).



FICURA 18-b) Arranjo espacial do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$(54).

4.3- Hidratação de hemoproteínas

4.3.1- Preparação das amostras

Utilizou-se meta-hemoglobina bovina e meta- mioglobina equina liofilizadas da Sigma.

As amostras eram depositadas em pequenos "barquinhos" de papel alumínio, pesadas e colocadas em dessecador sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo, isto para obter-se as amostras mais secas possíveis. A quantidade média de água retirada das amostras, na secagem sob pentóxido de fósforo, era de 10 a 12% em peso. O tempo de secagem de três dias mostrou-se conveniente.

Retiradas do dessecador as amostras eram colocadas em recipientes sob diferentes pressões de vapor, obtidas de diferentes soluções salinas, para obter-se diferentes graus de hidratação. Depois de dois ou três dias as amostras eram pesadas novamente, e assim poder-se-ia saber a quantidade de água adsorvida. Em seguida as amostras eram colocadas em tubos de quartzo e submetidas às medidas de RPE.

4.3.2- Medidas de RPE

Utilizou-se o espectrômetro Varian (características já citadas) utilizando a cavidade retangular (multi-purpose cavity E-231) com o sistema de controle de temperatura da Varian modelo E-257 pois as medidas foram efetuadas à temperatura de -156 ^{o}C já que à temperatura ambiente o tempo de relaxação do ferro é curto para ser detectado o sinal. A modulação do sinal foi feita em 100 KHz, e a potência de microondas utilizada foi de 10 mW.

4.3.3- Medidas de absorção óptica

Foram feitas algumas medidas de absorção óptica, das amostras dissolvidas em água, utilizando o Espectrofotômetro Beckman DK-2 e a faixa de comprimento de onda varrida foi de 450 nm a 700 nm. Estas medidas foram feitas para controle das amostras.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Complexos Cu(II) - Aliina

5.1.1- Resultados

5.1.1.1- Espectros de absorção eletrônica no visível

É bastante conhecida as transições eletrônicas de complexos do íon Cu(II) com aminoácidos e peptídios, na região do visível. Geralmente as bandas de absorção são largas e ao redor de 600 nm (~ 16.000 cm^{-1}) correspondentes a transições d-d, transições, estas, permitidas devido a acoplamentos com modos vibracionais essencialmente.

As simetrias dos campos cristalinos comuns, que aparecem nestes tipos de complexos, são tetragonal e quadrado planar, com pequenas distorções. A razão disto é que os ligantes mais comuns nestes complexos são átomos de nitrogênio e oxigênio, que são vinculados pelas ligações com átomos de carbono, formando planos bem definidos. Pode-se observar, entretanto, que complexos só com oxigênios ou só com nitrogênios em simetria quadrado planar dão bandas de absorção em comprimentos de ondas diferentes sendo mais comuns os valores de 640 nm e 540 nm respectivamente (55).

Para espectros obtidos de soluções dos complexos, existem poucas situações onde é possível observar mais de uma banda, já que a largura da mesma não permite resolver todas as transições d-d.

Nos complexos de aliina com o íon cobre(II) em solução

foram feitas medidas de absorção óptica desde pH= 2 até pH= 13, na faixa de comprimento de ondas compreendido entre 400 nm e 1100 nm. A figura 19 mostra alguns espectros medidos (preparados na proporção 20 ligantes : 1 metal (20L:1M); solução de aliina 200 mM em hidróxido de sódio 0,2 M e cloreto de cobre 10 mM), onde pode-se observar que a posição do máximo da banda de absorção varia com o pH, sugerindo ou mudança no campo cristalino, ou aparecimento e desaparecimento de espécies distintas de complexos. Pode ainda ser visto da figura (19) que o comprimento de onda do máximo de absorção dos espectros observados variam de 740 nm até 595 nm sendo que o máximo da banda para pH= 7,0, por exemplo, tem o valor de 608 nm mostrando que o complexo deve envolver ligantes tipo oxigênio e nitrogênio como é esperado para aminoácidos.

A variação do comprimento de onda do máximo da banda com o pH está mostrado na figura 20. De acordo com esta figura e supondo a existência de espécies distintas de complexos, já que o crescimento do pH produz a dissociação de prótons dos diferentes grupos ionizáveis nos seus respectivos pKs (em presença do íon) espera-se a existência de 4 espécies de complexos. O primeiro a pH baixo (2,5) o segundo ao redor de pH= 4,0, o terceiro que deve existir em uma faixa ampla de pH (entre 6 e 11) e o quarto acima de 11.

Medidas de soluções de aliina e cobre(II) preparados na proporção 4L:1M (solução de aliina 40 mM em hidróxido de sódio 0,1 M e cloreto de cobre 10 mM) foram feitas e conforme mostra a figura (21) evidenciou-se um complexo altamente estável na região entre os pHs 6 e 11 em acordo com o resultado obtido na preparação 20L-1M. Pode-se observar entretanto que os máximos das bandas apresentados na figura 21 são sistematicamente deslocados para comprimentos de ondas mais altos.

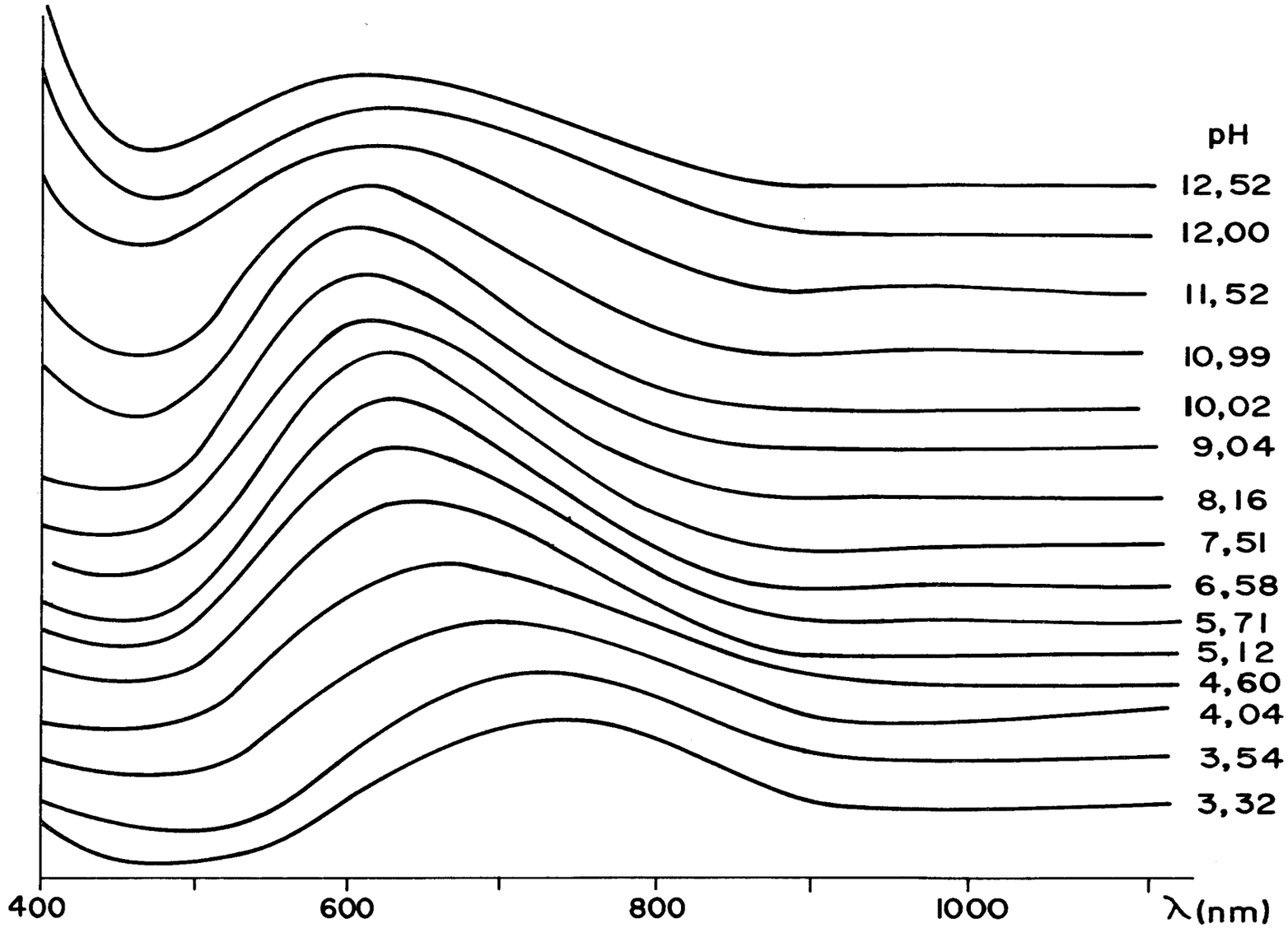


FIGURA 19 - Espectros de absorção eletrônica dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções.

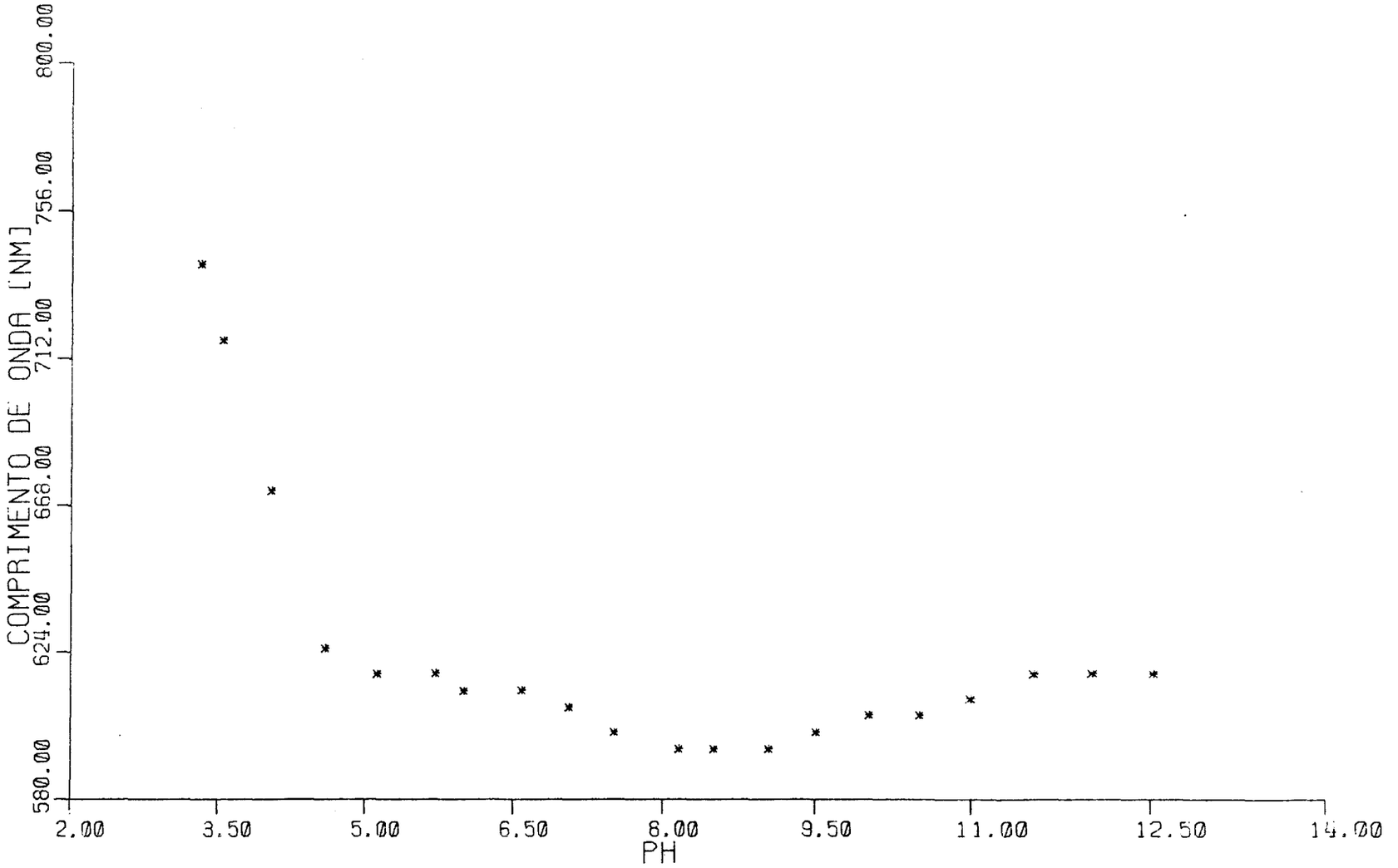


FIGURA 20 - Gráfico do comprimento de onda correspondente ao máximo da banda de absorção dos espectros eletrônicos dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções.

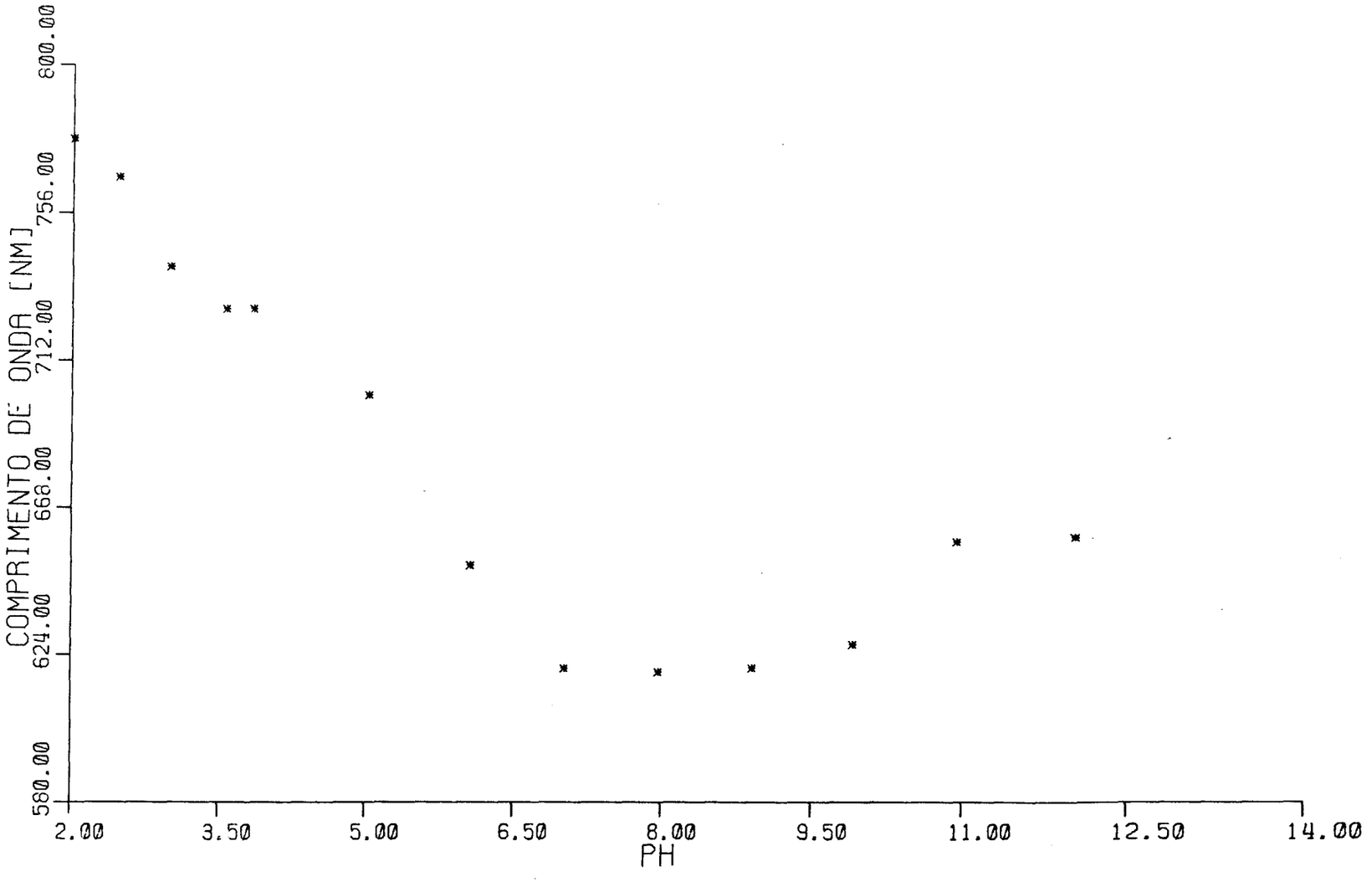


FIGURA 21 - Gráfico do comprimento de onda correspondente ao máximo da banda de absorção dos espectros eletrônicos dos complexos Cu(II)-aliina (4L:1M) em função do pH das soluções.

5.1.1.2- Espectros de RPE

Os espectros de RPE foram tomados em Banda X (9 GHz) em duas temperaturas: ambiente e -140 °C.

A temperatura ambiente os espectros são promediados em suas dependências angulares devido ao movimento de rotação dos complexos, observando-se, de um modo geral, as quatro linhas correspondentes à interação do spin eletrônico com o spin nuclear do próprio núcleo do íon cobre(II).

Alguns espectros de complexos preparados na proporção 20L-1M são mostrados na figura 22 e a figura 23 dá os gráficos de g e Ao em função do pH.

Notamos em pH baixo a coexistência de duas espécies de complexos, um provavelmente o íon coordenado com água e outro onde o íon deve estar coordenado com oxigênios de grupos carboxílicos do aminoácido.

Em pH mais alto (entre 6 e 11) deve existir um único tipo de complexo onde o íon cobre(II) está coordenado a oxigênios de grupos carboxílicos e nitrogênios de grupos amina. A mudança nos parâmetros espectroscópicos (g, separação hiperfina e comprimento de onda do máximo de absorção) em pH maior que 11 pode ser devido a formação de hidroxi compostos.

A partir das medidas à temperatura de -140 °C foi possível determinar a simetria axial para o sítio de ligação do íon cobre(II) - ligantes em todos os casos medidos. Foi possível também obter os valores de g (paralelo e perpendicular) e separação hiperfina paralela, que mostraram-se concordantes com os dados de absorção óptica e RPE em temperatura ambiente, conforme mostrado nas figuras 24 e 25 e tabela IV.

Mediu-se também complexos cobre(II) - aliina na proporção 4L-1M. As figuras 26 e 27 mostram os dados obtidos onde no-

ta-se concordância com a proporção 20L:1M no que se refere ao número de complexos obtidos. Observou-se também, dos espectros obtidos à temperatura de -140 °C, que nos complexos a pH baixo (menor que 3,5) não houve resolução espectral das interações hiperfinas e isto deve-se ao fato de haver dois complexos coexistindo nestes pHs, onde um deles, o íon coordenado com água (solvatado) é caracterizado por uma única linha larga e que no caso sobrepõe as interações hiperfinas do outro complexo que está coordenado ao aminoácido.

Dos espectros a temperatura ambiente observou-se a coexistência desses dois tipos de complexos em pHs entre 2 e 6 e à medida que cresceu o pH houve uma diminuição na quantidade de complexo do Cu(II) solvatado e conseqüente aumento de complexo do Cu(II) coordenado com o aminoácido.

As tabelas IV e V resumem os dados obtidos para as preparações 20L:1M e 4L:1M respectivamente.

Foram preparados também complexos com diversas estequiometrias (1L:1M; 2L:1M; 3L:1M; e 4L:1M) e em pHs diferentes que foram centrifugados e os precipitados secos e submetidos à medida de RPE e de três dessas preparações foram efetuados diagrama de pó. Estas preparações foram feitas na tentativa de obter-se dados adicionais a respeito dos complexos formado, como por exemplo tipo de pó obtido já que era importante saber se as amostras eram policristalinas ou amorfo para continuação das tentativas de obtenção dos monocristais, e também para confirmação de outros dados, como por exemplo tipo de simetria do sítio do íon Cu(II). Os dados de RPE de quatro dessas preparações são mostrados na tabela VI.

5.1.1.3- Medidas Cristalográficas

Os diagramas de pó efetuados de três amostras, figura (28), revelaram tratar-se de amostras policristalinas e não amorfas. No entanto tentativas de obtenção de monocristais foram infrutíferas.

5.1.2- Discussão

De acordo com os resultados obtidos das medidas de absorção óptica dos complexos foi possível sugerir a existência de quatro espécies de complexos.

Em pH muito baixo (menor que 2,5) todos os grupos do aminoácido que apresentam prótons dissociáveis devem estar protonados e o íon deve estar coordenado com água, dando, por isto mesmo, uma banda muito larga com pequena absortividade e com o comprimento de onda máximo perto de 800 nm, características do íon dissolvido em água (55).

O grupo carboxílico é esperado estar desprotonado em pH próximo de quatro e deve se coordenar ao íon Cu(II) alterando por isso o comprimento de onda do máximo de absorção para valores menores que o do íon coordenado com água. O grupo amina deve ser desprotonado a pH mais elevado dando origem a novos complexos o que conseqüentemente introduz nova alteração no comprimento de onda do máximo de absorção e novamente para valores menores, como é de se esperar. A formação de hidroxi compostos é sugerida para explicar a mudança no comprimento de onda máximo de absorção dos complexos com pH maior que 11.

As preparações diferentes (20L:1M e 4L:1M) apresentam o mesmo comportamento qualitativo, como pode ser observado dos dados apresentados, porém quantitativamente a preparação 4L: M apresenta valores do máximo do comprimento de onda sistematicamente

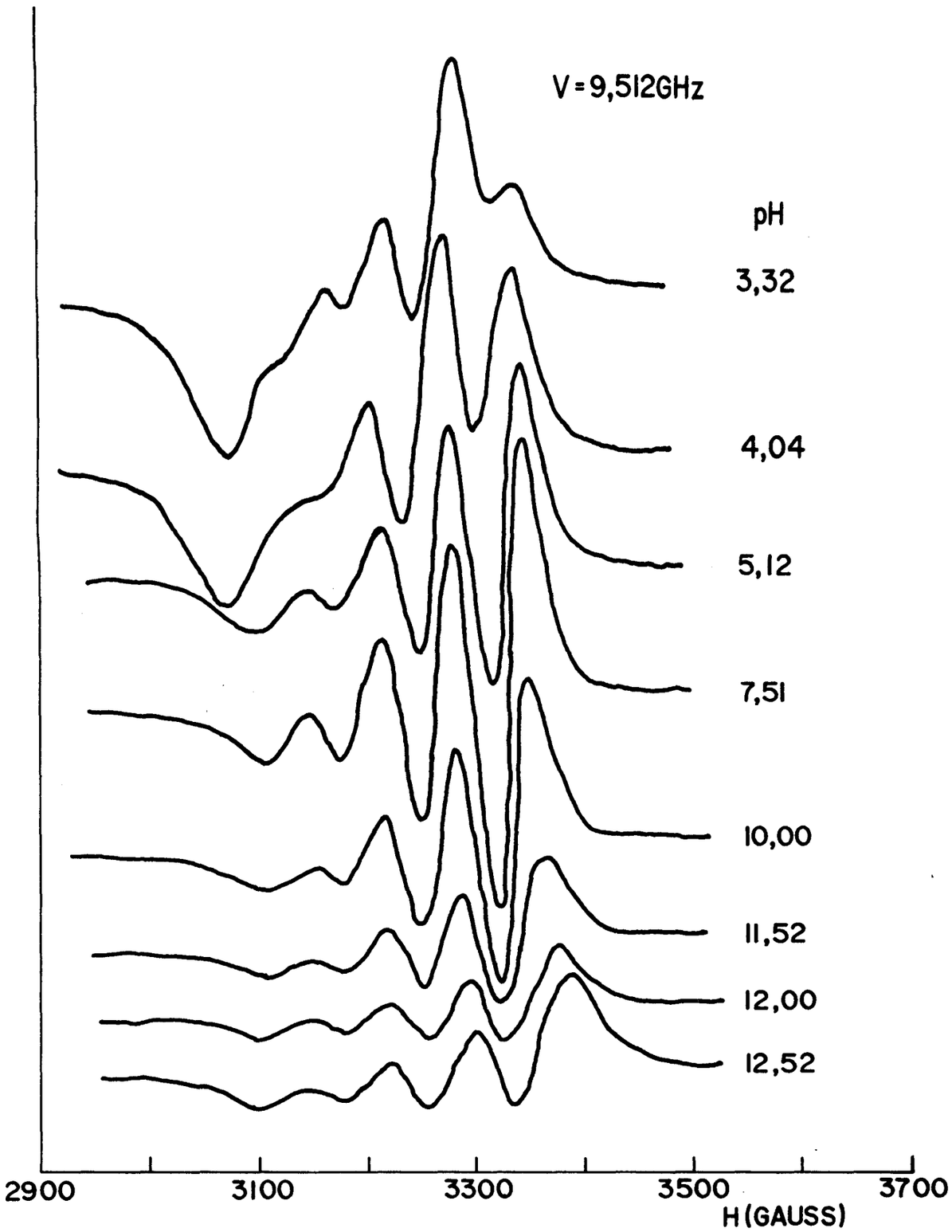


FIGURA 22 - Espectros de RPE dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T-ambiente.

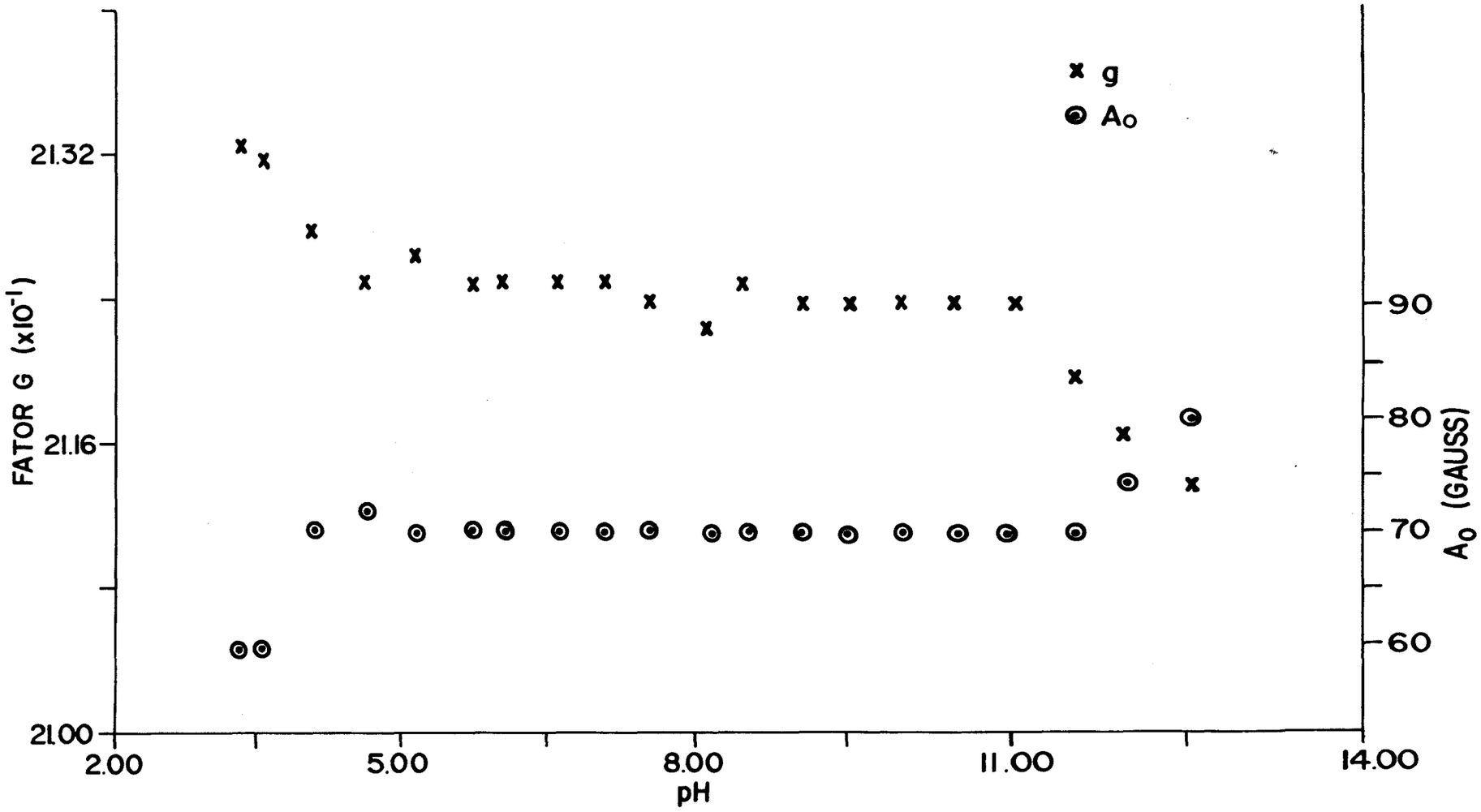


FIGURA 23 - Gráfico dos parâmetros g e A_o dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T-ambiente.

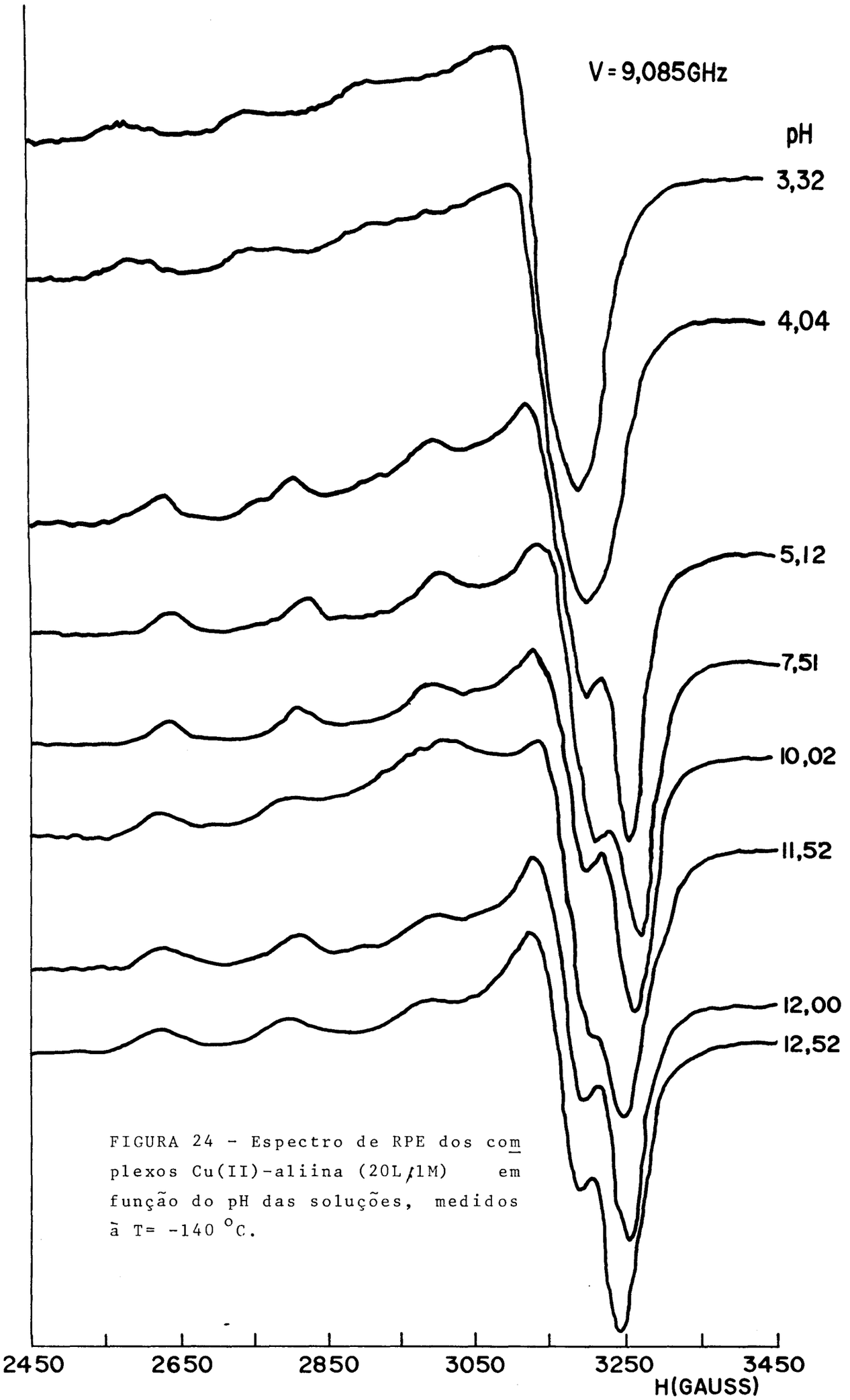


FIGURA 24 - Espectro de RPE dos complexos Cu(II)-aliina (20L/1M) em função do pH das soluções, medidos à T= -140 °C.

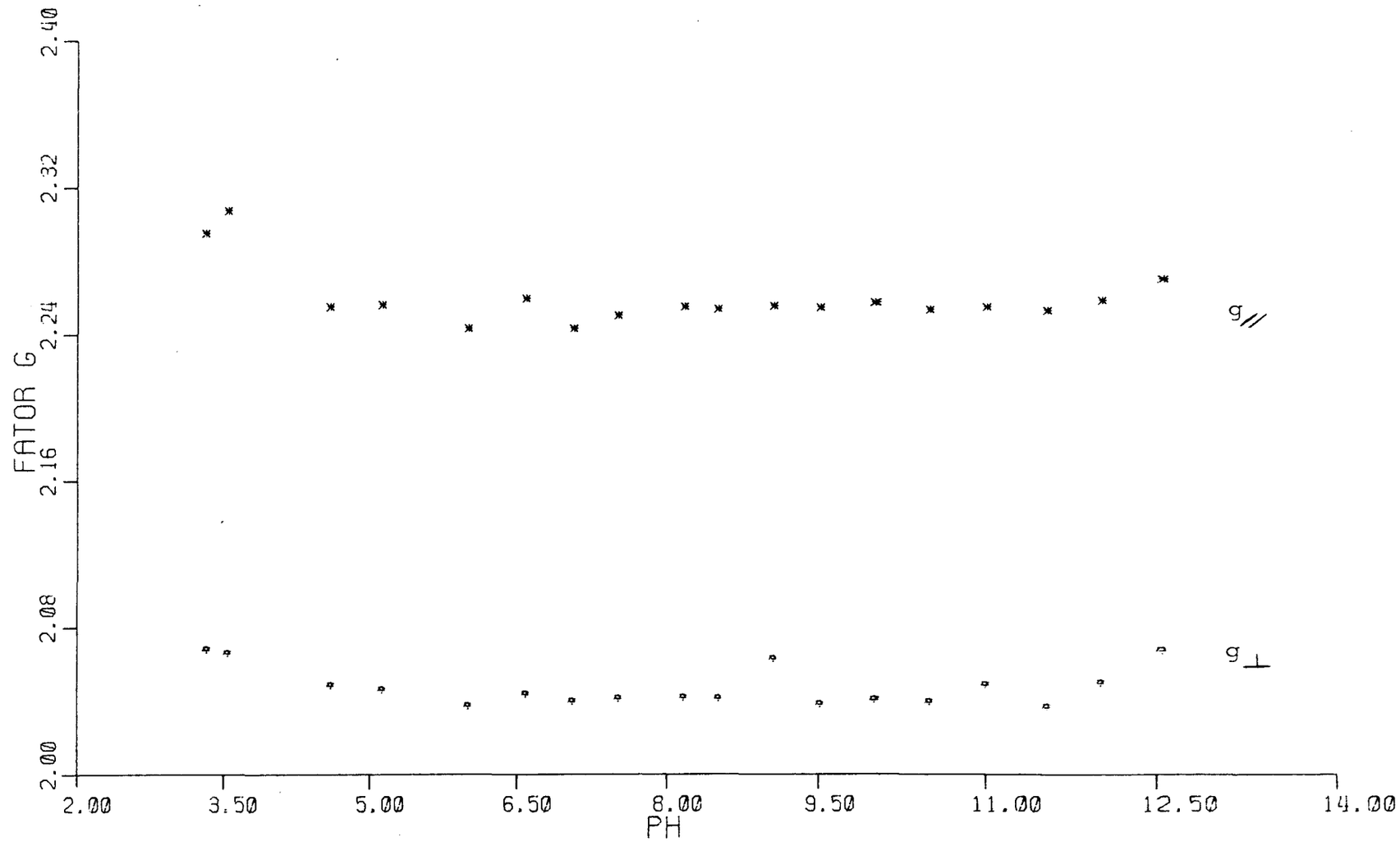


FIGURA 25 - Gráficos dos parâmetros $g_{//}$ (*) e $g_{\perp}$ (✡) dos complexos Cu(II)-aliina (20L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T= -140 °C.

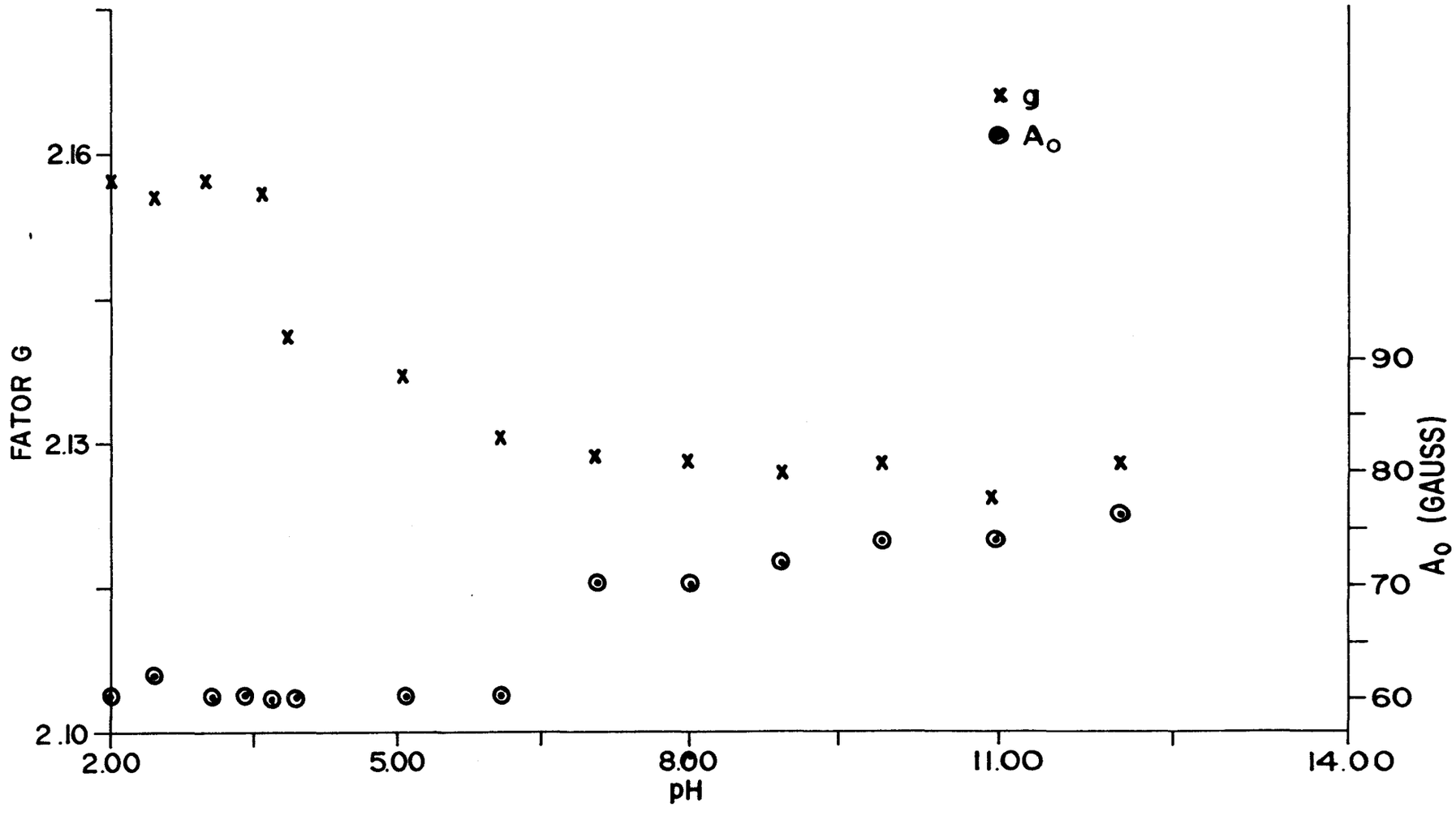


FIGURA 26 - Gráficos dos parâmetros g e A_o dos complexos Cu(II)-aliina (4L:1M) em função do pH das soluções, medidos à T- ambiente.

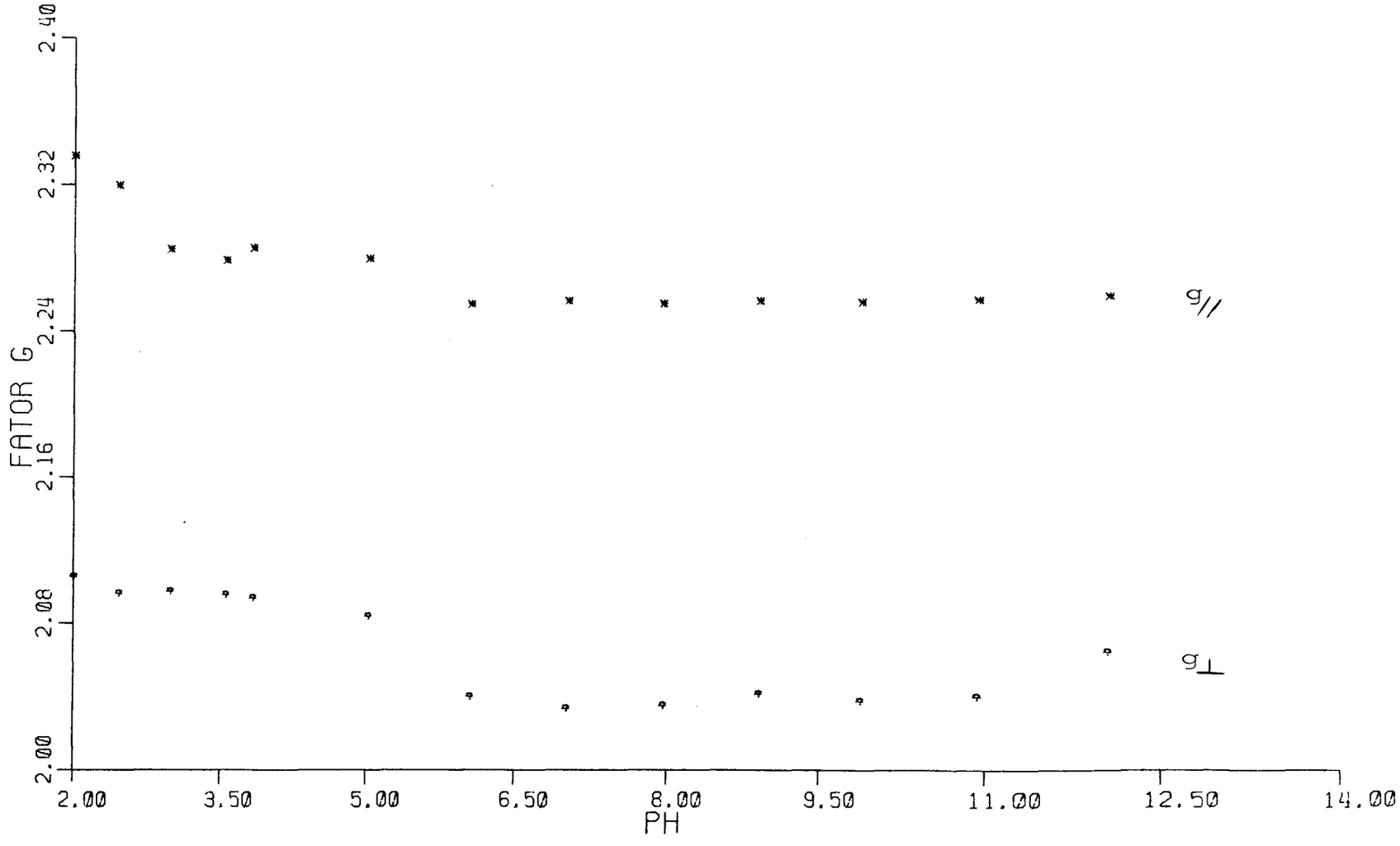


FIGURA 27 - Gráficos dos parâmetros $g_{//}$ (*) e $g_{\perp}$ (✿) dos complexos Cu(II)-aliina (4L:1M) em função do pH das soluções, medido à T= -140 °C.

TABELA IV - Valores dos parâmetros espectroscópicos de RPE e absorção eletrônica para os complexos de Cu(II) -aliina (20L:1M).

pH	g_o	A_o(G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//}$(G)	$\lambda_{máx.}$(nm)
3,32	2,132	60	2,296	2,069	163	740
3,54	2,132	60	2,308	2,067	163	718
4,04	2,128	70	-	-	-	673
4,59	2,125	72	2,257	2,049	175	625
5,12	2,126	70	2,257	2,047	178	618
5,71	2,125	70	-	-	-	618
6,00	2,125	70	2,244	2,038	180	613
6,58	2,125	70	2,260	2,044	176	613
7,06	2,125	70	2,244	2,040	180	608
7,51	2,124	70	2,251	2,042	180	600
8,16	2,122	70	2,256	2,042	178	595
8,50	2,125	70	2,255	2,042	178	595
9,04	2,124	70	2,256	2,064	175	595
9,50	2,124	70	2,256	2,039	178	600
10,02	2,124	70	2,258	2,041	178	605
10,51	2,124	70	2,254	2,040	179	605
10,99	2,124	70	2,255	2,049	175	610
11,52	2,120	70	2,253	2,037	180	618
12,00	2,116	74	2,259	2,050	180	618
12,52	2,114	80	2,271	2,068	180	618

TABELA V - Valores dos parâmetros espectroscópicos de RPE e absorção eletrônica para os complexos de Cu(II) - aliina (4L:1M).

pH	g_o	A_o(G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//}$(G)	$\lambda_{máx.}$(nm)
2,01	2,161	60	2,336	2,107	não resolvido	778
2,46	2,159	62	2,320	2,097	não resolvido	767
2,99	2,161	60	2,285	2,098	não resolvido	740
3,56	2,160	60	2,279	2,097	não resolvido	727
3,84	2,144	60	2,286	2,095	156	702
5,02	2,139	60	2,280	2,085	163	651
6,06	2,133	60	2,256	2,041	178	620
7,02	2,130	70	2,258	2,034	179	619
7,96	2,130	70	2,256	2,036	179	620
8,90	2,129	72	2,258	2,042	178	620
9,90	2,130	74	2,257	2,038	179	627
10,93	2,126	74	2,258	2,041	178	658
12,04	2,130	76	2,260	2,065	180	659

TABELA VI - Dados de RPE de amostras policristalinas.

pH (solução)	SAL	PROPORÇÃO METAL-LIGANTE	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//}$(G)
6,41	Cloreto	1 : 2	2,244	2,053	172
9,00	Cloreto	1 : 2	2,256	2,049	175
7,46	Sulfato	1 : 2	2,246	2,084*	178
10,70	Sulfato	1 : 3	2,252	2,056	175

* simetria rômbica: g_x = 2,120

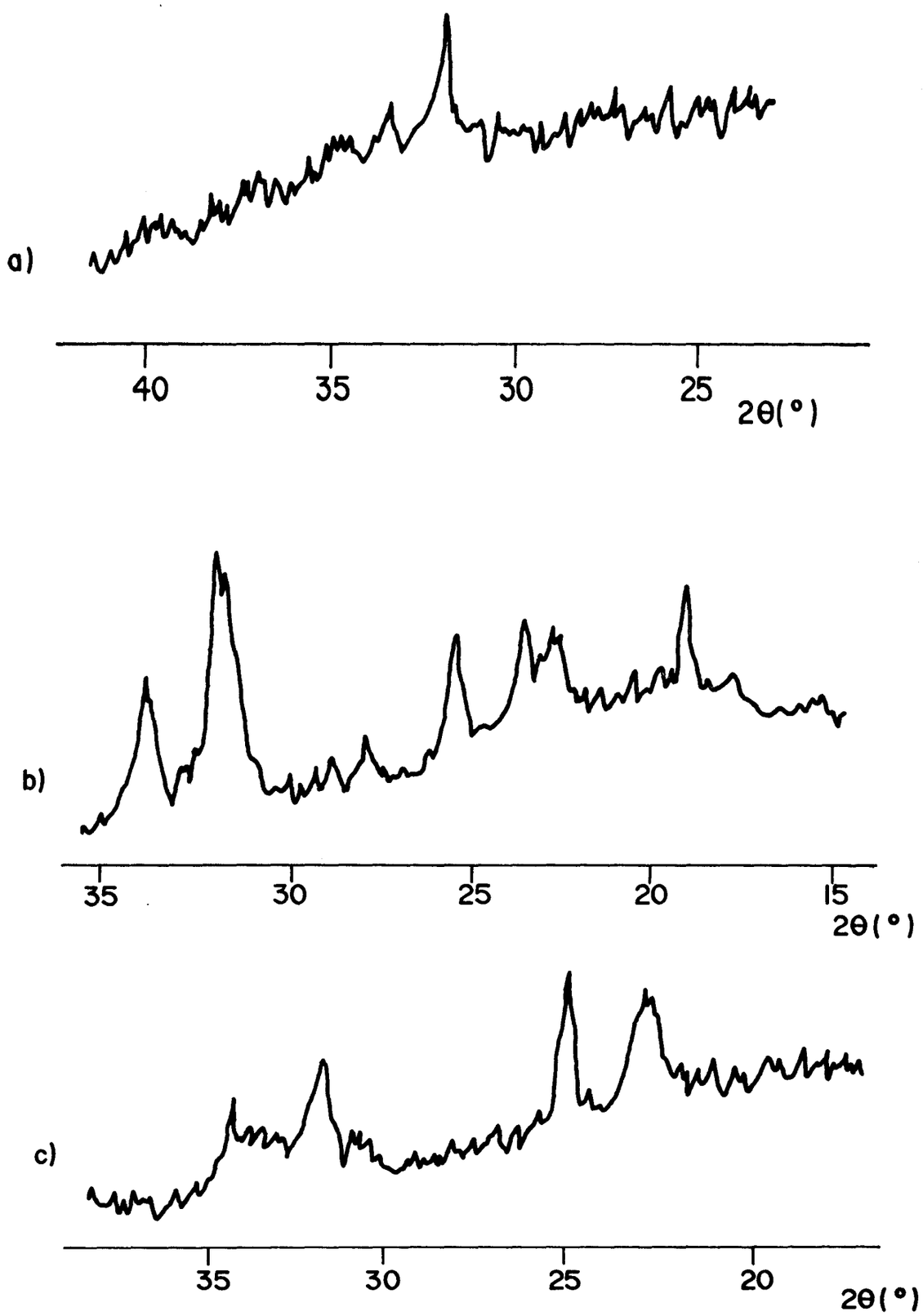


FIGURA 28 - Diagramas de pó de 3 amostras policristalinas:
a) Aliina - $CuC\ell_2$ (2L:1M) pH= 10,4;
b) Aliina - $CuSO_4$ (2L:1M) pH= 7,4;
c) Aliina - $CuSO_4$ (3L:1M) pH= 10,7.

mais elevado que os da 20L:1M e isso deve estar relacionado a uma quantidade relativa muito maior de íon Cu(II) dissociado na preparação 4L:1M elevando por isso os valores do máximo de absorção em direção a do íon Cu(II) coordenado com água.

Os dados obtidos das medidas de RPE mostram concordância com os resultados de absorção óptica ou seja também sugerem a existência de quatro espécies de complexos.

A coexistência de dois tipos de complexos, um onde o íon está coordenado com água e outro possivelmente onde oxigênios de grupos carboxílicos também participem da coordenação, em pH baixo é proposto devido ao tipo de espectro observado onde nota-se cinco linhas de absorção em vez das quatro normalmente encontradas para um único tipo de complexo de cobre.

Em pH mais alto, os grupos carboxílicos e amina estão desprotonados e provavelmente se coordenem ao íon Cu(II), o tipo de complexo que deve existir é o de 2L:1M onde o íon Cu(II) está coordenado a dois átomos de nitrogênios e dois de oxigênios, e este tipo de complexo é o que existe na faixa de pH entre 6 e 11. A interação super-hiperfina entre o spin nuclear (I= 1) dos nitrogênios e o spin eletrônico do íon Cu(II) não foi, em nenhum caso observado, no entanto isto pode ser explicado supondo que os nitrogênios ocupem posições não equivalentes e, por esta razão, são escondidos pela largura e superposição dos dois tripletos não equivalentes.

Para complexos em pH elevado (acima de 11) é suposta a formação de hidroxi-compostos como sendo responsável pela alteração dos parâmetros espectroscópicos g e Ao.

Nascimento, O.R. (55) estudando a formação de complexos do dipeptídeo glicil-triptofano com o íon Cu(II) obteve na faixa de pH entre 6,5 e 11 um complexo onde o íon Cu(II) está coordenado a dois oxigênios e dois nitrogênios localizados em po-

sições não equivalentes (dados confirmados cristalograficamente de um monocristal obtido). Os espectros de RPE dos complexos, nessa faixa de pH, não apresentam resolvidas as interações super-hiperfinas do íon Cu(II) com os núcleos de nitrogênio. Os parâmetros espectroscópicos (comprimento de onda do máximo de absorção, g e A) desses complexos mostram acentuada semelhança com os obtidos para complexos do aminoácido aliina com o íon Cu(II) na mesma faixa de pH.

Silva, G.P. (3) obteve de complexos aliina Cu(II), preparados na proporções 1L:1M e 2L:1M, precipitados que foram secos e dos quais efetuaram-se medidas de RPE onde constatou-se as interações super-hiperfinas devido a dois núcleos de nitrogênios coordenados ao íon Cu(II). Nesse mesmo trabalho, com base em medidas de espectroscopia infravermelho e de RPE, sugeriu a coordenação do átomo de oxigênio do grupo sulfóxido ao íon Cu(II) em um complexo formado em pH= 2,5. Tentou-se reproduzir esses resultados efetuando preparações semelhantes mas não se obteve sucesso.

Nosso estudo sobre a formação de complexos Cu(II)-aliina não se mostrou relevante em vista dos resultados que foram obtidos e dos que já existiam. O objetivo era efetuar um estudo sistemático, utilizando a técnica de RPE e absorção óptica, da formação de complexos em função do pH e também tentar obter monocristais de algum dos complexos para estudos cristalográficos e de RPE.

Os estudos de formação de complexos tinha o interesse adicional devido a possibilidade, que já havia sido sugerida por Silva, G.P. (3), da participação do grupo sulfóxido como ligante do íon Cu(II). O estudo cristalográfico, por sua vez, possibilitaria não só a obtenção de dados a respeito do complexo formado como também seria determinado a estrutura da aliina já que a estrutura apresentada, proposta por Stoll e Seebeck (53), foi resulta-

do de estudos de análises químicas. Ressalte-se ainda que além dos dados que seriam obtidos da cristalografia do complexo é também através de estudos com monocristais que a técnica de RPE fornece o máximo de informação, ou seja: orientacão do íon metálico com relação aos eixos cristalográficos; simetria do campo cristalino no complexo; caráter covalente da ligacão; deslocalização da nuvem eletrônica, entre outras.

O fato de não se ter obtido monocristais certamente foi devido a cadeia lateral do aminoácido, que com exceção do grupo sulfóxido, é altamente apolar impossibilitando assim possíveis pontes de hidrogênio com moléculas de água que poderiam estabilizar ou possibilitar a cristalização. Tentou-se contornar esta dificuldade preparando soluções "mistas", água-solvente apolar, como citado na seção 4.1.1.3 e neste meio efetuando a complexação do metal com o aminoácido, porém não se obteve resultado positivo.

5.2- Complexo dicloro bis(benzil difenil fosfinóxido) cobre(II)

5.2.1- Resultados

5.2.1.1- Cristalografia

Dos estudos cristalográficos efetuados foram obtidos os seguintes dados da estrutura cristalina:

Sistema: Monoclínico

Grupo espacial: $C_{2/c}$

Parâmetros de rede:

a = 13,143 (4) Å

b = 13,798 (4) Å

$c = 20,151\ (8)\ \text{Å}$

$\beta = 101,1\ (3)^{o}$ ângulo entre a e c

Volume da cela unitária: $V = 3585,9\ \text{Å}^3$

Número de moléculas por cela unitária: 4

Distância Cu-Cu = 9,258 Å

Foram obtidos também as posições dos átomos do sítio de ligação do cobre em relação a um sistema tri-ortogonal (figura 29):

Cu	(-0,9699; -1,5205; 4,9435)
O'	(0,3882; -0,1421; 4,9415)
Cℓ	(-0,0211; -2,9169; 6,3376)
Cℓ'	(-1,9194; -2,9169; 3,5534)
O	(-2,3279; -0,1421; 4,9455)

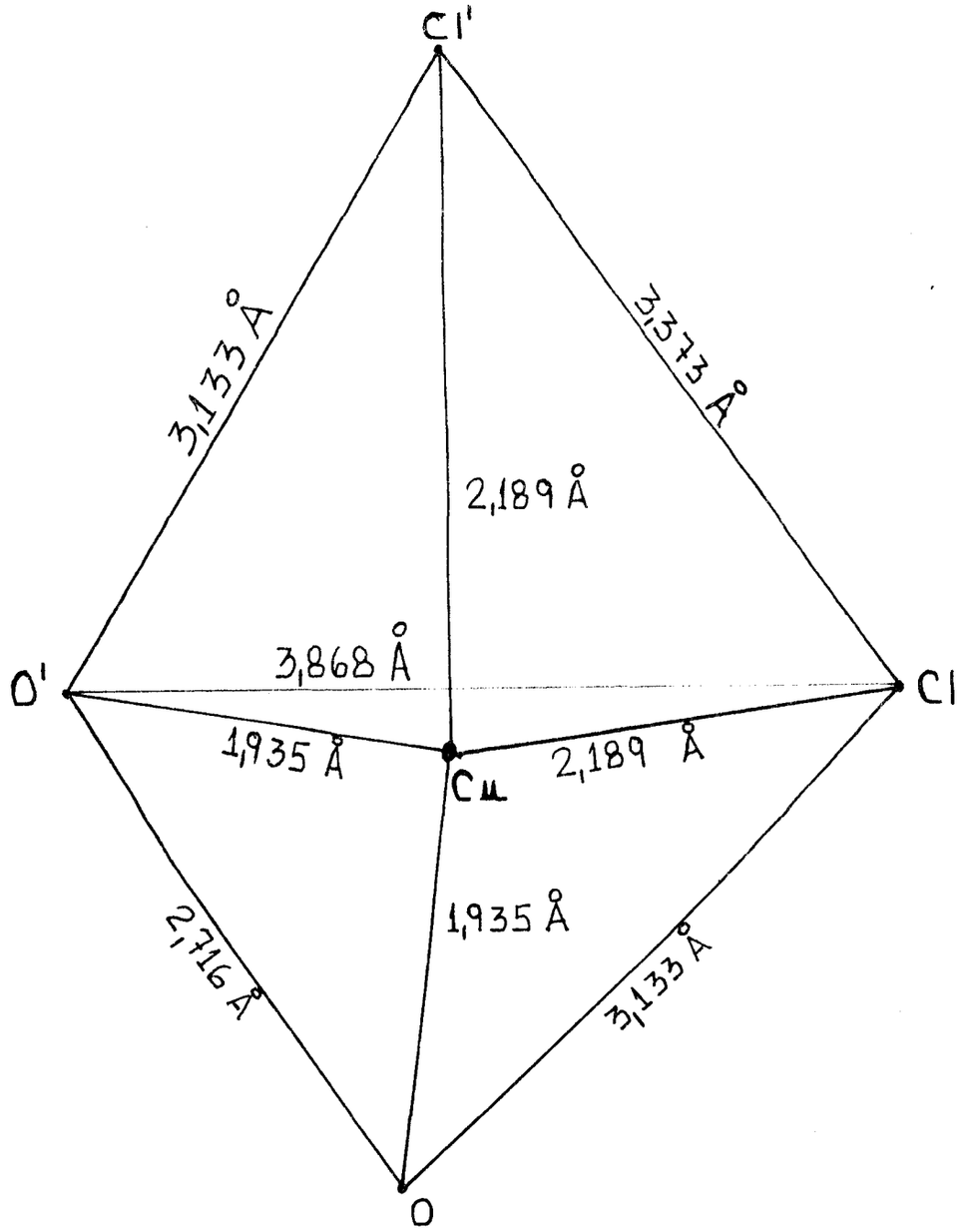


FIGURA 29 - Estereoquímica do sítio de ligação do íon cobre(II) no complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$.

5.2.1.2- RPE

Alguns espectros para diferentes ângulos do campo magnético em torno dos eixos do laboratório (a,b,c) são mostrados na figura 30.

Os valores encontrados, depois do ajuste, para compor o tensor $\overline{\overline{g}}^2_{abc}$ foram:

$$\overline{\overline{g}}^2_{abc} = \begin{bmatrix} 4,567815 & -0,492627 & -0,305638 \\ -0,492627 & 5,454830 & 0,620039 \\ -0,305638 & 0,620039 & 4,683355 \end{bmatrix}$$

Na diagonalização obteve-se:

$$\bar{\bar{g}}_D^2 = \begin{bmatrix} 4,3645 & 0 & 0 \\ 0 & 6,0289 & 0 \\ 0 & 0 & 4,3127 \end{bmatrix}$$

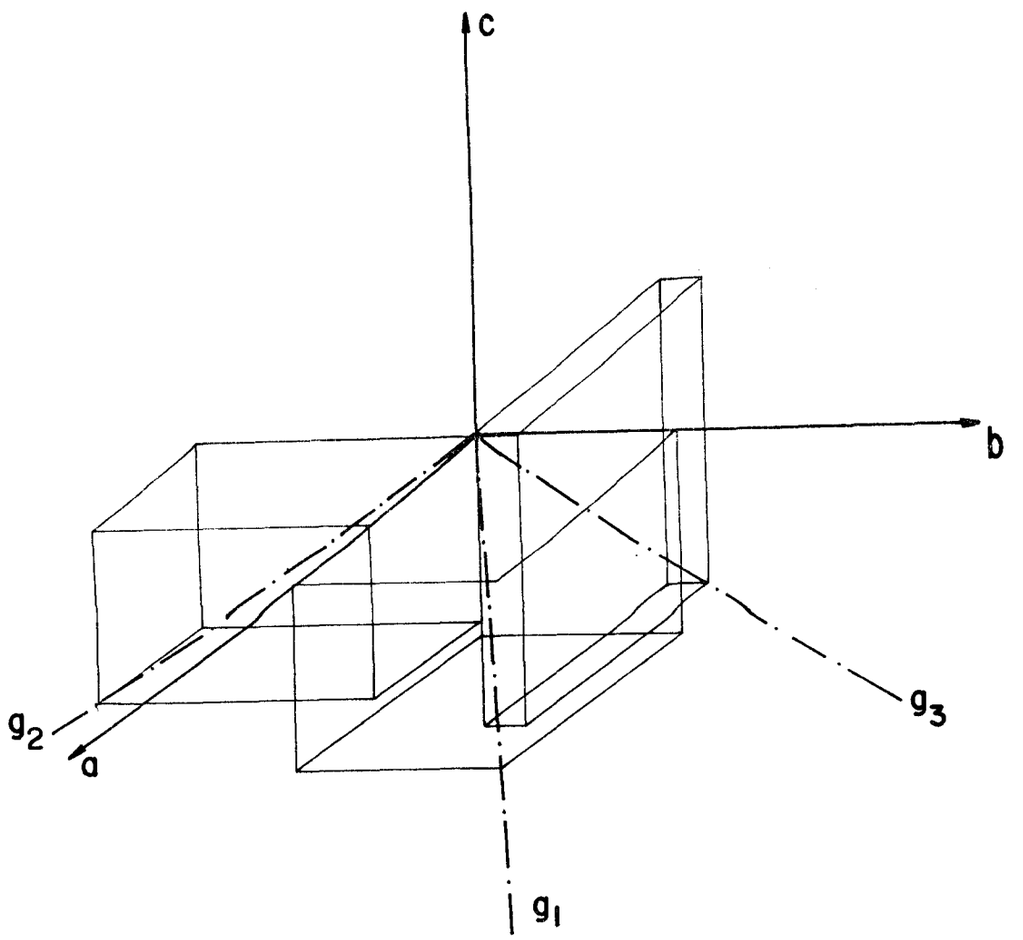
E a matriz dos cossenos diretores:

$$I = \begin{bmatrix} 0,652633 & 0,368538 & -0,662005 \\ 0,575272 & -0,809637 & 0,116403 \\ -0,493084 & -0,456801 & -0,740405 \end{bmatrix}$$

E portanto os componentes principais do tensor $\bar{\bar{g}}$ foram:

		Auto Vetores		
g_1 =	2,0891	0,652633	0,575272	-0,493084
g_2 =	2,4554	0,368538	-0,809637	-0,456801
g_3 =	2,0767	-0,662005	0,116403	-0,740405

No esquema, a seguir, é mostrado as direções dos componentes do tensor $\bar{\bar{g}}$ em relação aos eixos de referência.



Os gráficos da variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ nos três planos perpendiculares, determinados pelos eixos experimentais (a, b,c) são mostrados na figura 31.

Na figura 32 é mostrado a variação angular da largura de linha (ΔH) nos três planos perpendiculares. A não resolução espectral das interações do spin eletrônico com o spin nuclear (interação hiperfina) do íon metálico foi causada pelo alargamento da linha de ressonância pela interação entre os centros paramagnéticos, que no monocristal estão próximos (distância = 9,258 Å).

5.2.1.3- Absorção Eletrônica

O espectro de absorção eletrônica referente às transi-

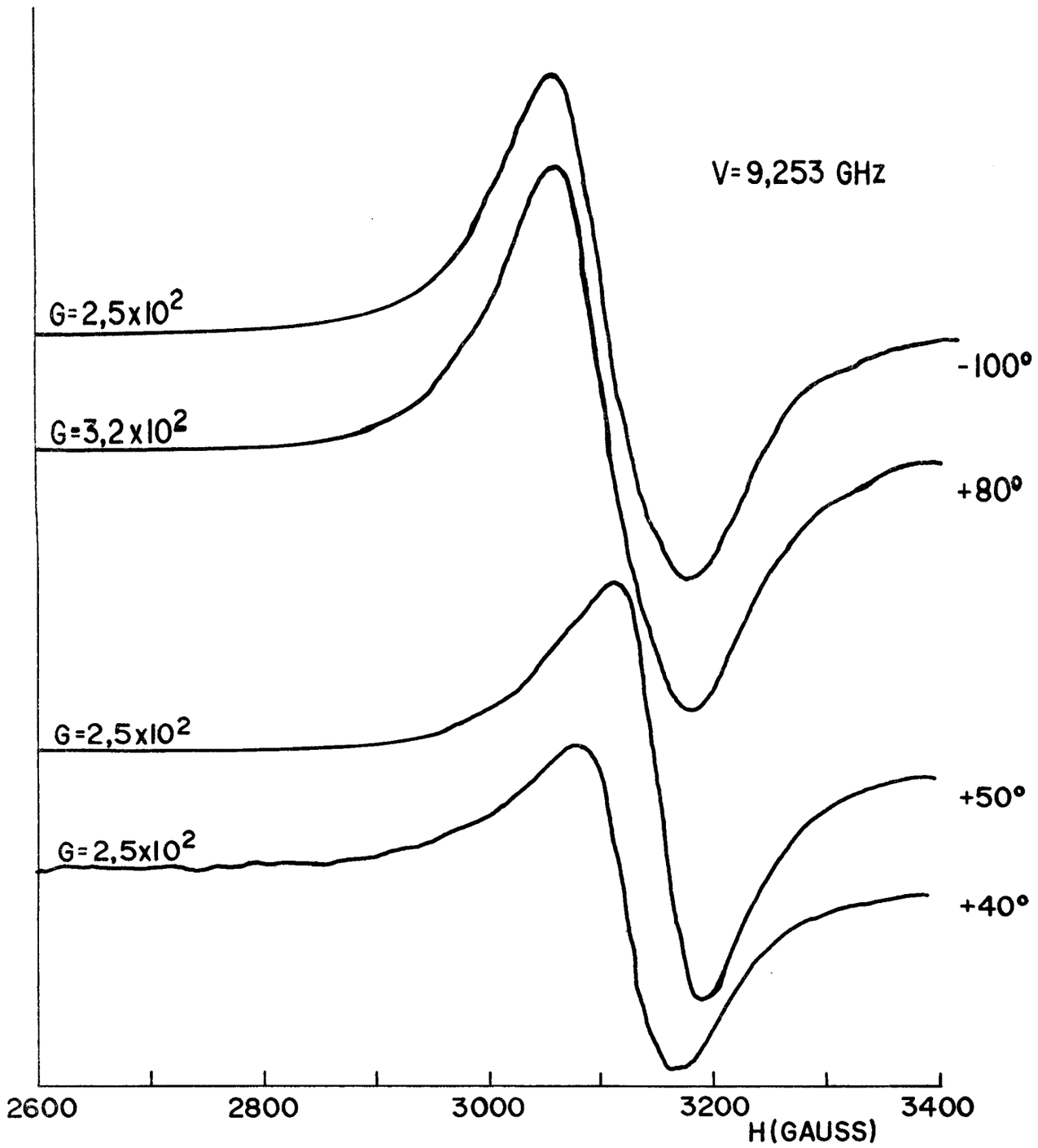


FIGURA 30 - Espectros de RPE do complexo dicloro bis (benzil difenil fosfinóxido) cobre(II) para 4 direções diferentes de aplicação do campo magnético Ho.

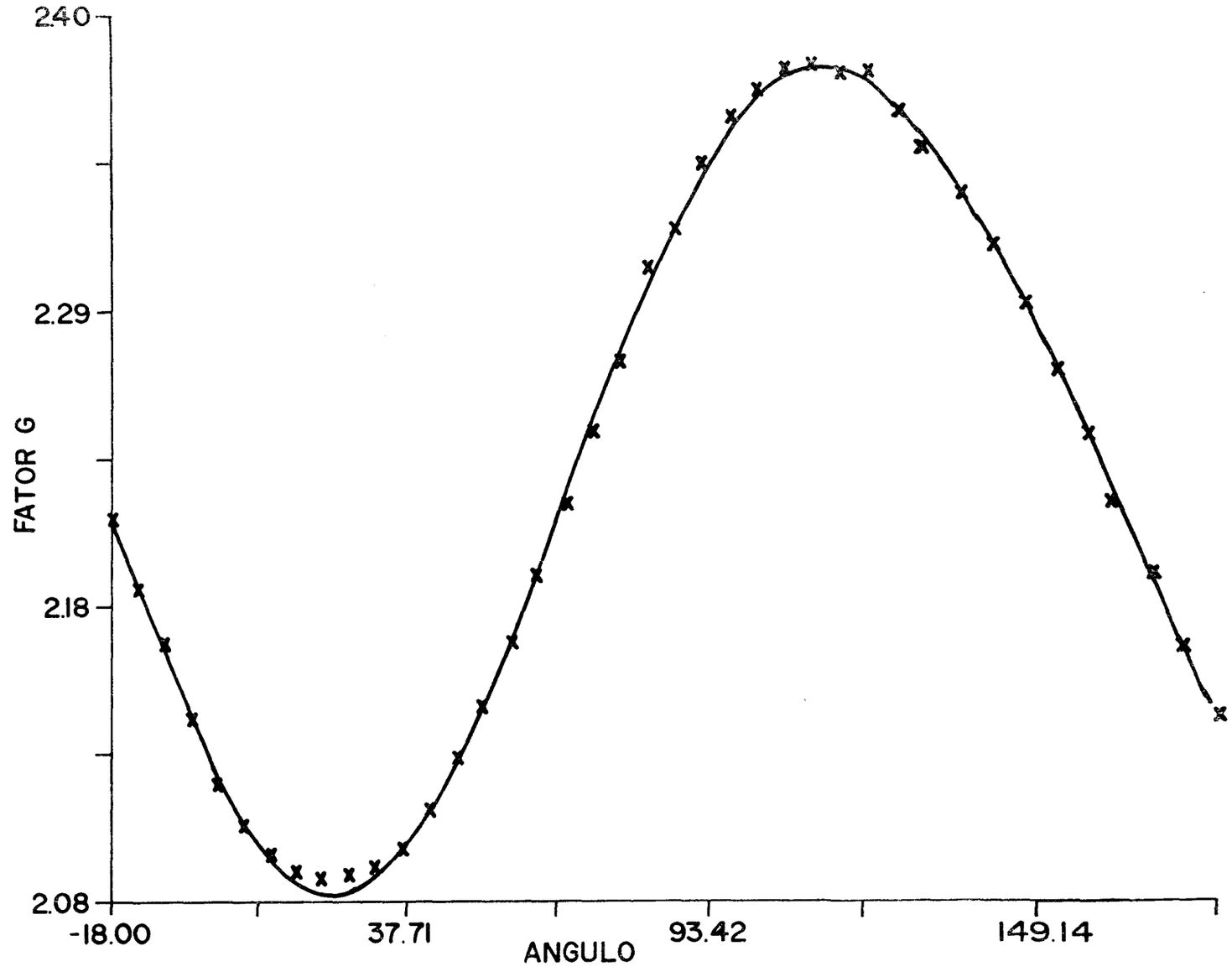


FIGURA 31-a) Variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ no plano ab, do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$.

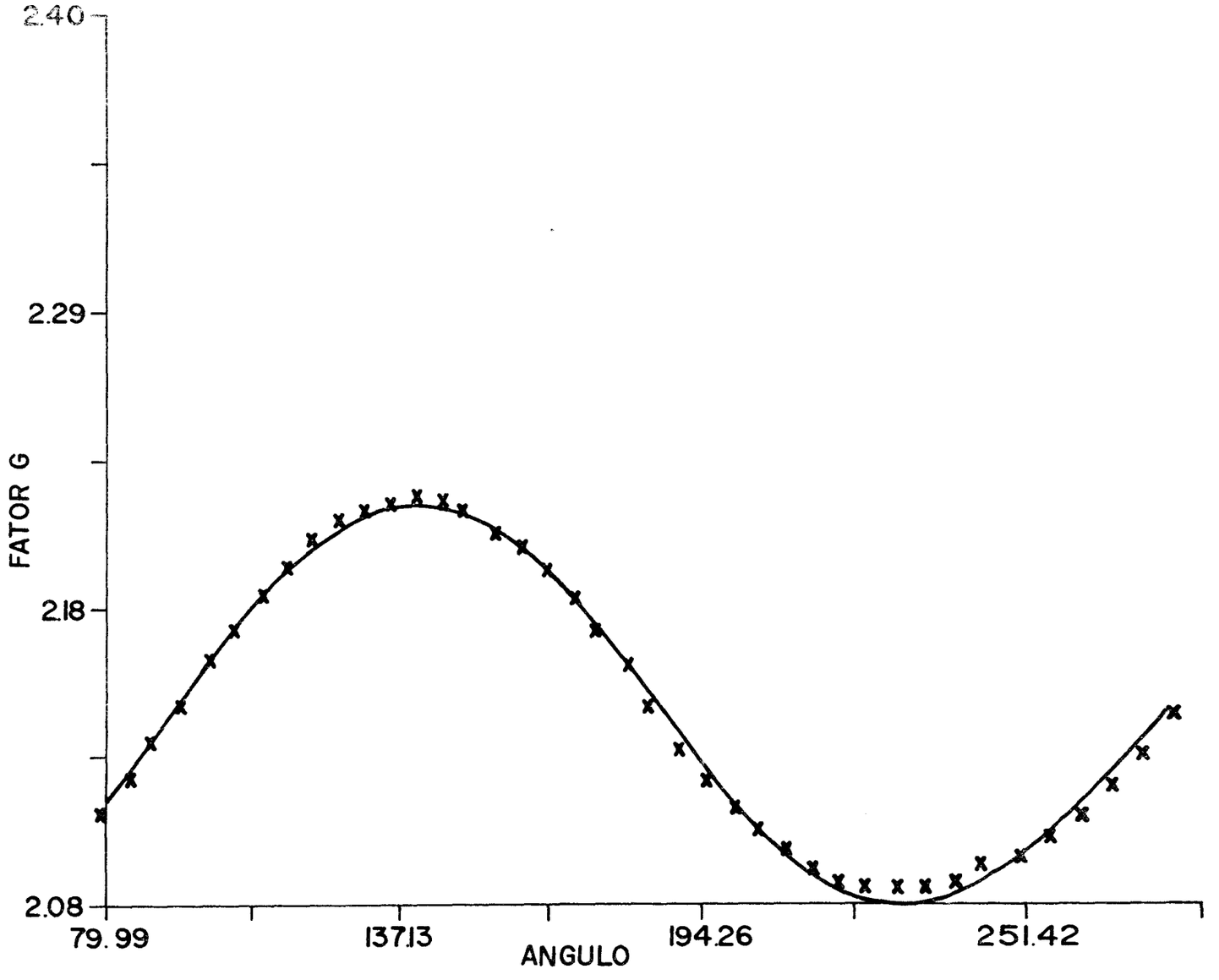


FIGURA 31-b) Variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ no plano ac, do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$

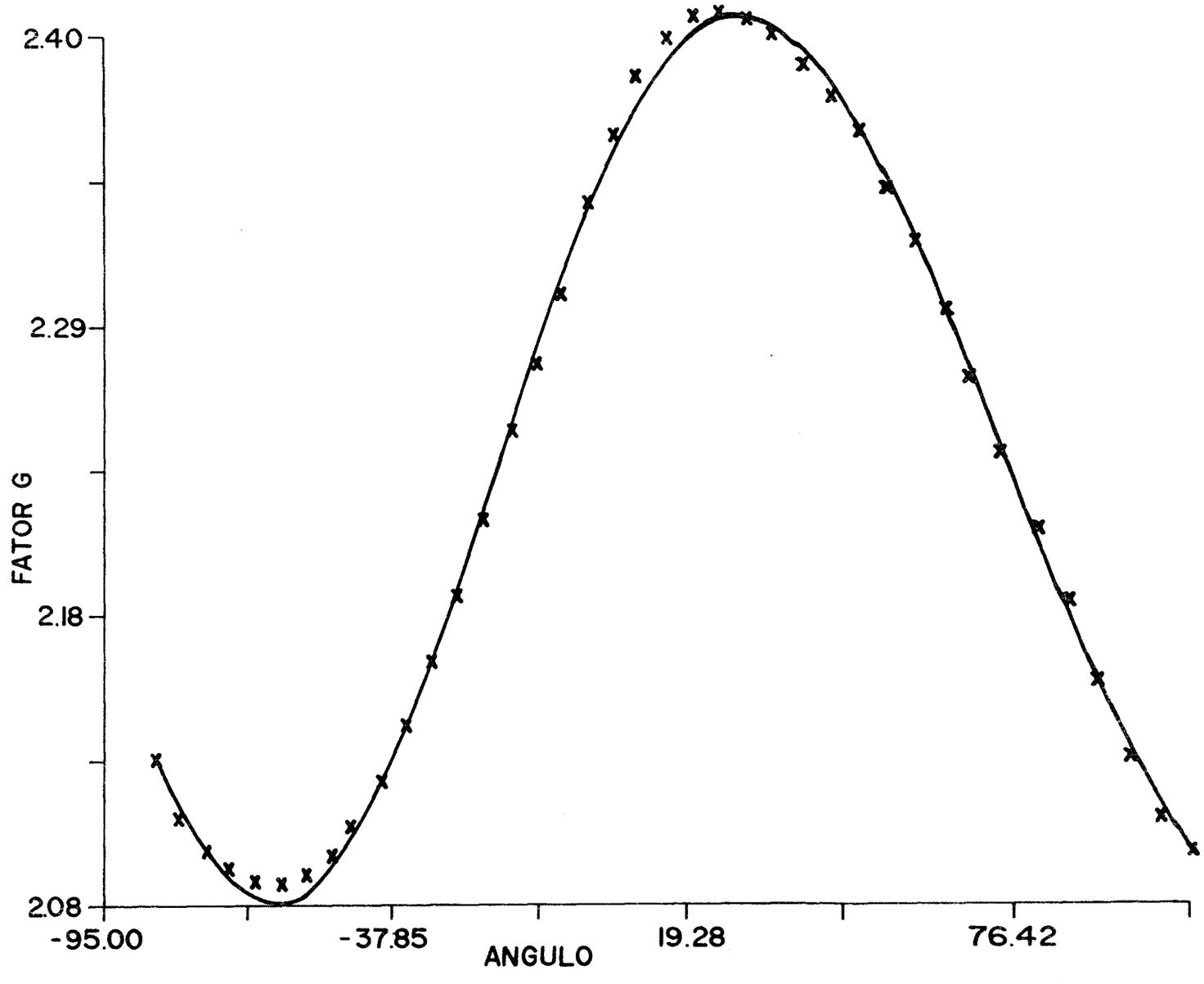


FIGURA 31-c) Variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ no plano bc, do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$.

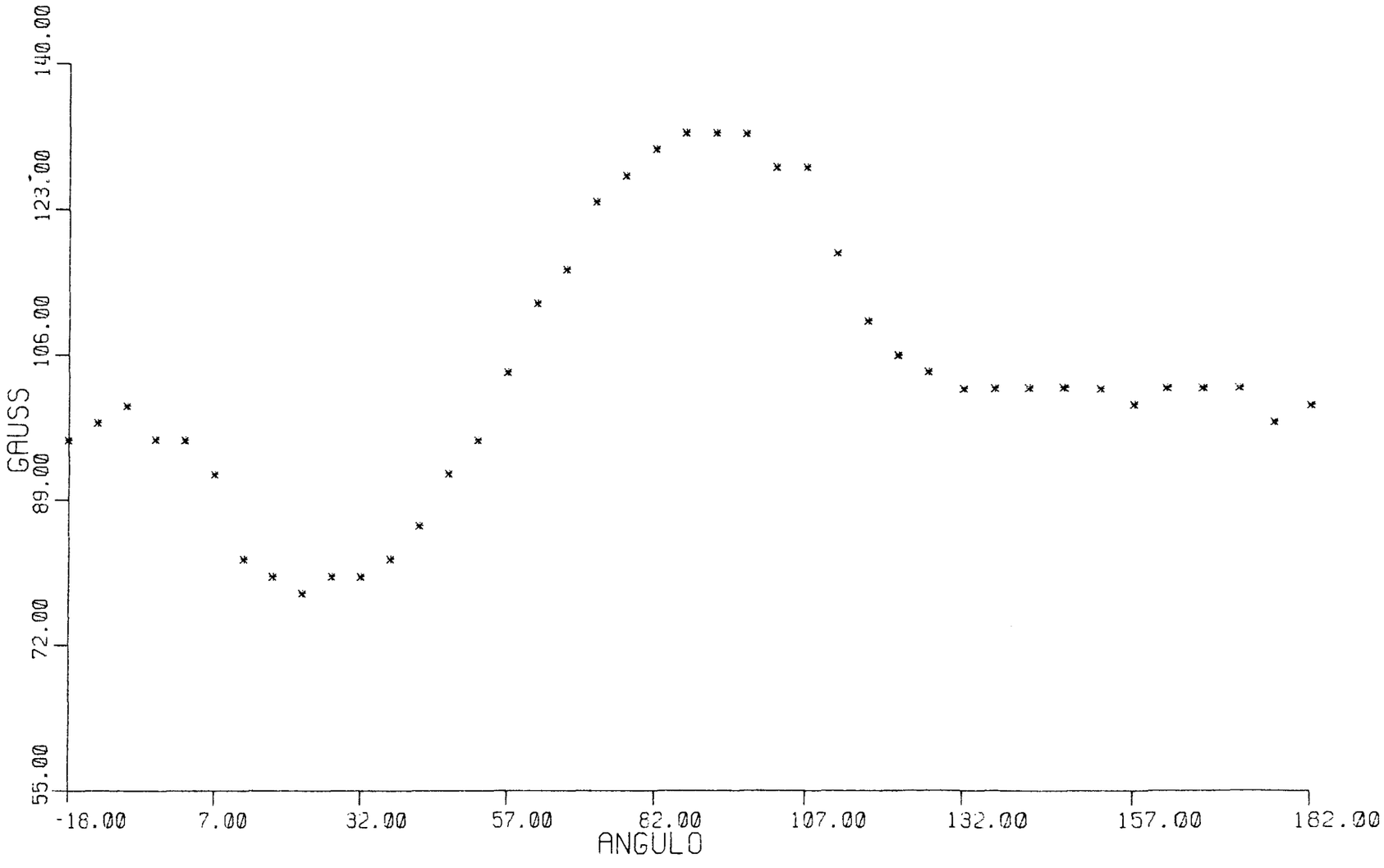


FIGURA 32-a) Variação angular da largura de linha (ΔH) no plano ab, do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$.

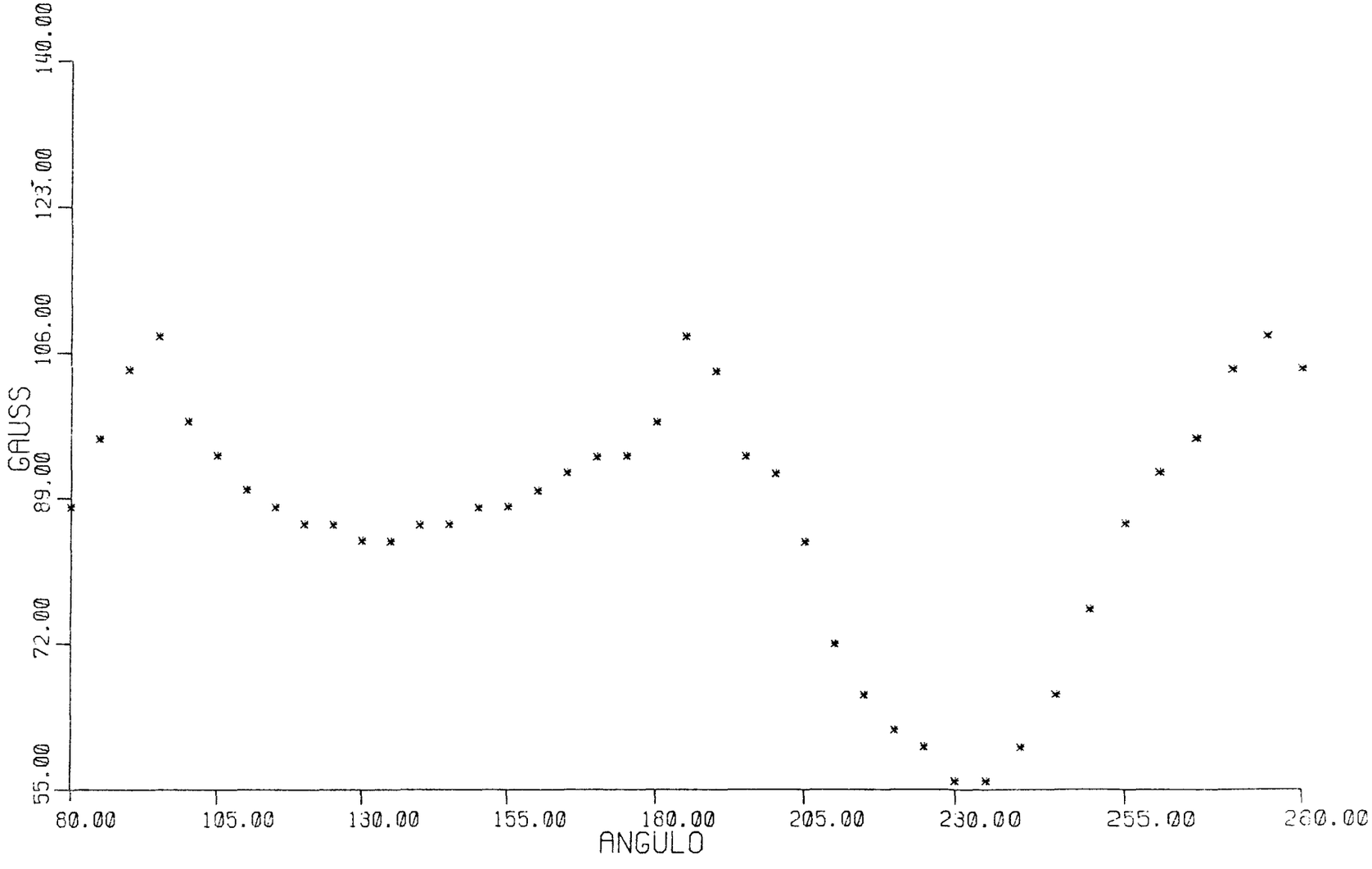


FIGURA 32-b) Variação angular da largura de linha (ΔH) no plano ac, do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$.

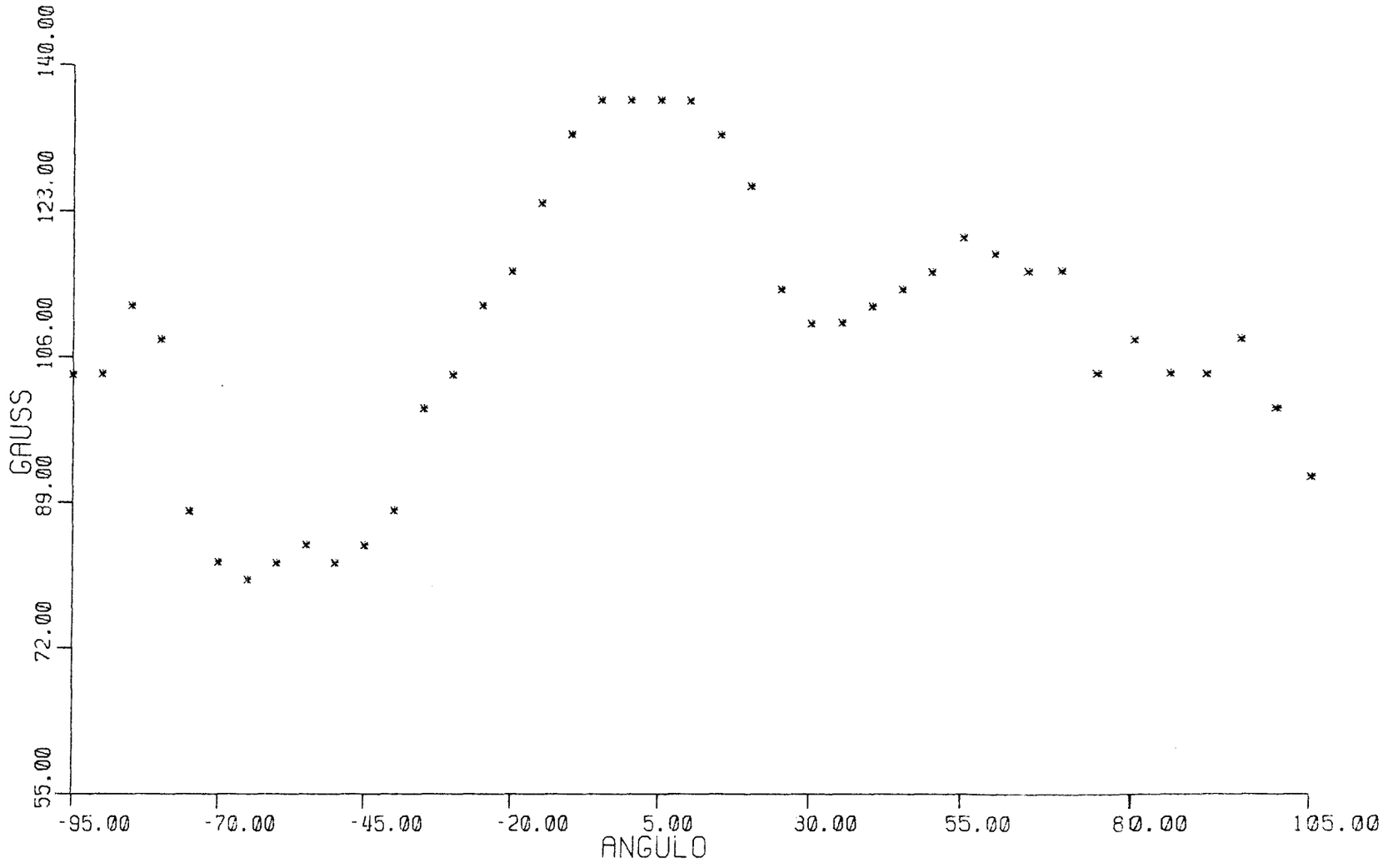


FIGURA 32-c) Variação angular da largura de linha (ΔH) no plano bc, do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$.

ções d-d do complexo em solução é apresentado na figura 33 (4). Observa-se uma banda de absorção larga, com o máximo em 880 nm, que normalmente é devida a superposição de três ou mais transições. Estas transições são algumas vezes resolvidas através de espectros do complexo em pó e outras quando é possível utilizar um monocristal. Neste caso o monocristal apresenta-se muito opaco o que impossibilita sua utilização. Assim tentou-se utilizar policristais do complexo para resolver as transições d-d.

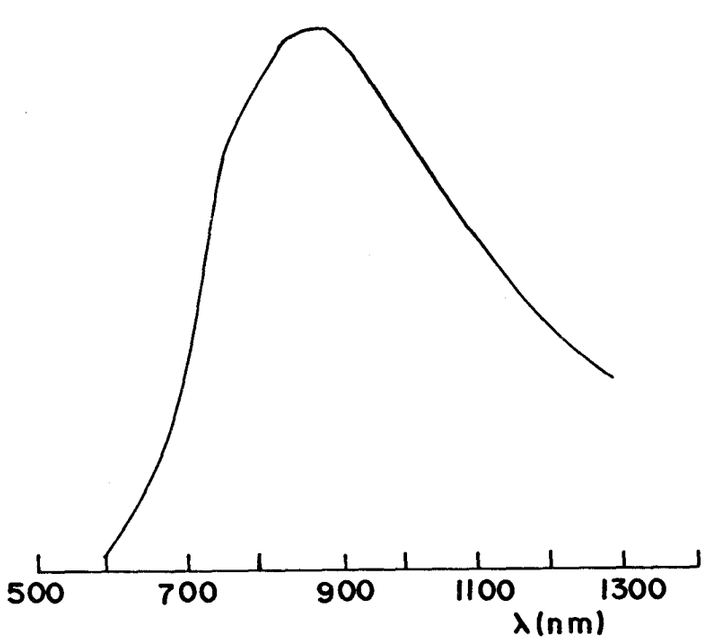


FIGURA 33 - Espectro de absorção do complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$ em solução de acetonitrila (4).

Para medidas de absorção eletrônica das amostras policristalinas deste complexo encontrou-se muita dificuldade devido ao espalhamento de luz muito acentuado e isto impossibilitou a obtenção de um espectro bem definido. Numa das tentativas de medida obteve-se o espectro mostrado na figura 34 e que será utilizado para algumas considerações.

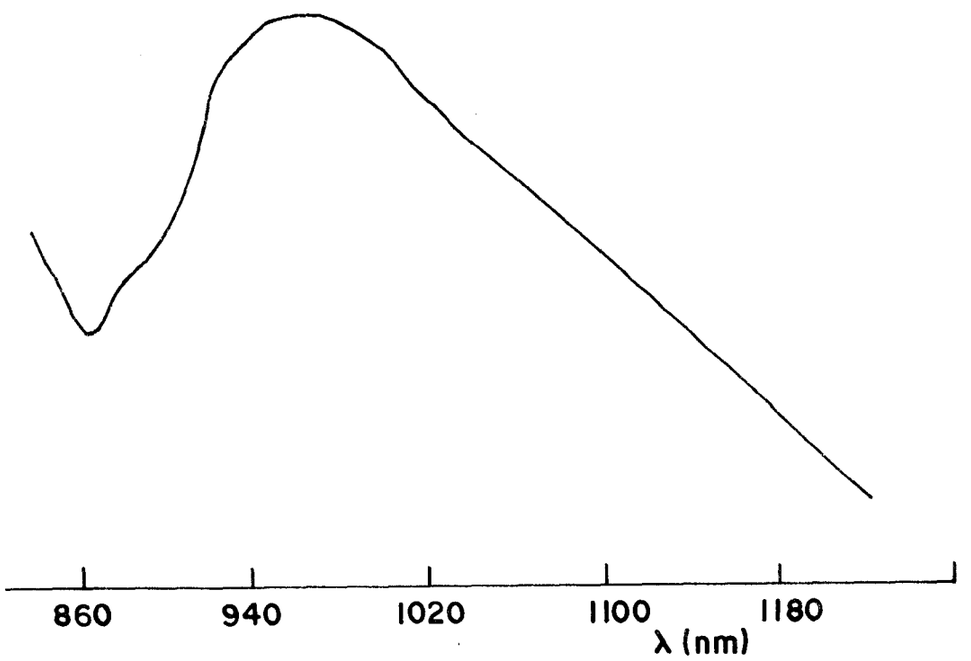
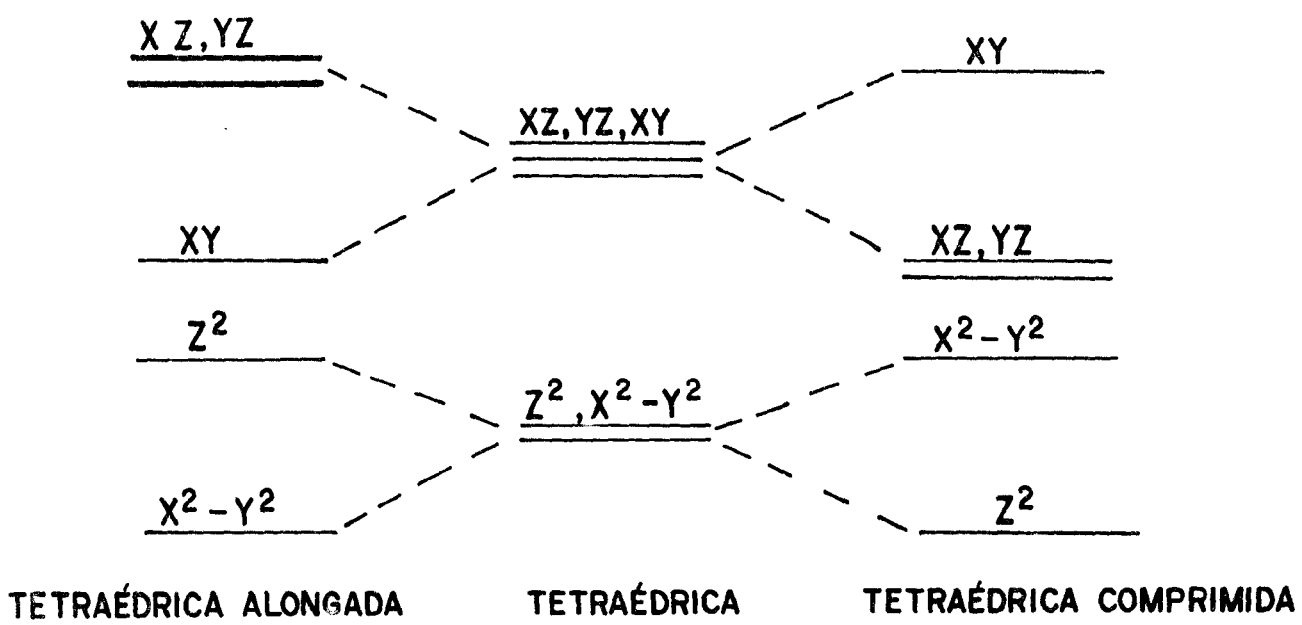


FIGURA 34 - Espectro de absorção de uma amostra policristalina do complexo $[CuC\ell_2(bdfpo)_2]$ em suspensão de fluorlube obtido por Mattioli, M.P.D. (56) no espectrofotômetro Beckman U.V.5270.

5.2.1.4- Determinação do estado fundamental do íon cobre(II)

Com base nos dados cristalográficos e de RPE e de cálculos de campo cristalino (51) que propõe o ordenamento dos níveis de energia orbital é proposto o estado fundamental para o íon Cu(II) no complexo.

Dos dados cristalográficos tem-se que o sítio do íon cobre(II) tem uma simetria tetraédrica distorcida, e Hathaway (51), com base em cálculos de campo cristalino propõe o seguinte ordenamento para os níveis de energia:



Supondo uma simetria tetraédrica alongada ter-se-ia como estado fundamental xz ou yz, já que o estado fundamental degenerado é geralmente removido por alguma forma de distorção Jahn--Teller ou pseudorotacional (51).

Usando teoria de perturbação obtém-se as autofunções com perturbações de 1ª ordem ($|\pm>$), que leva em conta o efeito dos estados excitados misturados ao estado fundamental via acoplamento spin-órbita, e atuando a hamiltoniana de Zeeman nesta função de onda é possível determinar a expressão para os componentes do tensor g e ver se há possibilidade de encontrar os valores obtidos experimentalmente com base nas expressões calculadas.

Tanto para o estado orbital xz como para yz, supostos como estado fundamental, os cálculos efetuados mostraram expressões para os componentes do tensor g que só seriam satisfeitas se os valores de g experimentais tivessem um caráter rômbico acentuado, dos quais um dos componentes deveria ter valor muito próximo de 2,0023 (g do elétron livre), e isto não foi observado experimentalmente. Ressalte-se também que estes estados fundamentais,

xz ou yz, não tem sido encontrado para complexos do íon Cu(II)[51].

Os cálculos supondo como estado fundamental o estado xy é apresentado a seguir.

Inicialmente calcula-se a função de onda com perturbações de 1ª ordem utilizando a expressão:

$$|\pm\rangle = |2,xy,\pm\rangle + \sum_{i,\alpha} \frac{\langle 2,i,\alpha|\lambda L.S|2,xy,\pm\rangle}{E_{xy} - E_i} |2,i,\alpha\rangle \qquad (54)$$

A interação spin-órbita pode ser expressa como:

$$\lambda L.S = \lambda L_z S_z + \frac{1}{2} \lambda L_x (S_+ + S_-) + \frac{1}{2i} \lambda L_y (S_+ - S_-) \qquad (55)$$

Assim usando a equação 55 e a tabela VII obtém-se as autofunções de 1ª ordem dado por:

$$|\pm\rangle = |2,xy,\pm\rangle \pm \frac{i\lambda}{E_{xy} - E_{x^2-y^2}} |2,x^2-y^2,\pm\rangle - \frac{i\lambda\,|2,zx,\mp\rangle}{2(E_{xy} - E_{xz})} \mp$$

$$\mp \frac{\lambda}{2(E_{xy} - E_{yz})} |2,yz,\mp\rangle \qquad (56)$$

TABELA VII - Operação do momento angular orbital nos orbitais d (48).

$\|\ >$	$L_x \|\ >$	$L_y \|\ >$	$L_z \|\ >$
xy	izx	-iyz	$-2i(1/2(x^2-y^2))$
yz	$i(1/2(x^2-y^2))+$ $+i\sqrt{3}(1/2\sqrt{3}(3z^2-r^2)$	ixy	-izx
zx	-ixy	$i(1/2(x^2-y^2))-$ $-i\sqrt{3}((1/2\sqrt{3})(3z^2-r^2))$	iyz
$1/2(x^2-y^2)$	-iyz	-izx	2ixy
$(1/2\sqrt{3})(3z^2-r^2)$	$-i\sqrt{3}yz$	$i\sqrt{3}zx$	0

A hamiltoniana de Zeeman é dada por:

$$H = \beta(L + g_e S)\ H \tag{57}$$

Assim calcula-se:

$$<\pm|\ L_z\ |\pm> = \mp \frac{4\lambda}{E_{xy}-E_{x^2-y^2}} \qquad <\pm|\ S_z\ |\pm> = \pm\frac{1}{2}$$

$$<\pm|\ L_x\ |\pm> = -\frac{\lambda}{E_{xy}-E_{xz}} \qquad <\pm|\ S_x\ |\pm> = \frac{1}{2}$$

$$<\pm|\ L_y\ |\pm> = \mp \frac{i\lambda}{E_{xy}-E_{yz}} \qquad <\pm|\ S_y\ |\pm> = \pm\frac{1}{2}i$$

Nos cálculos acima somente termos em 1ª ordem de λ foram considerados.

Portanto tem-se:

$$<\pm|\ H\ |\pm> = (\pm \frac{1}{2} g_e \mp \frac{4\lambda}{E_{xy}-E_{x^2-y^2}})\ \beta H_z \tag{58}$$

$$<\pm|\ H\ |\mp> = (\frac{1}{2} g_e - \frac{\lambda}{E_{xy}-E_{xz}})\ \beta H_x \pm i\ (\frac{1}{2} g_e - \frac{\lambda}{E_{xy}-E_{yz}})\ \beta H_y \tag{59}$$

Com base nas duas equações (58, 59) pode-se ter as energias para os dois estados de spins (± 1/2) e calculando a diferença de energias (ΔE) entre os dois estados de spins (± 1/2) pode-se obter a expressão para os três componentes do tensor g dados por:

$$g_z = g_e - \frac{8\lambda}{E_{xy}-E_{x^2-y^2}} \tag{60-a}$$

$$g_x = g_e - \frac{2\lambda}{E_{xy}-E_{xz}} \tag{60-b}$$

$$g_y = g_e - \frac{2\lambda}{E_{xy}-E_{yz}} \tag{60-c}$$

Os valores de g obtidos experimentalmente foram:

$g_1 = 2{,}0891$; $g_2 = 2{,}4554$ e $g_3 = 2{,}0767$

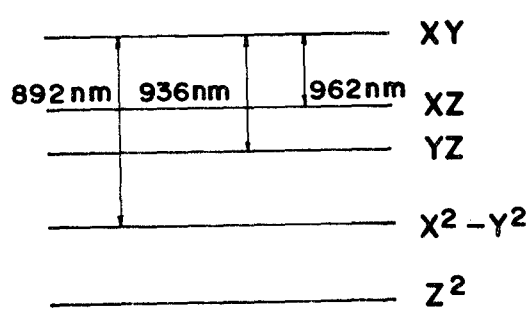
Portanto é coerente associar g_z a g_2 e g_x e g_y a g_1 e g_3 respectivamente ou não. O fato de g_1 e g_3 serem diferentes indica que os estados xz e yz não estão mais degenerados, como é proposto para o caso de simetria tetraédrica comprimida, já que alguma distorção adicional deve existir, como por exemplo a dis-

torção do ângulo tetraédrico que tem 139,3 ^{o} (tetraedro regular tem 109 ^{o}). Se os estados xz e yz não são degenerados as diferenças de energia $E_{xy} - E_{xz}$ e $E_{xy} - E_{yz}$ não são iguais e portanto g_x e g_y devem ser ligeiramente diferentes. O valor maior de g_z é esperado já que sua expressão apresenta um fator multiplicativo de λ quatro vezes maior que para g_x e g_y e as diferenças de energia para as três transições devem ser pequenas. Assim as 3 expressões* podem satisfazer plenamente os valores de g obtidos experimentalmente.

5.2.1.5- Cálculos dos fatores de redução orbital

Com base no espectro de pó (figura 34) do complexo e supondo existir 3 transições d-d, correspondentes aos comprimentos de onda 962, 936 e 892 nm e utilizando as expressões [60(a,b,c)] possível obter os fatores de redução orbital.

Assim pode-se associar as absorções citadas às seguintes transições:



* Nas expressões λ vale -828 cm^{-1} (para o íon de Cu(II) livre) e as diferenças de energia são valores positivos.

O ordenamento de xz e yz foi proposto ocasionalmente, poderia ser o inverso.

Assim, tem-se:

962 nm → = $1,04 \times 10^4$ cm^{-1}

936 nm → = $1,07 \times 10^4$ cm^{-1}

892 nm → = $1,12 \times 10^4$ cm^{-1}

λ (para o íon Cu(II) livre) = -828 cm^{-1}

$$g_z = g_e - r_z \frac{8\lambda}{E_{xy}-E_{x^2-y^2}}$$

$$g_x = g_e - r_x \frac{2\lambda}{E_{xy}-E_{xz}}$$

$$g_y = g_e - r_y \frac{2\lambda}{E_{xy}-E_{yz}}$$

onde r_x, r_y e r_z são os fatores de redução orbital e portanto tem-se:

$$2,4554 = 2,0023 + r_z \frac{8.828}{1,12 \times 10^4} \rightarrow r_z = 0,766$$

$$2,0891 = 2,0023 + r_x \frac{8.828}{1,07 \times 10^4} \rightarrow r_x = 0,561$$

$$2,0767 = 2,0023 + r_y \frac{2.828}{1,04 \times 10^4} \rightarrow r_y = 0,467$$

O fator de redução orbital expressa a razão entre o parâmetro de interação spin órbita efetivo e o parâmetro de interação spin-órbita do íon livre, ou seja:

$$r = \frac{\lambda_{ef}}{\lambda_{\text{íon livre}}}$$

Os valores diferentes para cada componente (x, y e z) obtidos mostra, mais uma vez, a anisotropia local.

A seguir será apresentado os cálculos dos fatores de redução orbital através de um procedimento diferente. Calcular-se-á o comprimento de onda correspondente às 3 transições d-d através das expressões |60(a,b,c)| usando os valores de g obtidos experimentalmente e utilizando o parâmetro de interação spin-órbita do íon livre nos cálculos. A seguir será calculado a razão entre os comprimentos de onda obtidos para as transições através dos "cálculos" e o comprimento de onda do complexo em solução. Isto é feito porque não há muita confiabilidade no espectro de pó apresentado e seria interessante comparar o resultado obtido, no qual ele foi utilizado, e o resultado a partir do espectro em solução no qual há total confiabilidade.

Portanto, tem-se:

$$2,4554 = 2,0023 + \frac{8.828}{E_{xy}-E_{x^2-y^2}}$$

$$E_{xy}-E_{x^2-y^2} = 14.619 \text{ cm}^{-1} \quad \text{e} \quad \lambda^{+*}_{z} = 684 \text{ nm}$$

$$r_z = \frac{\lambda^{+}}{\lambda^{+}_{\text{solução}}} = \frac{684}{880} = 0,777$$

---

* λ^{+} → comprimento de onda e não parâmetro de interação spin-órbita.

$$2,0891 = 2,0023 + \frac{2.828}{E_{xy}-E_{xz}}$$

$$E_{xy} - E_{xz} = 19.078\ cm^{-1} \rightarrow \lambda^{+} = 524\ nm$$

$$r_x = \frac{524}{880} = 0,595$$

$$2,0767 = 2,0023 + \frac{2.828}{E_{xy}-E_{yz}}$$

$$E_{xy} - E_{yz} = 22,258\ cm^{-1} \rightarrow \lambda^{+} = 449\ nm$$

$$r_y = \frac{449}{880} = 0,510$$

5.2.2- Discussão

A partir dos dados cristalográficos foi montado (tridimensionalmente) o sítio da ligação do cobre (conforme descrito na seção 4.2.2) e a forma obtida foi um tetraedro distorcido em direção à base formada pelos átomos Cℓ, O e O' (figura 29) e com uma distorção do ângulo tetraédrico que tem 139,3 ^{o} (tetraedro regular tem ~109 ^{o}).

Os dados obtidos das medidas de RPE revelaram tratar-se de um centro com simetria de caráter rômbico, ou seja, apresentou 3 componentes diferentes para o tensor $\bar{\bar{g}}_D$, onde 2 dos componentes apresentaram valores relativamente próximos (g_1 = 2,0891 e g_3 = 2,0767) quando comparados ao terceiro (g_2 = 2,4554), caracterizando assim uma simetria axial distorcida, o que concorda plenamente com os dados cristalográficos.

A variação angular da largura de linha (ΔH) |figura 32(a,b,c)| não apresentou o mesmo comportamento que a variação angular do tensor $\bar{\bar{g}}$ figura |31(a,b,c)| sugerindo ou uma interação en-

tre os centros, do tipo spin-spin (e não dipolar) ou a existência de 2 tipos de centros magnéticos ligeiramente não equivalentes, sobrepostos na largura de linha, já que em alguma extensão dos gráficos ($\bar{\bar{g}}$ e ΔH) existe concordância.

Para tentar resolver este tipo de dúvida, existência de dois centros magnéticos não equivalentes ou interação spin-spin, uma possibilidade seria efetuar as medidas em diferentes temperaturas e ver a dependência da largura da linha em baixas temperaturas.

Com base nos dados cristalográficos construiu-se o "modelo" tridimensional do sítio do íon de cobre(II) que possibilitou evidenciar a simetria tetraédrica distorcida para o sítio. Hathaway (51) propõe, com base em cálculos de campo cristalino o ordenamento para os níveis de energia para os casos de simetria tetraédrica e tetraédrica distorcida, por alongamento ou diminuição da distância entre o íon de Cu(II) e os ligantes. Nesse sentido o tipo de distorção que o tetraedro apresenta não é facilmente distinguível, se o fosse seria possível, a princípio propor o estado fundamental somente com base nos dados cristalográficos e de cálculos de campos cristalinos, assim utilizou-se também teoria de perturbação em conjunto com os dados de RPE para determinar o estado fundamental.

Para o caso de simetria tetraédrica alongada o estado orbital xz ou yz deveria ser o fundamental. Os cálculos efetuados levaram a expressões para o fator g, nos dois casos, que requeriam valores de g acentuadamente rômbico inclusive com um dos valores dos componentes de g muito próximo de 2,0023. Os valores de g obtidos experimentalmente apresentam um caráter rômbico, porém tendendo para axial com pequena distorção, mas nenhum dos componentes tem valor próximo de 2,0023. É conveniente citar também que estes estados, xz ou yz, não tem sido encontrado como fundamental

para o íon de Cu(II).

Para a simetria tetraédrica comprimida que propõe como estado fundamental xy as expressões obtidas para o fator g mostraram-se coerentes com os valores de g obtidos experimentalmente. Portanto é proposto o estado fundamental xy para o íon Cu(II) no complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$.

Os cálculos para os fatores de redução orbital, utilizando os dados do espectro de pó, mostraram também a anisotropia do campo cristalino e os valores obtidos são plenamente coerentes com o tipo de simetria do complexo e com os valores de g obtidos.

No entanto já que não há confiabilidade total no espectro de pó obtido tentou-se uma maneira alternativa para efetuar os cálculos dos fatores de redução orbital e que conseqüentemente poderia também revelar se realmente há ou não alguma confiabilidade no resultado do próprio espectro da amostra policristalina.

A utilização do comprimento de onda do máximo de absorção do espectro da amostra em solução como parâmetro de referência para esses cálculos é proposto considerando que ele representa o valor médio da superposição das transições d-d existentes. E da forma como descrito na seção 5.2.1.5, os resultados obtidos foram muito próximo dos obtidos utilizando os dados do espectro da amostra em pó. Assim sendo propõe-se que existe confiabilidade tanto nos valores dos fatores de redução orbital obtidos como no espectro de pó utilizado.

5.3- Hidratação de hemoproteínas

5.3.1- Resultados

5.3.1.1- Medidas de RPE

As medidas de RPE das amostras foram efetuadas à tempe

ratura de -156 ^{o}C, e alguns espectros são mostrados nas figuras (35 e 36).

Os espectros são caracterizados por absorções com valores de g em torno de 6; 4,3 e 2. A absorção em $g \simeq 6$ é devida a componente perpendicular do estado de spin 5/2 do íon Fe(III) em campo cristalino axial; em, 4,3 é associada também ao estado de spin 5/2 porém em um campo cristalino rômbico e as absorções em torno de 2 devido ao estado de spin 1/2 do íon Fe(III) em um campo cristalino axial ou rômbico e pela absorção de um radical criado, com g= 2,01 (linha de absorção bem estreita (~10 Gauss)).

Das diferenças observadas nos espectros obtidos em diferentes porcentagens de hidratação tentou-se relacionar alguns parâmetros de forma que pudessem traduzir aspectos particular e de interesse das amostras. Convencionou-se chamar de I_1 a intensidade da linha de absorção e ΔH_1 a sua largura em $g \simeq 6$; I_2 a intensidade da linha de absorção e ΔH_2 a sua largura em g= 4,3 e I_3 a intensidade da linha de absorção em g= 2,01 (do radical) conforme mostra as figuras 36a e 36b.

Os parâmetros utilizados foram: $g_{\perp}(\simeq 6)$, ΔH_1, a razão $I_3/(I_1 + I_2)$ e a razão S_2/S_1 onde S_2 é dado por $((\Delta H_2)^2 . I_2)$ e $S_1 = (\Delta H_1)^2 . I_1$ e representam em uma primeira aproximação, as áreas das linhas de absorções em $g \simeq 4,3$ e $g \simeq 6$ respectivamente.

5.3.1.2- Meta hemoglobina bovina

Os valores medidos de g, para a linha de absorção do estado de spin 5/2 do íon Fe(III) em campo cristalino axial ($g_{\perp}$), apresentaram alterações para as amostras em diferentes porcentagens de hidratação. Foi encontrado um valor máximo de g = 5,79 e um mínimo de g = 5,65 onde o valor máximo é observado nas amostras mais secas e o menor nas mais úmidas, porém um comportamento con-

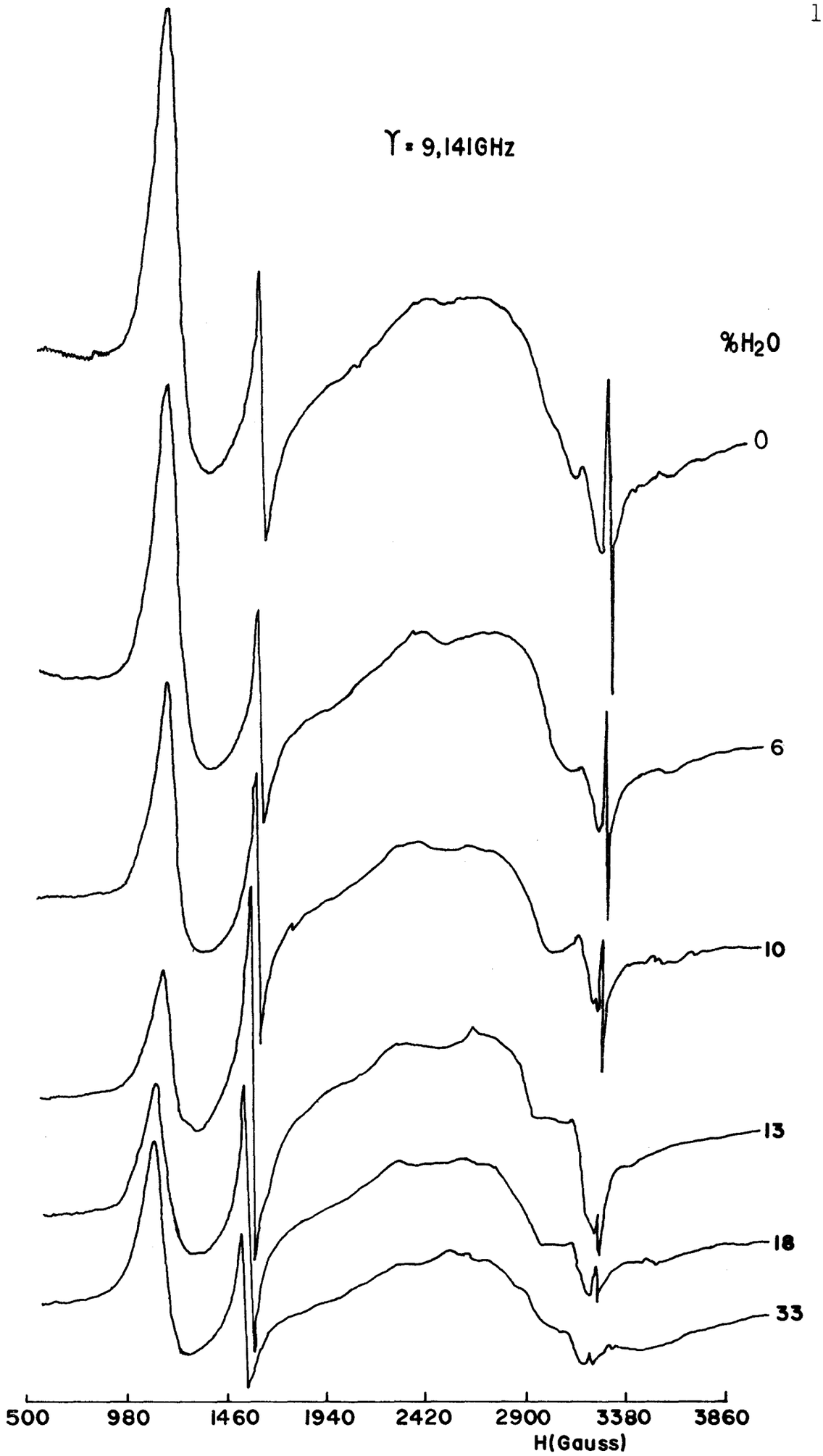


FIGURA 35.- Espectros de RPE para metahemoglobina bovina em diferentes graus de hidratação.

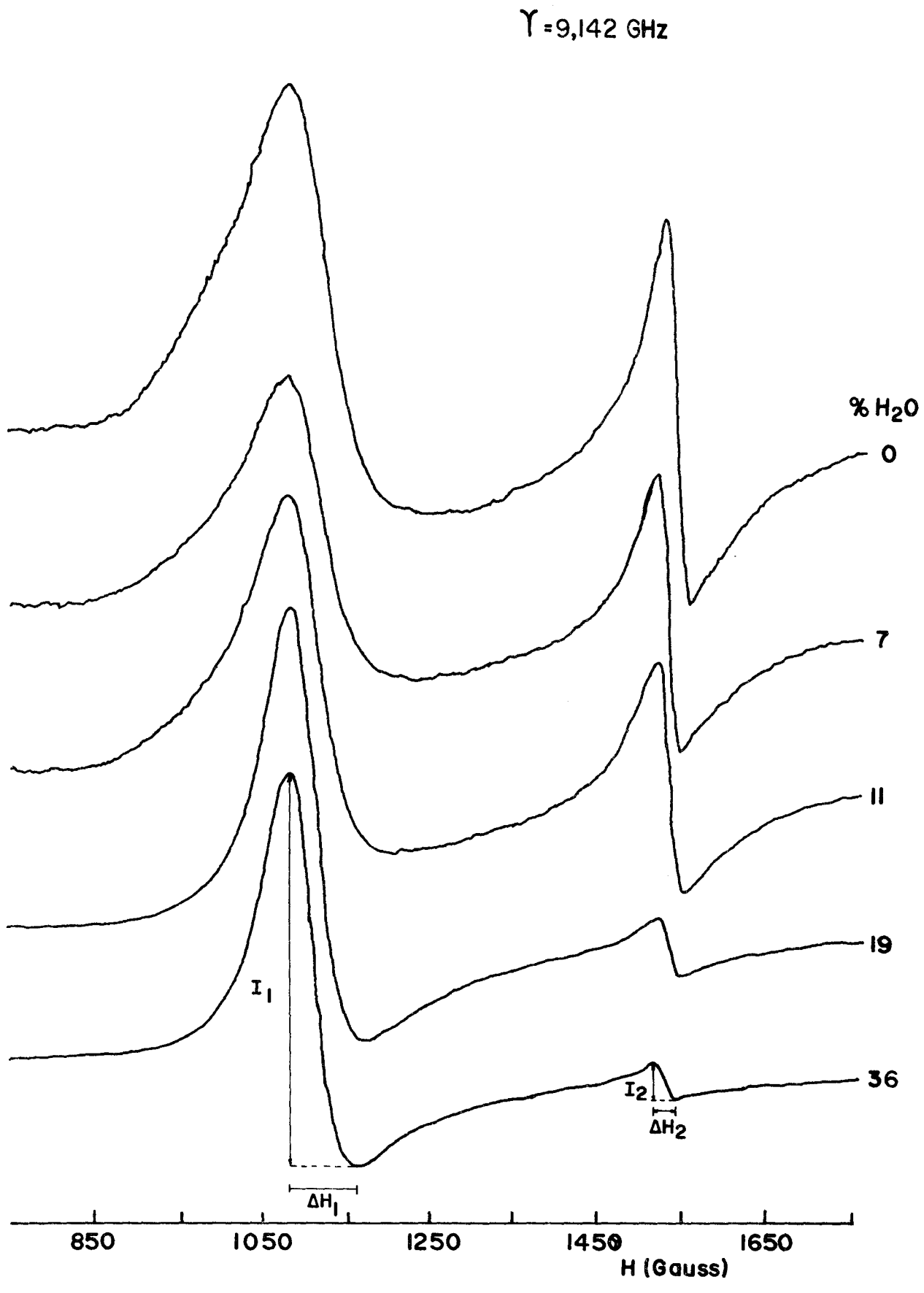


FIGURA 36-a) Espectros de RPE para a metamioglobina equina em diferentes graus de hidratação, em campo baixo

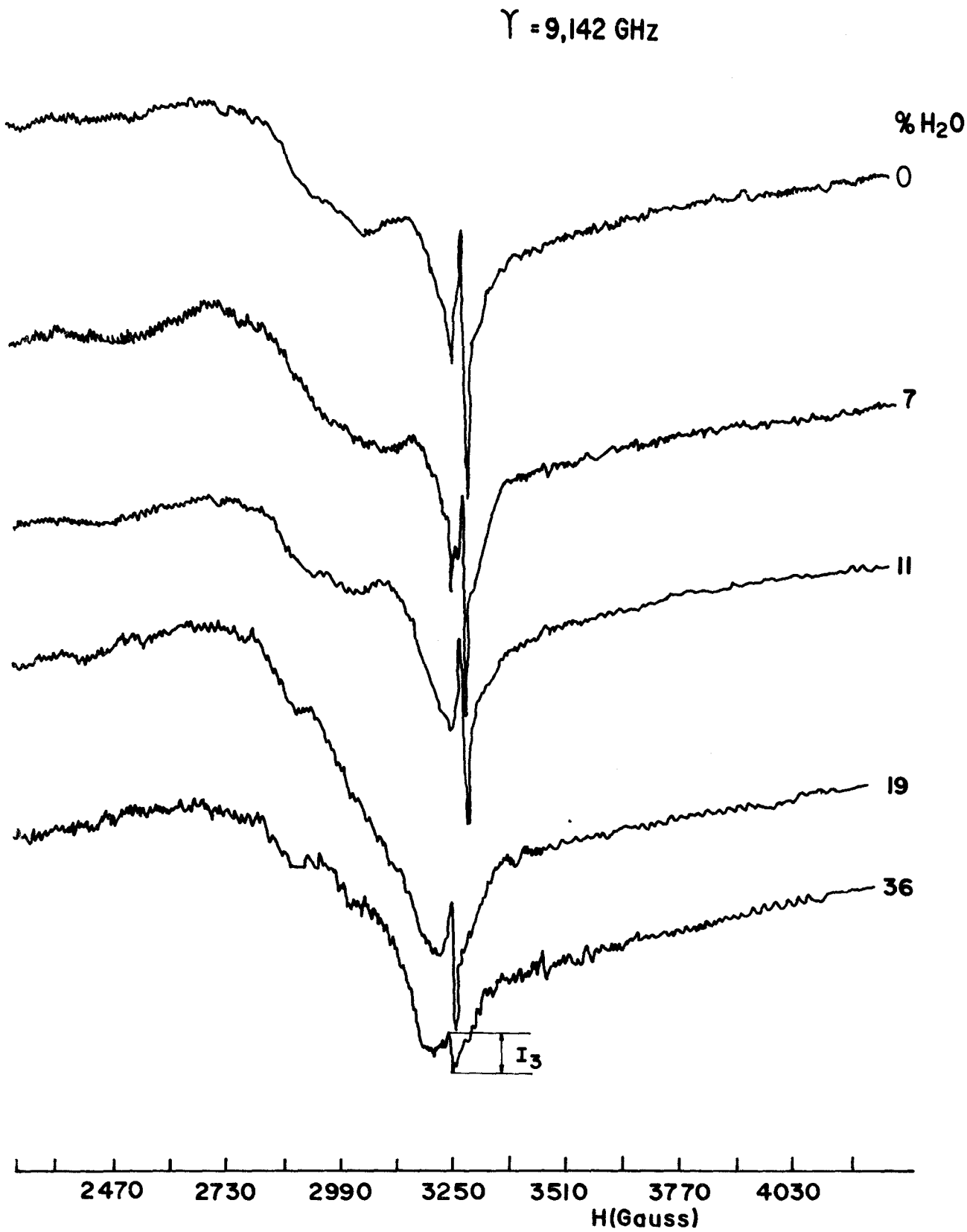


FIGURA 36-b) Espectros de RPE para a meta Mb equina em diferentes graus de hidratação, em campo alto.

tínuo não foi obtido ou seja não parece existir uma correlação monotônica.

Comportamento análogo é observado para a largura de linha desta absorção (ΔH_1) que tem um máximo de 200 Gauss e um mínimo de 150 Gauss, observado nas amostras mais secas e amostras mais úmidas, respectivamente, e que da mesma forma que a variação de g_1, não apresenta uma correlação monotônica.

A linha de absorção em g próximo a 4,3 manteve-se inalterado com o grau de hidratação, e teve como valor mais preciso g = 4,28. Para a linha de absorção do radical o valor de g igual a 2,01 também manteve-se inalterado com a hidratação.

As intensidades das linhas de absorção (I_1, I_2 e I_3) variaram acentuadamente com a porcentagem de hidratação, conforme pode ser verificado nos espectros mostrados.

Observando-se, dos espectros, que a intensidade de I_3 decrescia monotonicamente com a hidratação foi proposta uma curva de "calibração" que poderia ajustar os valores obtidos experimentalmente, conforme descrito na seção 4.3.1.

A curva de "calibração" foi obtida colocando em gráfico os valores de $I_3/(I_1 + I_2)$ em função da hidratação experimental e traçando uma curva média que melhor se adaptasse aos pontos experimentais, figura 37.

O gráfico S_2/S_1 x hidratação, figura 38, mostra um máximo em uma região de hidratação entre 11 e 13%.

5.3.1.3- Meta mioglobina equina

Analogamente aos resultados obtidos para a meta Hb, os valores de g das linhas de absorções em g próximo a 4,3 e 2,0 (radical) mostraram-se constantes nas diversas porcentagens de hidratação medidas, onde os valores mais preciso foram 4,29 e 2,01 res

pectivamente.

O gráfico da figura 39 mostra o comportamento de g_1 (≈ 6) em função da hidratação, que diferentemente da meta Hb, apresenta um comportamento monotônico. O valor máximo de g obtido foi 5,801 e o menor 5,716 referente à amostra mais úmida e a mais seca respectivamente.

As intensidades das linhas de absorções (I_1, I_2 e I_3) mostraram, como na Hb, variações acentuadas, como é mostrado nas figuras 36a e 36b.

Interessante também ressaltar o comportamento de ΔH_1 que mostrou uma variação entre 80 e 170 Gauss onde o valor maior é observado com a amostra mais seca e o menor com a mais úmida, e além disso pode ser traçada uma curva de "calibração", análoga à da Hb, com base na variação de ΔH_1 com a hidratação, conforme mostra a figura 40.

O comportamento da razão $I_3/(I_1 + I_2)$ versus hidratação experimental (figura 41) apresentou um aspecto semelhante a do ΔH_1 x hidratação experimental e pode também ser utilizada como curva de "calibração".

O gráfico da razão S_2/S_1 versus hidratação (figura 42) mostrou um máximo, menos nítido que o da Hb, em um grau de hidratação de ~ 8%.

5.3.2- Discussão

Os parâmetros medidos e relacionados das medidas de RPE mostraram-se de uma utilidade significativa.

A relação $I_3/(I_1 + I_2)$ que serviu como base para uma curva de "calibração" traz em si uma propriedade notável ou seja a partir da medida de RPE inferir sobre a porcentagem de hidratação de uma amostra. Isto sem dúvida é um resultado relevante po-

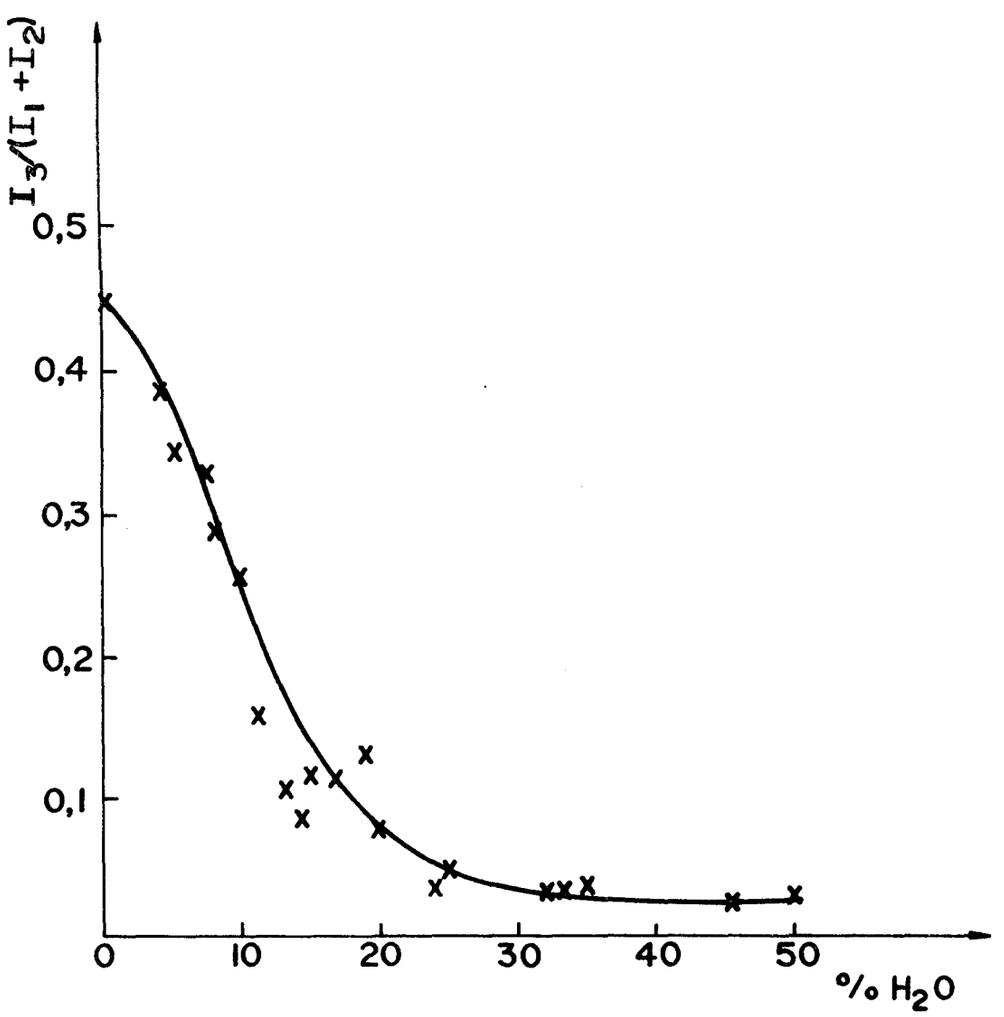


FIGURA 37 - Gráfico de $I_3/(I_1 + I_2)$ em função do grau de hidratação para meta Hb bovina.

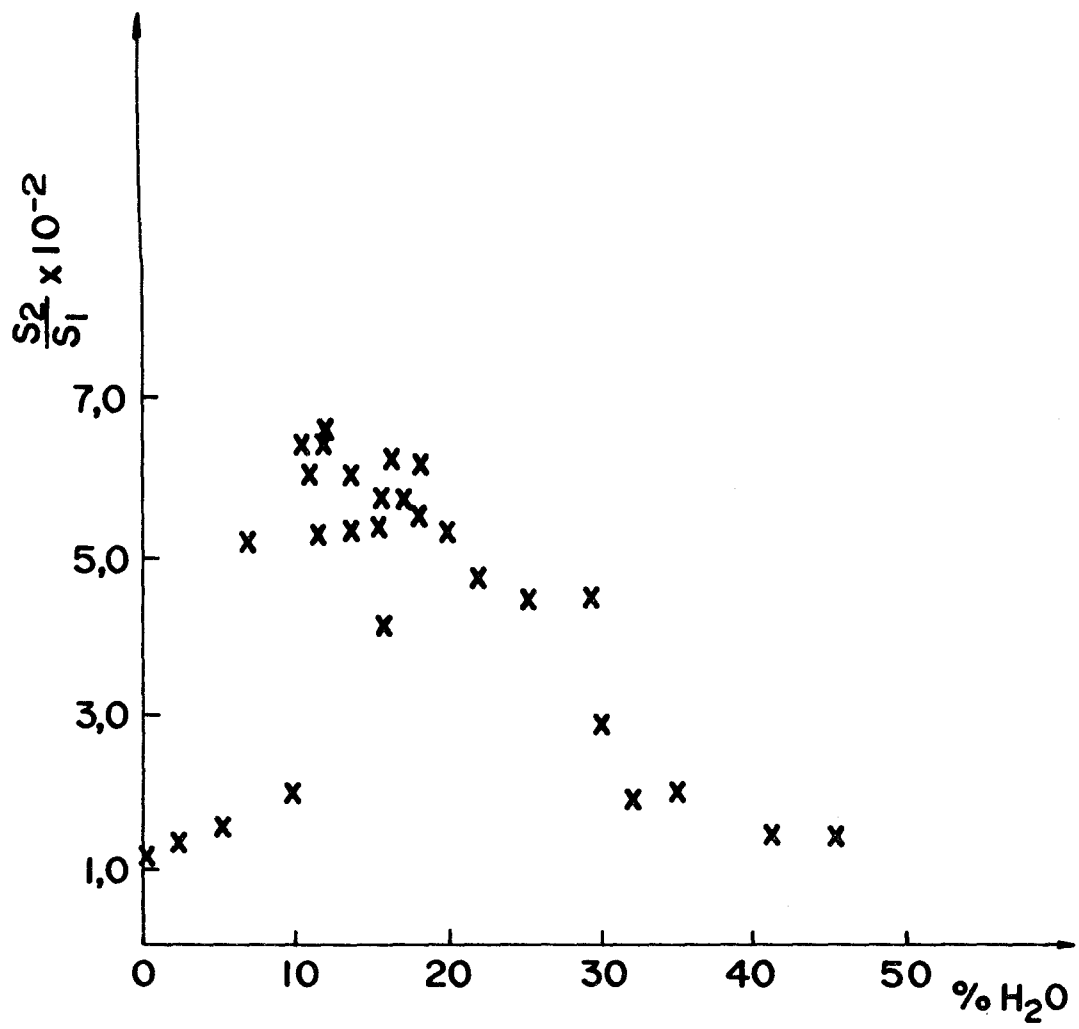


FIGURA 38 - Gráfico de S_2/S_1 em função do grau de hidratação para meta Hb bovina.

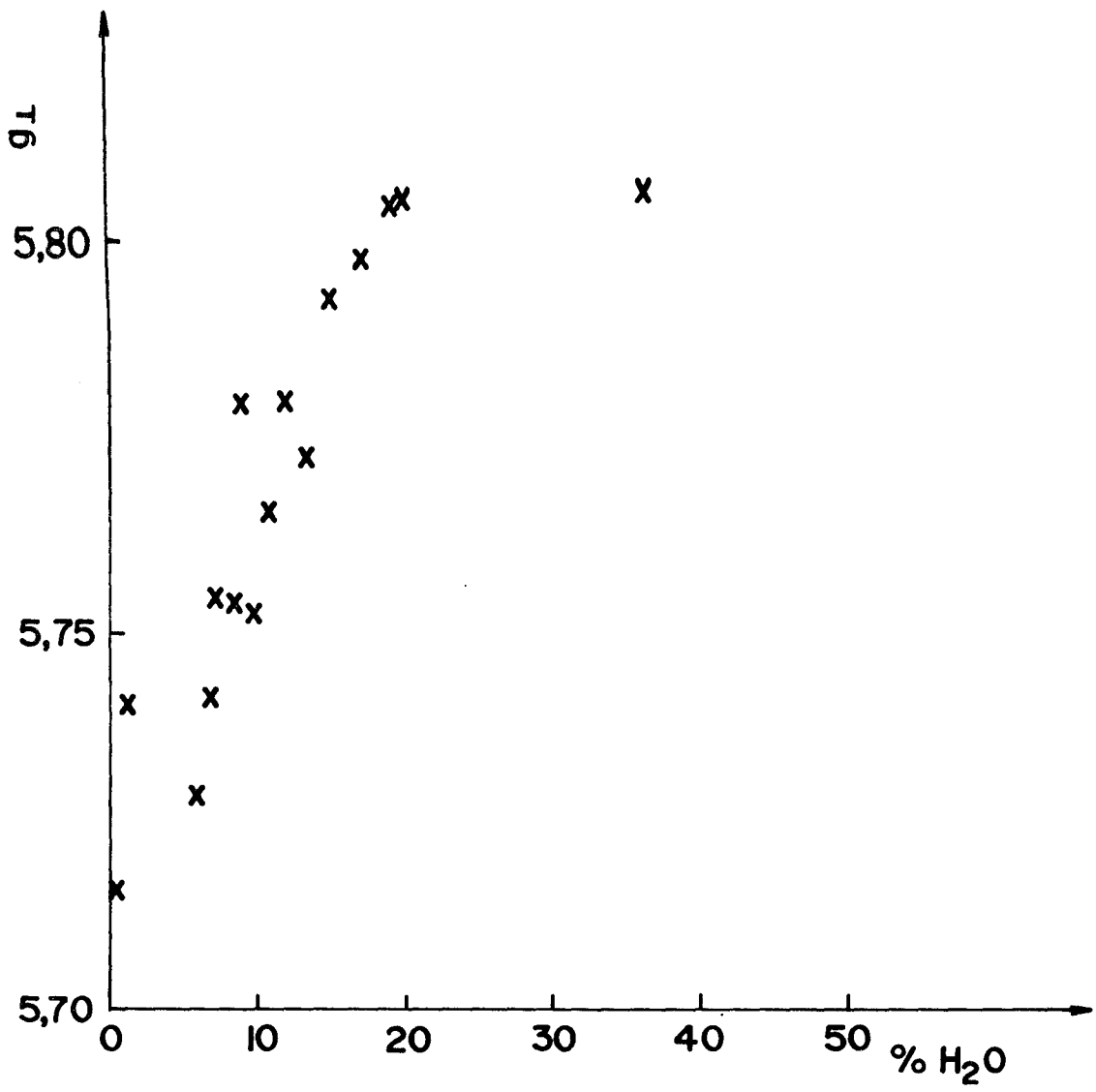


FIGURA 39 - Gráfico de $g_{\perp}$ em função do grau de hidratação para meta Mb equina.

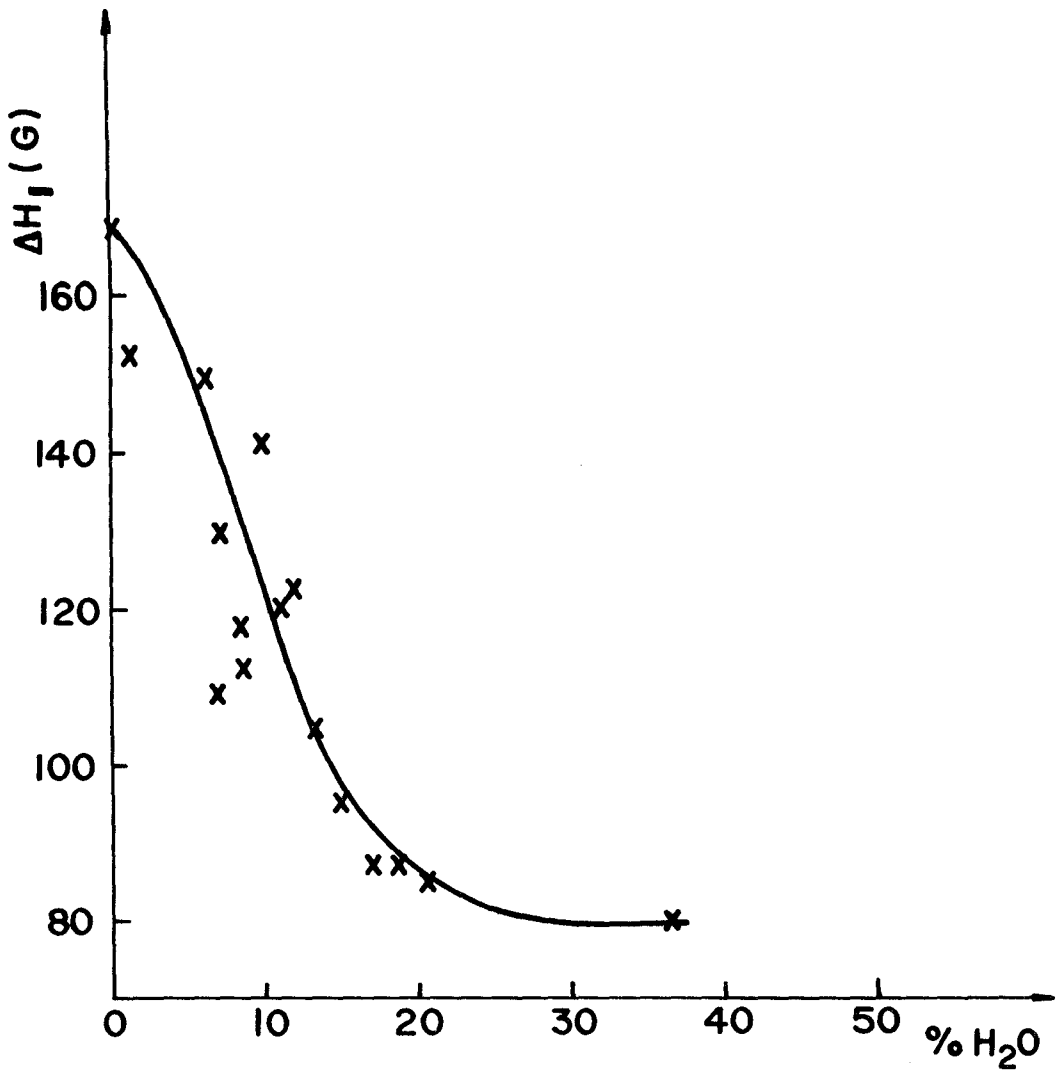


FIGURA 40 - Gráfico de ΔH_1 em função do grau de hidratação para meta Mb equina.

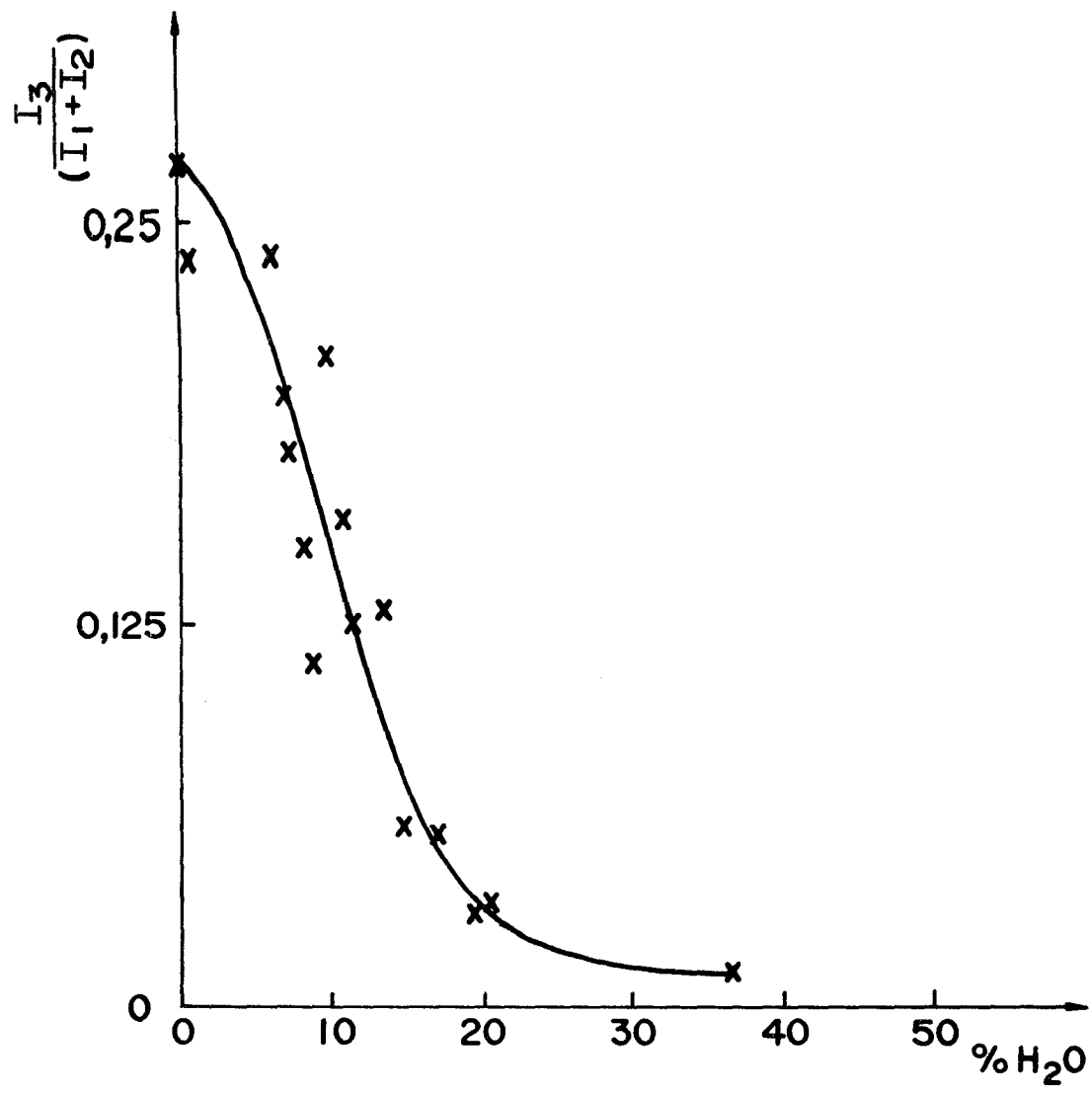


FIGURA 41 - Gráfico de $I_3/(I_1 + I_2)$ em função do grau de hidratação para meta Mb equina.

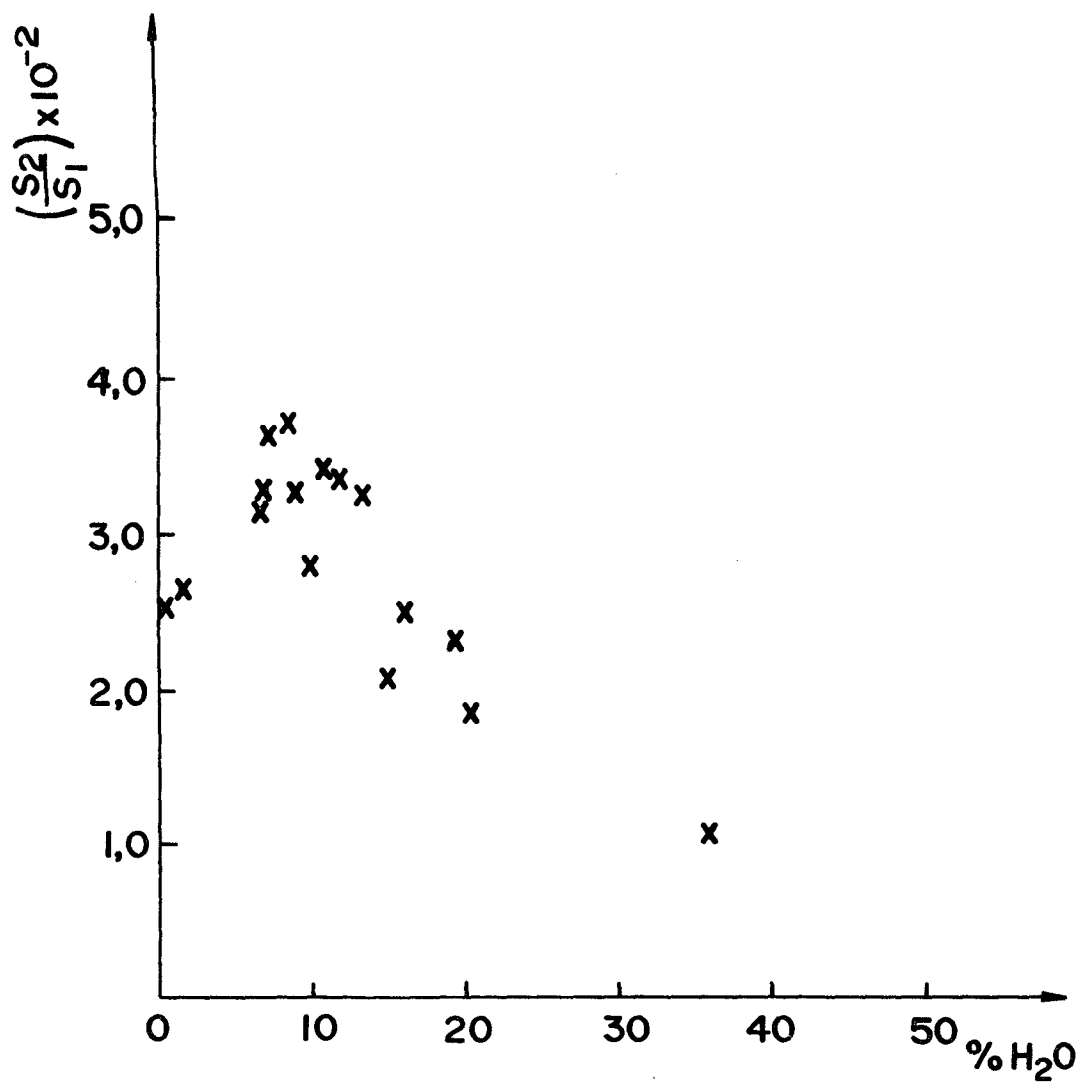


FIGURA 42 - Gráfico de S_2/S_1 em função do grau de hidratação para meta Mb equina.

rém é importante conhecer a origem dos termos que constituem a relação.

Para construir a curva de "calibração" partiu-se do observado que I_3 decrescia com a porcentagem de hidratação. Portanto, primeiramente tentar-se-á conhecer a origem da absorção em g = 2,01.

Em uma das amostras efetuou-se medidas de RPE em diversas temperaturas e constatou-se que a linha de absorção em g= 2,01 estava presente mesmo à temperatura ambiente o que descartou a possibilidade de estar ligada à absorção do íon Fe(III).

T. Yonetani e H. Scheleyer (57) observaram em medidas de RPE, a -196 °C, de citocromo c peroxidase, em solução 6 mM em fosfato tampão 0,1 M, e em policristais secos, uma linha de absorção estreita em g = 2,00 que segundo eles era derivada de um radical livre ocasionalmente encontrado nas preparações da enzima. Esta absorção foi reconhecida com um excelente padrão interno de calibração do valor do campo magnético (g "marker").

Pelas características (largura de linha (10 G), valor de g (2,01), e existência em temperatura ambiente) a linha de absorção, por nós observada em g = 2,01, certamente também é devido a algum radical criado na desidratação das hemoproteínas (Hb e Mb). No entanto, diferentemente que no citocromo c peroxidase, em todas as amostras policristalinas medidas observou-se tal linha de absorção e em solução nunca foi detectada.

Apesar de conhecida a origem da linha de absorção, o mecanismo pelo qual o radical é formado não foi possível ser estabelecido e será objeto de estudos posteriores.

A absorção em g ≈ 6 ($g_\perp$) é sabidamente devido à componente perpendicular do estado de spin 5/2 em campo axial do íon Fe(III) da hemoproteína em estudo e sua intensidade decresce consideravelmente na desidratação, e a largura de linha para a pro-

teína desidratada é maior que da hidratada.

A variação da largura de linha, em $g \approx 6$, deve estar relacionado a desvios da simetria axial do sítio do íon Fe(III) (58). devido a alterações na conformação da proteína desidratada.

A absorção em $g = 4,3$ é devido ao íon Fe(III), estado de spin (5/2) sujeito a um campo cristalino rômbico (52). Esta linha de absorção pode estar ligada a mudanças de conformação (ou desnaturação) da proteína devido a retirada das moléculas de água, na secagem, o que alterou a simetria de grupos heme, no qual o íon Fe(III) ficou sujeito a um campo cristalino rômbico, sendo portanto responsável pela absorção citada.

Quando a proteína é hidratada novamente nota-se a redução ou desaparecimento desta linha de absorção (em $g = 4,3$) o que caracteriza o caráter reversível da "desnaturação". O sinal remanescente que eventualmente aparece em solução é devido às proteínas que não tem sua conformação nativa recuperada.

O decréscimo na intensidade de I_1 com a desidratação é acompanhado pelo surgimento da linha de absorção em $g \approx 4,3$ e também pelo aparecimento de absorções com g próximo de 2, que provavelmente sejam devido a componentes de baixo spin (1/2) do íon Fe(III).

Nota-se que em solução onde I_1 é muito intenso, I_2 é mínimo ou eventualmente nem é detectado e também as absorções com g próximo de 2 tem suas intensidades reduzidas ou nulas em solução. Amostras em diferentes graus de hidratação têm as intensidades das linhas de absorção diferentes também. Com base nessas observações é possível sugerir existir uma interconversão de simetrias entre os sítios do íon Fe(III).

Assim, supondo correta a interconversão de simetrias para os centros paramagnéticos, a soma das intensidades I_1 e I_2 poderia fornecer um valor aproximadamente constante e foi dessa ma-

neira utilizado, juntamente com I_3, para obtenção dos pontos da curva de "calibração". Pensou-se utilizar a soma $(S_1 + S_2)$ como valor constante, em vez de $(I_1 + I_2)$, mas esta apresentava uma variação acentuada e foi preterida.

Essa interconversão de simetrias poderia ser exatamente comprovada se fosse possível efetuar com uma mesma amostra várias medidas em diferentes graus de hidratação. Calculando as áreas das curvas de absorção (incluindo também as absorções com g próximo de 2), já que são proporcionais ao número de spins responsáveis pela absorção, a soma delas deveria ser constante para todas as medidas e diferiria apenas nas contribuições individuais de cada linha de absorção, comprovando assim a interconversão de simetrias.

A construção de um "porta amostra" adequado, que possibilite efetuar o experimento citado acima, é nosso propósito e será utilizado na continuação desses estudos.

Um problema adicional, para a comprovação exata da interconversão de simetria, é a resolução completa das absorções com g próximo de 2, o que também será alvo de estudos futuros.

O gráfico da relação S_2/S_1 em função da hidratação (figura 38) mostra um máximo em uma hidratação entre 11 e 13%, para a meta Hb.

O fenômeno onde propriedades físicas e químicas de proteínas dependem fortemente do grau de hidratação tem sido observado em uma variedades de experimentos. O aspecto característico deste comportamento é a existência de um valor de hidratação crítica. Acima e abaixo deste valor condições físicas e químicas diferentes parecem prevalecer. Este fato parece estar relacionado a uma quantidade mínima de adsorção de moléculas de água necessária para induzir uma variação conformacional em direção a estrutura nativa.

Podem ser citados vários trabalhos que fazem referência à hidratação crítica (hc):

- medidas de condutividade protônica (Maricic "et alii" (5) -
  - hc= 18% (Hb bovina)

- medidas de dispersão dielétrica (G. Brausse "et alii" (6) -
  - hc= 16,5% (Hb equina)

- dependência da constante dielétrica (D. Rosen) (7) -
  - hc= 24,6 (albumina de soro bovino) e hc= 23,5 (mioglobina de cachalote)

- dependência da constante dielétrica (Takashima e Schwan (59) -
  - hc= 0,10 (ovalbumina)

- isotermas de adsorção (G. Brausse "et alii" (6) -
  - hc= 0,12 (Hb equina)

- efeito Hall (Chai,S.Y. e Vogelhut, P.O) (9) -
  - hc= 0,13 (Hb bovina)

Os diferentes valores de hidratação crítica obtidos podem ser devido aos seguintes fatores: composição e conformação específica das diferentes proteínas consideradas; medida exata do conteúdo de água; e tipo de técnica e parâmetro físico utilizado.

Comparando os dados obtidos da literatura com os dados obtidos, por nós, com base na relação S_2/S_1 é muito provável que o valor de ~13% de hidratação, onde tem-se um máximo para a relação S_2/S_1 (figura 38) trata-se da hidratação crítica para a meta Hb bovina detectada através da medida de RPE convencional.

O comportamento da relação S_2/S_1 x hidratação apresenta duas tendências diferentes, abaixo e acima da hidratação crítica. Abaixo da hidratação crítica, à medida que aumenta a quantidade de água adsorvida há um aumento no número de sítios com simetria rômbica (aumento de S_2). Acima deste valor nota-se um decréscimo no número de sítios com simetria rômbica (diminue S_2) até que em solução este número de sítios é muito pequeno.

G. Brausse e colaboradores observaram que a variação de volume da hemoglobina equina liofilizada durante adsorção de água aumenta lentamente na variação do grau de hidratação até 12% (hidratação crítica por eles observada através de estudos com isotermas de adsorção), contudo aumenta mais rapidamente na variação de 12 a 24% que seria esperado se esta variação fosse meramente devido a quantidade de água líquida ou gelo adicionada. Isto foi explicado considerando que acima da hidratação crítica a variação de volume acentuada ocorre devido ao aumento de volume da própria proteína, que tem uma mudança de conformação em direção a estrutura nativa hidratada, a qual tem um volume maior que a desidratada (37).

O resultado por nós obtido, máximo da relação S_2/S_1 em torno de 13%, pode ser explicado considerando que acima deste valor condições próximas das de soluções existem e há um aumento considerável de sítios que obtêm sua configuração nativa hidratada, que havia sido perdida com a desidratação, e dessa forma há um decréscimo na absorção em g = 4,3.

Em um estado completamente seco (artificial), a proteína provavelmente tem uma conformação diferente da nativa, inteiramente no estado hidratado, pois a camada de hidratação é considerada ser (em adição à interações hidrofóbicas da cadeia peptídica) parte integrante da estrutura terciária da proteína. Um argumento para este conceito é, por exemplo, a forte dependência com a hidratação da susceptibilidade magnética da hemoglobina observada

por Havemann e Haberditzl (8).

Como o estado eletrônico do ferro é suposto ser determinado pela conformação da proteína e vice-versa (60), uma variação no estado do ferro implica numa variação da estrutura terciária pertinente a uma variação no grau de hidratação.

Nossos resultados sugerem que a alteração na estrutura terciária ocasionada pela desidratação traz alterações no sítio do Fe(III) (heme). Essas alterações são traduzidas em mudanças na simetria do sítio, de axial para rômbica, e na intensidade do campo cristalino, de campo baixo para campo alto, alterando assim o estado de spin de 5/2 para 1/2.

É possível que essas alterações ocorram simultaneamente para alguns sítios, ou seja estes tem alterado o estado de spin (de 5/2 para 1/2) e a simetria (axial para rômbica), e para outros isoladamente, ou seja, mudança apenas na simetria ou apenas no estado de spin. Como conseqüência dessas alterações tem-se o surgimento da linha de absorção em g= 4,3 (estado de spin 5/2 com simetria rômbica), e das linhas de absorções em g próximo de 2 (estado de spin 1/2 simetria rômbica ou axial (essas linhas de absorções não são bem resolvidas)) e também o alargamento da linha da absorção em g ≈ 6 (desvios da simetria axial, conforme já citado).

As medidas efetuadas com a meta Mb equina mostrou um decréscimo monotônico da largura de linha da absorção com g ≈ 6 com o aumento do grau de hidratação e esses dados foram utilizados para construir uma curva de "calibração". Isto evidencia que a retirada de água na proteína seja a responsável direta ou indiretamente, pelo alargamento da linha de absorção com g ≈ 6.

O comportamento diferente da largura de linha da absorção em g ≈ 6 em função do grau de hidratação para a Mb e a Hb pode ser explicado da seguinte forma: a Mb, sendo um monômero tem uma interação específica com a água idêntica para todas moléculas

de Mb e isso reflete-se num comportamento monotônico de ΔH_1 com a hidratação; a Hb, por sua vez, sendo um tetrâmero (2 cadeias α e 2 cadeias β), apesar de também ter uma interação específica com a água, certamente parecida com a da Mb, contudo cada cadeia do tetrâmero é modulada também por interacões adicionais entre unidades que podem resultar em efeitos ligeiramente diferente em cada uma delas e dessa forma não há um comportamento monotônico de ΔH_1 com a hidratação.

Analogamente ao comportamento da largura de linha da absorção com $g \approx 6$ (ΔH_1) os valores exatos de $g_\perp$ ($g \approx 6$) para a Mb apresentou um comportamento monotônico, porém crescente, com o aumento do grau de hidratação, enquanto para a Hb um comportamento monotônico não foi encontrado, sugerindo também como razão para tais comportamentos as diferenças de estrutura entre as duas proteínas citadas acima, levando-se em conta que interações entre unidades na Hb são distintas das interações com água e devem produzir outro tipo de estabilização no tetrâmero.

A absorção com $g = 2{,}01$ (radical livre) para a Mb mostrou o mesmo comportamento, decréscimo da intensidade com a hidratação, como o encontrado para a Hb sugerindo assim uma não dependência de tal comportamento com a composição e estrutura das duas proteínas.

O gráfico da relação S_2/S_1 em função da hidratação (figura 42) para a Mb apresentou um máximo em torno de 8% de hidratação. A diferença entre os máximos da relação S_2/S_1 encontrado para a Mb e Hb sugere comportamentos distintos, em termos quantitativos, das duas proteínas com relação à hidratação. Ressalte-se também que o valor máximo de S_2/S_1 para a meta Hb é quase três vezes maior que o da meta Mb enquanto para a amostra mais seca o valor de S_2/S_1 da Hb é duas vezes e meia (2,5) menor que o da Mb, e assim o gráfico da Hb apresenta o máximo de forma muito mais acen

tuada que o da Mb. Qualitativamente, no entanto, o comportamento para as duas proteínas parece ser idêntico ou seja abaixo do valor máximo de S_2/S_1 o número de sítios com simetria rômbica aumenta com o grau de hidratação e acima do valor de hidratação a crítica decresce (Figuras 38 e 42).

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

6.1- Complexos Cu(II)-Aliina

1- Dos resultados obtidos das medidas de absorção eletrônica e RPE dos complexos foi possível propor a existência de, pelo menos, quatro espécies de complexos. O primeiro a pH baixo (menor que 3,5) no qual o íon Cu(II) está solvatado, o segundo que deve existir já em pH em torno de 3,5 onde o íon Cu(II) está possivelmente coordenado a oxigênios de grupos carboxílicos do aminoácido, o terceiro que existe na região de pH entre 6 e 11, o íon metálico é coordenado por oxigênios de grupos carboxílicos e nitrogênios de grupos amina formando complexos do tipo 2L-1M, e o quarto em pH maior que 11 onde deve haver também hidroxilas (OH^-) coordenando-se ao íon Cu(II).

2- No complexo 2L-1M formado nos pHs entre 6 e 11 a não resolução espectral das interações super-hiperfinas, entre o spin eletrônico do íon metálico (S= 1/2) e o spin nuclear dos nitrogênios (I= 1), no espectro de RPE, é devido a posicionamentos não equivalentes dos nitrogênios, em relação ao íon Cu(II), e por esta razão são escondidos pela largura e sopreposição dos dois tripletos não equivalentes.

3- A não obtenção de monocristais do complexo está relacionada ao fato da cadeia lateral (resíduo) do aminoácido aliina ser, com exceção do grupo sulfóxido, altamente apolar e is-

to impossibilita a formação de pontes de hidrogênios essenciais na estabilização da estrutura cristalina.

6.2- Complexo $|CuC\ell_2(bdfpo)_2|$

1- Das medidas de RPE no monocristal obteve-se três valores distintos de g, caracterizando uma simetria rômbica para o sítio do íon metálico. Este resultado está em pleno acordo com os dados cristalográficos que propõe uma simetria tetraédrica distorcida para o sítio.

2- Propõe-se o estado fundamental dxy para o íon Cu(II) no complexo com base nos dados de RPE, e cristalográficos e usando teoria de campo cristalino.

3- Os valores dos fatores de redução orbital foram obtidos utilizando, adicionalmente aos dados de RPE, dados de absorção eletrônica dos complexos em solução ou em pó e mostraram-se concordantes com os dados cristalográficos e de RPE.

4- As interações hiperfinas do íon Cu(II), no espectro de RPE, não foram resolvidas devido ao alargamento da linha de ressonância por interações entre os centros paramagnéticos, que no monocristal estão próximos.

6.3- Hidratação de Hemoproteínas

Meta Hb bovina e meta Mb equina liofilizadas foram submetidas à medida de RPE, à temperatura de -156 °C, observando-se as variações espectrais de amostras em diferentes graus de hidratação. A partir de resultados preliminares obtidos propõe-se:

1- As alterações introduzidas pela desidratação na estrutura das hemoproteínas trouxe alterações também no sítio do Fe(III) (heme) que foram traduzidas em mudanças na simetria do sítio, de axial para rômbica, e na intensidade de campo cristalino, de campo fraco para campo forte, alterando assim o estado de spin do íon férrico de 5/2 para 1/2. Essas alterações foram responsáveis pelo surgimento da linha de absorção em g= 4,3 (simetria rômbica), pelo alargamento da linha em g_1 (desvios da simetria axial) e também pelo surgimento das absorções em g próximo de 2 (estado de spin 1/2). Adicionalmente a essas alterações criou-se também um radical livre, na desidratação, com g= 2,01.

2- Da razão S_2/S_1 em função da hidratação foi obtido um máximo em uma hidratação em torno de 13% para a meta Hb bovina e propõe-se que este valor seja a hidratação crítica detectada através de medida de RPE convencional. Para a meta Hb este valor máximo de S_2/S_1 foi obtido em uma hidratação de 8%.

3- Da observação do sinal de RPE do radical livre, com g= 2,01, sua intensidade (I_3) mostrou-se dependente do grau de hidratação. No gráfico de $I_3/(I_1 + I_2)$ em função da hidratação obteve-se um comportamento que pode ser utilizado como uma curva de "calibração". Esse resultado também é expressivo no sentido que a partir da medida de RPE é possível inferir a respeito do grau de hidratação da amostra.

4- O valor preciso de g_1 e a largura de linha dessa absorção (ΔH_1) mostraram-se dependentes do grau de hidratação. Para a meta Mb observou-se um comportamento monotônico desses parâmetros com a hidratação, g_1 aumentou com a hidratação e ΔH_1 decresceu. O gráfico de ΔH_1 em função da hidratação apre

sentou um comportamento idêntico ao de $I_3/(I_1 + I_2)$ e também pode ser utilizado como curva de "calibração", tendo a vantagem adicional de ser obtida a partir de um parâmetro absoluto e não de um relativo. Para a meta Hb, no entanto, tanto $g_\perp$ como ΔH_1 mostraram valores maiores nas amostras mais secas e menores nas mais úmidas, porém um comportamento monotônico não foi obtido. Os comportamentos distintos entre a meta Mb e meta Hb devem ocorrer devido a interações adicionais entre as unidades da estrutura quaternária da meta Hb que podem resultar em efeitos ligeiramente diferente em cada uma delas e portanto apresentam um comportamento diferente da Mb.

Devido a relevância das observações obtidas através dos resultados preliminares pretende-se dar continuidade a este estudo e dentre as atividades futuras estão:

- efetuar as medidas tendo controle da quantidade de spins responsáveis pelo sinal de RPE, e assim pode relacionar parâmetros absolutos com o grau de hidratação;

- a construção de um "porta amostra" que permita fazer medidas com uma mesma amostra em diferentes graus de hidratação;

- substituir o sexto ligante do íon Fe(III) no heme e observar o comportamento do correspondente derivado;

- utilizar a correspondente apoproteína para estudos de formação do radical;

- estender os estudos para outras hemoproteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - BACCI, M. - La Rivista del Nuovo Cimento, 5, 12, (1982).

2 - MALMSTROM, BO G. - The Evolution of Proteins Structure and Function. A Symposium in Honor of Professor Emil L.Smith. Metalloenzymes, 87-96, Edited by: David S.Sigman and Mary A.B.Brazier, Academic Press, (1980).

3 - SILVA, G.P. - Interação de alguns aminoácidos sulfurados com íons metálicos de transição e pós-transição. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de Araraquara,UNESP, 1982.

4 - MATTIOLLI, M-P.D. - Complexos de cobre(II) com fosfinóxidos. Dissertação de mestrado, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, 1980.

5 - MARICIC,S. "et alii" - Biochim.Biophys.Acta, 79, 293-300,1964.

6 - BRAUSE, G. "et alii" - Journal of Physical Chemistry, 72, 3098--3105, (1968).

7 - ROSEN, D. - Trans.Faraday Soc.,59, 2178, (1973).

8 - HAVEMANN, R. and HABERDITZL, W. - Z.Physik Chem. (Leipzig), 210, 267, (1959).

9 - CHAI, S.Y. and VOGELHUT, P.O. - J.Appl.Phys.,38, 613-618,(1967).

10 - ELEY, D.D. "et alii". - Proc.R.Soc.London A, 331, 457-468, (1963).

11 - BRUNAUERS, S. "et alii" - J.Amer.Chem.Soc., 60, 309-319,(1960).

12 - FLORY, P.J. - J.Chem.Phys., 10, 51-61, (1942).

13 - EHREMBERG, A. "et alii" - Magnetic Resonance in Biological Systems. Oxford, London, Pergamon, (1967).

14 - PEISACH, J. "et alii" - Journal Biological Chemistry, 242, 2847, (1967).

15 - MALMSTRÖM, B.G. "et alii" - Biochim.Biophys. Acta, 205, 48, (1970).

16 - STIGBRAND, T. and SJÖHOLM, I. - Biochim. Biophys.Acta, 263, 244, (1972).

17 - COLMAN, P.M. "et alii" - Nature (London), 272, 319, (1978).

18 - ADMAN, E.T. "et alii" - J.Mol.Biol., 123, 35, (1978).

19 - BRILL, A.S. and BRYCE, G.F. - J.Chem.Phys., 48, 4398, (1968).

20 - SPIRO, T.G. (Editor) - Copper Proteins, New York, N.Y. (1981).

21 - SOLOMON, E.I. "et alii" - Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 73, 1389, (1976).

22 - PENFIELD, K.W. "et alii" - J.Am.Chem.Soc., 103, 4382, (1981).

23 - Mc MILIIN, D.R. and MORRIS, M.C. - Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78, 6567, (1981).

24 - BENCINI, A. "et alii" - J.Am.Chem.Soc., 102, 5234, (1980).

25 - SUGIURA, T. TANAKA, H. - Chem.Pharm.Bull., 18, 368, (1970).

26 - SUGIURA, Y.; TANAKA, H. - Mol.Pharmacol., 8, 249, (1972).

27 - SUGIURA, Y. "et alii" - J.Am.Chem.Soc., 97, 5577, (1975).

28 - SUGIURA, Y. HIRAYAMA, Y. - Inorganic Chem., 15, 679, 1976 - - J.Am.Chem.Soc., 99, 1581, 1976.

29 - DICKERSON, R.E. and GEIS, I. - The Structure and Action of Proteins, W.A. Benjamin Inc., (1969).

30 - ANTONINI, E. and BRUNORI, M. - "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, "North Hollan Publ.Co., (1971).

31 - TABAK, M. - "Mudanças Conformacionais em Mioglobinas: um estudo por RPE em marcadores de spin", tese de Livre Docência, IFQSC - Universidade de São Paulo, (1982).

32 - FEHER, G. "Electron Paramagnetic with Applications to Selected Problems in Biology", Gordon and Breach, Sience Publ., (1970).

33 - KNOWLES, P.F. "et alii" - "Magnetic Resonance of Biomolecules", John Wiley & Sons, (1976).

34 - STRYER, L. - "BIOCHEMISTRY", Freeman and Company,(1975).

35 - CHARLES, R.C. and SCHIMMEL, P.R. - "The Conformation of Biological Macromolecules", Freeman and Company, (198).

36 - BAFFA Fº, O. - "Estudos Estruturais das Mioglobinas de "Aphysia Brasiliana" e"Dermochelis Coriácea"por Técnicas Ópticas e Ressonância Paramagnética Eletrônica", Tese de Doutoramento, IFQSC, Universidade de São Paulo, (1984).

37 - PERUTZ, M.F. - Trans Faraday Soc., 42B, 187-195, (1946).

38 - BRAGG, W.L. and PERUTZ, M.F. - Acta Cryst., 5, 323-328, (1952).

39 - BRAGG, Sir LAWRENCE "et alii" - Proc.R.Soc.London., A222, 33-44, (1954).

40 - HAUROWITZ, F. J.Biol.Chem., 193, 443-452, (1951).

41 - KEILIN, D. and HARTREE, E.F. Nature (London), 170, 161-162, 1952.

42 - HABERDITZL, W. "et alii" - Z.Phys.Chem., 218, 354-366,1961.

43 - MARICIC, S. and PIFAT, G. - ABH dt A kad Wiss. Berl. (Kl. Med.), 63-73, (1966).

44 - KILLION, P.J. "et alii" - J.Coll.Interface Sci., 34, 495--504, (1970).

45 - ELEY, D.D. and SPINEY, D. - Nature (London), 188, 724, (1960).

46 - ELEY, D.D. and LESLIE, R.B."Electronic Aspects of Biochemistry" (Ed.B.Pullman), p.105, New York, Academic Press, (1964).

47 - ELEY, D.D. and PETHING, R. - Disc.Faraday Soc., 51, 164--175, (1970).

48 - PAKE, G.E. and ESTLE, T.L. - "The Physical Principles of Electron Paramagnetic Resonance", W.A. Benjamin, Inc., (1973).

49 - POOLE, C.P. and FARACH, H.A. - "THEORY OF MAGNETIC RESONANCE", John Wiley & Sons, (1972).

50 - ABRAGAM, A. and BLEANEY, B. - "Electron Paramagnetic Resonance", Clarendon Press-Oxford, (1970).

51 - HATHAWAY, B.J. and BILLING, D.E. - Coord.Chem.Rev.5, 143-207, (1970).

52 - WICKMAN, H.H. "et alii" - J.Chem.Phys. 42, 6, 2113-2117, (1965).

53 - STOLL, A. and SEEBECK, E. - Adv.Enzymol, 11, 377-400, (1951).

54 - GAMBARDELLA, M.T.P.; CASTELLANO, E.E. - "Estrutura Cristalina e Molecular do dicloro bi(benzil difenil fosfinóxido) cobre(II)". VIII Congresso Ibero-Americano de Cristalografia, Buenos Aires, Argentina, (1983).

55 - NASCIMENTO, O.R. - Complexos do dipeptídio glicil-triptofano com íon Cu(II). Caracterização por medidas de absorção eletrônica no visível e por ressonância paramagnética eletrônica. Tese de Livre Docência. IFQSC-USP, (1982).

56 - MATTIOLI, M.P.D. - Comunicação Privada.

57 - YONETANI, T. and SCHLEYER, H. - Journal of Biological Chemistry 42, 17, 3296-3933, (1967).

58 - PEISACH, J. "et alii" - Journal of Biological Chemistry, 246, 10, 3342-3355, (1971).

59 - TAKASHIMA, S. and SCHWAN, H.P. - J.Phys.Chem.,69, 4176, (1965).

60 - LUMRY, R. - Japan J.Phys., 1, 2, (1961).