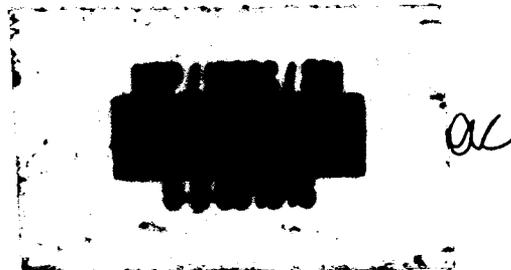


**INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS**  
**Departamento de Física e Ciência dos Materiais**

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE  
COMPLEXOS DE TIROSINA, GLICIL-  
TIROSINA E TIROSIL-GLICINA  
COM O ÍON  $\text{Cu}^{2+}$**

**Tania Toyomi Tominaga**



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

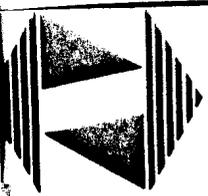
**Orientador: Prof.Dr. Marcel Tabak**

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO  
IFSC/USP - SETOR

**São Carlos-São Paulo**

**1993**

175

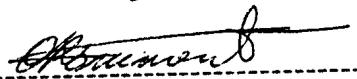


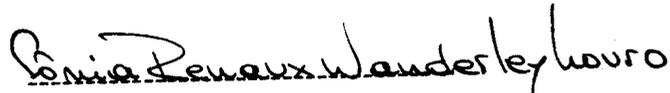
MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE TANIA TOYOMI TOMINAGA APRESENTADA POR  
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 01/10/1993

Av. Dr. Carlos Botelho,  
Cidade Postal 369  
CEP 13560.970 - São Carlos  
Brasil

COMISSÃO JULGADORA:

  
Prof. Dr. Marcel Tabak

  
Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

  
Profa. Dra. Sonia Renaux Wanderley Louro

**Dedico este trabalho**

**Aos meus pais,**

**às minhas irmãs,**

**e ao Fábio**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Em particular gostaria de agradecer:

Ao prof. Dr. Marcel Tabak, pela orientação segura, as proveitosas e "acaloradas" discussões, sugestões, dedicação e amizade.

Ao prof. Dr. Hidetake Imasato por sua prestimosa contribuição neste trabalho, sugestões e amizade.

Ao prof. Dr. Otaciro R. Nascimento por suas valiosas sugestões, auxílios na análise dos espectros de RPE, discussões do trabalho e amizade.

Aos amigos Maria Helena, Christiane e Emerson pelas sugestões, discussões, estímulo, apoio, dedicação e amizade.

À Cristina Lara pela ajuda no tratamento dos dados, sugestões e críticas ao trabalho, paciência, e principalmente pela amizade.

Aos amigos do laboratório Ana Carolina, Sérgio, Itamar, Shinya, Rosemeire, Sylvana, Rosângela pelo agradável convívio e amizade.

Ao Roberto e Isabel, técnicos do laboratório de Biofísica pela amizade e auxílio no manuseio dos equipamentos.

Aos professores Dra. Janice R. Perussi, Dr. Roberto G. S. Berlinck, Dr. Vitor Yushmanov pela amizade.

Às bibliotecárias Wil, Rose, Sônia, Neusa, Cibely e Mara.

À D.Ruth pelos almoços, incentivo, dedicação e amizade.

Às minhas irmãs Glória e Emy pelos estímulos, carinho, companheirismo e amizade.

Ao Fábio pelo companheirismo, carinho, incentivos, dedicação, paciência e pela inestimável ajuda na realização e finalização deste trabalho.

Àos meus pais Masahide e Tomiko que sempre com dedicação, amor e carinho sempre me acompanharam e apoiaram nesta longa jornada que é a vida.

**Ao CNPQ pelo apoio financeiro.**

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIACÕES**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**CAPITULO I - INTRODUÇÃO**

1.1 Proteínas azuis	1
1.2 Peptídeos com cobre	3

**CAPITULO II - RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA**

2.1 Introdução	8
2.2 A técnica de RPE.	8
2.3 Descobramento hiperfino	12
2.4 Espectro de RPE	14
2.4.1 Espectros de amostras em solução.	14
2.4.2 Espectros de amostras congeladas.	15

**CAPÍTULO III - FLUORESCÊNCIA**

3.1 Introdução	17
3.2 Princípios básicos de fluorescência.	18
3.3 Medidas de fluorescência.	22
3.3.1 Espectros de excitação de fluorescência.	22
3.3.2 Espectros de emissão de fluorescência	23
3.3.3 Rendimento quântico de fluorescência	23
3.3.4 Tempo de vida do estado excitado .	24
3.3.5 Arranjo experimental p/ medida de fluorescência	25

3.4 Sensibilidade da fluorescência ao meio	26
3.5 Supressão de fluorescência	28
3.5.1 Supressão colisional	29
3.5.2 Supressão estática .	30
3.6 Transferência de energia	33
3.7 Fluorescência de proteínas	35

#### **CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1 Materiais	40
4.2 Equipamentos	41
4.3 Métodos .	42
4.3.1 Absorção ótica e RPE	42
4.3.2 Fluorescência	43
4.4 Análise de dados	44
4.4.1 Absorção ótica - decomposição em gaussianas	44
4.4.2 RPE - Subtração espectral	44
4.4.3 Fluorescência - de pKs e constantes de associação	45

#### **CAPÍTULO V - RESULTADOS EXPERIMENTAIS.**

5.1 Absorção ótica	46
5.1.1 Decomposição em gaussianas	51
5.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica	60
5.2.1 Espectros de amostras em solução	60
5.2.2 Espectros de amostras congeladas	63
5.2.3 Subtração espectral	82
5.3 Fluorescência	91

## **CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

**6.1 Absorção ótica** 107

**6.2 RPE** 108

**6.3 Fluorescência** 111

**APÊNDICE** 115

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 122

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig.1) Desdobramentos dos níveis de energia para spin eletrônico  $S=1/2$  na presença de campo magnético.

Fig.2) Desdobramento hiperfino para spin nuclear  $I=1$

Fig.3) Espectro policristalino típico de uma proteína de cobre à  $-150^{\circ}\text{C}$ .

Fig.4) Algumas estruturas de sondas de fluorescência

Fig.5) Produção e relaxação de um estado excitado. Diagrama de Jablonski e fenômenos fotofísicos.

Fig.6) Excitação e emissão de fluorescência

Fig.7) Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro.

Fig.8) Espectro de excitação do brometo de ethidium

Fig.9) Espectro esquemático para um par de doador e aceitador .

Fig.10) (a) Espectro de absorção dos aminoácidos aromáticos.

(b) Espectro de emissão dos aminoácidos aromáticos.

Fig.11) Espectro de emissão da fluorescência do ASH e aminoácidos aromáticos.

Fig.12) Estruturas moleculares da l-tirosina, l-tyr-gly e gly-l-tyr.

Fig.13) Espectros de absorção ótica dos dipeptídeos em função do pH.

Fig.14) Variação do comprimento de onda do máximo da banda de absorção dos dipeptídeos em função do pH

Fig.15) Decomposição em gaussianas dos espectros óticos dos complexos tyr-gly:Cu<sup>2+</sup> (10:1) em (a)pH 7.54 e (b)pH 9.59

Fig.16) Decomposição em gaussianas dos espectros óticos dos complexos gly-tyr:Cu<sup>2+</sup> (10:1) em (a)pH 7.54 e (b)pH 9.59

Fig.17) Amplitudes das gaussianas dos espectros óticos em função do pH para os complexos de tyr-gly:Cu<sup>2+</sup> (10:1)

Fig.18) Amplitudes das gaussianas dos espectros óticos em função do pH para os complexos de gly-tyr:Cu<sup>2+</sup> (10:1)

Fig.19) Espectro de RPE dos complexos de tirosina:Cu<sup>2+</sup>(10:1)à temperatura ambiente.

Fig.20) Espectros de RPE dos complexos de Tyr-Gly com Cu<sup>2+</sup> em função do pH à temperatura ambiente.

Fig.21) Espectros de RPE dos complexos de Gly-Tyr com Cu<sup>2+</sup> em função do pH à temperatura ambiente.

Fig.22) Espectros de RPE dos complexos de Tyr- $Cu^{2+}$  à temperatura de  $-150^{\circ}C$ .

Fig.23) Espectros de RPE dos complexos Tyr-Gly com  $Cu^{2+}$  a temperatura de  $-150^{\circ}C$ .

Fig.24) Espectros de RPE dos complexos Gly-Tyr com  $Cu^{2+}$  à temperatura de  $-150^{\circ}C$ .

Fig.25) Gráfico do parâmetro  $g_0$  dos complexos de Tyr- $Cu^{2+}$  em função do pH, à temperatura ambiente.

Fig.26) Gráfico do parâmetro  $A_0$  dos complexos de Tyr- $Cu^{2+}$  em função do pH, à temperatura ambiente.

Fig.27) Parâmetro  $g_0$  dos dipeptídeos- $Cu^{2+}$  em função do pH à temperatura ambiente.

Fig.28) Parâmetro  $A_0$  dos dipeptídeos- $Cu^{2+}$  em função do pH à temperatura ambiente.

Fig.29) Gráfico do parâmetro  $g_{//}$  dos complexos de Tyr-Gly e Gly-Tyr com  $Cu^{2+}$  em função do pH à  $-150^{\circ}C$ .

Fig.30) Gráfico do parâmetro  $A_{//}$  dos complexos de Tyr-Gly e Gly-Tyr com  $Cu^{2+}$  em função do pH à  $-150^{\circ}C$ .

Fig.31) O espectro em pH 3,5 corresponde à diferença entre o espectro experimental nesse pH e o espectro de cobre livre multiplicado pelo fator 0.85. Os parâmetros correspondentes estão na tabela II. Os parâmetros espectroscópicos para a diferença, espectro C, são  $A_0 = 68$  gauss e  $g_0 = 2.129$ .

Fig.32) Diferença espectral entre os pHs 6,02 e 7,01 multiplicado por um fator 0,48 , onde A é o espectro puro, B o espectro mistura e C o espectro resultante desta diferença.

Fig.33) Espectro resultante da diferença entre pH 6,02 e 7 multiplicado por 0,48 (escala ampliada).

Fig.34) Diferença espectral entre os pHs 5,08 e 6,9 multiplicado por um fator 0,38 , onde A é o espectro puro, B o espectro mistura e C o espectro resultante desta diferença.

Fig.35) Espectro resultante da diferença entre pH 5,08 e 6,9 multiplicado por 0,48 (escala ampliada).

Fig.36) Curvas de titulação da Tyr e Tyr-Cu<sup>2+</sup> (1:1).

Fig.37) Supressão da fluorescência do fenol em função do pH.

Fig.38) Intensidade da fluorescência de Gly-Tyr em função do pH na ausência e na presença de Cu<sup>2+</sup>.

Fig.39) Intensidade da fluorescência de Tyr-Gly em função do pH a ausência e na presença de Cu<sup>2+</sup>.

Fig.40) Intensidade de Fluorescência em função da relação [Cu<sup>2+</sup>]/[Tyr] em dois pHs fixos (pHs 7,0 e 9,0)

Fig.41) Intensidade da fluorescência dos peptídeos em função da  $[Cu^{2+}]$  em dois pHs fixos (pHs 7,0 e 9,0).

Fig.42) Intensidade da fluorescência dos peptídeos em função da relação  $[Cu^{2+}]/[dipeptídeos]$  em dois pHs fixos (pHs 7,0 e 9,0).

Fig.43) Gráfico de Stern-Volmer para Tyr em pH 7,0.

Fig.44) Gráfico de Stern-Volmer para Gly-Tyr nos pHs 7,0 e 9,0.

Fig.45) Gráfico de Stern-Volmer para Tyr-Gly nos pHs 7,0 e 9,0.

## LISTA DE TABELAS

Tabela I-Propriedades magnéticas e óticas de algumas proteínas azuis contendo o ion  $Cu^{+2}$ .

Tabela II-Parâmetros de RPE para diferentes dipeptídeos com o ion  $Cu^{+2}$ .

Tabela III-Parâmetros de RPE para diferentes dipeptídeos com o ion  $Cu^{+2}$ -ligante.

Tabela IV-Intensidades relativas das linhas hiperfinas dos núcleos equivalentes.

Tabela V-Valores típicos de parâmetros fotofísicos de moléculas orgânicas.

Tabela VI-Propriedades espectroscópicas phe, tyr e trp.

Tabela VII-Parâmetros de decomposição dos espectro ótico dos complexos tyr-gly- $Cu^{+2}$  (10:1) em função do pH.

Tabela VIII-Parâmetros de decomposição dos espectro ótico dos complexos de gly-tyr- $Cu^{+2}$  (10:1) em função do pH.

Tabela IX- $K_{//}$  e  $K_{\perp}$  são respectivamente fator de redução orbital na direção paralela e perpendicular do campo magnético.

Tabela X-Valores dos parâmetros de espectros de RPE tyr- $Cu^{+2}$  em função do pH

Tabela XI-Valores dos parâmetros de espectros de RPE de tyr-gly- $Cu^{+2}$  em função do pH.

Tabela XII-Valores dos parâmetros de espectros de RPE de gly-tyr- $Cu^{+2}$  em função do pH

Tabela XIII-Valores dos PKs dos grupos carboxílico, amino e fenólico de tyr-ly e gly-tyr.

Tabela XIV-Valores das constantes de equilíbrio para gly-tyr e tyr-gly em dois pHs: 7,0 e 9,0.

## **ABREVIações**

**Abs. Ótica = Absorção Ótica**

**gly - gly = glicil - glicina**

**gly - gly - phe = glicil - glicil - fenilalanina**

**gly - glua = glicil - ácido glutâmico**

**gly - phe = glicil - fenilalanina**

**gly - aspa = glicil - ácido aspártico**

**gly - trp = glicil - triptofano**

**gly - trp - gly = glicil - triptofil - glicina**

**gly - tyr = glicil - tirosina**

**RPE = ressonância Paramagnética Eletrônica**

**trp = triptofano**

**tyr - gly = tirosil - glicina**

## RESUMO

Neste trabalho estudou-se a formação de complexos da tirosina e de seus dipeptídeos tirosil-glicina e glicil-tirosina com o íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Para a caracterização destes complexos foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de Absorção Ótica na região do visível (400 à 800 nm), Ressonância Paramagnética Eletrônica em duas temperaturas (ambiente e  $\sim -150^\circ\text{C}$ ) e a técnica de fluorescência.

No caso da tyr os dados experimentais obtidos pela espectroscopia de RPE sugerem a formação de pelo menos duas espécies distintas de complexos além do cobre hidratado. Os complexos propostos foram: o  $\text{CuL}_4$  (ao redor de pH 3,5) e o  $\text{CuL}_2$  (na faixa de pH 4,0 e 12,0). Já para os dipeptídeos são evidenciados três tipos diferentes de complexos. São propostos os seguintes complexos:  $\text{CuL}_2$  (ao redor de pH 4,5),  $\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})$  (na faixa de pH 7,0 e 12,0) e  $\text{CuL}(\text{OH})_2^{2-}$  (acima de pH 12,0).

Os espectros de RPE mostram claramente que com o aumento de pH, ocorre a complexação do  $\text{Cu}^{2+}$  com os dipeptídeos. Em pHs altos (acima de pH 10,0) surgem nestes espectros uma estrutura superhiperfina de 5 linhas típicas para a coordenação de  $\text{Cu}^{2+}$  com dois nitrogênios. Quanto a tirosina, o espectro de seu complexo com  $\text{Cu}^{2+}$ , não apresenta estrutura superhiperfina, sendo o sinal obtido, típico do complexo com  $\text{Cu}^{2+}$ .

Da mesma forma que foi observado por RPE, pode-se observar pelos espectros óticos, que em pHs baixos (2,0 a 3,5) para os dipeptídeos, os espectros apresentam uma banda larga e mal resolvida, característica do íon de  $\text{Cu}^{2+}$  livre em solução. Observou-se também um deslocamento do máximo das bandas para o

azul, apresentando características típicas das transições d-d correspondentes às várias espécies de complexos do metal em equilíbrio.

Os dados de fluorescência foram muito informativos. As titulações da tyr e dos dipeptídeos puros em função do pH permitiram a determinação dos valores de pKs dos grupos ionizáveis.

O efeito de supressão de fluorescência devido ao paramagnetismo do cobre foi usado tanto para a determinação da estequiometria quanto para a determinação das constantes de associação dos complexos dos dipeptídeos com  $\text{Cu}^{2+}$  em dois pHs fixos ( pH 7,0 e 9,0). Encontrou-se complexos com a seguinte estequiometria (ligante/metal): 2:1 e 1:1 respectivamente para a tyr e para os dipeptídeos nestes pHs.

Um modelo simples de equilíbrio foi desenvolvido e estimou-se as constantes de associação da ordem de  $10^7\text{M}^{-1}$  para os complexos de dipeptídeo- $\text{Cu}^{2+}$ .

## ABSTRACT

The main goal of this work was to study the formation of the complexes of tyrosine and its dipeptides tyrosil-glycyl and glycyl-tyrosine with the transition metal ion  $\text{Cu}^{2+}$ .

The characterization of these complexes was performed through the use of spectroscopic techniques: optical absorption, electron paramagnetic resonance at both room temperature and  $-150^{\circ}\text{C}$  and fluorescence emission.

The EPR spectroscopy suggested for tyrosine two distinct species. The following complexes were proposed:  $\text{CuL}_4$  ( $\sim\text{pH } 3,5$ ) and  $\text{CuL}_2$  (in the range of pH between 4,0-12,0). Three different complexes were evidenced for dipeptides- $\text{Cu}^{2+}$ :  $\text{CuL}_2$  ( $\sim\text{pH } 4,5$ );  $\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})$  (in the range of pH between 7,0-12,0) and  $\text{CuL}(\text{OH})_2^{2-}$  (above pH 12,0).

EPR spectra shows clearly the complexation of  $\text{Cu}^{2+}$  to the dipeptides. Both at intermediate and high pHs and especially above pH 10.0 a superhyperfine structure of five lines typical for coordination of copper to two nitrogens was observed. In the case of the aminoacid no superhyperfine structure is observed. EPR data suggest that in a wide pH range between 7.0 and 11.0 the complex formed by the dipeptides was  $\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})$

Electronic optical absorption was measured at room temperature as a function of pH in the range 2.0 - 13.0. It was observed that at low pHs (2.0 - 3.5) the spectra for the dipeptides was characterized by a broad not well resolved band around 800 nm characteristic of hydrated free  $\text{Cu}^{2+}$  in water solution. EPR spectra are in agreement with this observation. Increase of pH leads to a blue shift in the absorption band

maximum and as a consequence to typical spectra for d-d transitions of the various species of complexes of copper in equilibrium in solution.

Fluorescence data were also very informative. The pure tyrosine and dipeptides' titration allowed to determine pKs' values of ionizable groups.

The effect of fluorescence suppression due to paramagnetic copper was used both to establish the stoichiometry of the complexes and the association constants. The stoichiometry of the complexes was determined as 2:1 and 1:1 ligand:metal for tyrosine and the dipeptides respectively at pH 7,0 and pH 9,0. A simple equilibrium model was developed and the association constants for the  $\text{Cu}^{+2}$ -dipeptides complexes at pH 7.0 and pH 9.0 were estimated to be around  $10^7\text{M}^{-1}$ .

## CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO

### 1.1 Proteínas azuis

No estudo de interação de proteínas com metais de transição, tem se dado especial atenção ao cobre, pois ele é um dos elementos essenciais para organismos vivos. Muitas proteínas de  $\text{Cu}^{2+}$  (em baixas concentrações), exercem funções importantes dentro da fisiologia animal e vegetal e o cobre faz parte de sítios ativos em muitas enzimas. Uma das funções do cobre é a sua participação nas reações catalíticas. Quantidades essenciais do cobre são necessárias para a vida, enquanto que a deficiência ou excesso podem causar sérias lesões nos tecidos vivos, tais como a doença de Wilson que é uma das doenças graves do fígado e a doença de Menke onde há uma degeneração progressiva do cérebro.

Em seres humanos o cobre é encontrado em ordem decrescente de concentração: no fígado, cérebro, coração, músculos e rins. Nas células sanguíneas também existem cerca de  $7,0 \times 10^5$  átomos de cobre por célula (Sarkar). Por isso esse metal de transição, tem sido alvo de muitos estudos e dentre as proteínas, existem algumas que merecem atenção especial, as proteínas azuis.

As proteínas azuis são assim chamadas devido a sua intensa coloração azul e possuem propriedades espectroscópicas não usuais: alta intensidade das bandas de absorção, forte dicroísmo circular associado a estas bandas e baixo valor de interação hiperfina. Algumas destas proteínas possuem vários íons de  $\text{Cu}^{2+}$ : a ceruloplasmina ou ferroxidase possui sete ou

oito, a laccase quatro, a plastocianina duas e as azurinas e estelacianina apenas um íon de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Em geral o peso molecular por íon de  $\text{Cu}^{2+}$  destas proteínas variam de 14,000-20,000 daltons.

As verdadeiras proteínas azuis são coloridas quando o cobre é cupríco e clara quando cuproso. Por exemplo, a hemocianina, que é um pigmento transportador de oxigênio em invertebrados marinhos, é azul, porém, não é considerada uma proteína azul, pois a absorvidade molar, por íon de  $\text{Cu}^{2+}$  é baixa em comparação com as proteínas azuis.

A tabela I apresenta alguns valores experimentais (parâmetros óticos e magnéticos) de proteínas azuis que contêm apenas um único íon de cobre.

tabela I- propriedades magnéticas e óticas de algumas proteínas azuis contendo íon  $\text{Cu}^{2+}$

proteína	origem	A// (gauss)	g//	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	absortividade ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
Azurina	Pseudoma aeruginosa	57	2,260	625	3,50
Umecianina	horseradish	35	2,317	610	3,36
Lacasefungal	Poliporus Versicolor	88	2,190	610	4,90
Superoxido Dismutase	Celulas vermelhas bovinas	134	2,029 2,108	-	-

A absorvidade máxima da banda em 600nm ( $16 \times 10^3 \text{cm}^{-1}$ ) é duas ordens de grandeza maior que a dos complexos mais simples e uma ordem de grandeza maior que a de muitos peptídeos. Mesmos

as bandas menos intensas em 500nm ( $19 \times 10^3 \text{cm}^{-1}$ ) e em 800nm ( $13 \times 10^3 \text{cm}^{-1}$ ), as proteínas azuis tem intensidade maiores que muitos complexos de cobre pequenos.

Em pH neutro, o desdobramento hiperfino  $|A_z|$  para estas proteínas está entre  $30 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$  a  $60 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$  (menor que 100 gauss), enquanto que para as proteínas não azuis, este valor varia entre  $140 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$  e  $220 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$  (maior que 140 gauss).

Na tabela I, não estão incluídas as proteínas azuis que contêm vários íons de  $\text{Cu}^{2+}$ , nem as que possuem cobres que não são detectáveis por RPE.

Os íons de cobre que são detectáveis por RPE são classificados em duas classes: tipo 1 e tipo 2.

O cobre tipo 1 possui  $|A_z|$  menor que  $100 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ , e tem sido encontrado apenas em proteínas que possuem bandas de absorção muito intensa em 600nm ( $16 \times 10^3 \text{cm}^{-1}$ ).

O cobre tipo 2 tem  $|A_z|$  maior que  $140 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$  (Vännngard, 1967), e é encontrado para todos os outros complexos de cobre incluindo aqueles que não são azuis, existindo poucas exceções à estas generalizações.

## 1.2 Peptídeos com cobre

Tem-se estudado muito complexos formados entre peptídeos com o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , pois eles são quimicamente muito parecidos com as proteínas cúpricas. Então, estes modelos de pequenos peptídeos com o íon  $\text{Cu}^{2+}$  têm permitido muitos esclarecimentos a respeito de complexação de proteínas com metais de transição.

Os peptídeos apresentam um grande número de possibilidades de coordenação que dependem do pH, do comprimento da cadeia, se

a cadeia lateral possui ou não grupos coordenáveis (Brill, 1977).

Os próprios aminoácidos complexam com metais de transição. Sportelli e colaboradores (Sportelli, 1976), mostraram que em complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  com aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) com estequiometria 2:1, na faixa de pH 4,2-6,8, os nitrogênios amina e os oxigênios carboxílicos participam como ligante. Forma-se um complexo com simetria quadrado planar, apresentando absorção máxima ao redor de 720nm para tyr, 690nm para trp e 630nm para phe. Os espectros de RPE tem valores de  $g_0$  da ordem de 2,150 para os três aminoácidos, não havendo diferenças significativas dos valores de  $g$  e  $A$  para os três aminoácidos.

Complexos de dipeptídeos com estequiometria 1:1, em pHs onde os nitrogênios peptídicos têm seus prótons ionizados, são coordenados pelos nitrogênios amina e peptídico e pelo oxigênio carboxílico, sendo o quarto ligante uma água ou um grupo  $\text{OH}^-$ . A absortividade máxima destes complexos é cerca de  $80\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , perto de 640nm, sendo os espectros de RPE semelhantes aos espectros apresentados pelos aminoácidos (Brill, 1977).

Os peptídeos maiores geralmente formam complexos 1:1 com o íon  $\text{Cu}^{2+}$  em pHs alcalinos, participando da complexação dois ou três nitrogênios amida, um nitrogênio amina e um ou nenhum oxigênio carboxílico ou água, com absortividade máxima de  $150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ao redor de 550nm. Os espectros de RPE geralmente apresentam desdobramentos hiperfinos, correspondentes a três ou quatro nitrogênios e parâmetros com simetria axial (com pequenas distorções rômbricas).

Um esforço maior tem sido colocado em estudos de complexos de pequenos peptídeos com íon  $\text{Cu}^{2+}$ , com o objetivo de reproduzir os dados espectroscópicos apresentados pelas proteínas azuis.

Os complexos de pequenos peptídeos têm geralmente, simetria quadrado planar muito pouco distorcida, e possuem espectros de RPE apresentando simetria axial. O mesmo não ocorre para as proteínas onde devido a vínculos estruturais a simetria do complexo pode ser mais baixa que a axial.

A possível influência de cadeias laterais, em pequenos peptídeos, pode em princípio, gerar distorções na simetria do complexo e, desta forma, gerar dados espectroscópicos mais próximos das proteínas azuis que apresentam as mesmas distorções.

Nesta linha Koslowski (Koslowski,1977) realizou um estudo dos vários dipeptídeos constituídos por Gly-x, onde x é um aminoácido aromático contendo cadeia lateral pesada próxima ao grupo carboxílico terminal.

Koslowski observou espectros de RPE destes complexos com simetria axial em uma faixa de pH até próximo de 11. Os complexos de cobre com estes dipeptídeos, geralmente formam quelatos tridentados com o grupo amina, amida e carboxílico e tem como quarto ligante uma molécula de água ou hidroxila.

Em pH acima de 12,0 a simetria se torna rômica, com exceção dos complexos gly-gly com cobre. Uma possível explicação para esta distorção seria dada pelo rompimento da ligação do oxigênio da carboxila com o íon por razões estéricas, provocadas pelo alto valor de pH (Koslowski,1977).

O argumento usado por Koslowski na importância da cadeia lateral pesada pode ser visto na tabela II pelo grau de distorção  $|g_x - g_y|$  crescente com o tamanho do resíduo lateral.

tabela II- parâmetros de RPE para diferentes dipeptídeos com  $\text{Cu}^{2+}$

$\text{Cu}^{2+}$ :ligante (1:10)	pH	$g_x$	$g_y$	$g_z$	$A_x$ (G)	$A_y$ (G)	$A_{//}$ (G)	$ g_x - g_y $
gly-gly	12,6	2,050	2,050	2,210	20	20	174	
gly-spa	12,6	2,130	2,030	2,246	52	20	129	0,100
gly-glua	12,5	2,142	2,025	2,254	61	30	107	0,117
gly-tyr	12,6	2,155	2,015	2,267	70	30	98	0,140

Sportelli e colaboradores estudaram interações de  $\text{Cu}^{2+}$  com aminoácidos aromáticos, dipeptídeos e tripeptídeos que possuíam aminoácidos aromáticos, tais como gly-phe, gly-gly-phe, gly-phe-ala, etc... (Sportelli, 1976 e 1977). Eles concluíram que os valores de  $g$ , isto é  $g_0$  e  $g_{//}$  medidos diretamente dos espectros em geral decrescem na sequência aminoácido  $\geq$  dipeptídeo  $>$  tripeptídeo, enquanto que  $|A_0|$  e  $|A_{//}|$  aumentam; o comprimento de onda da transição d-d do cobre decresce.

A tabela III apresenta alguns dos dados experimentais espectroscópicos apresentados por Sportelli.

tabela III- Parâmetros de RPE para diferentes complexos de  $\text{Cu}^{2+}$ -ligantes

Ligante (2mM)	$ A_{//} _{\pm 2}$ gauss	$ A_{\perp} _{\pm 2}$ gauss	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_0_{\pm 2}$ gauss	$g_0$
trp	164	21,5	2,257	2,053	69	2,121
gly-trp	173	18,5	2,234	2,058	70	2,117
gly-trp-gly	190	31	2,186	2,048	84	2,094
phe	169	20,5	2,051	2,051	70	2,119
gly-phe	172	20,5	2,057	2,057	71	2,117
gly-phe-ala	191	32	2,043	2,043	85	2,094

No presente trabalho através das técnicas de RPE, Fluorescência e Absorção ótica, estamos descrevendo o comportamento da tyr e dois de seus dipeptídeos gly-tyr e tyr gly e a influencia da cadeia lateral pesada em função do pH. Também estamos estudando a interação da tyr e dos dipeptídeos com o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , e como este íon suprime a fluorescência, em que proporção este íon se liga ao aminoácido e peptídeos na formação de complexos.

Devido ao paramagnetismo do íon  $\text{Cu}^{2+}$  e em consequência da complexação com a tyr e os dipeptídeos ocorre uma supressão significativa da fluorescência que pode ser usada no estudo da formação dos complexos, determinando-se as constantes de estabilidade e estequiometria.

## Capítulo II -Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

### 2.1 Introdução

A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é um tipo de espectroscopia que envolve a absorção de energia de uma fonte de microondas por uma amostra colocada em um campo magnético externo. A amostra deve conter íons paramagnéticos (elétrons desemparelhados) em sua estrutura, isto é, possuir momento magnético para poder interagir com o campo magnético.

Entretanto na natureza, nem todos os sistemas encontrados são paramagnéticos. Desta forma aqueles sistemas que contêm centros paramagnéticos intrínsecos podem facilmente ser estudados. Na ausência de paramagnetismo existem maneiras de criarmos estes centros, tais como : introduzir moléculas ou íons paramagnéticos na rede cristalina (os marcadores de spin, metais de transição); criar defeitos na amostra através de irradiação de raio X, por exemplo.

Os espectros de RPE normalmente são obtidos, variando-se o campo aplicado para uma dada frequência fixa. As frequências mais comuns existentes são: banda Q (35 GHz), banda X (9,5 GHz), banda S (2-4 GHz) e banda L (1-2 GHz).

Através da técnica de RPE podemos estudar estrutura e dinâmica de moléculas, mudanças conformacionais de proteínas, interações de complexos químicos. A técnica também pode ser usada como um método de investigação de impurezas em amostras.

### 2.2 A técnica de RPE

A técnica de RPE se baseia no desdobramento de níveis de energia correspondentes ao spin eletrônico mediante a aplicação de um campo magnético estático  $\vec{H}$  (efeito Zeeman).

O sistema mais simples para estudarmos os princípios da RPE é o caso de um elétron colocado em um campo magnético. Este sistema possui dois níveis de energia e spin eletrônico  $S = \frac{1}{2}$ . Na ausência de campo magnético os níveis de energia são degenerados, mas são desdobrados na presença deste.

De acordo com a física clássica o momento magnético  $\vec{\mu}$  interage com o campo magnético  $\vec{H}$  apresentando uma energia de interação  $E$  contínua:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (2.1)$$

Na mecânica quântica esta energia possui valores bem definidos, isto é,  $E$  é quantizado. Por isso a expressão (2.1) pode ser trocada por um Hamiltoniano de interação, dado por:

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (2.2)$$

O momento magnético correspondente ao spin do elétron é dado por :

$$\vec{\mu} = -g\beta \vec{S} \quad (2.3)$$

onde  $\beta$  é magneton de Bohr,  $\vec{S}$  é o spin eletrônico e  $g$  é o fator giromagnético, cujo valor é característico da espécie.

Substituindo a equação 2.3 em 2.2, temos:

$$\mathcal{H} = g\beta \vec{S} \cdot \vec{H} \quad (2.4)$$

A solução deste Hamiltoniano fornece as possíveis energias para o sistema.

Denotando-se por  $\vec{z}$  a direção do campo magnético, temos:

$$E = g\beta H M_S \quad (2.5)$$

onde  $S_z$  indica que, como os spins eletrônicos são quantizados, tomam algumas orientações permitidas em relação ao campo magnético, correspondentes às energias distintas.

Para o caso do sistema de dois níveis de energia onde  $S = \frac{1}{2}$ , as energias obtidas como solução para a equação 2.2 são :

$$E_+ (M_S = +\frac{1}{2}) = \frac{1}{2} g\beta H \quad (2.6)$$

$$E_- (M_S = -\frac{1}{2}) = -\frac{1}{2} g\beta H \quad (2.7)$$

Podemos induzir transições fornecendo ao sistema uma quantidade de energia  $\Delta E = g\beta H$ . Assim, se para o sistema for fornecido energia através de uma fonte de microondas de frequência  $\nu$ , a condição para a transição espectroscópica será dada por :

$$E_- - E_+ = h\nu = g\beta H_0 \quad (2.8)$$

onde  $h$  é a constante de Planck.

Se variarmos então o valor de  $H$ , podemos encontrar o campo de ressonância  $H_0$  e conseqüentemente o fator  $g$ , que indica a

posição do espectro em função ao campo magnético, já que

$$g = \frac{h\nu}{\beta} \cdot \frac{1}{H_0}$$

A absorção de energia gera um espectro que normalmente é registrado na forma da primeira derivada da absorção e esta mostrado na fig.1.

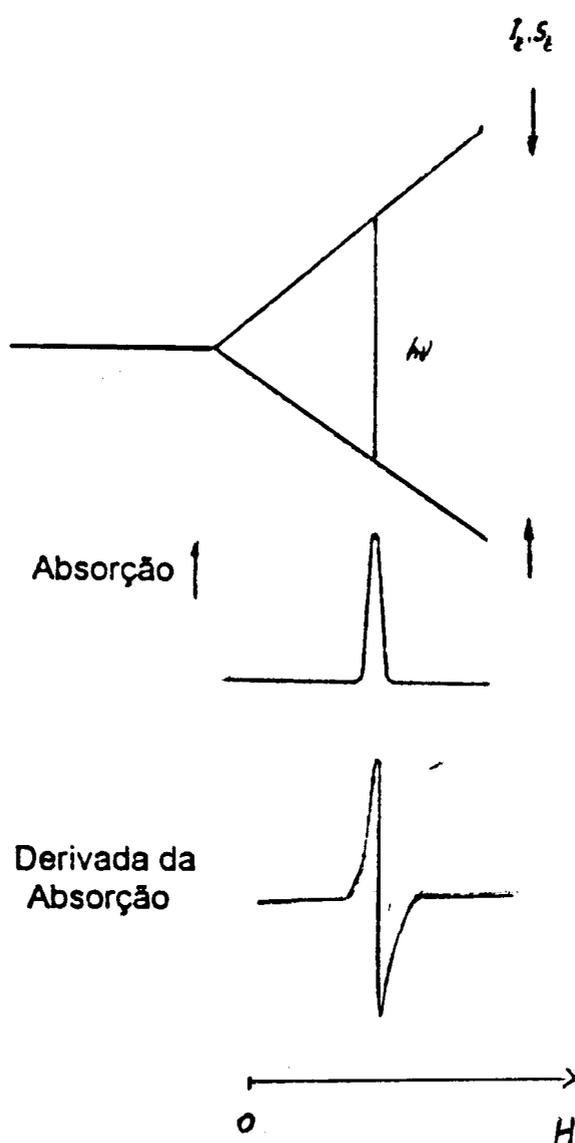


fig.1 Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico  $S=1/2$  na presença de campo magnético (Knowles, 1976)

### 2.3 Desdobramento Hiperfino

O desdobramento hiperfino origina-se da interação do momento magnético eletrônico com o momento magnético de núcleos vizinhos. Para íons dos metais de transição, o desdobramento hiperfino dominante vem do núcleo do íon paramagnético e a estrutura superhiperfina, com desdobramentos menores, podem vir dos ligantes, sendo o mais comum o nitrogênio.

O número de linhas hiperfinas de um dado núcleo depende do seu spin nuclear  $I$ , este número é dado por  $(2I + 1)$ , para uma espécie com  $I=1$ , por exemplo o nitrogênio; cada spin nuclear é quantizado e tem três orientações possíveis igualmente prováveis correspondentes às projeções do spin:  $I_z = 1, 0, +1$ . Cada núcleo dá origem a três linhas como indica a figura 2. Nesta figura o desdobramento hiperfino nos níveis de energia será dado por  $1/2 A$ , onde  $A$  é a constante de desdobramento hiperfino, pois a energia de interação hiperfina é dada por  $A \cdot I_z \cdot S_z$ . Então, quando se tem a contribuição da interação hiperfina, a equação 2.8 se torna:

$$h\nu = g\beta H \pm \frac{1}{2} A m_I \quad (2.9)$$

onde  $m_I$  são os possíveis valores de  $I_z$ . A constante hiperfina  $A$  será dada em unidades de energia ( $\text{cm}^{-1}$ ) ou em unidades de campo magnético  $A/g\beta$  (Gauss).

As linhas hiperfinas podem ser utilizadas para identificar o núcleo o qual deu origem ao desdobramento hiperfino do espectro de RPE.

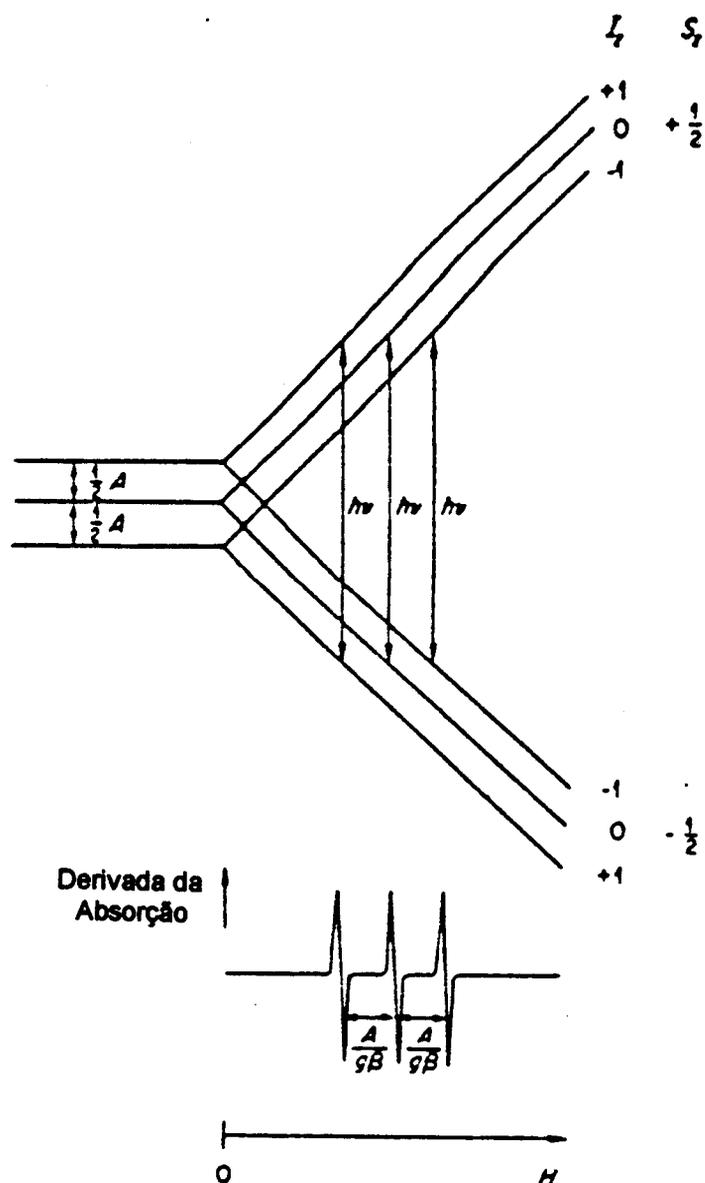


fig.2 Desdobramento hiperfino para spin nuclear  $I=1$ .

As múltiplas linhas de um único núcleo ou múltiplas linhas de diversos núcleos equivalentes podem ser diferenciadas. Estas últimas, embora igualmente espaçadas, possuem intensidades diferentes enquanto um único núcleo, com maior momento nuclear, dá origem a linhas de intensidades iguais. Em geral, os desdobramentos hiperfinos para  $n$  núcleos equivalentes consistem de  $(n+1)$  linhas que são igualmente espaçadas e tem intensidades

dadas pela tabela IV. As intensidades relativas são dadas pelos coeficientes binomiais da expansão da expressão  $(1+x)^n$ .

n										
0	1									
1	1									1
2	1								2	1
3	1						3	3	1	
4	1				4	6	4	1		
5	1			5	10	10	5	1		
6	1	6		15	20	15	6		1	

tabela IV-Intensidades relativas das linhas hiperfinas do núcleos equivalentes

## 2.4 Espectros de RPE

### 2.4.1 Espectros de amostras em solução

As moléculas em solução diluída e não viscosa possuem um movimento rápido e rândomico, por isso, todos os efeitos da anisotropia são anulados, isto é, os espectros de amostras em solução serão independentes da orientação magnética. Consequentemente os valores de  $g$  e constante hiperfina serão uma média dos valores principais dos tensores  $g$  e hiperfino, respectivamente  $(g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}$  e  $A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}$ ). Estes valores são conhecidos como  $g$  isotrópico ( $g_0$ ) e constante isotrópica hiperfina ( $A_0$ ) e são dados por:

$$A_0 = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (2.10)$$

$$g_0 = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (2.11)$$

Em caso de simetria axial, a expressão se simplifica:

$$A_o = \frac{1}{3}(A_{//} + 2A_{\perp}) \quad (2.12)$$

pois,  $A_{zz} = A_{//}$  e  $A_{xx}=A_{yy}=2A_{\perp}$ ; analogamente

$$g_o = \frac{1}{3}(g_{//} + 2g_{\perp}) \quad (2.13)$$

Geralmente estes espectros isotrópicos possuem linhas finas.

#### 2.4.2 Espectros de solução congelada ou espectro de pó

Quando se abaixa a temperatura as moléculas já não possuem mais movimentos rápidos nem randômicos, por isso os espectros apresentados terão a contribuição de todas as possíveis orientações. Neste caso os valores de  $g$  e os desdobramentos hiperfinos dependem da direção do campo magnético em relação aos eixos moleculares e um espectro com muito mais informações será obtido.

Ao invés de linhas finas encontradas nos espectros isotrópicos, teremos agora espectros com linhas mais largas e formas de linhas distorcidas.

A princípio todos os valores principais de  $A$  e  $g$  deveriam ser determinados nestes espectros. Entretanto devida a superposição dos espectros, nem sempre todos os valores de  $g$  e desdobramentos hiperfinos podem ser determinados.

A fig.3 mostra um espectro de amostra congelada de uma proteína de cobre com simetria axial.

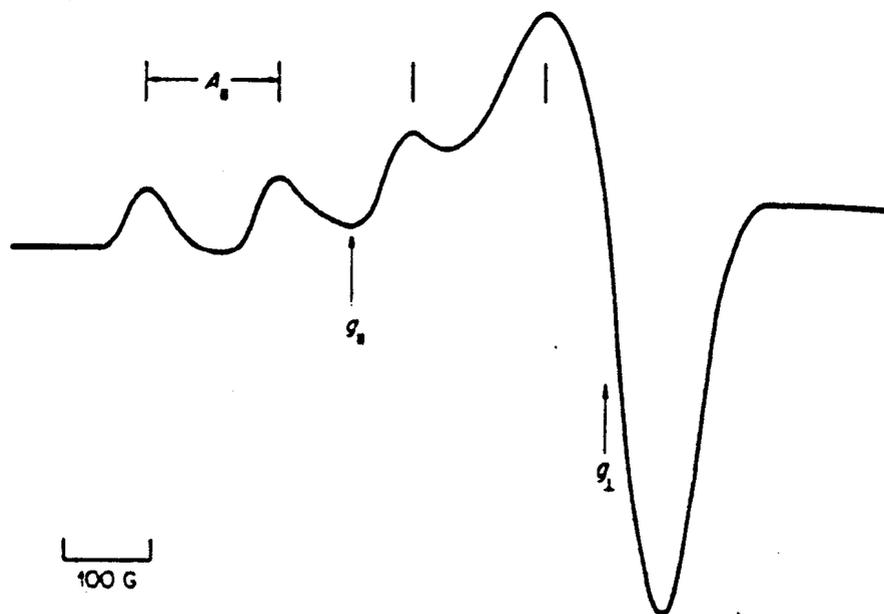


Fig.3 Espectro de pó de uma proteína de cobre típica à  $-150^{\circ}\text{C}$ .

A fig.3 mostra a distância entre os picos em campo baixo, que corresponde ao desdobramento hiperfino  $A_{||}$ . O valor de  $g_{||}$  é encontrado medindo-se o centro de gravidade destas linhas espectrais, e  $g_{\perp}$  é o centro de gravidade da linha espectral para campo alto. Não se consegue determinar o valor de  $A_{\perp}$  através do espectro, pois ele deve ter um valor muito pequeno para ser resolvido.

## CAPÍTULO III - FLUORESCÊNCIA

### 3.1 Introdução

A espectroscopia de fluorescência tem sido largamente utilizada como ferramenta nas pesquisas químicas, bioquímicas, biofísicas e médicas. Este uso tem-se ampliado devido ao desenvolvimento de novas tecnologias na produção e detecção da luz.

Vários fatores têm contribuído para que esta técnica seja muito utilizada, entre eles a possibilidade de se trabalhar com soluções extremamente diluídas, tipicamente na faixa de  $10^{-6}$  M para proteínas ou  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M para outros grupos fluorescentes. Já que a técnica investiga apenas subunidades moleculares que possuem grupos fluorescentes, ela permite obtenção de informações da vizinhança do cromóforo. A alta sensibilidade da técnica é uma consequência do tempo relativamente longo ( $10^{-9}$ s- $10^{-6}$ s) que uma molécula fluorescente permanece em um estado excitado. A absorção ótica, por exemplo, é um processo que ocorre em um período extremamente curto, da ordem de  $10^{-15}$  s, e nesta escala de tempo a molécula e o meio são efetivamente estáticos. Já na fluorescência, que é um fenômeno onde a molécula permanece excitada durante um tempo de  $\mu$ s a ns, vários processos podem acontecer tais como: reações de protonação e desprotonação, mudanças conformacionais em proteínas e reorientação do cromóforo. Também deve-se levar em conta, que a emissão de luz pode revelar propriedades completamente diferentes das propriedades estudadas ou obtidas por análise da absorção ótica, uma vez que se obtém informações

sobre propriedades e reatividades dos estados excitados. Uma outra vantagem é a seletividade do processo. Em proteínas, por exemplo, existem apenas 3 aminoácidos fluorescentes, o trp, a tyr e a phe que podem ser usados como marcadores intrínsecos. Às proteínas que não possuem cromóforos fluorescentes, isto é que não contêm aminoácidos aromáticos podem-se acoplar covalentemente ou não marcadores extrínsecos. Os marcadores covalentes são principalmente aqueles que possuem grupos reativos que modificam seletivamente tióis e amins de proteínas. Alguns exemplos estão apresentados a seguir na figura 4.

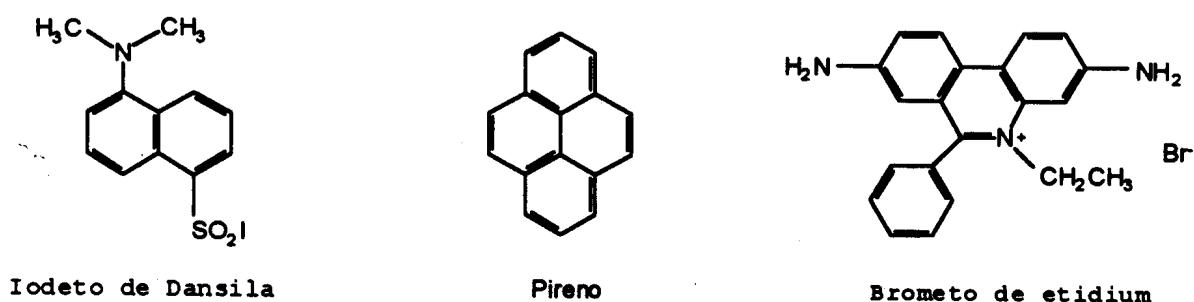


fig.4 Algumas Estruturas de sondas de fluorescência (Cantor,1980)

### 3.2 Princípios básicos da fluorescência

A fluorescência é um fenômeno que envolve a absorção de energia por uma molécula. Quando esta absorve um fóton de luz, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Ocorre então, um relaxamento para o nível vibracional fundamental do estado excitado através da conversão interna

(processo não radiativo), e então há o retorno para o estado eletrônico fundamental com emissão de luz.

Porém como mostra a fig. 5, competindo com a emissão, existem vários outros processos que contribuem para o estado excitado perder energia.

Os processos não radiativos de relaxamento que competem com a fluorescência ( $k_F$ ) são: conversão interna ( $k_{ic}$ ); cruzamento intersistema ( $k_{is}$ ) e supressão de vários tipos [ $k_q(Q)$ ]. Portanto a fração que representa a deexcitação através da fluorescência é dada por:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{ic} + k_{is} + k_s(Q)} \quad (3.1)$$

Esta fração  $\phi_F$  é conhecida como rendimento quântico de fluorescência. Podemos ver através desta equação que, se todos os processos não radiativos não existissem ou fossem infinitamente desprezíveis então  $\phi_F=1$ , ou seja o rendimento quântico de fluorescência seria 100%, isto é, o único mecanismo de relaxamento seria a fluorescência.

Discutindo então, alguns dos fatores que afetam a intensidade da fluorescência temos :

(1) *Conversão Interna* ( $k_{ic}$ ): Neste processo, a energia de excitação é perdida por colisão com o solvente ou por dissipação através dos modos vibracionais internos, geralmente  $k_{ic}$  e a temperatura são diretamente proporcionais, conseqüentemente a fluorescência decresce com o aumento da temperatura.

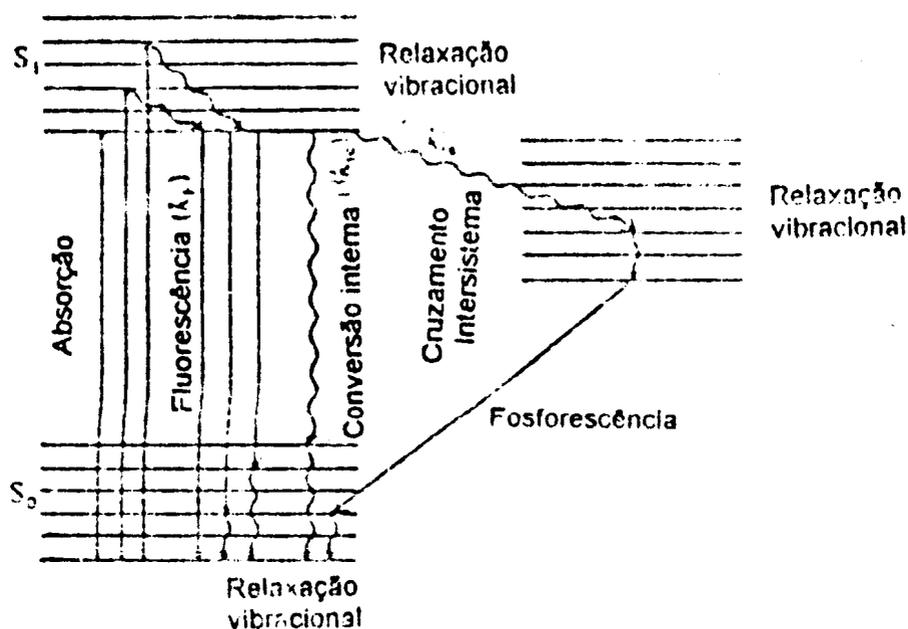


fig.5 Os caminhos para produção e relaxamento de um estado excitado

(2) *Cruzamento intersistema* ( $k_{is}$ ): Neste processo isoenergético a troca de spin (nominalmente proibida) converte um singlete excitado  $S_1$  em um estado tripleto excitado  $T_1$ , que decai prontamente para o nível vibracional fundamental  $T_1$ , que se converte para o estado singlete fundamental  $S_0$ , tanto por fosforescência (emissão de um fóton) ou por conversão interna. Geralmente o estado tripleto  $T_1$ , tem energia mais baixa que o singlete excitado  $S_1$ , portanto, a fosforescência ocorre em comprimentos de ondas maiores que a fluorescência. Como a transição envolvida na fosforescência envolve mudança de multiplicidade  $S_1-T_1$  e  $T_1 \rightarrow S_0$  o tempo de vida é muito mais longo que o tempo de vida de fluorescência.

(3) *Supressão de fluorescência* [ $K_q(Q)$ ]. Geralmente é o resultado de colisões ou de formação de complexos com solutos moleculares (Q) capazes de reduzir o tempo de vida do estado excitado ou manter o complexo no estado fundamental provocando a supressão de fluorescência.

Consideremos agora, o efeito de outros níveis eletrônicos. A fig.6 mostra esquematicamente a excitação e emissão de fluorescência.

A conversão interna entre os singletos de energia mais altos, tal como  $S_3 \rightarrow S_2$  é muito mais rápida que as taxas que consideramos até aqui ( $S_1 \rightarrow S_0$ ). A relaxação vibracional dos níveis vibracionais excitados de cada estado eletrônico é mais rápida que a emissão de fóton. O resultado prático é que toda fluorescência que observamos é normalmente originária do nível vibracional fundamental do singlete excitado. Esta observação tem implicações importantes (Brand, L):

- O espectro de luz emitida deve ser independente do comprimento de onda de excitação,  $\lambda_{exc}$ .
- Todos os espectros de fluorescência estarão deslocados para comprimentos de onda maiores (menor energia) que a banda de absorção.
- a forma da banda de emissão será aproximadamente uma imagem especular da banda de absorção cujo máximo está centrado em comprimentos de ondas maiores que o da banda de absorção. Este deslocamento é conhecido como deslocamento de Stokes.

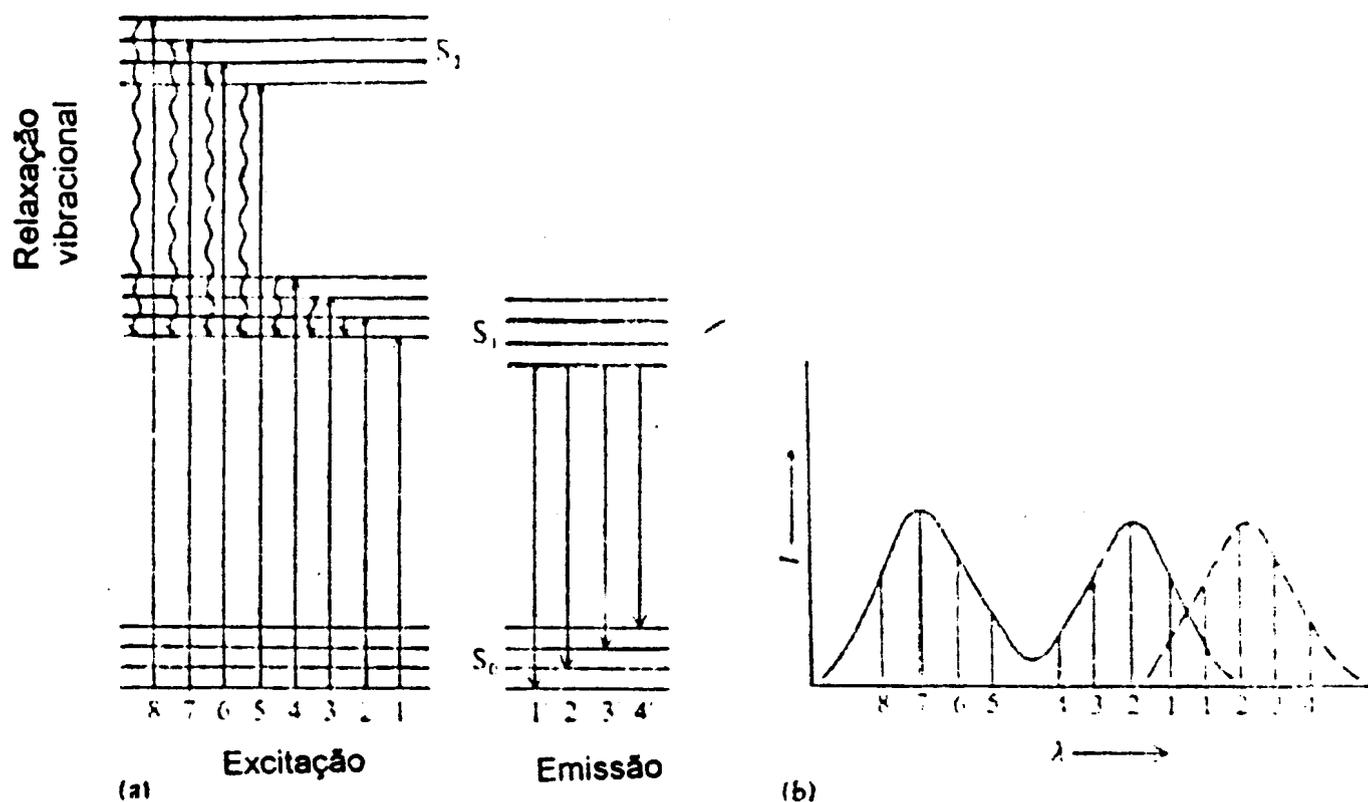


fig.6 A excitação e emissão de fluorescência. (Cantor, 1980)

### 3.3 Medidas de fluorescência

#### 3.3.1 Espectros de excitação da fluorescência

Os espectros de excitação representam as intensidades da fluorescência em função do comprimento de onda da luz excitadora. No caso de uma solução pura de uma molécula cromófora, o espectro de excitação corrigido corresponderá ao espectro de absorção desde que a relaxamento radiativa ocorra do nível vibracional fundamental do estado eletrônico excitado. Este parâmetro irá mudar se a energia potencial relativa entre os estados excitado e fundamental for modificado por alguma perturbação.

#### 3.3.2 Espectros de emissão da fluorescência

Os espectros de emissão representam as intensidades da fluorescência em função do comprimento de onda da emissão. Ela representa a transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado  $S_1$  para o estado fundamental  $S_0$ . Tem-se um interesse particular nos espectros de emissão, pois ele é sensível às reações químicas ou perturbações de solventes durante o tempo de vida do estado excitado.

### 3.3.3 Rendimento quântico da fluorescência

O rendimento quântico  $\phi_F$  é definido como a razão entre o número de quanta emitido pelo número de quanta total absorvido.

Para um dado composto, o rendimento quântico depende das taxas de vários processos de relaxamento expresso pela equação (3.1) englobando-se as constantes de velocidade dos fenômenos não radiativos dentro de uma somatória:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i + \sum_j k_j [Q_j]} \quad (3.2)$$

$k_F$  é a constante de velocidade para emissão da fluorescência e  $k_i$  são as constantes de velocidade para os vários processos não radiativos de relaxação que competem com a fluorescência e  $k_j$  são as constantes de supressão pelas substâncias  $Q$ .

Como consequência destes muitos caminhos para a dissipação do excesso de energia, o rendimento quântico pode ser muito sensível ao meio e aos grupos estruturais que cercam o

cromóforo. Então, devido a existência destes vários outros processos que competem com a emissão de fluorescência, o rendimento quântico é sempre menor que 1 ( $\phi_F < 1$ ).

As medidas de rendimento quântico podem nos dar idéia da contribuição da fluorescência para reações do estado excitado, enquanto que o espectro de absorção fornece informações principalmente sobre reações do estado fundamental.

### 3.3.4 Tempo de vida do estado excitado ( $\tau_0$ )

O tempo de vida  $\tau_0$ , que equivale a  $k^{-1}$  é definido como o tempo requerido para que a população decaia para 1/e do valor inicial através de um mecanismo particular ( equação 3.4 ).

Na tabela V estão apresentados valores típicos das constantes de velocidades e de tempos de vida que estão envolvidos nos vários processos relacionados às transições eletrônicas.

tabela V\* - Valores típicos de parâmetros fotofísicos de moléculas orgânicas

Processo	cte. velocidade $k$ ( $s^{-1}$ )	$\tau_0$ (s)
$S_2 \rightarrow S_1$	$10^{11} - 10^{14}$	$10^{-14} - 10^{-11}$
$S_1 \rightarrow S_0$	$10^5 - 10^8$	$10^{-8} - 10^{-5}$
$S_1 \rightarrow T_1$	$10^7 - 10^8$	$10^{-8} - 10^{-7}$
$T_1 \rightarrow S_0$	$10^{-1} - 10^4$	$10^{-4} - 10$

\* (Dwaine, 1976)

Como pode-se observar enquanto o tempo requerido para absorver um fóton ultravioleta é de aproximadamente  $10^{-15}$ s, o tempo de relaxação de moléculas em solventes orgânicos comuns é

aproximadamente de  $10^{-11}$ s. Por outro lado a fosforescência caracteriza-se por tempos de vida mais longos que variam desde  $10^{-7}$ s até valores na faixa de milisegundos. Por envolver transições entre estados de multiplicidades distintas a emissão de fluorescência como em um processo de decaimento, é de primeira ordem e pode ser descrito por uma função exponencial:

$$A^* = A_0 e^{-\frac{t}{\tau_0}} \quad (3.3)$$

Quando  $t = \tau_0$

$$\frac{A^*}{A_0} = e^{-1}$$

$$\therefore A^* = \frac{A_0}{e} \quad (3.4)$$

onde  $A_0$  é o número de moléculas excitadas no instante que a luz excitadora é desligada e  $A^*$  é o número de moléculas que permanecem excitadas em um instante  $t$ , após a luz excitadora ser desligada e  $e$ =base natural do logarítmo=2,71828.

### 3.3.5 Arranjo experimental para a medida de fluorescência

A fig.7 mostra uma montagem esquemática típica para as medidas de fluorescência.

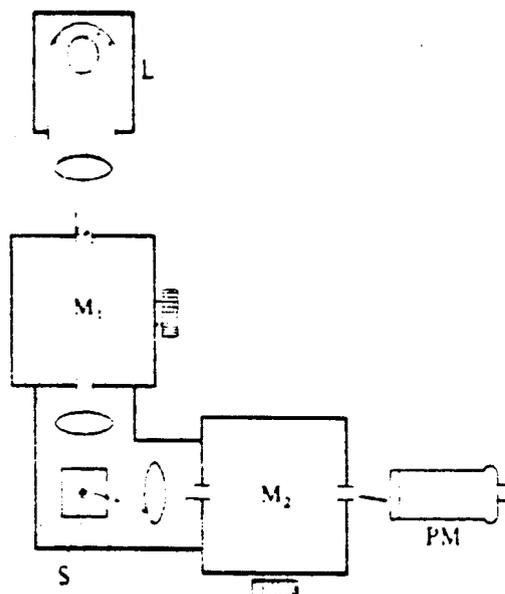


fig.7 Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro. L é a fonte de luz;  $M_1$  é um monocromador de excitação;  $M_2$  é um monocromador de emissão e PM é uma fotomultiplicadora e s a amostra. (Cantor,1980)

Este arranjo pode ser usado de duas maneiras: se variarmos o monocromador de emissão  $M_2$  mantendo-se fixo o monocromador de excitação  $M_1$ , temos um espectro de emissão, que é a distribuição da intensidade em função do comprimento de onda de luz emitido pelo singlete excitado. Alternativamente podemos ter  $M_2$  fixo e  $M_1$  variando. Neste caso temos a produção do espectro de excitação. Como todos os estados excitados de energia mais alta decaem rapidamente para o estado vibracional mais baixo do primeiro estado eletrônico excitado antes da emissão, o espectro de excitação de um composto puro deve ter exatamente a mesma forma do espectro de absorção.

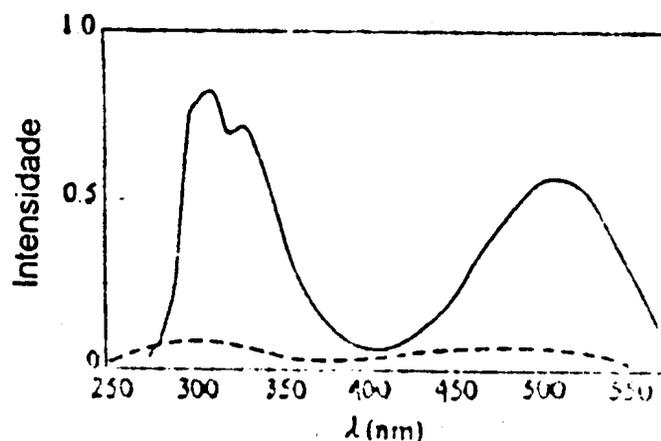
### 3.4 Sensibilidade da fluorescência ao meio

Geralmente a emissão da fluorescência é muito mais sensível ao meio ambiente em que se encontra o cromóforo que a absorção de luz. Portanto, a fluorescência é uma técnica muito mais efetiva para se estudar as ligações dos ligantes ou mudanças conformacionais de proteínas. A sensibilidade da

fluorescência é uma consequência do longo tempo que a molécula permanece no estado excitado antes da relaxamento.

Na fluorescência um singlete permanece no estado excitado cerca de  $10^{-9}$ s. Neste tempo vários tipos de processos podem ocorrer, tais como reações de protonação ou desprotonação, mudanças conformacionais locais de proteínas, alterando a natureza química ou a coordenada de ligação afetando assim as características da emissão. No caso da absorção ótica, que é um processo que ocorre em  $10^{-15}$  s, a molécula e seu meio são efetivamente estáticos.

Muitas moléculas fluorescentes tem uma propriedade conveniente: ter a fluorescência suprimida quando estão em solução aquosa; porém quando estão em meio rígido ou não polar, tem a intensidade da fluorescência aumentada.



(.1)

fig.8 Espectro de excitação do brometo de etidina em solução aquosa (linha cheia) ou ligado (linhas tracejadas)

Se um marcador for ligado a um sítio não polar ou rígido de uma proteína o espectro de fluorescência será dominado por espécies ligadas. Um exemplo é o caso do brometo de etidina apresentado na fig.8

Um outro efeito do meio, é o cromóforo fluorescente sofrer supressão colisional devido a solutos moleculares. O oxigênio é um tripleto no estado fundamental que ao colidir com um singleto excitado promove o cruzamento entre sistemas aumentando a velocidade de conversão singleto-tripletto, suprimindo a fluorescência. Qualquer átomo pesado, como por exemplo o iodeto e os íons de césio, apresenta também propriedade supressora, entretanto através de um mecanismo distinto (Cantor, 1980).

Um cromóforo livre em solução aquosa é muito sensível para tal supressão. Quando incorporado em uma estrutura macromolecular ele se torna menos sensível ao solvente. Esta blindagem é uma proteção contra a supressão da fluorescência. As medidas de fluorescência em função da concentração do supressor podem ajudar a discriminar grupos de uma proteína que estejam profundamente escondidos.

### **3.5 Supressão de fluorescência**

Denomina-se supressão de fluorescência, qualquer processo que diminui a intensidade da fluorescência de uma dada espécie. Estes processos podem ser : reações no estado excitado, transferência de energia, formação de complexos e supressão por colisão.

Dentre estes processos iremos discutir a supressão colisional e a supressão estática. Chama-se supressão colisional ou dinâmica aquela que é devido às colisões entre fluoróforos e supressores. Por outro lado a supressão estática aquela devido a formação de complexos.

A supressão da fluorescência tem sido muito utilizada como ferramenta. Estas aplicações são devido a propriedades favoráveis do processo de supressão. Os dois tipos de supressão requerem um contato entre o fluoróforo e o supressor, e conseqüentemente fornecem informações importantes sobre o fluoróforo.

No caso da supressão estática, um complexo é formado entre o fluoróforo e supressor, sendo que, este complexo não é fluorescente.

No caso da supressão colisional, o supressor precisa difundir com o fluoróforo durante o tempo de vida excitado (é um processo dependente do tempo). Após o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton. Através desta observação, pode-se conhecer, por exemplo, a acessibilidade do fluoróforo ao supressor. Se um dado solvente é muito viscoso, então a difusão é muito lenta, portanto, a supressão será inibida. Com isso a supressão pode revelar a velocidade de difusão do supressor.

### 3.5.1 Supressão colisional

A supressão colisional da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_D \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3.5)$$

F e  $F_0$  são as intensidades de fluorescência na presença e na ausência de supressores, respectivamente;  $k_D$  é a constante

bimolecular de supressão;  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor;  $[Q]$  é a concentração do supressor.

Geralmente representamos graficamente  $F_0 / F$  em função de  $[Q]$  pois espera-se que  $F_0/F$  seja linearmente dependente da concentração do supressor. A reta deste gráfico deve interceptar o eixo para  $F_0 / F = 1$  e a inclinação nos fornece a constante  $K_{SV}$ , ( $K_{SV}^{-1}$  é a concentração do supressor para o qual  $F_0 / F = 2$  ou seja 50% da intensidade seja suprimida).

Em geral, um gráfico de Stern-Volmer linear indica uma única classe de fluoróforos ou pelo menos todos igualmente acessíveis ao supressor. Se existir mais de uma classe de fluoróforos, cujas acessibilidades ao supressor são distintas, então o gráfico de Stern-Volmer não será um gráfico linear.

É importante observar aqui, que apenas o gráfico linear de Stern-Volmer não prova a ocorrência de supressão colisional da fluorescência. Devemos ter maiores evidências, das quais falaremos mais adiante.

### 3.5.2 Supressão estática

No caso da supressão estática, há formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Quando este complexo absorve luz ele retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton.

Podemos relacionar a intensidade da fluorescência com o supressor através da constante de associação da formação de complexos. Esta constante será dada por:

$$K_s = \frac{[F_Q]}{[F][Q]} \quad (3.6)$$

$[F_Q]$  é a concentração do complexo;  $[F]$  e  $[Q]$  são respectivamente as concentrações do fluoróforo e supressor livres.

Se a espécie complexada é não fluorescente, então a fração da fluorescência que permanecer ( $F_0 / F$ ) será dada pela fração dos fluoróforos que permaneceram livres ( $f$ ), isto é:

$$f = \frac{F_0}{F} \quad (3.7)$$

Denominando-se  $[F]_0$  como a concentração total de fluoróforos, temos que:

$$[F]_0 = [F] + [F_Q] \quad (3.8)$$

Substituindo a equação (3.8) em (3.6),

$$K_s = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (3.9)$$

Como a razão das concentrações de fluoróforos  $[F]/[F]_0$  equivale à razão entre as intensidades de fluorescência  $F/F_0$ , temos:

$$K_s = \frac{F_0}{F[Q]} - \frac{1}{[Q]} = \frac{1}{[Q]} \left\{ \frac{F_0 - F}{F} \right\} \quad (3.10)$$

$$[Q]K_s = \frac{F_0}{F} - 1$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad (3.11)$$

Podemos notar, que a equação (3.5) é idêntica a equação (3.11), com exceção da constante de supressão que na equação (3.11) representa a constante de associação.

Então para distinguirmos qual é o tipo de supressão que está ocorrendo, precisamos conhecer a dependência da supressão com o tempo de vida, com a temperatura e com a viscosidade.

Medidas de tempo de vida da fluorescência é o método mais efetivo para se distinguir entre os dois tipos de supressão.

As medidas de supressão em função da temperatura podem indicar qual o mecanismo de supressão que está ocorrendo. A supressão dinâmica depende da difusão e para altas temperaturas o coeficiente de difusão aumenta e portanto espera-se que a constante de supressão bimolecular também aumente. Ao contrário, na supressão estática a estabilidade do complexo decresce com o aumento da temperatura e conseqüentemente diminui o valor da constante de supressão estática .

Podemos também distinguir por meio dos espectros óticos qual é o tipo de supressão. A supressão colisional afeta apenas os estados excitados do fluoróforo e portanto não há mudanças no espectro ótico. Já a formação de complexos no estado fundamental frequentemente resulta na perturbação do espectro ótico do fluoróforo.

### 3.6 Transferência de energia

A transferência de energia é definida como a transferência do estado excitado de um doador (d) para um aceitador (a). Esta transferência é resultante da interação dipolo - dipolo entre o doador d e o aceitador a.

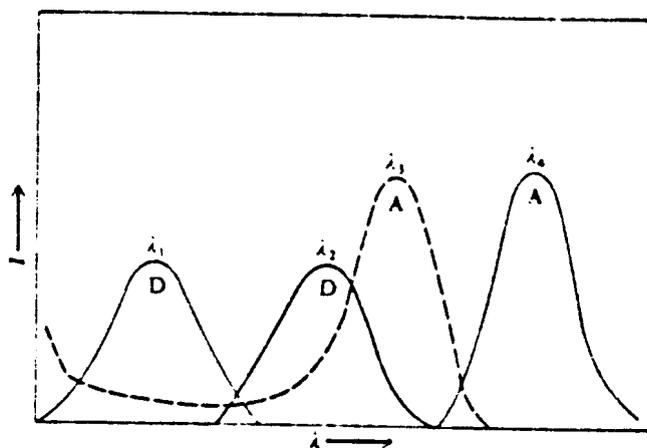


fig.9 Espectro esquemático para um par de doador e aceitador para medidas de transferência de energia (Cantor, 1980)

A taxa de transferência de energia depende da superposição dos espectros de emissão do doador e de absorção do aceitador, da orientação relativa do doador e do aceitador, e da distância entre as moléculas. A partir da medida da transferência de energia pode se medir distâncias entre doadores e aceptores. Como demonstraremos em seguida tais medidas requerem que d-a sejam separadas por uma distância que não varia durante o tempo de vida do estado excitado do doador.

Considere um doador e um aceitador separados por uma distância fixa R. A teoria de Theodore Förster estabelece que, a taxa de transferência de energia é dada por :

$$k_T = \left(\frac{1}{\tau_D}\right)\left(\frac{R_0}{R}\right)^{-6} \quad (3.12)$$

$\tau_D$  é o tempo de vida do doador na ausência do aceitador e  $R_0$  é a distância crítica de Förster, dada pela equação (3.13):

$$R_0 = 9,7 \times 10^3 (J \kappa^2 n^{-4} \phi_D)^{\frac{1}{6}} \text{ cm} \quad (3.13)$$

onde  $J$  é a integral superposição de recobrimento entre as bandas de emissão do doador e de absorção do aceitador,  $f_D$  é a fluorescência normalizada do doador,  $n$  é o índice de refração do meio que separa o doador e o aceitador,  $\phi_D$  é o rendimento quântico do doador na ausência do aceitador,  $\kappa^2$  é um fator geométrico complexo que depende da orientação relativa do doador e do aceitador.

Um parâmetro que é medido frequentemente é a eficiência da transferência de energia ( $E$ ). Este parâmetro, a fração de doadores excitados que são deexcitados pela transferência de energia para os aceitadores, é determinado pela equação (3.14)

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} \quad (3.14)$$

Substituindo (3.12) em (3.14), temos :

$$E = \frac{R^6}{R_0^6 + R^6} \quad (3.15)$$

Portanto a eficiência de transferência de energia pode ser diretamente relacionada com as distâncias entre um doador e um aceitador.

### 3.7 Fluorescência de proteínas

Três aminoácidos são responsáveis pela emissão da fluorescência que se observa em proteínas: o trp, a tyr e a phe. Os espectros de absorção estão mostrados na fig.10a e os seus parâmetros tabelados na tabela VI.

tabela VI-Propriedades espectroscópicas da phe, tyr e trp (Szabo,1989)

aminoácidos	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\phi_F$	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)
fenilalanina	258	193	0.06	282
tirosina	275	1405	0.14	304
triptofano	275	5580	0.14	348
	290	3935		

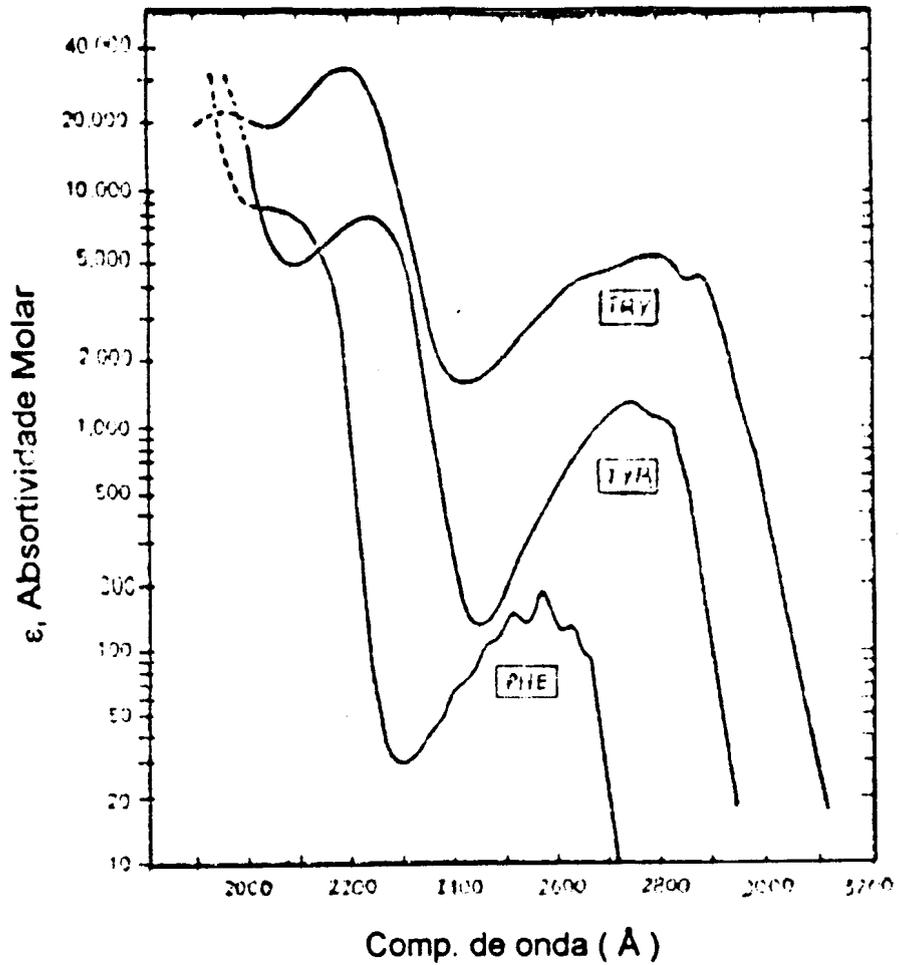


fig.10 (a) Espectros de absorção dos aminoácidos aromáticos (Lakowicz, 1983)

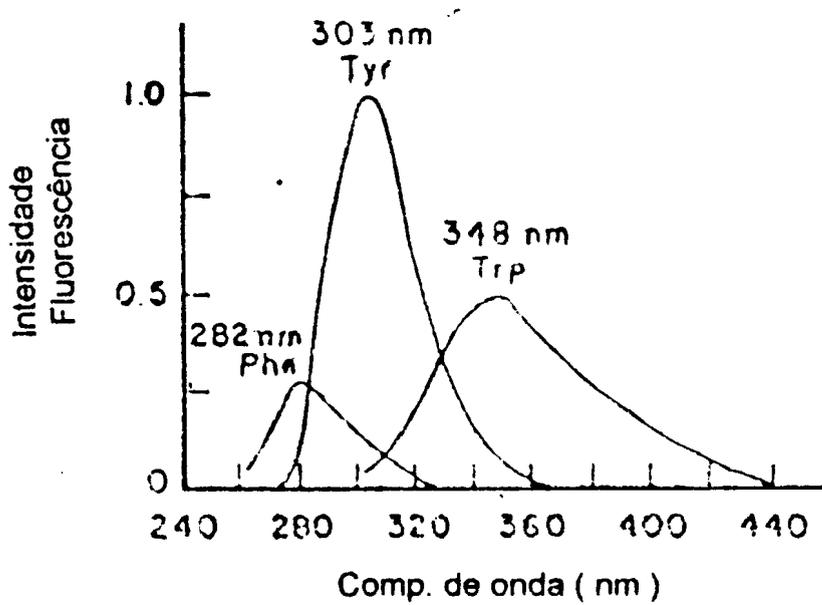


Fig.10 (b) Espectros de emissão dos aminoácidos (Lakowicz, 1983)

Geralmente as proteínas são excitadas em um comprimento de onda próximo ou maior que 280nm. Em consequência, a phe não é excitada; além disso o rendimento quântico desta é muito mais baixo e portanto a emissão deste resíduo raramente é observado.

A absorção de proteínas em 280 nm então é devido aos resíduos da tyr e do trp. Em comprimentos de onda maiores que 295 nm, a absorção é devido principalmente ao trp. Sugerindo então que a fluorescência do trp pode ser excitada seletivamente na faixa de 295nm à 305nm. Entretanto, trabalhos recentes mostram que, a tyr também tem sido utilizada como um marcador extrínseco de fluorescência de proteínas, (Huggins,1993; Lin,1991; Tadaki, 1993; Wells-Knecht, 1993). Em proteínas que possuem os dois aminoácidos o trp e a tyr , pode-se selecionar a emissão da tyr por métodos químicos ( Casas-Finet, 1992).

O espectro de emissão dos aminoácidos aromáticos estão mostrados na fig.10b. A emissão máxima do trp ocorre em 348 nm e é altamente sensível a polaridade do solvente. A emissão máxima da tyr ocorre em 304 nm , sendo praticamente insensível a polaridade do solvente. E por último a emissão da phe ocorre em 282nm.

### **3.7.1 A emissão do trp e da tyr**

Em muitas proteínas, a emissão da fluorescência é dominada pelo trp, quando o comprimento de onda de excitação é maior que 280 nm. Isto está ilustrado na fig.11; ela mostra o espectro de emissão da albumina do soro humana (ASH), do trp e de uma mistura de tyr e trp na razão molar 18:1.

348

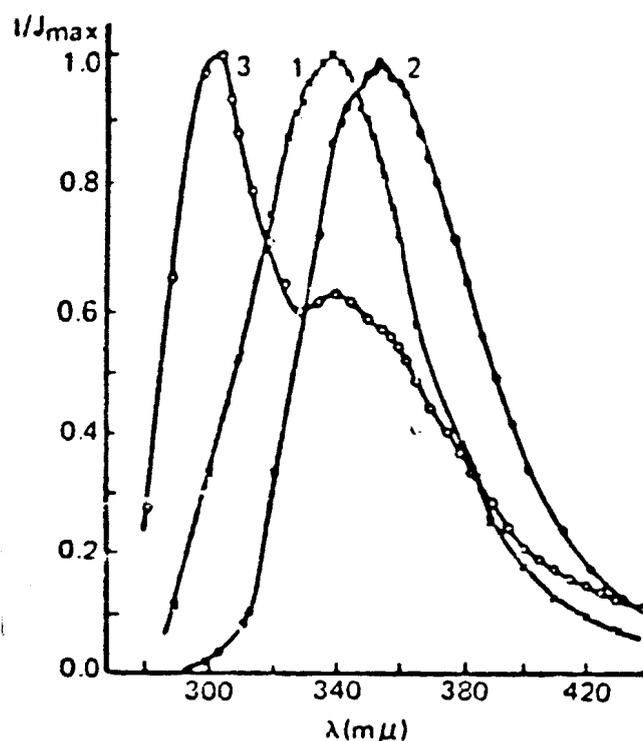


fig.11 Espectro de emissão da fluorescência do ASH e aminoácidos aromáticos. (1)ASH, (2)try, (3)mistura de tyr com try. (Lakowicz,1983)

A emissão de trp de ASH ocorre em comprimentos de onda menores quando comparados a do trp em água. Este deslocamento para o azul é resultado da blindagem do trp pela água. Embora exista grande quantidade de tyr, o espectro de emissão do ASH é predominantemente devido ao trp. Isto é surpreendente, pois a emissão da tyr domina o espectro da mistura da tyr e do trp 18:1, que reproduz a proporção destes resíduos no ASH. Apesar da sua alta absorvidade em 280nm, seu alto rendimento quântico em solução aquosa, a emissão da tyr de muitas

proteínas é muito pequena e na maioria das vezes não é detectável.

A ausência da emissão da tyr em muitas proteínas depende da sua estrutura tridimensional. Geralmente a desnaturação de proteínas resulta no crescimento da emissão da tyr. Foram sugeridas muitas razões para a ausência da fluorescência da tyr nas proteínas: uma delas pode ser a transferência de energia para resíduos do trp. Espera-se que a transferência de energia seja eficiente, desde que a distância crítica de Förster para transferência Tyr-Trp, seja aproximadamente 14 Å, cujo valor é comparável ao diâmetro de muitas proteínas.

Outra razão pode ser a supressão da fluorescência da tyr pela presença de grupos próximos à cadeia peptídica (grupos carboxílicos carregados ou grupos aminos não carregados). Tal supressão é devido a transferência de um próton para prótons aceitadores durante o tempo de vida do estado excitado (Lakowicz, 1983). Além disso a fluorescência da Tyr também pode ser suprimida pelos grupos amino carregados e pelos grupos carboxilatos neutros.

## CAPÍTULO IV-MATERIAIS E MÉTODOS

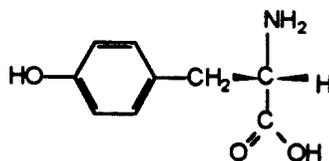
### 4.1 Materiais

Nesse trabalho foram utilizados a L-tyr na forma cloridrato (PM=217.7) e os peptídeos gly-L-tyr e L-tyr-gly (PM=238.2) obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co.

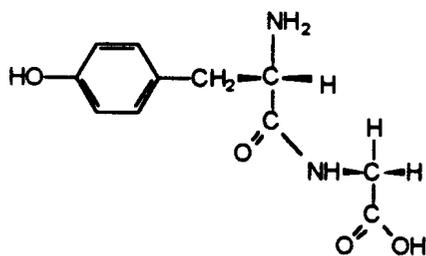
As soluções de cobre foram preparadas à partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  obtido comercialmente da Merck.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

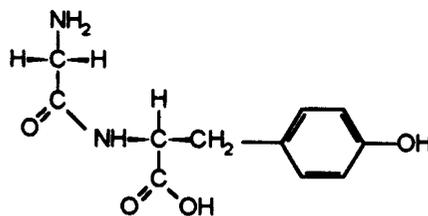
As estruturas químicas da tyr e dipeptídeos estão apresentados na fig.12.



L-tirosina



L-tirosil-glicina



Glicil-L-tirosina

fig.12 Estrutura molecular da L-tyr, L-tyr-gly e Gly-L-tyr

## 4.2 Equipamentos

Para as medidas de absorção ótica foram utilizados os espectrofotômetros Varian modelo Cary 2315 e Shimadzu UV-180.

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Varian modelo E-109, operando em banda-X (9.5 GHz) em duas temperaturas, ambiente e próximo à do nitrogênio líquido (-150°C)

A cavidade utilizada foi a retangular (Varian E-231) para ambas temperaturas.

Para as medidas à temperatura ambiente foram utilizadas como porta amostra uma cela plana de quartzo, a fim de se evitar perdas dielétricas devido a presença de água na cavidade. Há um mínimo de perda quando a parte larga da cela se encontra paralela à lateral da cavidade e a camada de água corresponde a espessura da parede interna da cela que é cerca de 0,1mm.

As medidas à temperatura baixa foram feitas por meio do sistema de temperatura variável da Varian. Neste sistema, o fluxo de nitrogênio é mantido resfriado por uma serpentina imersa em nitrogênio líquido. Neste caso as amostras são colocadas em tubos de quartzo de 3,0 mm de diâmetro interno.

Para as medidas de fluorescência utilizou-se um espetrofluorímetro Jasco FP777, e as concentrações foram controladas espectroscopicamente através de medidas de absorção em 275nm em um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000 ou Shimadzu UV-180.

As mudanças de pHs das soluções foram controladas pelo pHmetro Corning modelo 130.

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Absorção Ótica e Ressonância Paramagnética Eletrônica

As amostras foram dissolvidas em água deionizada, sendo que para a tyr utilizamos uma concentração de 2mM e para os dipeptídeos 10mM. A menor concentração de tyr foi devido à sua baixa solubilidade na faixa de pH estudada. Não foi possível a utilização de tampões, pois a maioria destes complexam como o cobre.

Deve-se aqui ressaltar que para facilitar a dissolução da L-tyr e L-tyr-gly as soluções foram alcalinizadas com pequenas alíquotas de NaOH 1M e posteriormente o pH das soluções foi ajustado conforme o desejado.

A estas soluções foram adicionadas, uma solução de  $\text{CuSO}_4$  de modo a se obter a relação ligante/metal de 10:1.

Variou-se o pH destas soluções de 2.0 a 13.5 utilizando-se soluções estoques de várias concentrações de NaOH e HCl, tomando-se medidas a cada 0.5 unidades de pH.

Estas amostras foram utilizadas para as medidas de: absorção ótica no visível, medindo-se as bandas correspondentes às transições d-d dos complexos de Cu(II) da tyr e dipeptídeos, obtendo-se espectros na faixa de comprimentos de onda de 400nm a 800nm e para Ressonância Paramagnética Eletrônica em duas temperaturas ( ambiente e  $-150^\circ\text{C}$  ). Foi utilizada a modulação dos sinais em 100KHz com amplitude de modulação 2 Gauss pico à pico e a potência de microondas de 10mW. Os demais parâmetros foram escolhidos de modo a se obter espectros sem distorção instrumental ou seja com velocidade de varredura menor do que

$\frac{\Delta H}{\tau}$  onde  $\Delta H$  é a largura de linha e  $\tau$  a constante de tempo utilizada. A calibração dos espectros afim de obter os valores de  $g$  dos complexos estudados foi realizada utilizando-se de um frequencímetro HP e padrão de  $\text{Cr}^{3+}$  em óxido de magnésio, com valor de  $g = 1,9797$ .

### 4.3.2 Fluorescência

As soluções de tyr e seus dipeptídeos foram preparadas em água deionizada, com concentrações em torno de  $40\mu\text{M}$  afim de se evitar efeito de filtro interno mantendo  $\text{DO}_{275} \leq 0,1$ . As concentrações foram controladas espectroscopicamente através das medidas da absorvância em  $275\text{nm}$  e usando-se o coeficiente de extinção molar  $1405\text{M}^{-1}$  (Szabo, 1989) para a tyr.

Para melhor dissolução de tyr e tyr-gly foi necessária a adição de NaOH às soluções e subsequente ajuste do pH ao valor desejado.

Determinamos a concentração da tyr pela equação da lei de Beer-Lambert:

$$\text{DO} = \epsilon C l \Rightarrow C = \frac{\text{DO}}{\epsilon l} \quad (4.1)$$

onde DO é a densidade ótica;  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $l$  caminho ótico (cm) e  $C$  é a concentração da solução.

Observamos a intensidade da fluorescência destas soluções em função do pH, tomando-se medidas a cada 0.5 unidades de pH.

Realizamos também titulações das soluções contendo íon metálico  $\text{Cu}^{2+}$  nas seguintes relações ligante/metálico: 1:1 ;2:1; 4:1.

As variações do pH foram realizadas com a adição de pequenas alíquotas de NaOH e HCl.

Para se obter informações adicionais da tyr e seus dipeptídeos com o  $\text{Cu}^{2+}$ , foram feitas titulações em função da concentração do metal em dois pHs fixos, pHs 7.0 e 9.0 .

Para todas as medidas, tomou-se o cuidado de proteger as amostras da luz mantendo-as envoltas em papel alumínio.

Os resultados das titulações foram analisados conforme descrito a seguir afim de se obter os valores de pK dos grupos ionizáveis e das constantes de associação de  $\text{Cu}^{2+}$  nos complexos.

#### **4.4 Análise de dados**

##### **4.4.1 Absorção ótica - decomposição em gaussianas**

Com o objetivo de se obter valores de energias associadas as transições d-d do cobre nos complexos em função do pH, os espectros de absorção ótica foram decompostos em componentes gaussianas. Para tal usou-se o programa SFG (Melo, 1992), onde um espectro eletrônico, com forma de linha gaussiana ou lorentziana pode ser decomposto em até seis gaussianas.

É possível variar a intensidade, a largura e a posição de cada componente individualmente e simultaneamente comparar visualmente ou através do desvio padrão a composição espectral (espectro teórico) com os espectros obtidos experimentalmente.

#### 4.4.2 RPE - subtrações espectrais

Muitas vezes os espectros de RPE se apresentam como uma mistura de muitos complexos, com isso nem sempre é possível obter todos os parâmetros experimentais diretamente dos espectros. Com a finalidade de se isolar os espectros puros e obter os dados experimentais da melhor maneira possível utilizaram-se diferenças espectrais.

A subtração é feita através de uma equação do tipo:  $C=B-Ax$ , onde B é o espectro mistura (onde existe mais de um complexo), A é o espectro puro, C é o espectro resultante da diferença entre B e A multiplicado por um fator X, que corresponde à porcentagem do complexo A presente no espectro mistura B e que é ajustável na otimização do espectro diferença.

#### 4.4.3 Fluorescência- Determinação dos pKs e constantes de associação

Os pKs dos grupos ionizáveis e as constantes de equilíbrio foram determinados pelas equações A1 e A18 desenvolvidas no apêndice.

Os ajustes das curvas foram feitos por meio de regressão não linear, utilizando-se o método dos mínimos quadrados.

## CAPÍTULO V- RESULTADOS EXPERIMENTAIS

### 5.1 Absorção ótica

As medidas de absorção ótica dos complexos dos dipeptídeos gly-tyr e tyr-gly com o íon  $\text{Cu}^{2+}$  foram realizadas variando-se o pH de 2,0 à 13,5 na faixa de comprimentos de onda de 400nm à 800nm.

A fig.13 mostra alguns dos espectros de absorção ótica obtidos dos complexos de tyr-gly com o  $\text{Cu}^{2+}$  em função do pH.

A medida que aumentamos o pH, podemos observar pelos espectros de absorção que há um deslocamento do máximo das bandas para o azul, isto é comprimentos de onda menores, apresentando características típicas das transições d-d correspondentes às várias espécies de complexos do metal. Acima de pH 8,0 há um deslocamento para o vermelho. A inspeção dos espectros demonstra a existência de uma banda larga que não permite a resolução de todas as transições. Essa resolução só é possível através de tratamento adequado dos espectros (por exemplo, de decomposição em Gaussianas).

O gráfico da fig.14 nos mostra a variação do comprimento de onda do máximo da banda de absorção dos 2 dipeptídeos em função do pH.

O gráfico sugere a existência de pelo menos 4 espécies distintas. A primeira espécie abaixo de pH 3,5 ; a segunda ao redor de pH 5,0 ; a terceira ao redor de pH 8,5 e a última acima de pH 11,0.

Sabendo que à medida que aumentamos o pH , vários grupos vão se desprotonando e conseqüentemente favorecendo o

aparecimento de espécies distintas, podemos observar pela Fig. 13 que :

-Até pH 3,5 os espectros apresentam uma banda larga e mal resolvida, próxima a 800nm e característica do íon  $\text{Cu}^{2+}$  livre em solução. Nestes pHs baixos, todos os grupos que apresentam prótons dissociáveis estão protonados e o íon  $\text{Cu}^{2+}$  deve estar, então coordenado com moléculas de água.

-Ao redor de pH 4,0 o grupo carboxílico já está desprotonado, mas ainda tem bastante cobre hidratado.

-Ao redor de pH 5,0, os grupos carboxílicos certamente estão desprotonados e os grupos amina já devem estar começando a contribuir com uma fração desprotonada. Podemos esperar, então o íon  $\text{Cu}^{2+}$  complexado com 2 ligantes através de um nitrogênio amina e um oxigênio carboxílico por peptídeo isto é o complexo  $\text{CuL}_2$ .

-Para pHs maiores que 6,0, os nitrogênios peptídicos já devem estar desprotonados. Podemos esperar então o quelato formado pelos nitrogênios amina e amida, pelo oxigênio da carboxila e o oxigênio da água como quarto ligante, o complexo  $\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})$ . Esta coordenação tridentada dos dipeptídeos em complexos de cobre foi encontrada para diversos outros sistemas (Nakon, 1974 e Koslowski, 1977).

-Acima de pH 11,0 Koslowski (Koslowski, 1977) sugere que o complexo observado é o  $\text{CuL}(\text{OH})_2^{2-}$ , onde a substituição do oxigênio carboxílico por uma hidroxila levaria a distorsão da simetria do complexo que se torna muito baixa. Da figura 14 pode-se notar que  $\lambda_{\text{max}}$  alcança um valor mínimo em torno de pH 8,5 voltando a aumentar em pHs alcalinos. Convém mencionar que os espectros de ambos dipeptídeos são extremamente similares.

Por causa da baixa solubilidade da tyr em água, a concentração utilizada em nossos experimentos também foi muito baixa (2mM); devido à isso não foi possível obter as medidas de absorção ótica para o aminoácido.

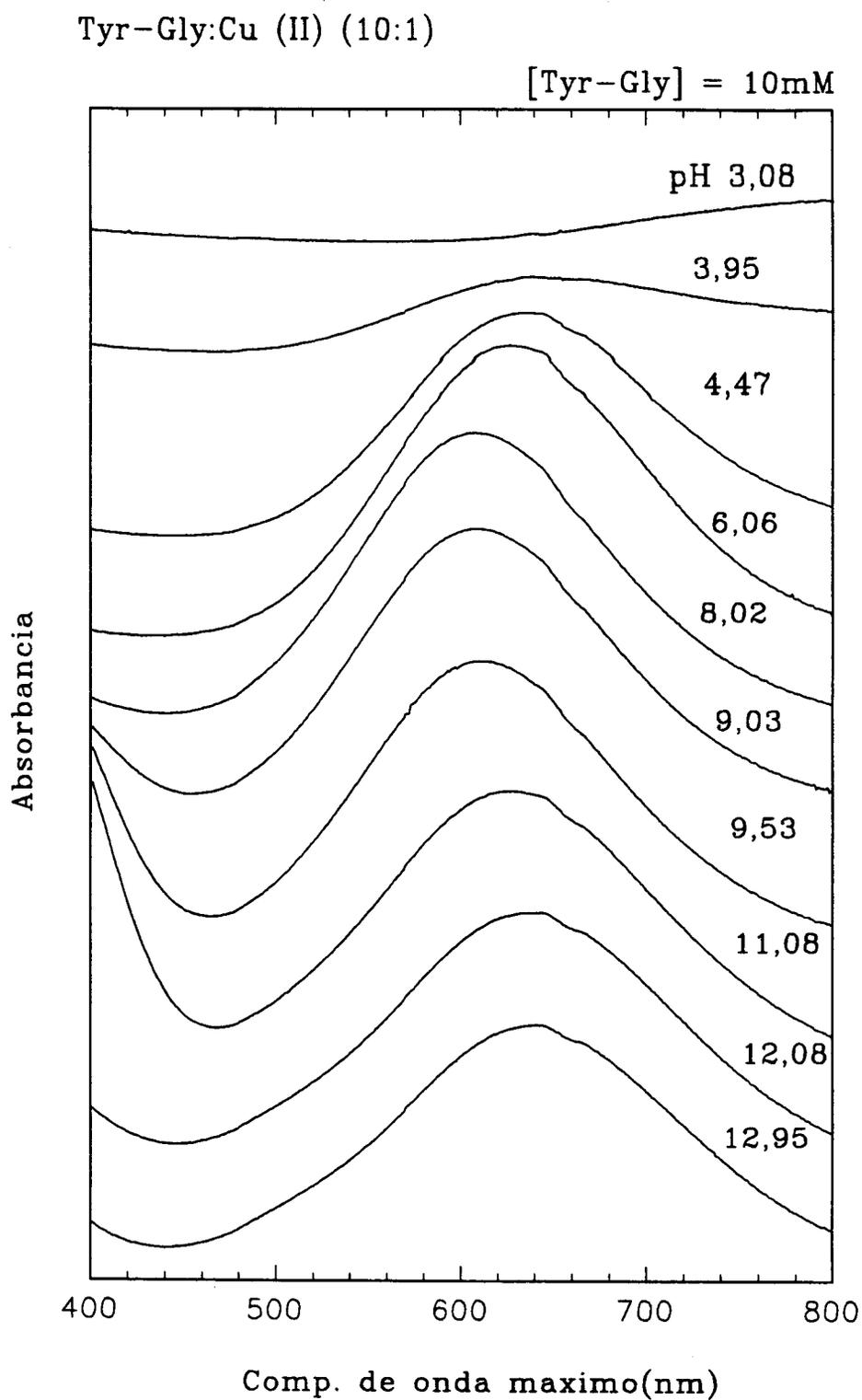


fig.13 Espectro de absorção ótica dos dipeptídeos em função do pH. Os zeros dos espectros na ordenada foram deslocados.

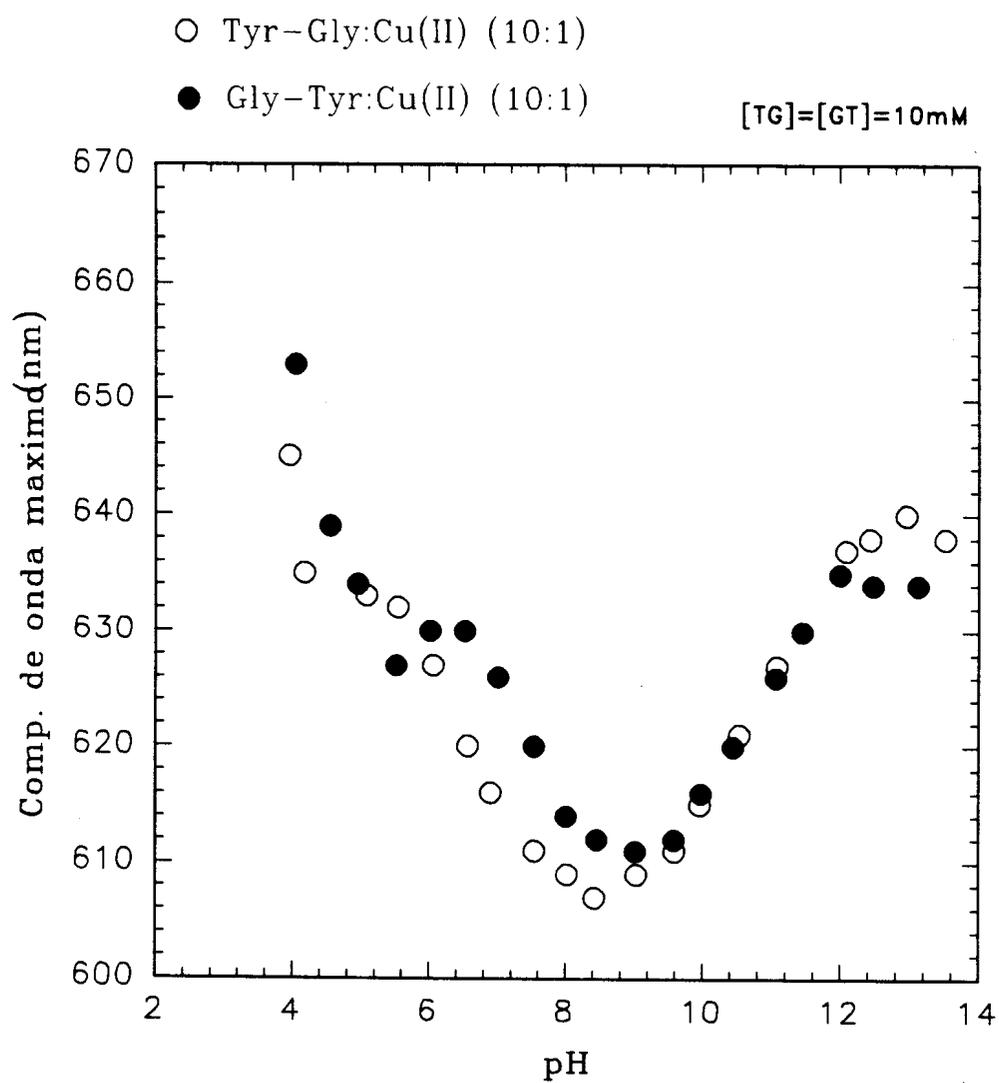


fig.14 Variação do comprimento de onda do máximo da banda de absorção dos dipeptídeos em função do pH.

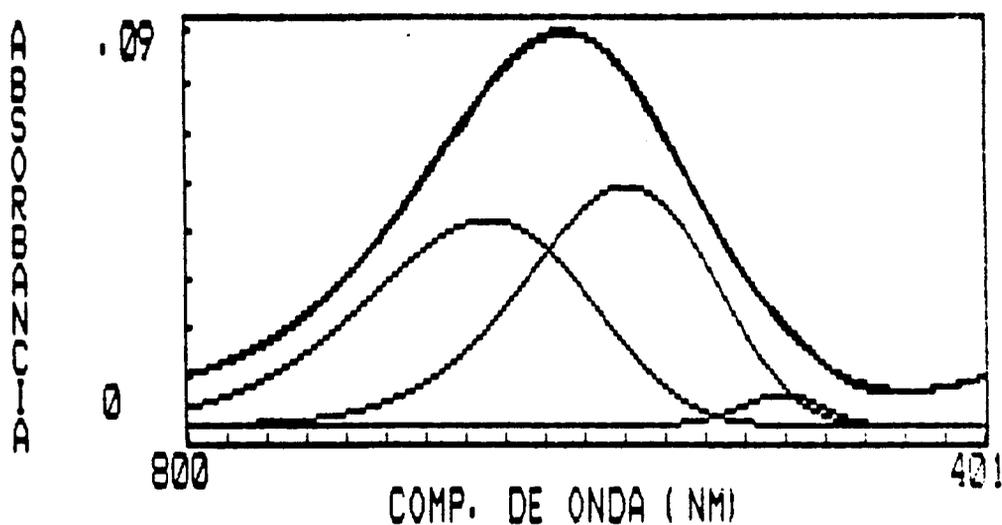
### 5.1.1 Decomposição em gaussianas

Com a finalidade de obter os valores de energias associadas às transições d-d do  $\text{Cu}^{2+}$  nos complexos em função do pH e caracterizar de modo mais completo a sua estrutura eletrônica, os espectros de absorção foram decompostos em componentes gaussianas. Utilizou-se para tal o programa mencionado no capítulo de métodos. Os resultados das simulações para ambos dipeptídeos e alguns pHs escolhidos estão apresentados nas figuras 15a, 15b, 16a e 16b. De modo geral os espectros podem ser decompostos em 3 gaussianas, sendo que uma delas tem uma contribuição muito menor que as outras duas. Nas tabelas VII e VIII estão apresentados os parâmetros das decomposições em função do pH, sendo que somente os dados das duas bandas mais intensas foram incluídos. São apresentados a posição do máximo de gaussiana ( $\lambda$ ), a sua área (que podem fornecer informações à respeito da força de oscilador) e o valor de energia correspondente à posição, ou seja  $1/\lambda$  em  $\text{cm}^{-1}$ .

O comportamento dos máximos das duas bandas é similar ao da banda total de absorção: ocorre diminuição de  $\lambda_{\text{max}}$  com aumento de pH, passagem por um valor mínimo e retorno a um valor maior que o mínimo, porém menor que o inicial para o meio ácido.

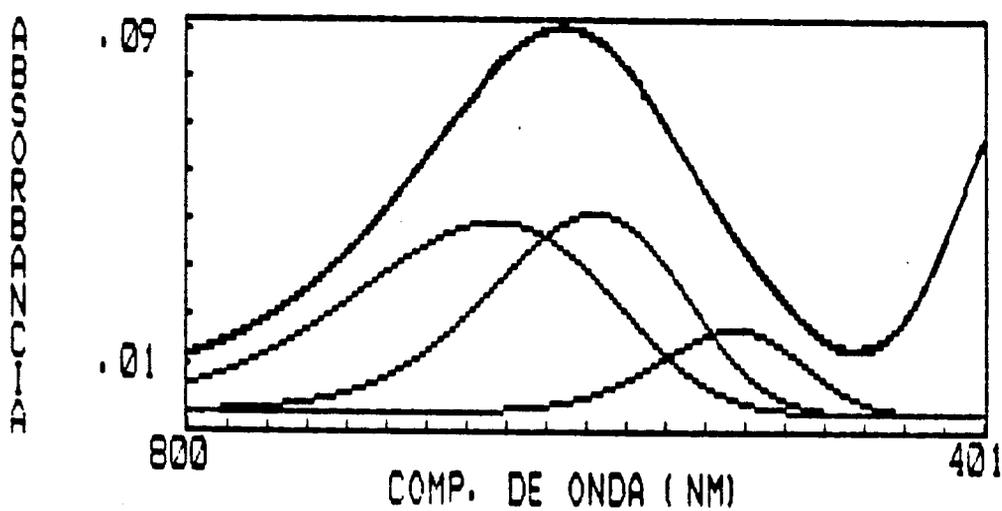
Nas figuras 17 e 18 as áreas para as 3 gaussianas são mostradas em função do pH para os dois dipeptídeos. Nota-se que a contribuição de banda menos intensa em 490-500nm aumenta no gly-tyr somente acima de pH 10,0. Essa banda para o tyr-gly tem uma contribuição pequena, porém constante em toda a faixa de pH acima de 7,0. As outras duas bandas centradas em 580-600nm e

650-660nm tem comportamentos diferentes nos dois dipeptídeos: para o gly-tyr na faixa de pH 7,50 a 11,0 a banda de 600nm é mais intensa do que a banda em 660nm; para o tyr-gly ocorre em pHs menores na faixa de pH 5,5-10,5. Considerando que as larguras das gaussianas variam pouco com o pH a variação de intensidades corresponde essencialmente à variação de áreas e reflete a proporção das duas componentes em função do pH.



Tyr-Gly:Cu<sup>2+</sup> (10:1)      pH7,54

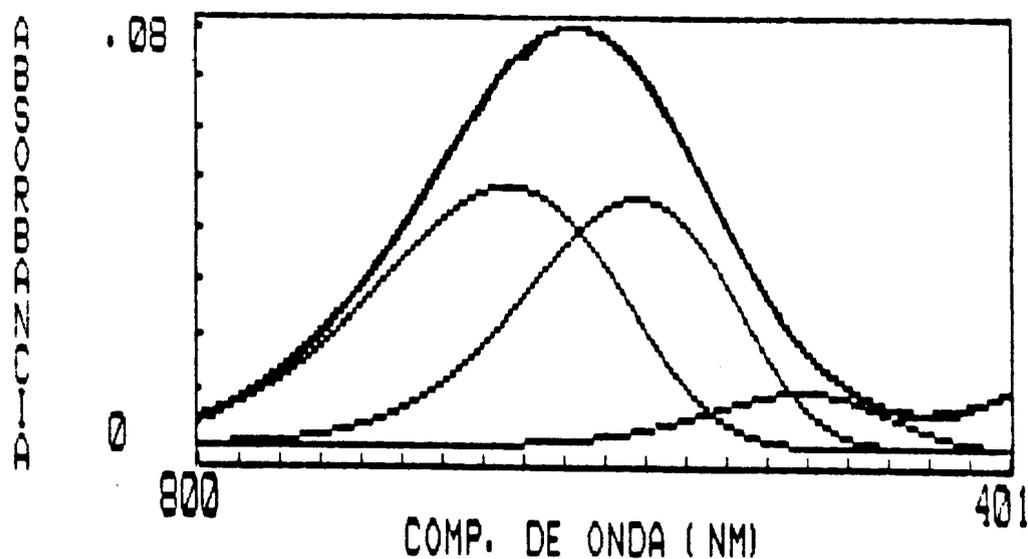
Gaussiana	Amplitude	Largura	Posição	Área
G1	0.0422	2.69	652	0.14227
G2	0.0624	2.89	585	0.22602
G3	0.0084	1.94	507	0.02042



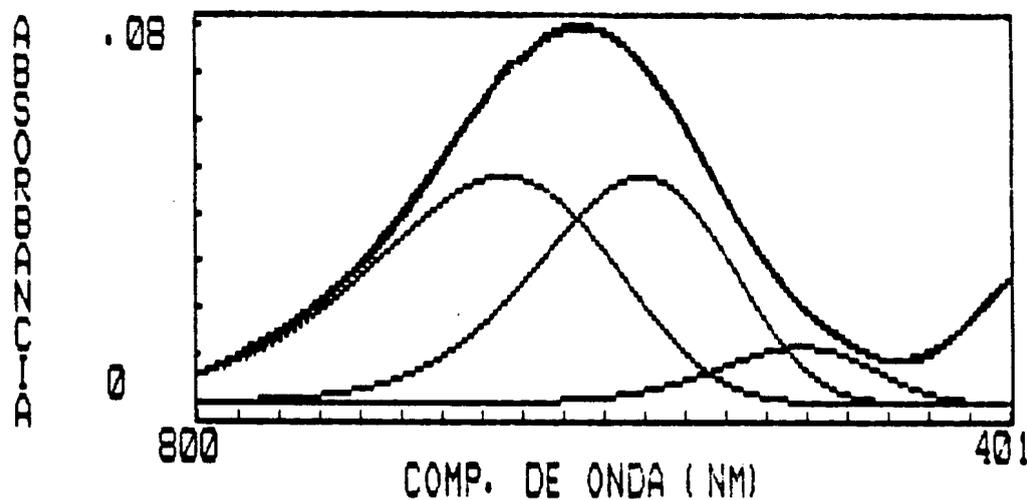
Tyr-Gly:Cu<sup>2+</sup> (10:1)      pH 9,59

Gaussiana	Amplitude	Largura	Posição	Área
G1	0.0437	2.72	653	0.14887
G2	0.0599	2.90	585	0.21771
G3	0.0098	1.86	507	0.02285

fig.15 Decomposição em gaussianas dos espectros óticos dos complexos tyr-gly:Cu(II) (10:1). (a) pH 7,54 e (b) pH 9,59.



Gly-Tyr:Cu <sup>2+</sup> (10:1)		pH 7,54		
Gaussiana	Amplitude	Largura	Posição	Área
G1	0.0415	2.90	645	0.15084
G2	0.0585	3.60	588	0.26395
G3	0.0035	2.23	489	0.00978



Gly-Tyr:Cu <sup>2+</sup> (10:1)		pH 9,59		
Gaussiana	Amplitude	Largura	Posição	Área
G1	0.0391	2.94	641	0.14407
G2	0.0575	3.56	587	0.25655
G3	0.0043	2.22	492	0.01196

fig16 decomposição em gaussianas dos espectros óticos dos complexos gly-tyr:Cu(II) (10:1). (a) pH 7,54 e (b) pH 9,59.

Tabela VII - Parâmetros de decomposição dos espectros de Absorção ótica do Tyr-Gly:Cu<sup>2+</sup> à temperatura ambiente.

pH	banda 1			banda 2		
	$\lambda$ (nm)	Amp	$1/\lambda$ (cm <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	Amp	$1/\lambda$ (cm <sup>-1</sup> )
3,95	663,5	0,0168	1,507	596,7	0,0111	1,676
4,47	663,5	0,0403	1,507	596,0	0,0420	1,678
5,08	663,5	0,0482	1,507	596,0	0,0574	1,678
5,54	664,0	0,0501	1,506	596,0	0,0624	1,678
6,06	661,0	0,0472	1,513	594,0	0,0613	1,684
6,56	659,5	0,0435	1,516	592,0	0,0644	1,689
6,90	657,0	0,0453	1,522	588,0	0,0623	1,699
7,54	652,0	0,0422	1,534	584,0	0,0624	1,711
8,08	650,5	0,0415	1,537	584,0	0,0628	1,712
8,48	651,5	0,0384	1,535	584,5	0,0634	1,711
9,03	651,5	0,0405	1,535	584,0	0,0612	1,712
9,58	653,0	0,0437	1,531	584,5	0,0600	1,711
9,96	654,0	0,4940	1,529	584,5	0,0557	1,711
10,53	655,0	0,0532	1,526	584,5	0,0520	1,711
11,08	656,0	0,0587	1,524	580,0	0,0444	1,724
12,08	667,5	0,0549	1,498	586,5	0,0441	1,705
12,43	668,0	0,0539	1,497	586,0	0,0442	1,706
012,95	667,5	0,0528	1,498	586,5	0,0399	1,705
13,52	669,0	0,0359	1,495	578,5	0,0288	1,702

Tabela VIII - Parâmetros de decomposição dos espectros de absorção ótica do Gly-Tyr:Cu<sup>2+</sup> à temperatura ambiente

pH	banda 1			banda 2		
	$\lambda$ (nm)	Amp	$1/\lambda$ (cm <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	Amp	Amp
4,55	665,9	0,0378	1,502	606,0	0,0322	1,650
4,96	658,9	0,0388	1,518	606,5	0,0474	1,649
5,52	654,5	0,0536	1,528	603,0	0,0575	1,658
6,02	652,0	0,0559	1,534	602,5	0,0616	1,660
6,53	650,0	0,0573	1,539	599,0	0,0607	1,669
7,01	647,0	0,0563	1,546	596,5	0,0603	1,676
7,54	664,5	0,0415	1,552	587,5	0,0585	1,702
8,01	641,5	0,0382	1,559	587,5	0,0584	1,702
9,02	639,5	0,0377	1,564	586,5	0,0587	1,705
9,59	641,0	0,0391	1,560	587,0	0,0575	1,704
10,45	646,5	0,0388	1,547	587,0	0,0563	1,704
11,07	654,0	0,0410	1,529	588,5	0,0531	1,699
11,45	656,5	0,0390	1,523	589,0	0,0457	1,698
12,00	657,0	0,0435	1,522	589,0	0,0464	1,698

Tabela IXa - Tyr-Gly:Cu(II) (10:1)

pH	$K_{//}^2$	$K_{\perp}^2$	$K_{//}$	$K_{\perp}$
5,08	0,509	1,395	0,713	1,181
5,54	0,493	0,686	0,702	0,823
6,06	0,486	0,729	0,697	0,854
6,56	0,491	0,701	0,701	0,837
6,90	0,496	0,715	0,704	0,846
7,54	0,493	0,720	0,702	0,849
8,08	0,498	0,700	0,706	0,837
8,48	0,500	0,720	0,707	0,849
9,03	0,500	0,690	0,707	0,831
9,58	0,496	0,699	0,704	0,836
9,96	0,496	0,699	0,704	0,836
10,53	0,497	0,772	0,705	0,837
11,08	0,496	0,809	0,704	0,899
12,08	0,445	0,913	0,667	0,955
12,43	0,438	0,924	0,662	0,961
12,95	0,438	0,924	0,662	0,961
13,52	0,444	0,912	0,666	0,955

Tabela IXb - Gly-Tyr:Cu(II) (10:1)

pH	$K_{//}^2$	$K_{\perp}^2$	$K_{//}$	$K_{\perp}$
4,55	0,671	0,306	0,819	0,553
4,6	0,616	0,435	0,785	0,659
5,52	0,611	0,458	0,782	0,677
6,02	0,576	0,538	0,759	0,733
6,53	0,592	0,541	0,769	0,736
7,01	0,520	0,493	0,721	0,702
7,54	0,522	0,686	0,722	0,828
8,01	0,524	0,665	0,724	0,815
9,02	0,528	0,707	0,727	0,840
9,59	0,524	0,635	0,724	0,797
10,45	0,518	0,645	0,719	0,803
11,07	0,526	0,582	0,725	0,763
11,45	0,524	0,653	0,724	0,808
12,00	0,523	0,653	0,723	0,808

Tabela IX -  $K_{//}$  e  $K_{\perp}$  são respectivamente fator de redução orbital (grau de covalência) na direção paralela e perpendicular ao campo magnético aplicado.

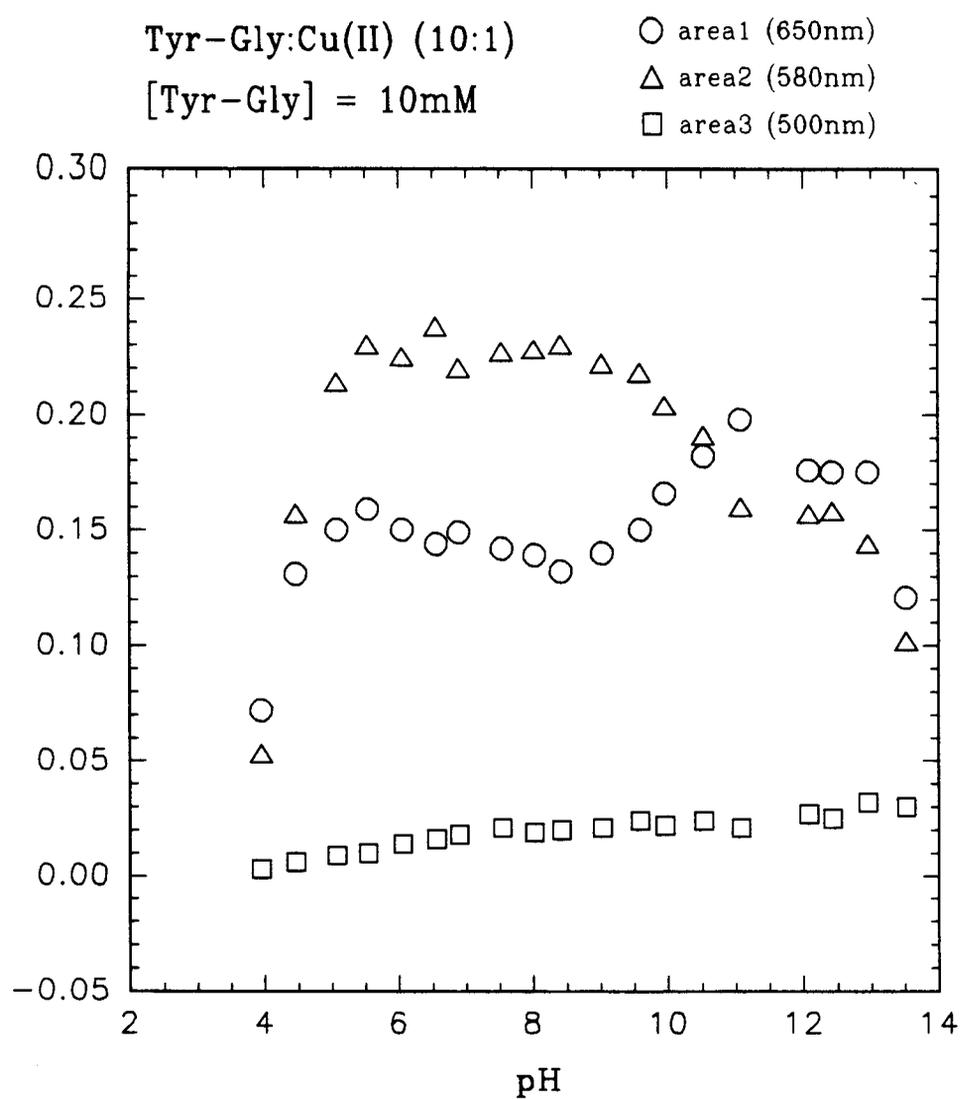


fig.17 Areas das gaussianas em função do pH para os complexos de tyr-gly: Cu(II) (10:1) em função do pH.

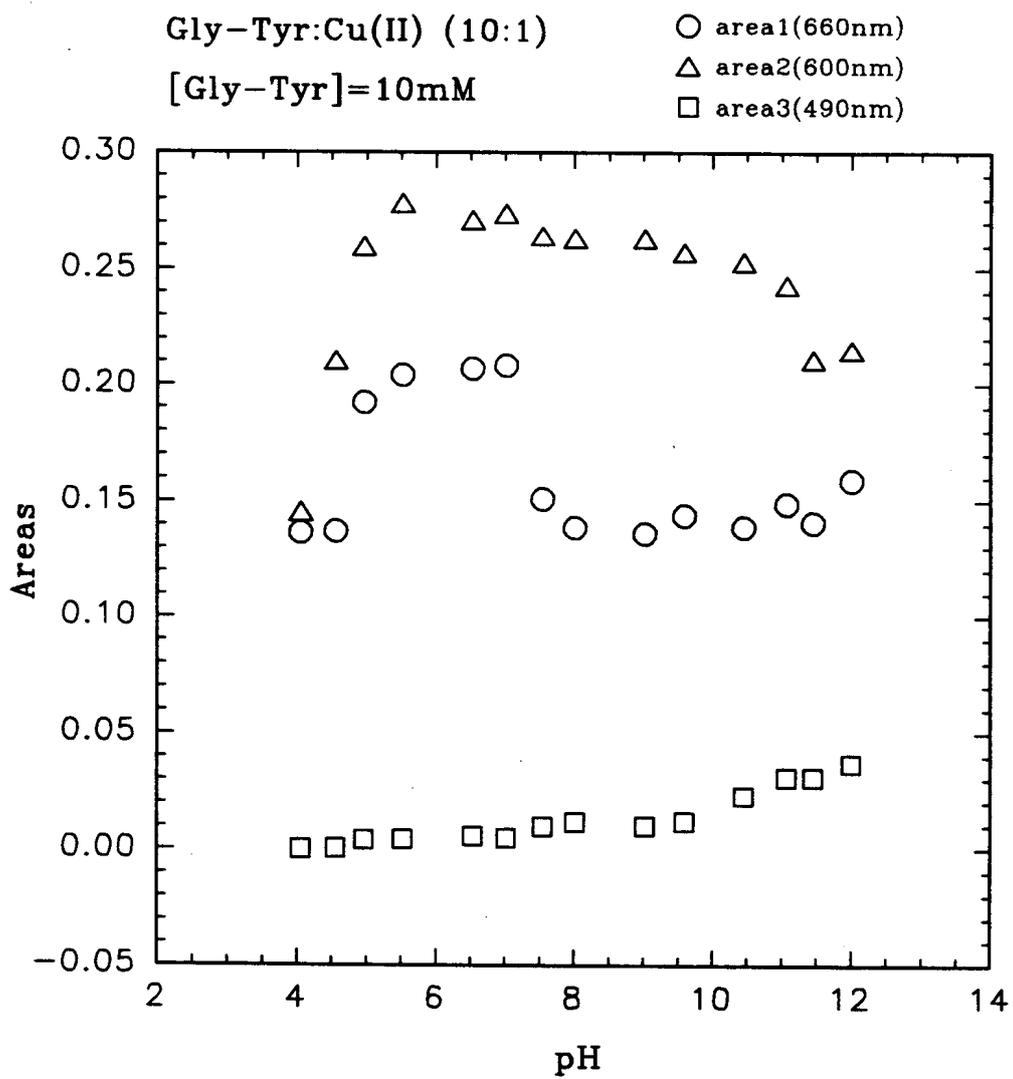


fig.18 Areas das gaussianas em função do pH para os complexos de gly-tyr: Cu(II) (10:1) em função do pH.

## 5.2 Ressonância Paramagnética eletrônica

Os espectros de RPE dos complexos de tyr e dos dipeptídeos com o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , foram obtidos à temperatura ambiente e à temperatura em que a solução está congelada ( $\sim -150^\circ\text{C}$ ).

À temperatura ambiente devido ao rápido movimento destes complexos, observa-se os espectros isotrópicos de RPE, dos quais pode-se extrair a média temporal dos valores de  $g$  e parâmetros hiperfinos. Os valores isotrópicos de  $g$  e  $A$  são dados por:

$$A_0 = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$

$$g_0 = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$$

Quando a solução é congelada, os complexos irão apresentar um movimento mais lento e com isso, então as contribuições de todas as orientações possíveis poderão ser detectadas, o que modificará a forma das linhas dos espectros. Observa-se, então, o chamado espectro do pó ou espectro de amostras congeladas.

### 5.2.1 Espectros de amostras em solução

As figs. 19, 20, 21 mostram respectivamente alguns dos espectros de amostras em solução à temperatura ambiente dos complexos de tyr, tyr-gly e gly-tyr com o íon  $\text{Cu}^{2+}$  em função do pH. Pode-se observar que a medida que o pH aumenta ocorre a complexação do íon  $\text{Cu}^{2+}$  com o aminoácido e com os dipeptídeos.

Pela figura 19. observa-se que:

-Até pH 2,50 os espectros obtidos são típicos de  $\text{Cu}^{2+}$  hidratado, caracterizando-se por uma linha larga e estrutura hiperfina não resolvida. Nestes pHs, todos os grupos que apresentam prótons dissociáveis estão protonados, o que faz com que o íon  $\text{Cu}^{2+}$  deva estar coordenado com moléculas de água.

-Nos pHs 3,0 e 3,5 o grupo carboxílico deve estar começando a contribuir com uma fração desprotonada, formando com isso o complexo  $\text{CuL}_4$ .

-Entre os pHs 4,0 à 5,0, os espectros apresentam cinco linhas, indicando a superposição de pelo menos dois complexos.

-Entre os pHs 5,5 e 12,0 não existem mudanças significativas entre os espectros e o sinal obtido é característico de um único complexo. Nestes pHs, o grupo carboxílico e o grupo amina já devem estar desprotonados, formando o complexo  $\text{CuL}_2$ .

Em toda faixa de pH, os espectros dos complexos do aminoácido com o metal não apresentaram estrutura superhiperfina.

As figs 25 e 26 mostram os parâmetros  $g_0$  e  $A_0$  dos complexos de tyr com cobre em função do pH.

Na-fig. 20, onde estão apresentados alguns dos espectros dos complexos de tyr-gly com  $\text{Cu}^{2+}$  podemos observar que:

-Até a faixa de pH 3.50, os espectros obtidos são típicos de íon  $\text{Cu}^{2+}$  coordenado com água.

-Entre os pHs 4,0-6,5 os espectros apresentam uma forma de quatro linhas, típicos para complexos de  $\text{Cu}^{2+}$ , relacionadas com a interação hiperfina elétron-núcleo de cobre. Na linha de campo alto, observamos uma estrutura de cinco linhas mal

resolvidas que correspondem a interação superhiperfina com dois nitrogênios equivalentes .

-Entre os pHs 7,0 à 9,5, os espectros são semelhantes aos anteriores em relação à interação hiperfina, mas a interação superhiperfina com nitrogênio desapareceu. Essa estrutura deve corresponder à coordenação de dois nitrogênios em posições não equivalentes (um nitrogênio peptídico e o outro amina), e por isso escondidos pela largura da linha de campo alto. Sabendo-se também que a distância média Cu-N de nitrogênios peptídicos está em torno de 1,92 Å, enquanto que para nitrogênios do amina terminal é de 2,00 Å (Nascimento, 1985).

-Acima de pH 10.5 a estrutura superhiperfina de cinco linhas reaparece, mostrando um outro tipo de complexo que predomina até o pH mais alto. Essas linhas superhiperfinas são mais bem resolvidas que aquelas em pHs mais baixos (pH 4.0-7.0), mostrando uma maior delocalização do elétron do metal para o ligante ou uma maior equivalência entre os nitrogênios. Estas estruturas são típicas da coordenação do  $\text{Cu}^{2+}$  com 2 nitrogênios equivalentes.

Os espectros de amostras em solução de gly-tyr, mostrados na fig.21 apresentam um comportamento bastante semelhante ao do outro dípeptídeo. Isto se deve ao fato, que a esta temperatura, as moléculas estão girando muito rapidamente e os espectros obtidos são uma média de todas direções possíveis. Neste caso a cadeia lateral não parece influenciar na estereoquímica dos complexos formados.

Os gráficos das figs. 27 e 28 onde estão apresentados os valores de  $g_0$  e  $A_0$  em função do pH, mostram que os 2 dípeptídeos se comportam de modo similar.

### 5.2.2 Espectros de amostras congeladas

As figs.22 ,23 e 24 mostram respectivamente alguns dos espectros de RPE dos complexos de tyr, tyr-gly e gly-tyr respectivamente com o íon  $\text{Cu}^{2+}$  em diferentes pHs à  $-150^\circ$ . Pode-se observar à esta temperatura que, linhas superhiperfinas não estão bem definidas devido a superposição das linhas em campo alto, além disso fica evidente a superposição de espectros de espécies diferentes.

Para ambos os dipeptídeos na faixa de pHs muito baixos até pH 3.0, os espectros obtidos apresentam estrutura hiperfina de quatro linhas mal resolvidas, característicos de  $\text{Cu}^{2+}$  complexado com água. Notamos também nestes espectros a existência de uma superposição de uma outra espécie de complexos.

Para tyr-gly- $\text{Cu}^{2+}$  cujos espectros estão mostrados na fig.23, observa-se que:

-Entre os pHs 3.5-4.5 observamos um mesmo tipo de espectro, onde não pudemos obter os valores de  $A_{//}$  dos espectros de pHs 4.0, provavelmente devido a superposição de dois complexos diferentes e a consequente baixa intensidade das linhas nessa região.

-Entre os pHs 5.0-11.0, observa-se um espectro de quatro linhas hiperfinas bem resolvidas, sendo que no espectro de pH 5,08, observamos que ainda existe uma mistura com o complexo que predomina nos pHs 3,0 -4,5.

-Acima de pH 11.5, podemos observar uma mudança no tipo de espectro a qual prevalece até o pH 13.0. Nestes pHs,  $A_{//}$  teve um aumento considerável em relação aos pHs mais baixos. Este

aumento pode indicar uma interação hiperfina mais forte que nos outros pHs.

Observa-se na fig.24, onde estão apresentados os espectros do gly-tyr-Cu<sup>2+</sup> que:

-Entre os pHs 3,5-5,5 o espectro essencialmente é o mesmo, com quatro linhas hiperfinas mal resolvidas, provavelmente também devido a superposição de espécies diferentes.

-Entre as faixas de pH 6.0 e 12.0 observamos espectros de uma espécie dominante, sendo que em pH 6.0 parece existir uma superposição dessa espécie com um outro complexo predominante em pHs mais baixos (3,5 - 4,5).

-Acima de pH 12.0, observamos uma mudança brusca na forma do espectro, sendo  $A_{//}$  bem menor em relação aos pHs mais baixos.

Comparando-se os parâmetros  $g_{//}$  e  $A_{//}$  para tyr-gly e gly-tyr, podemos observar nos gráficos das figuras 29 e 30 que, para pHs menores que pH 6,0 os dois dipeptídeos apresentam comportamentos opostos, ou seja, enquanto o valor de  $g_{//}$  cresce para tyr-gly, decresce o valor de gly-tyr, sendo o fato confirmado para o gráfico de  $A_{//}$  em função do pH. Isso pode ser atribuído a mudança no campo cristalino ocasionado pela posição do resíduo lateral pesado que influi na estereoquímica do complexo.

Não há grandes diferenças para os valores de  $g_{//}$  e  $A_{//}$  entre os pH 7,0-11,0, onde predomina o complexo CuL(H<sub>2</sub>O) para ambos os dipeptídeos, evidenciando talvez o mesmo tipo de complexo formado. Nesta faixa de pH o resíduo lateral pesado parece não influenciar no tipo de complexo formado.

Acima de pH 12,0, onde predomina o complexo  $\text{CuL}(\text{OH})_2^{2-}$ , podemos observar que  $A_{//}$  para tyr-gly ( $A_{//}=195$  gauss) é bem maior que o gly-tyr ( $A_{//}=85$  gauss). O valor de  $g_{//}$  para tyr-gly é de 2,197 e para o gly-tyr  $g_{//}=2,278$ , demonstrando que houve uma mudança na estereoquímica deste complexo.

Os parâmetros obtidos dos espectros isotrópicos ( $g_0$  e  $A_0$ ) e dos espectros de amostras congeladas ( $g_{//}$  e  $A_{//}$ ) dos complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  com tyr e com os dipeptídeos estão apresentados na forma de gráficos nas figs. 25,26,27,28,29 e 30 e tabelados nas tabelas X,XI e XII.

Através de um programa adequado, tentamos separar e identificar algumas das espécies dos vários complexos obtidos.

Os parâmetros espectroscópicos medidos em pH 7,0 dos nossos dipeptídeos estão de acordo com aqueles apresentados por Sportelli e outros (Sportelli,1977), onde são estudados por RPE vários peptídeos pequenos complexados com cobre (gly-trp, gly-phe, gly-try-gly, gly-phe-ala, gly-gly-phe,etc..) em um pH fixo (pH 7,2). Também os parâmetros em pH mais alto (9,5 e 13,0) estão de acordo com os dados apresentados por Koslowski (Koslowski ,1976).Koslowsky faz um estudo de vários complexos de dipeptídeos com cobre (gly-asp, gly-tyr, gly-gly,gly-glua) que possuem cadeia lateral pesada e como isso pode influenciar na baixa simetria destes complexos de pHs altos. Nossos dados também estão de acordo com os dados apresentados por Nascimento e outros (Nascimento, 1985)onde são estudados complexos de gly-trp com  $\text{Cu}^{2+}$  por RPE em vários pHs.

Nossos parâmetros espectroscópicos para tyr são parecidos com os dados apresentados por Sportelli e colaboradores (Sportelli,1976). Nesse trabalho os autores estudaram a

interação do cobre com os aminoácidos aromáticos, onde as soluções foram preparadas com a máxima concentração solúvel em água onde seus pHs naturais variam entre 4,2 e 6,8 dependendo da concentração do aminoácido.

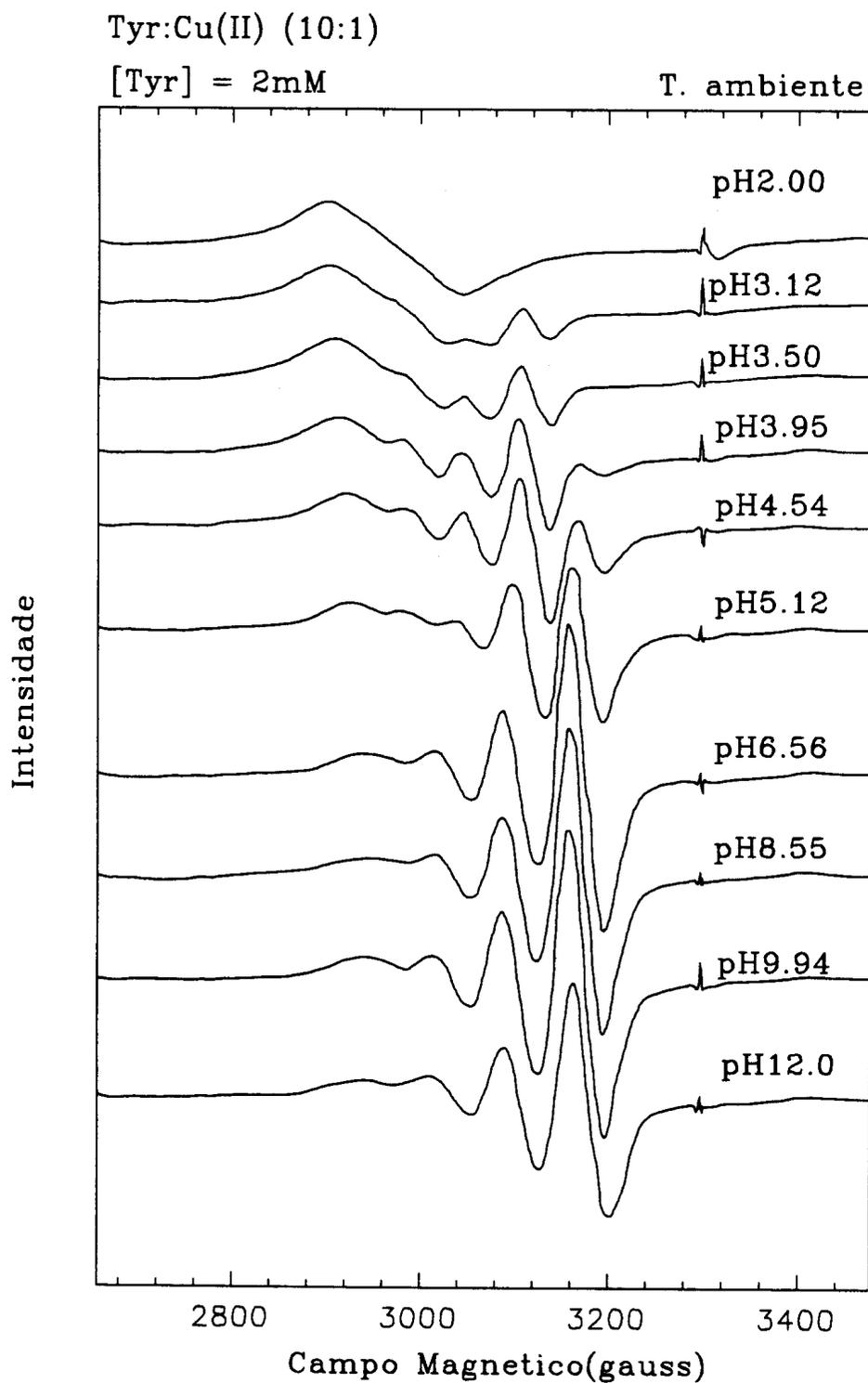


Fig.19 Espectros de RPE dos complexos de tyr-Cu<sup>2+</sup> (10:1) a temperatura ambiente. Os zeros dos espectros na ordenada foram deslocados. O marcador utilizado foi o Cr<sup>3+</sup> em óxido de magnésio.

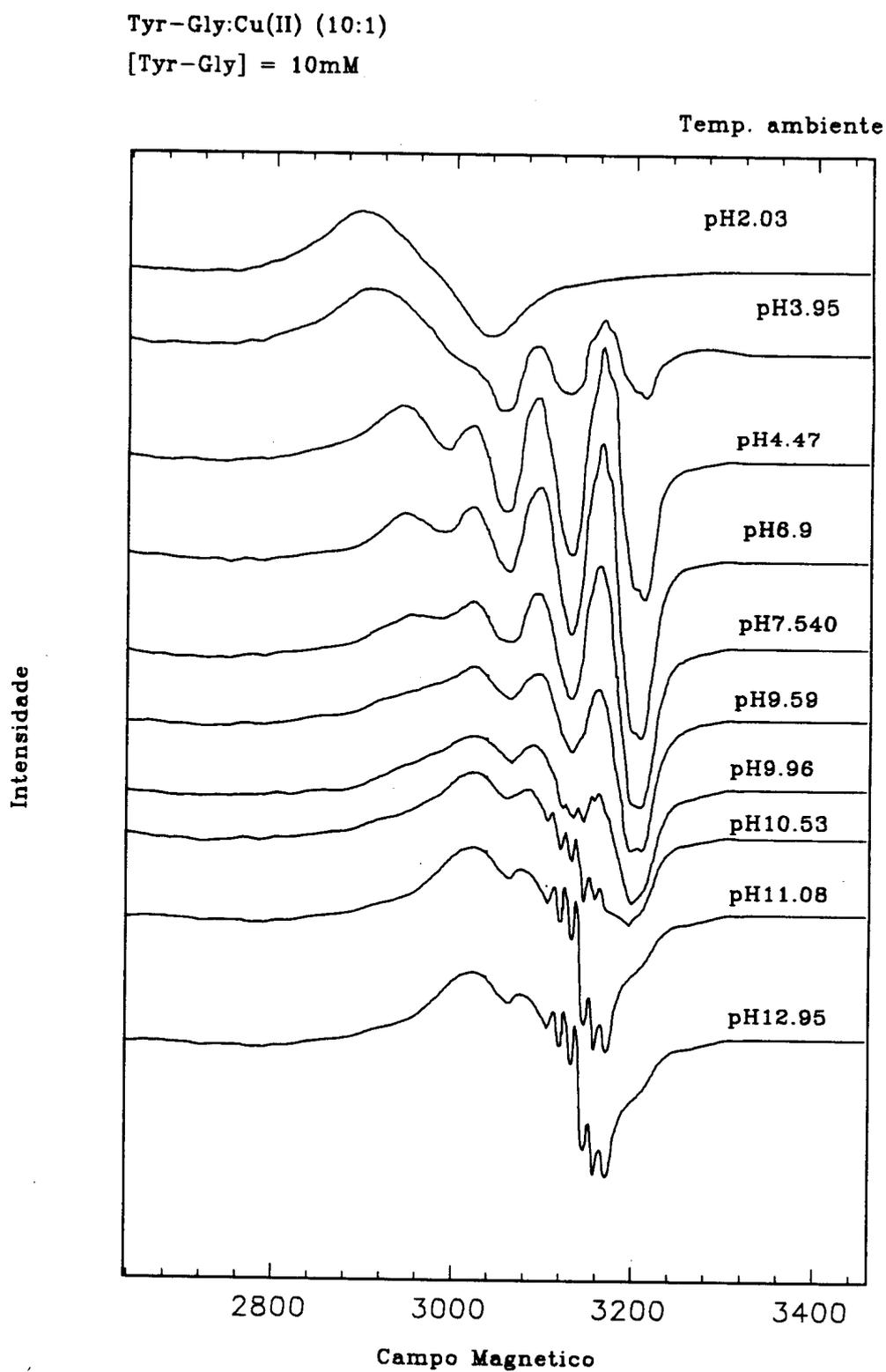


Fig.20 Espectros de RPE dos complexos de tyr-gly com  $\text{Cu}^{2+}$  (10:1) em função do pH a temperatura ambiente. Os zeros dos espectros na ordenada foram deslocados. O marcador utilizado foi o  $\text{Cr}^{3+}$  em óxido de magnésio.

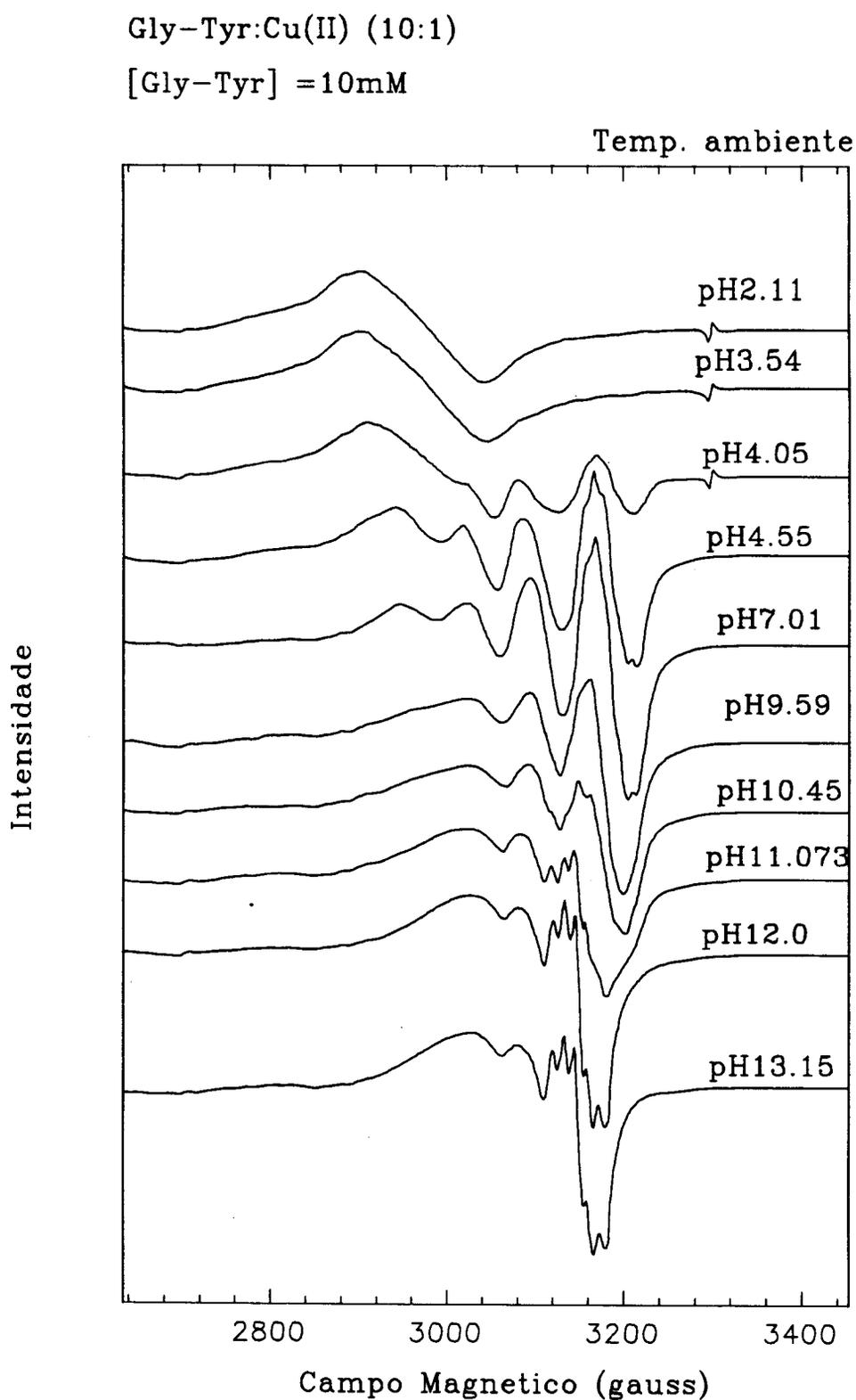


Fig.21 Espectros de RPE dos complexos de gly-tyr com  $\text{Cu}^{2+}$  (10:1) em função do pH a temperatura ambiente. Os zeros dos espectros na ordenada foram deslocados. O marcador utilizado foi o  $\text{Cr}^{3+}$  em óxido de magnésio.

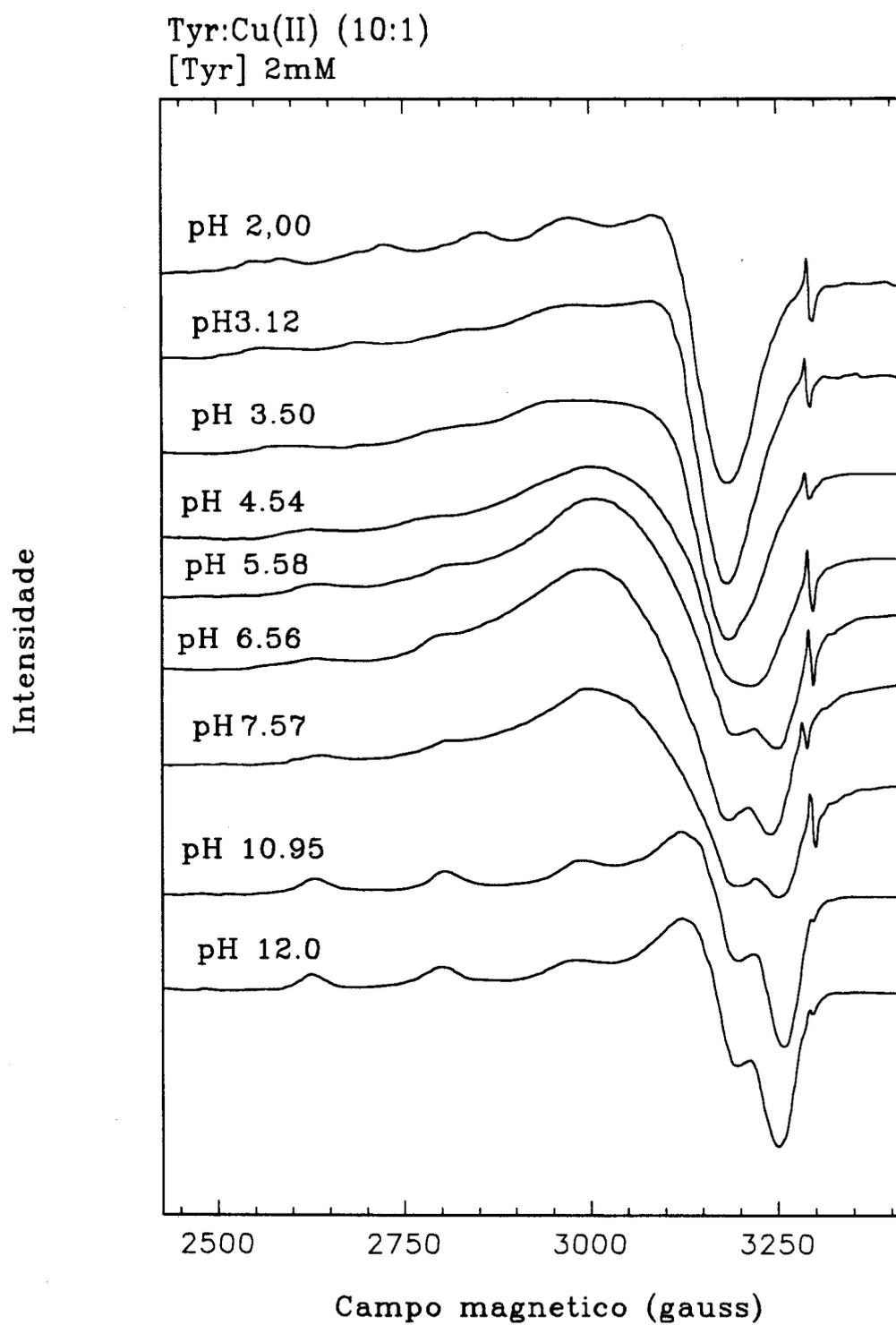


Fig.22 Espectros de RPE dos complexos de tyr-Cu<sup>2+</sup> (10:1) em função do pH a -150°C. Os zeros dos espectros na ordenada foram deslocados. O marcador utilizado foi o Cr<sup>3+</sup> em óxido de magnésio.

Tyr-Gly :Cu(II) (10:1)

[Tyr-Gly] = 10mM

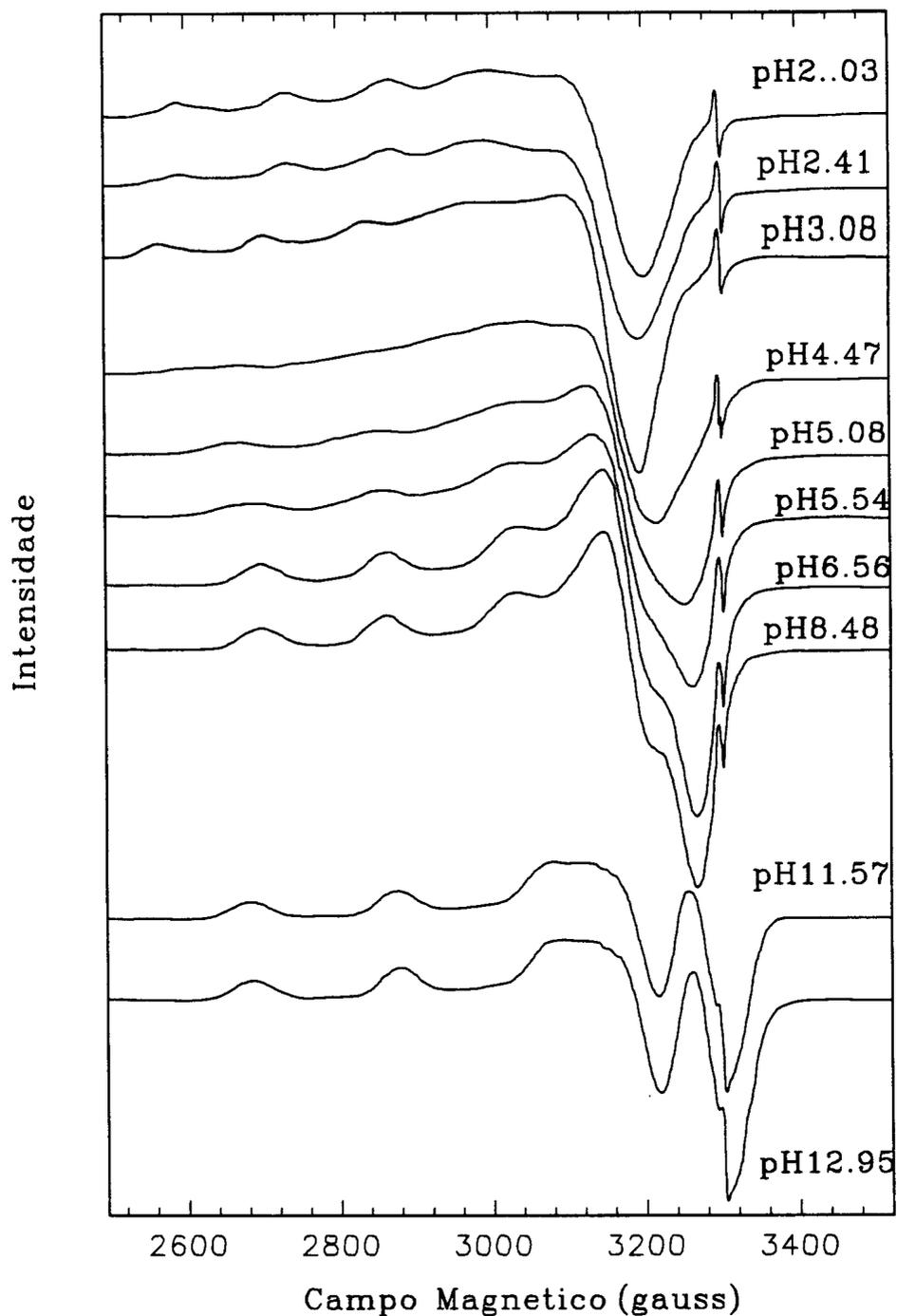


Fig.23 Espectros de RPE dos complexos de tyr-gly com  $\text{Cu}^{2+}$  (10:1) a temperatura de  $-150^\circ\text{C}$  em função do pH. Os zeros dos espectros na ordenada foram deslocados. O marcador utilizado foi o  $\text{Cr}^{3+}$  em óxido de magnésio.

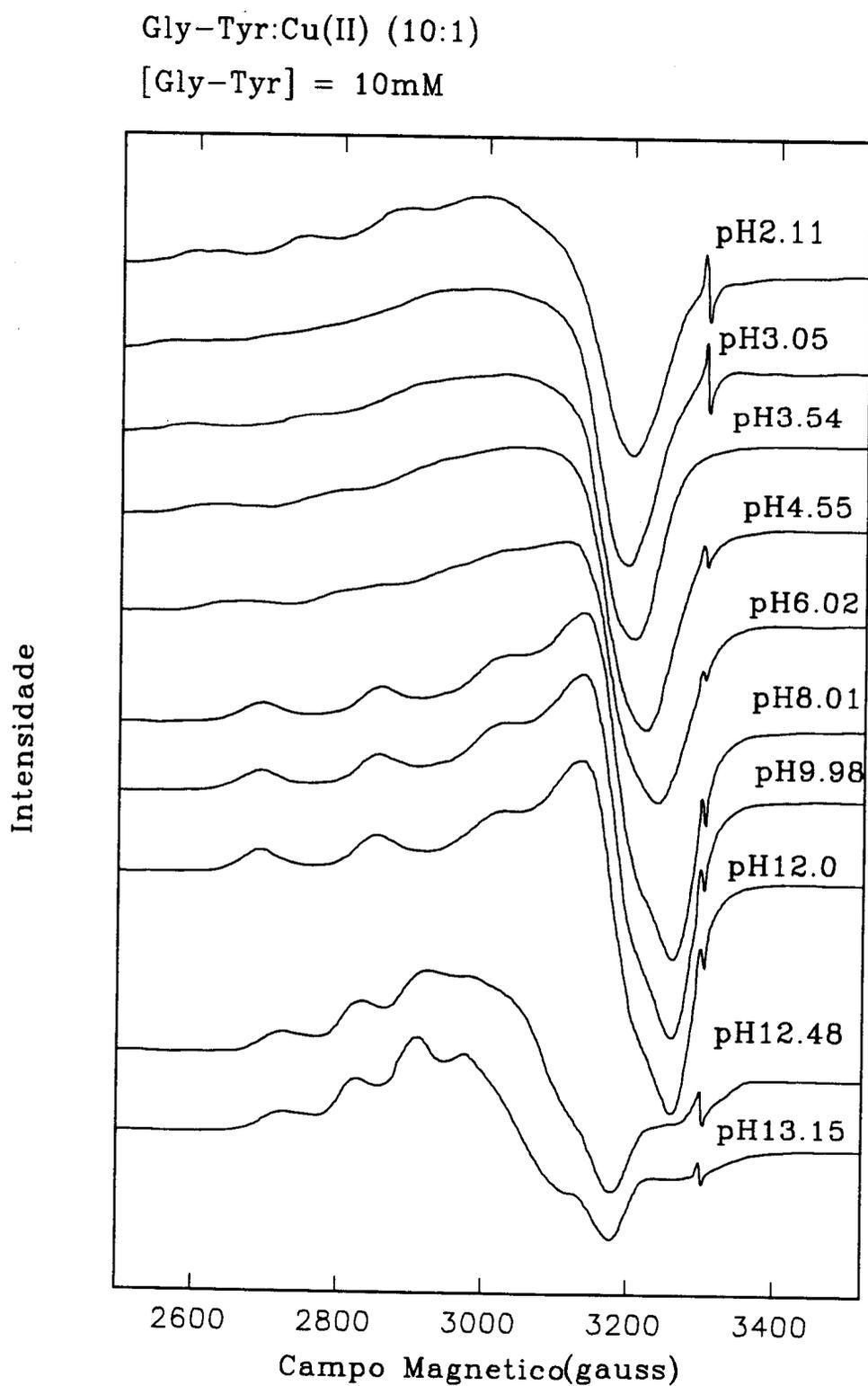


Fig.24 Espectros de RPE dos complexos gly-tyr com  $\text{Cu}^{2+}$  (10:1) em função do pH a  $-150^\circ\text{C}$ . Os zeros dos espectros na ordenada foram deslocados. O marcador utilizado foi o  $\text{Cr}^{3+}$  em óxido de magnésio.

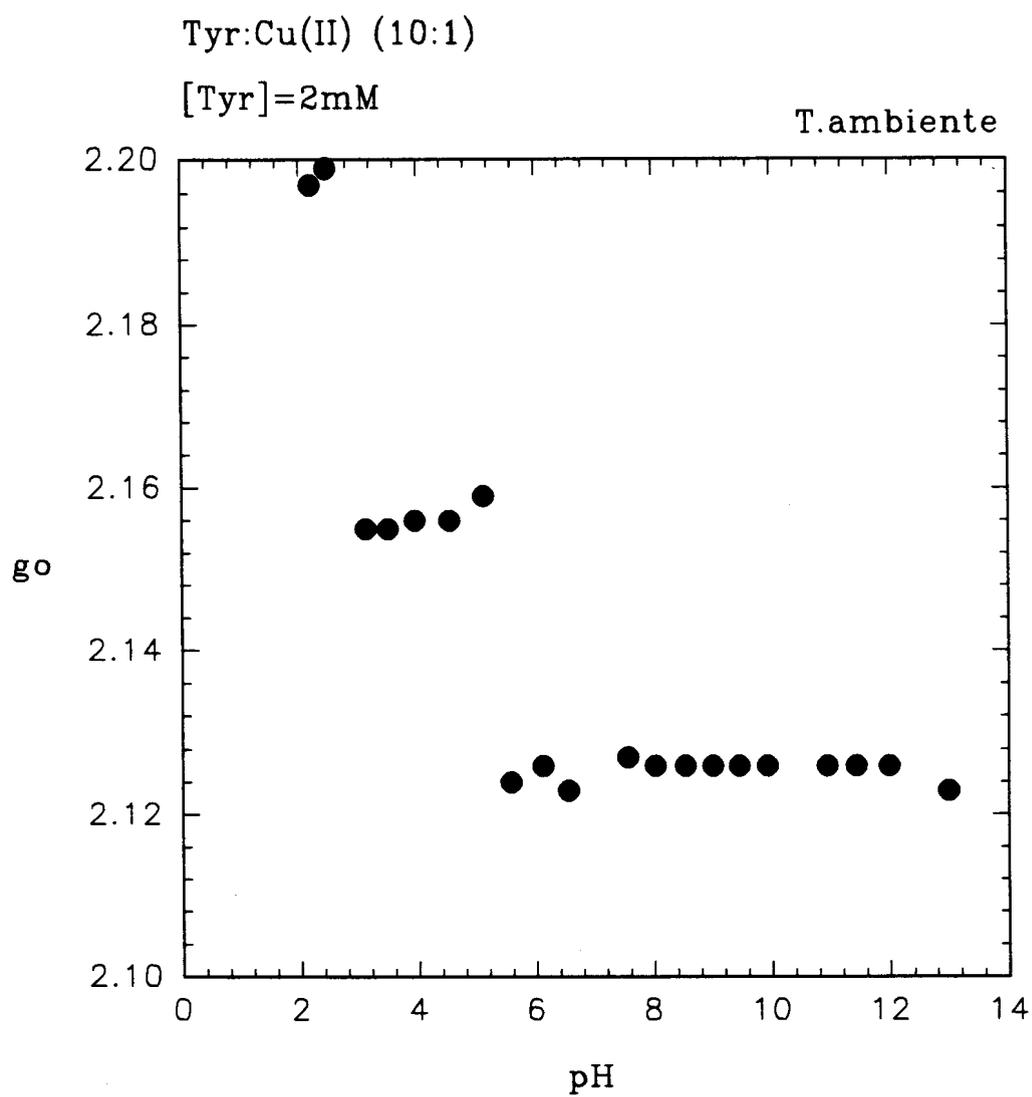


Fig.25 Gráfico do parâmetro  $g_0$  dos complexos de tyr-Cu<sup>2+</sup> (10:1) em função do pH a temperatura ambiente.

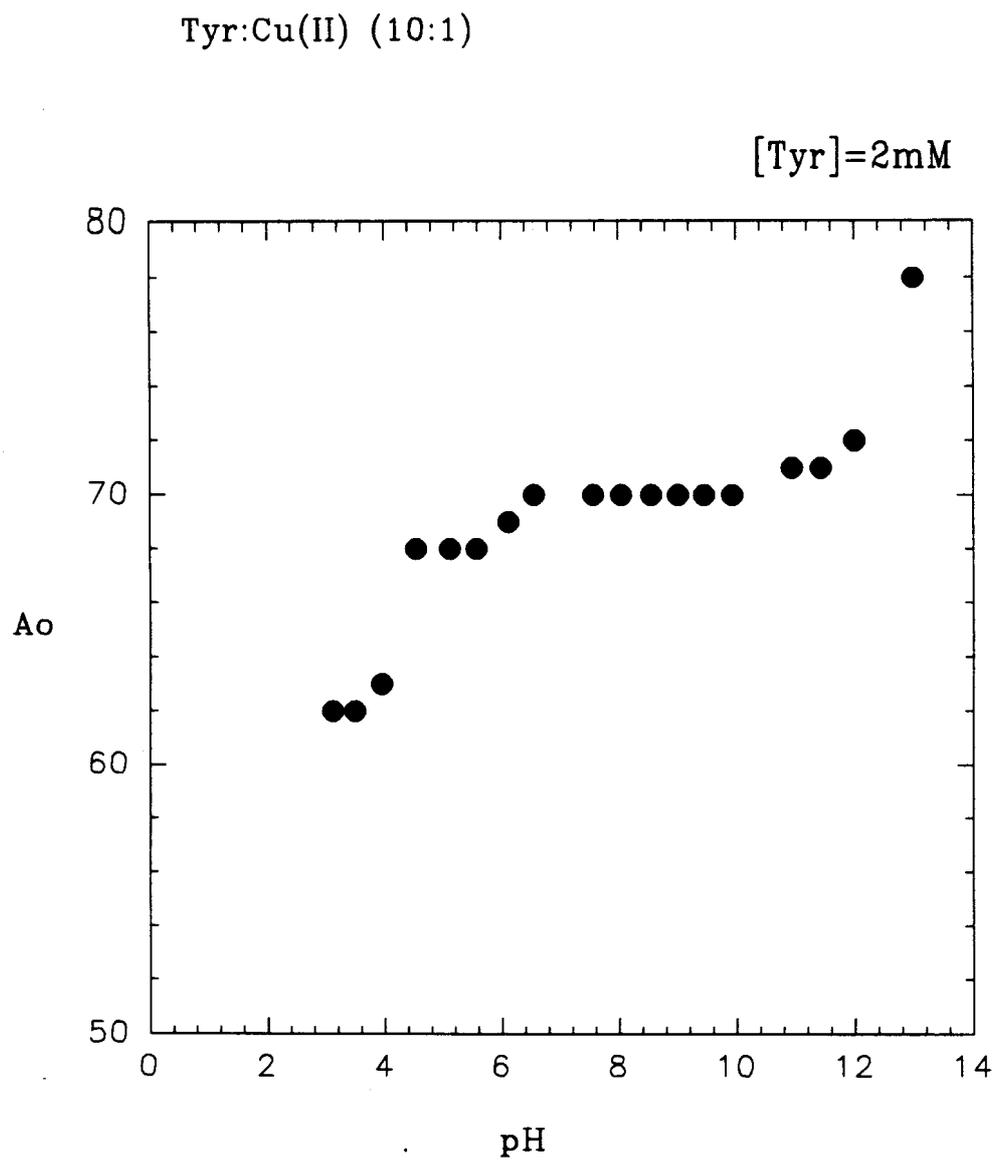


Fig.26 Gráfico do parâmetro  $A_o$  dos complexos de tyr-Cu<sup>2+</sup> (10:1) em função do pH a temperatura ambiente.

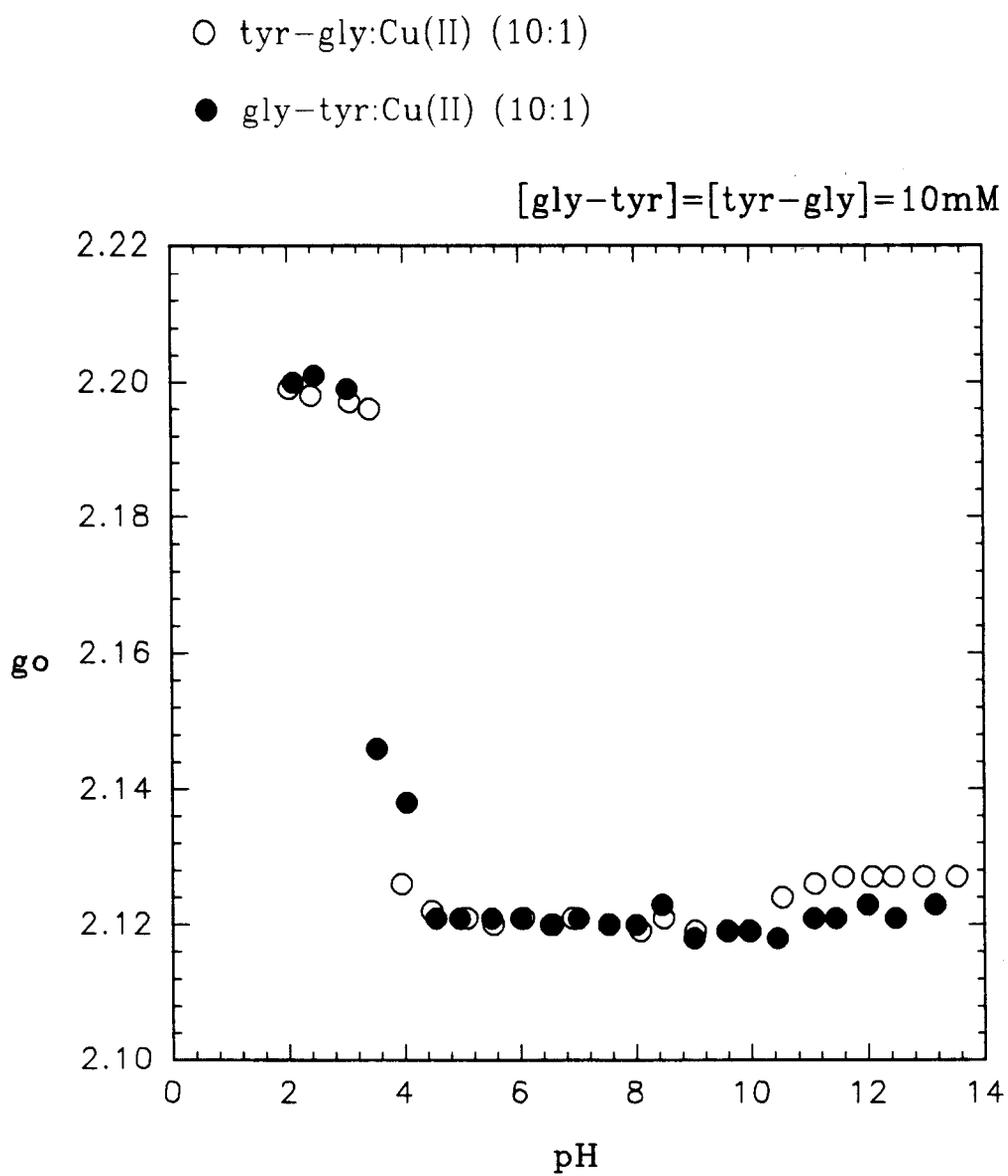


Fig.27 Gráfico do parâmetro  $g_o$  dos dipeptídeos-Cu (10:1) em função do pH a temperatura ambiente.

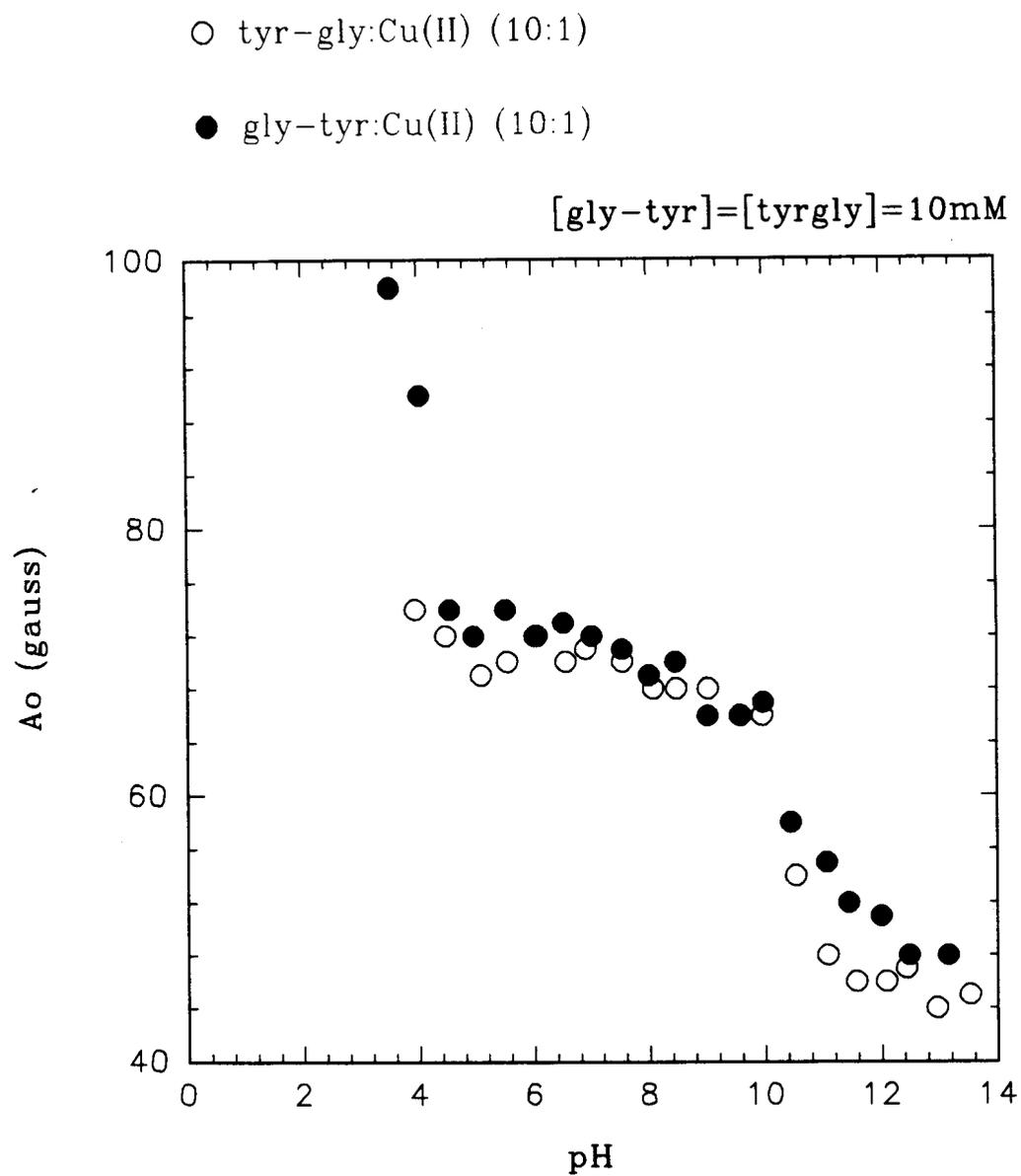


Fig.28 Gráfico do parâmetro  $A_0$  dos dipeptídeos-Cu (10:1) em função do pH a temperatura ambiente.

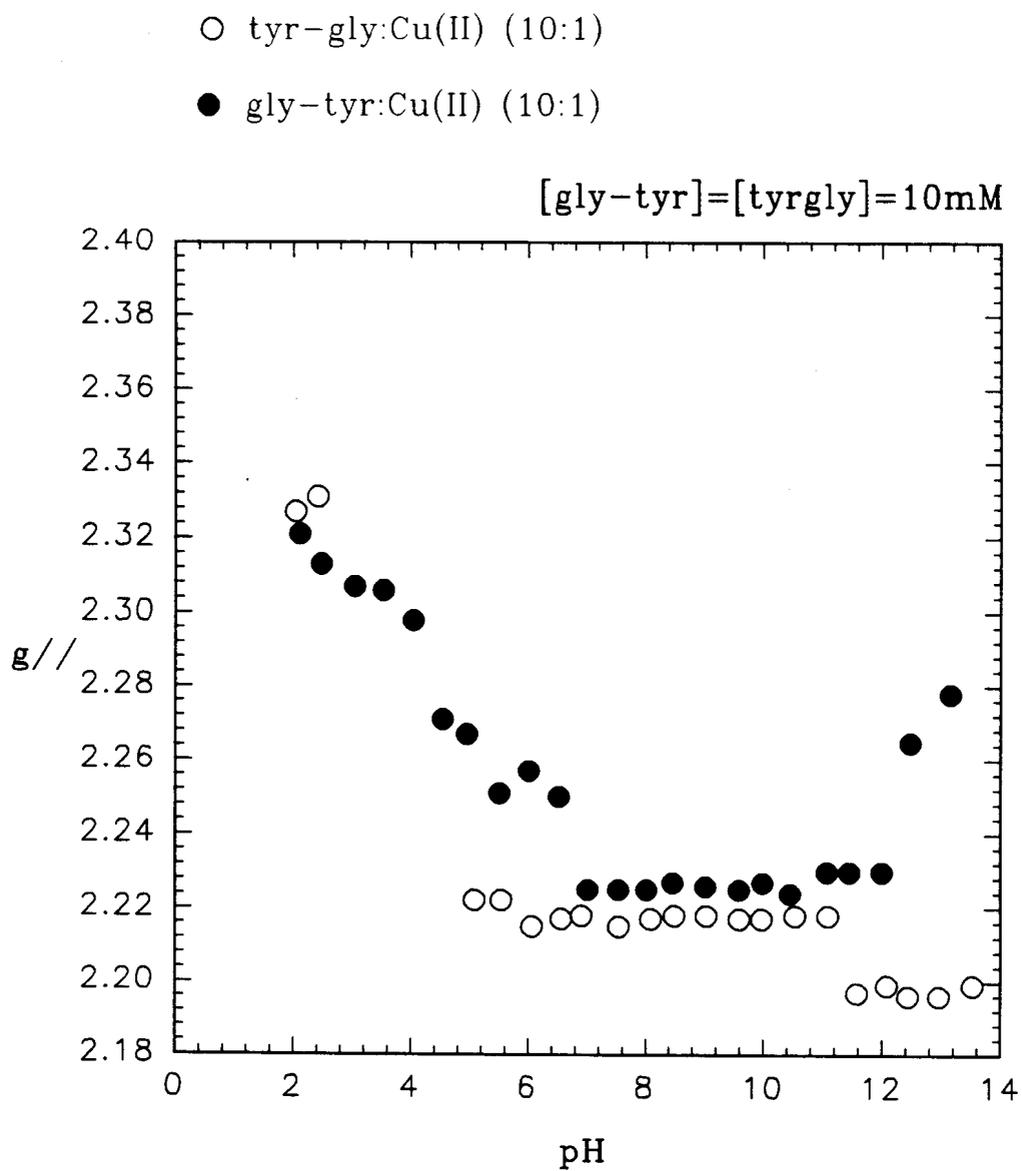


Fig.29 Gráfico do parâmetro  $g//$  dos dipeptídeos-Cu (10:1) em função do pH a  $-150^{\circ}\text{C}$ .

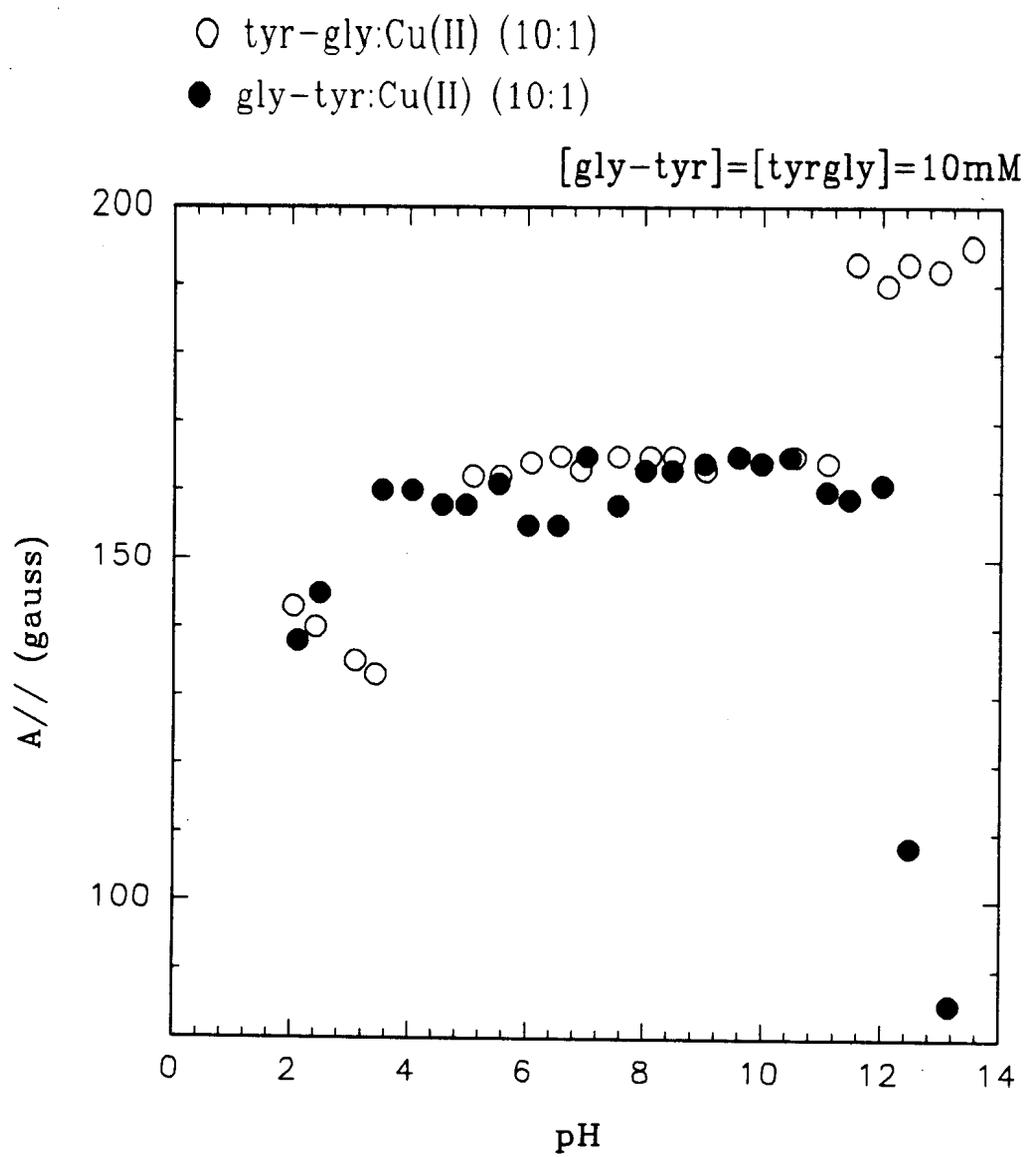


Fig.30 Gráfico do parâmetro  $A_{//}$  dos dipeptídeos-Cu (10:1) em função do pH a  $-150^{\circ}\text{C}$ .

tabela X - Valores dos parâmetros de RPE de tyr-Cu(II)

pH	$g_0$	$A_0$ (G)	$g_{//}$	$A_{//}$ (G)	$g_{\perp}$	$A_{\perp}$ (G)
2,0	2,197		2,327	118	2,132	
2,47	2,199		2,337	121	2,130	
3,12	2,155	62	2,336	130	2,065	28
3,50	2,155	62				
3,95	2,156	63				
4,54	2,155	68	2,234	190	2,117	
5,12	2,159	68	2,230	190	2,124	
5,58	2,124	68	2,241	189	2,066	6
6,12	2,126	69	2,251	179	2,064	14
6,56	2,123	70	2,238	189	2,066	11
7,57	2,127	70	2,251	179	2,065	19
8,04	2,126	70	2,250	183	2,064	14
8,55	2,126	70	2,247	178	2,066	16
9,01	2,126	70	2,248	183	2,065	14
9,46	2,126	70	2,246	181	2,066	15
9,94	2,126	70	2,234	191	2,072	10
10,95	2,126	71	2,259	170	2,060	22
11,44	2,126	71				
12,00	2,126	72	2,262	173	2,058	22
13,00	2,130	78	2,263	186	2,064	26

Tabela XI -Valores dos parâmetros de RPE de Tyr-Gly:Cu<sup>2+</sup> (10:1)

pH	g <sub>o</sub>	A <sub>o</sub> (G)	g//	A// (G)	g <sub>⊥</sub>	A <sub>⊥</sub> (G)
2,03	2,199		2,327	143	2.135	
2,41	2,198		2,331	140	2.131	
3,08	2,197			135	2.116	
3,42	2,196			133	2.112	
3,95	2,126	74				
4,47	2,122	72				
5,08	2,121	69	2,222	162	2.069	16
5,54	2,120	70	2,222	162	2.070	20
6,06	2,121	72	2,215	164	2.074	26
6,56	2,120	70	2,217	165	2,071	24
6,90	2,121	71	2,218	163	2,072	25
7,54	2,120	70	2,215	165	2,072	23
8,08	2,119	68	2,217	165	2,070	20
8,48	2,121	68	2,218	165	2,072	20
9,03	2,119	68	2,218	163	2,069	21
9,58	2,119	66	2,217	165	2,070	17
9,96	2,119	66	2,217	164	2,070	17
10,53	2,124	54	2,218	165	2,077	
11,08	2,126	48	2,218	164	2,080	
11,57	2,127	46	2,197	193	2,092	
12,08	2,127	46	2,199	190	2,091	
12,43	2,127	47	2,196	193	2,092	
12,95	2,127	44	2,196	192	2,092	
13,52	2,127	45	2,199	195	2,091	

Tabela XII- Valores dos parâmetros de RPE de Gly-Tyr:Cu<sup>2+</sup>(10:1)

pH	g <sub>o</sub>	A <sub>o</sub> (G)	g <sub>//</sub>	A <sub>//</sub> (G)	g <sub>⊥</sub>	A <sub>⊥</sub> (G)
2,11	2,200		2,321	138	2,140	
2,48	2,201		2,313	145	2,145	
3,05	2,199				2,088	
3,54	2,146	98	2,307	160	2,066	67
4,05	2,138	80	2,306	160	2,054	55
4,55	2,121	74	2,298	158	2,033	32
4,96	2,121	72	2,271	158	2,046	29
5,52	2,121	74	2,267	161	2,048	31
6,02	2,121	72	2,251	155	2,056	31
6,53	2,120	73	2,257	155	2,056	32
7,01	2,121	72	2,225	165	2,051	26
7,54	2,120	71	2,225	158	2,069	28
8,01	2,120	69	2,225	163	2,067	22
9,46	2,123	70	2,227	163	2,067	24
9,02	2,118	66	2,226	164	2,071	17
9,59	2,119	66	2,225	165	2,064	17
9,98	2,119	67	2,227	164	2,066	9
10,45	2,118	58	2,224	165	2,065	5
11,07	2,121	55	2,230	160	2,059	3
11,45	2,121	52	2,230	159	2,066	
12,00	2,123	51	2,230	161	2,066	
12,48	2,121	48	2,265	108	2,069	18
13,15	2,123	48	2,278	85	2,049	30

### 5.2.3 Subtração espectral

Na tentativa de se obter espectros dos complexos puros, isto é, de espectros isolados de um único complexo, utilizamos diferenças espectrais para alguns valores de pHs.

A subtração é feita através de uma equação da seguinte forma:  $C=B-Ax$ , onde B é o espectro mistura onde deve existir mais de um complexo; A é o espectro simples onde deve predominar um único complexo; C é o espectro resultante da diferença entre B e A e x é um fator conveniente que corresponde à porcentagem do complexo A presente no espectro mistura B e que é ajustável na otimização do espectro diferença.

#### para tirosina

Os espectros experimentais de  $\text{Cu}^{2+}$ -tyr em pHs ácidos apresentam contribuição de cobre livre hidratado e de cobre nos complexos com aminoácido. Inicialmente foi feita a subtração usando o espectro experimental num dado pH ( espectro B ) e o espectro do cobre livre ( espectro A ) multiplicado pelo fator x adequado. Na figura 19 o espectro em pH 3,5 é o observado experimentalmente, enquanto que o espectro da fig.31 no mesmo pH corresponde ao espectro sem o cobre livre. Nos pHs 4,5, 5,5 e 6,5 as proporções de  $\text{Cu}^{2+}$  livre encontrados foram respectivamente 45%, 23% e 13%.

Na faixa de pH 4,0-5,0 dos espectros de amostras em solução da tyr Observa-se a existência de cinco linhas. Isto provavelmente é devido a existência de mais de um complexo,

pois o espectro típico de complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  de compostos de baixo peso molecular deve ter quatro linhas. Nesta faixa de pH existe a predominância de uma espécie com uma determinada forma de linha, mas com características de pHs anteriores (ao redor de pH 3,5).

Desta forma, como mostra a fig.31, consideramos que no espectro A de pH 3.5 predomina uma única espécie, o espectro B de pH 5.12 contém mais de uma espécie e C é o espectro resultante, que é encontrado fazendo-se diferença entre B e A multiplicado por um fator 0,6. Conclui-se então, que no espectro de pH 5,12 existe cerca de 60% da espécie pura em pH 3,50. Analisando o espectro C, observa-se que este, tem a mesma forma de linha e os mesmos valores de  $g_0$  e  $A_0$  dos espectros dos pHs acima de pH 6,0. Com isso concluímos que na faixa de pH 4,0 à 5,0 há uma mistura de duas espécies (uma de pH baixo e outro de pH alto).

Então para a tyr verifica-se a existência de 3 espécies: a primeira que existe até o pH 3,5 (o  $\text{CuL}_4$ ) com  $A_0=62\text{G}$  e  $g_0=2,155$ , a segunda que predomina em uma grande faixa de pH de 4,0 à 12,0 ( $\text{CuL}_2$ ) com  $A_0=71\text{G}$  e  $g_0=2.126$ , e a terceira para pHs acima de 12,0 com  $A_0=78\text{G}$  e  $g_0=2.130$ , na qual as mudanças em relação às espécies anteriores são relativamente pequenas.

Devido à baixa solubilidade da tyr, as soluções utilizadas para este experimento foram preparadas em baixas concentrações, o que não possibilitou a obtenção de espectros razoáveis de tyr- $\text{Cu}^{2+}$  a  $-150^\circ\text{C}$  com os quais pretendia-se fazer subtrações espectrais.

### Para os dipeptídeos

Nos espectros dos dipeptídeos à temperatura ambiente não fica clara a superposição de complexos, ou seja, parece existir apenas um tipo de complexo entre os pH 4,5-10,5. Porém quando as amostras são congeladas, observa-se a superposição dos espectros nesta faixa de pH. Por isso resolveu-se fazer subtrações espectrais apenas dos espectros de amostras congeladas dos dipeptídeos.

Pode-se observar nos espectros de RPE à  $-150^{\circ}\text{C}$  de gly-tyr (fig.24) que, na faixa entre pH 3,0 e 7,0 não aparecem as quatro linhas na região de  $g_{//}$  bem definidas, características de um único tipo de complexo, isto é, os desdobramentos hiperfinos não estão bem resolvidos, sugerindo claramente a superposição dos espectros de pelo menos duas espécies distintas de complexos.

Pode-se observar que no espectro de pH 6,0, existe uma superposição de dois complexos: um que predomina ao redor de pH 5,0 ( $\text{CuL}_2$ ) e outro complexo tridentado  $[\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})]$  que existe predominantemente na faixa de pH 7,0-11,0.

Considerando-se o espectro de pH 7.01 como sendo o da espécie pura e o de pH 6.02 como o espectro mistura e utilizando-se subtração espectral foi possível determinar um dos espectros puros do complexo existente em pH 6,0, o complexo  $\text{CuL}_2$  e com isso pudemos caracterizá-lo espectroscopicamente. Encontramos para este complexo os seguintes parâmetros:  $A_{//}=168\text{G}$ ,  $g_{//}=2,26$  e  $g_{\perp}=2,07$ . A fig.32 mostra a subtração entre os espectros de pH 6,02 e pH 7,01 multiplicado por um fator 0,48. Portanto neste pH existe cerca 50% do complexo  $\text{CuL}_2$ .

Este complexo apresenta alguma estrutura na linha de campo alto. Essa estrutura deve corresponder às interações superhiperfinas devido ao nitrogênio amina. Na fig.33 numa escala ampliada apresenta-se o espectro diferença.

Para este dipeptídeo tem-se: para pHs em torno de pH 2,50 temos o  $\text{Cu}^{2+}$  coordenado com água, ao redor de pH 4,50 a existência predominante do complexo  $\text{CuL}_2$ , na faixa de pH 7,0-12,0 encontra-se a predominância da espécie  $\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})$  e acima do pH 12,0 temos o complexo  $\text{CuL}(\text{OH})_2^{2-}$ .

Através do mesmo procedimento utilizado para o outro dipeptídeo (tyr-gly) e escolhendo-se os pHs 5,08 e 6,90 obtivemos como espectro resultante o espectro da fig.35. Os parâmetros para este complexo são  $A_{//}=168\text{G}$ ,  $g_{//}=2,257$  e  $g_{\perp}=2,070$ . A fig. 34 apresenta a subtração espectral entre os pHs 5,08 e 6,90 multiplicado por um fator 0,38. Portanto existe cerca de 40% desta espécie ( $\text{CuL}_2$ ) no pH 5,08.

Para o tyr-gly também existem pelo menos três espécies distintas: a primeira ao redor de pH 4,50 a segunda na faixa de pH 6,5-11,0 e a terceira acima de pH 11,5.

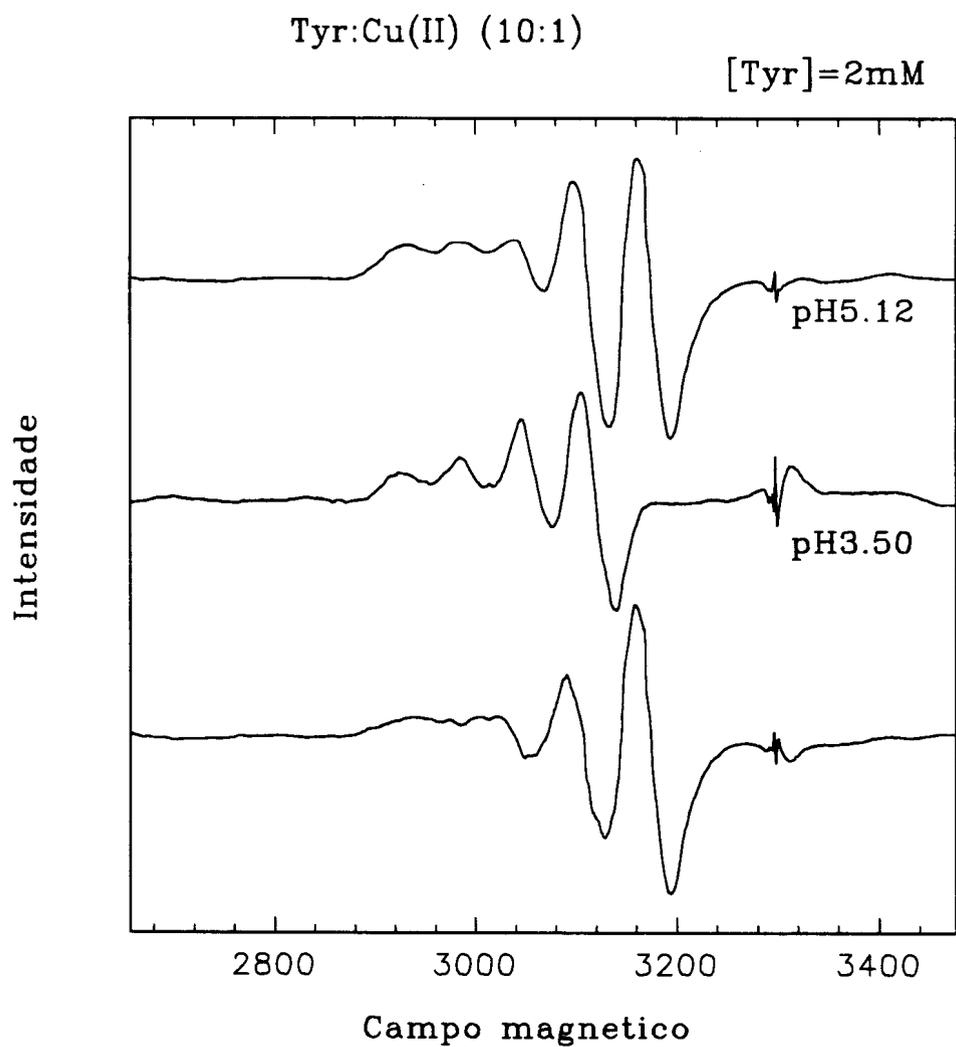


Fig.31 O espectro em pH 3,5 corresponde à diferença entre o espectro experimental nesse pH e o espectro de cobre multiplicado pelo fator 0,85. Os parâmetros correspondentes estão na tabela II. Os parâmetros espectroscópicos para a diferença, espectro C, são  $A_0=68$  gauss e  $g_0=2,129$ .

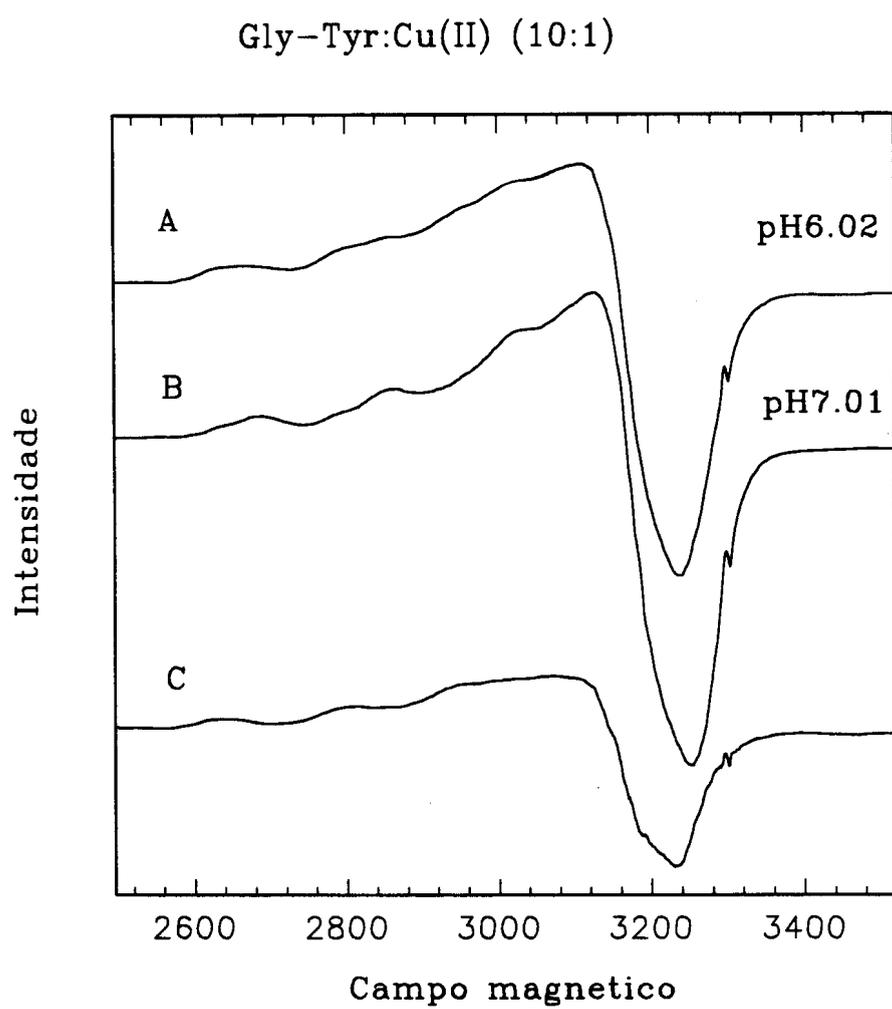


Fig.32 Diferença espectral entre os pHs 6,02 e 7,01 multiplicado por uma fator 0,48, onde A é o espectro puro, B o espectro mistura e C o espectro resultante desta diferença.

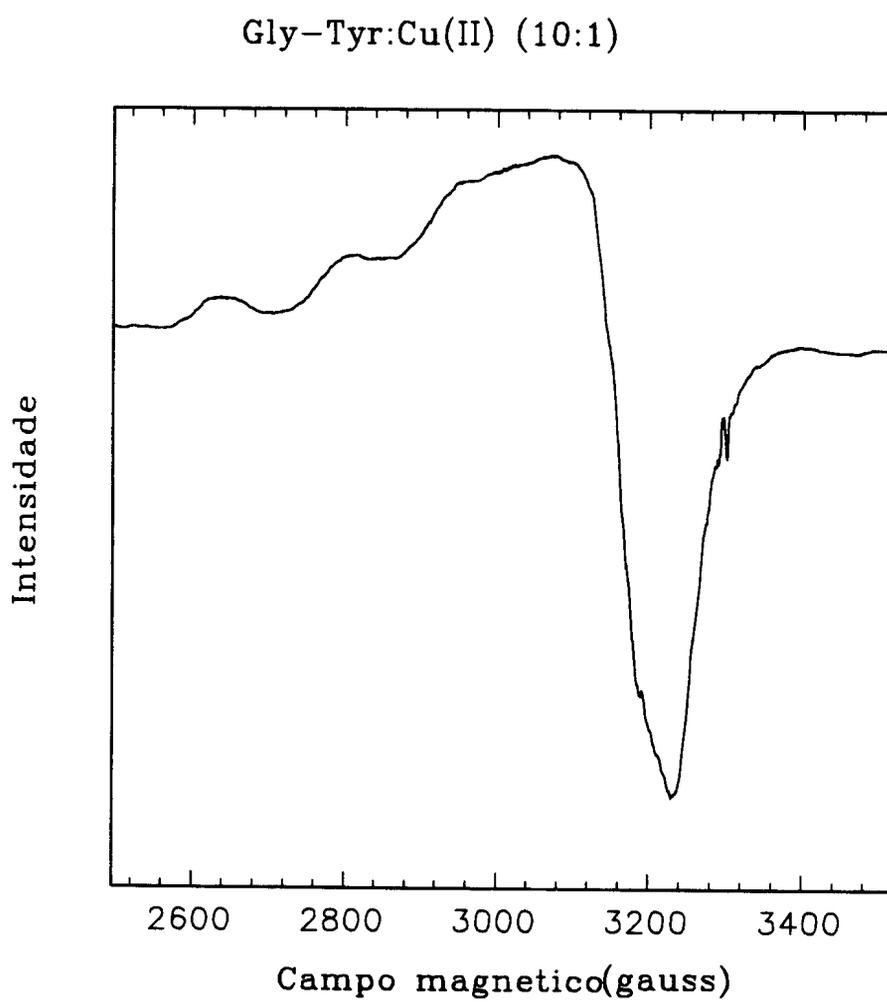


Fig.33 Espectro resultante da diferença entre pH 6.02 e 7.0 multiplicado por um fator 0.48 (escala ampliada).

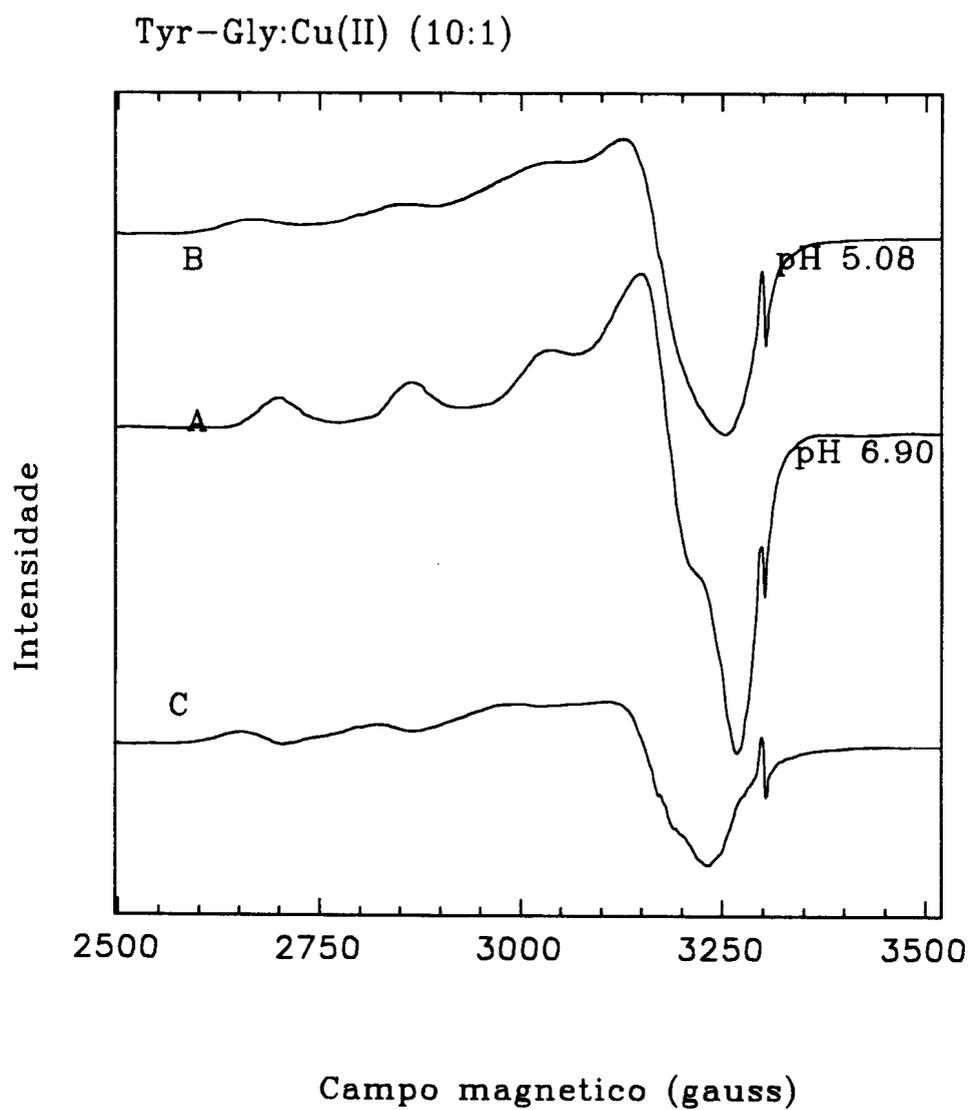


Fig.34 Diferença espectral entre os pHs 5,08 e 6,90 multiplicado por um fator 0,38, onde A é o espectro puro, B é o espectro mistura e C é o espectro resultante desta diferença.

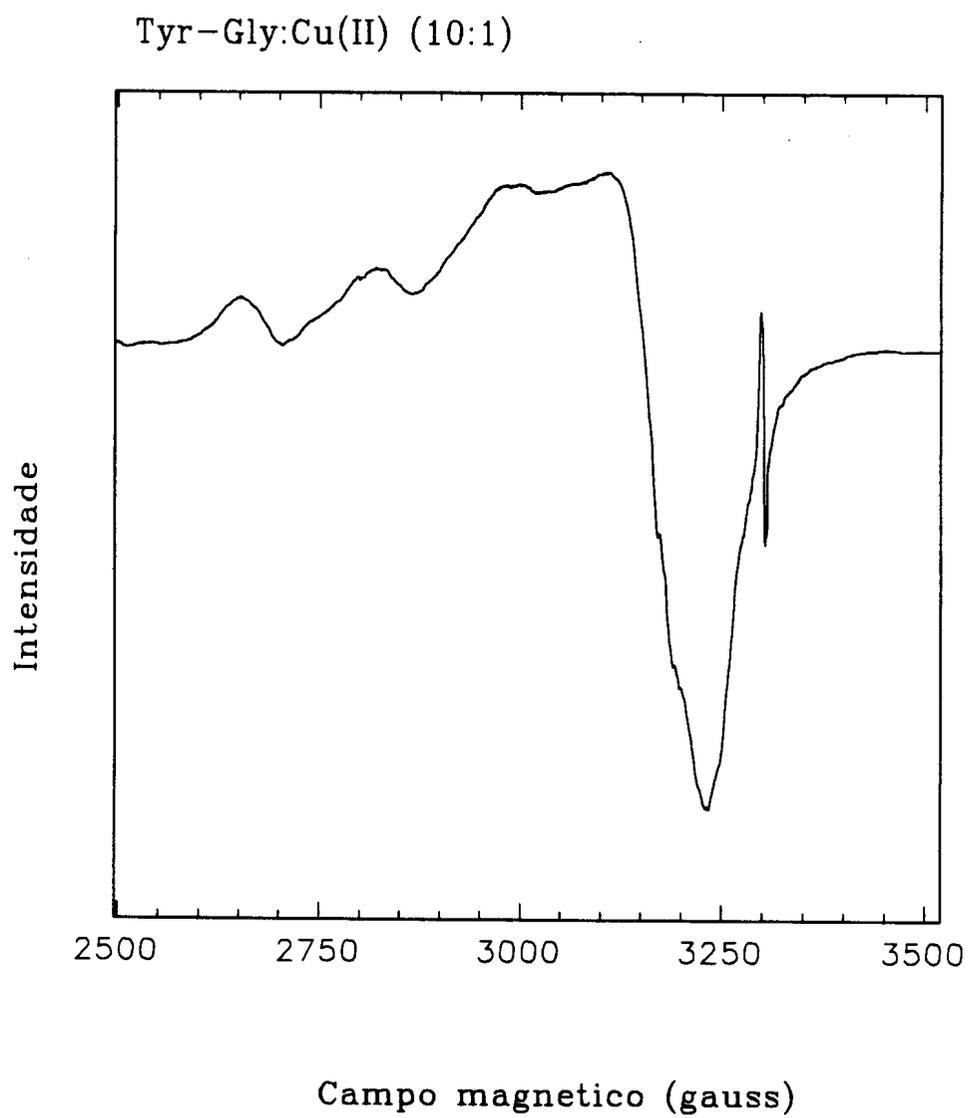


Fig.35 Espectro resultante da diferença entre pH 5.08 e 6.90 multiplicado por um fator 0.38 (escala ampliada).

### 5.3 Fluorescência

A fig. 36 apresenta as curvas de titulações da tyr pura e do aminoácido com o íon cobre na razão ligante metal (1:1).

A faixa de pH 2,0-4,0, é a região de ionização do grupo carboxílico (pK 2,30), nesta região começa ocorrer a supressão da fluorescência com a adição do íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Fayet e colaboradores (Fayet, 1971) encontraram para tyr o valor de pK 2,2 correspondente a protonação do grupo carboxílico.

Pode-se observar que na ausência do metal, na faixa de pH 4,0-9,0, a fluorescência permanece quase que constante, não evidenciando a desprotonação do grupo  $\text{NH}_3^+$ , cujo pK tem valor em torno de pH 9,0, confirmando os resultados encontrados por Fayet e outros (Fayet, 1971). Fayet e colaboradores realizaram um estudo da variação do espectro de fluorescência e do rendimento quântico em função do pH para os aminoácidos aromáticos, no qual observou-se que o rendimento quântico da tyr entre os pHs 4,0-8,0 era constante.

Entre os pHs 9,0 e 13,0 vemos que há uma supressão muito forte da fluorescência. É nesta região, que ocorre a ionização do grupo fenólico de tyr (pK 10,28), sendo que a ionização deste grupo reduz o rendimento quântico da fluorescência para valores desprezíveis. Na titulação do aminoácido puro parece haver uma pequena diminuição de fluorescência em torno de pH 9,0, porém essa diminuição certamente é mascarada pela ionização do grupo fenólico e portanto fica mal resolvida. Na literatura (Edelhoch, 1968) se encontraram respectivamente valores de pKs 9,28 e 9,63 para os grupos amino e fenólico. A

fig.37 mostra um experimento controle de supressão de fluorescência do fenol com pK de 10,26.

Com a adição do cobre, ocorre supressão considerável da fluorescência com pK ao redor de 5,0, e na faixa de pH 6,0-13,0 a fluorescência é praticamente nula.

A fig. 38 apresenta as curvas de titulações para o glicil-tyr e o dipeptídeo com  $\text{Cu}^{2+}$  nas seguintes estequiometrias: 1:1, 2:1 e 4:1.

Novamente podemos observar que na região de ionização do grupo carboxílico (pK 3,0), a fluorescência não é afetada pela presença do cobre.

Na ausência do metal, podemos observar que :

-Na faixa que vai do pH 4,0 à 7,0 a fluorescência se mantém constante, pois é nesta região que o dipeptídeo está na forma zwitteriônica.

-Entre os pHs 8,0 à 10,0, a intensidade de fluorescência aumenta. Na região de pH 8,0 a 9,0 segundo Edelhoich e colaboradores (Edelhoich,1968) e Cowgill (Cowgill,1976) o grupo amino converte-se da forma protonada para não protonada ( $\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2$ ) com pK 8,44.

-Para pHs mais altos, ocorre praticamente a supressão total da fluorescência, devido a ionização do fenol com pK 10,7.

Podemos notar pela fig. 38 que ocorre uma supressão da fluorescência proporcional à concentração de cobre adicionado, e os pKs do grupo amino e do grupo fenólico mesmo com a adição de cobre não parecem ter mudado ou alternativamente o peptídeo que não está ligado ao metal tem o pK invariável enquanto o que se liga ao metal tem o pK drasticamente reduzido.

Para o tyr-gly fig.39, encontramos valores de pK muito próximos do outro dipeptídeo: pK 2,98 para o grupo carboxílico, pK 8.0 para o grupo amina e pK 10,51 para o grupo fenólico. Notamos que embora o comportamento do tyr-gly seja muito parecido com o gly-tyr, podemos ver que não há uma supressão da fluorescência em torno do pH 9,0. Isto pode ser devido à maior estabilidade do complexo formado pelo gly-tyr com o  $\text{Cu}^{2+}$  o que implicaria a necessidade de excesso de  $\text{Cu}^{2+}$  para suprimir toda a fluorescência do tyr-gly.

É interessante notar que no dipeptídeo ambas as desprotonações dos grupos  $-\text{NH}_3^+$  e OH fenólico estão bem evidenciados, enquanto que no aminoácido livre os valores de pK parecem estar muito próximos um do outro, impedindo uma boa resolução de ambos.

As fig. 40 , 41 e 42 nos mostram respectivamente a supressão da fluorescência em função das razões  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{tyr}]$ ,  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{gly-tyr}]$  e  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{tyr-gly}]$  e da concentração de metal para dois pHs fixos: pH 7,0 e pH 9,0.

Das figuras 42 a e 42b podemos tirar que a estequiometria dos complexos no caso dos dipeptídeos é 1:1, enquanto que no aminoácido é igual à 2:1 fig.40.

Os dados da figs.41 foram ajustados através de um modelo simples descrito no apendice 2 que leva em conta a estequiometria 1:1 e que permitiu a obtenção de constante de associação metal-peptídeo.

Pelos ajustes dos dados experimentais das titulações dos compostos puros, utilizando-se a equação A1 determinamos os pKs dos grupos carboxílico, amino e fenólico na ausência de cobre. Os resultados estão apresentados na tabela XIII.

grupo	pK		
	l-tyr	gly-l-tyr	tyr-l-gly
carboxílico	2,30(2,2) <sup>a</sup>	3,00(3,00) <sup>a</sup>	2,98
amino	(9,28) <sup>b</sup>	8,44(8,0-9,0) <sup>d</sup>	8,00
fenólico	10,28(10,31) <sup>a</sup>	10,70(10,4) <sup>c</sup>	10,51

tabela XIII-valores dos pKs dos grupos carboxílico, amino e fenólico de tyr-gly, gly-tyr.

obs: Entre parentesis os valores mencionados por (Fayet,1971)<sup>a</sup> (Edelhoeh,1968)<sup>b</sup> (White, 1958)<sup>c</sup> e (Cowgill,1976)<sup>d</sup>.

Na tabela XIV apresentamos as constantes de equilíbrio nos pHs 7,0 e 9,0 que foram obtidas por meio dos ajustes dos dados experimentais utilizando-se a equação A18. As equações utilizadas nesses ajustes estão apresentadas no apêndice.

dipeptídeo	pH	cte de equilíbrio(M <sup>-1</sup> )
gly-tyr	7,0	(1,09 ± 0,03) × 10 <sup>7</sup>
tyr-gly	7,0	(0,82 ± 0,06) × 10 <sup>7</sup>
gly-tyr	9,0	(1,48 ± 0,01) × 10 <sup>7</sup>
tyr-gly	9,0	(1,32 ± 0,02) × 10 <sup>7</sup>

tabela XIV-valores das constante de equilíbrio para gly-tyr e tyr-gly em dois pHs:pH 7,0 e pH 9,0.

Pelos dados da tabela XIII,observamos que nos dois pHs as constantes de equilíbrio para o gly-tyr são maiores que para o outro dipeptídeo, indicando que os complexos formados pelo gly-tyr com Cu<sup>2+</sup> devem ser mais estáveis que os complexos de tyr-gly com o metal.

Nos dois dipeptídeos a constante de estabilidade do complexo em pH 9,0 é maior que a constante em pH 7,0, pois no pH 9,0 devem existir mais grupos desprotonados, e portanto os complexos

formados neste pH devem ser mais estáveis.

É comum analisar-se os dados de supressão de fluorescência pela equação de Stern-Volmer (Lakowicz,1983;Chen,1986 e Tabak,1990):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_D \tau [Q] = 1 + k_{SV} [Q]$$

onde  $F_0$  e  $F$  são respectivamente as intensidades da fluorescência na ausência e na presença do supressor, e  $k_{SV}$  é a constante de supressão de Stern-Volmer,  $k_D$  é a constante bimolecular que representa em geral um mecanismo colisional,  $\tau$  é o tempo de vida da fluorescência na ausência do supressor e  $[Q]$  é a concentração do supressor. A inclinação da reta do gráfico de  $F_0/F$  pela concentração do supressor fornece a constante  $K_{SV}$ .

Os gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da tyr, do gly-tyr e do tyr-gly pelo  $Cu^{2+}$  estão apresentados nas fig.s 43, 44a e 45b. Pode-se observar que não é possível a linearização dos gráficos mesmo quando se considera apenas a região de concentrações mais baixas do  $Cu^{2+}$ . Para mostrar este fato, nas figuras 44b e 45b apresenta-se somente a região de baixas concentrações do supressor em escala expandida e pode se observar facilmente que não se trata de uma relação linear.

O modelo para explicar a não linearidade dos gráficos de Stern-Volmer deve ser mais complexo pois, pode estar ocorrendo a formação de um segundo complexo, já que a supressão

colisional pode ser excluída devido as baixas concentrações de fluoróforo e supressor utilizadas nos experimentos.

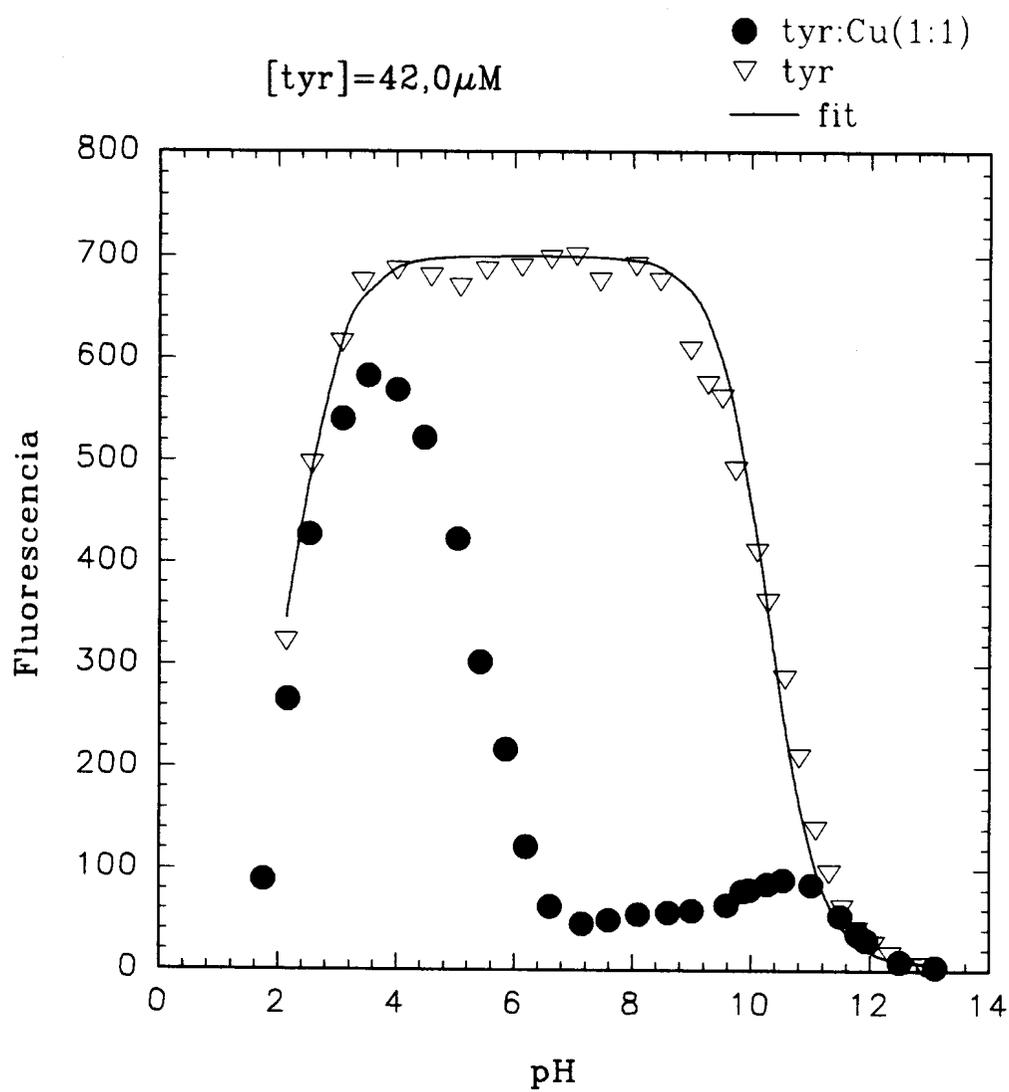


Fig.36 Curvas de titulação da tyr e tyr-Cu<sup>2+</sup> (1:1). O ajuste da curva foi feito através do modelo descrito no apêndice.

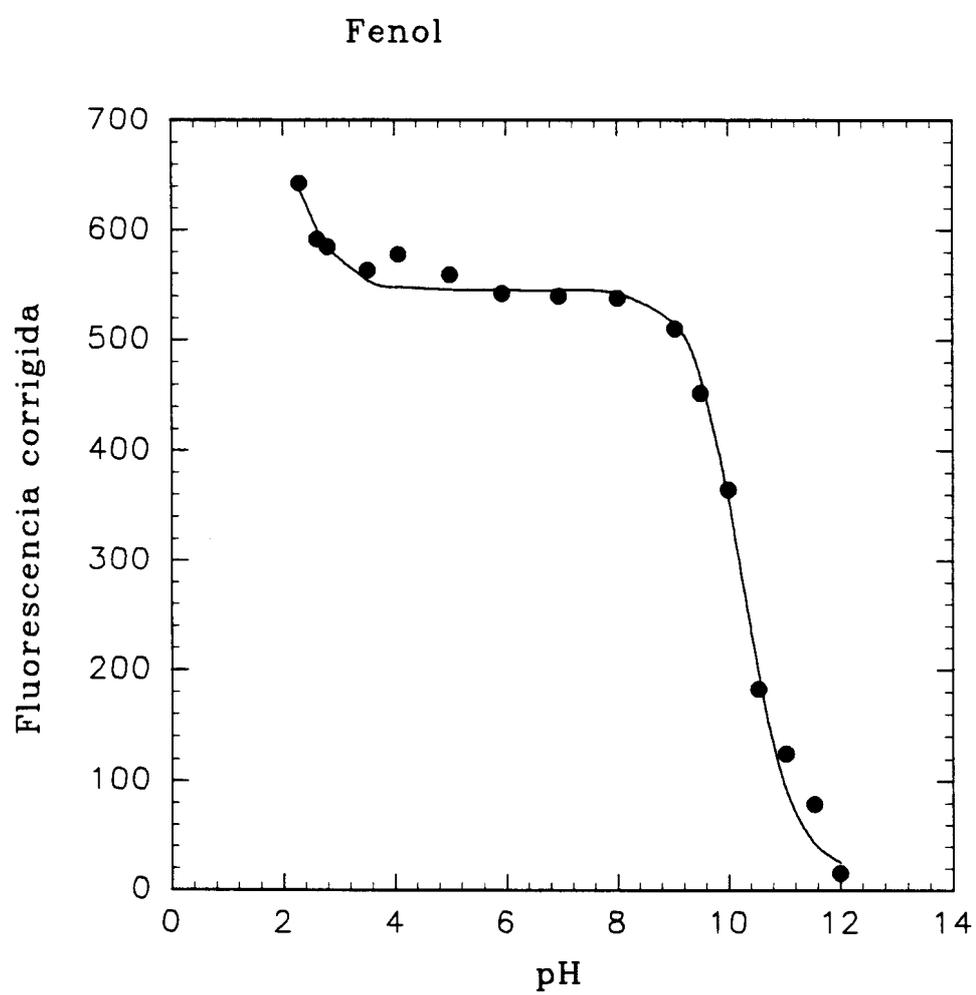


Fig.37 Supressão da fluorescência do fenol em função do pH. O ajuste da curva foi feito através do modelo descrito no apêndice.

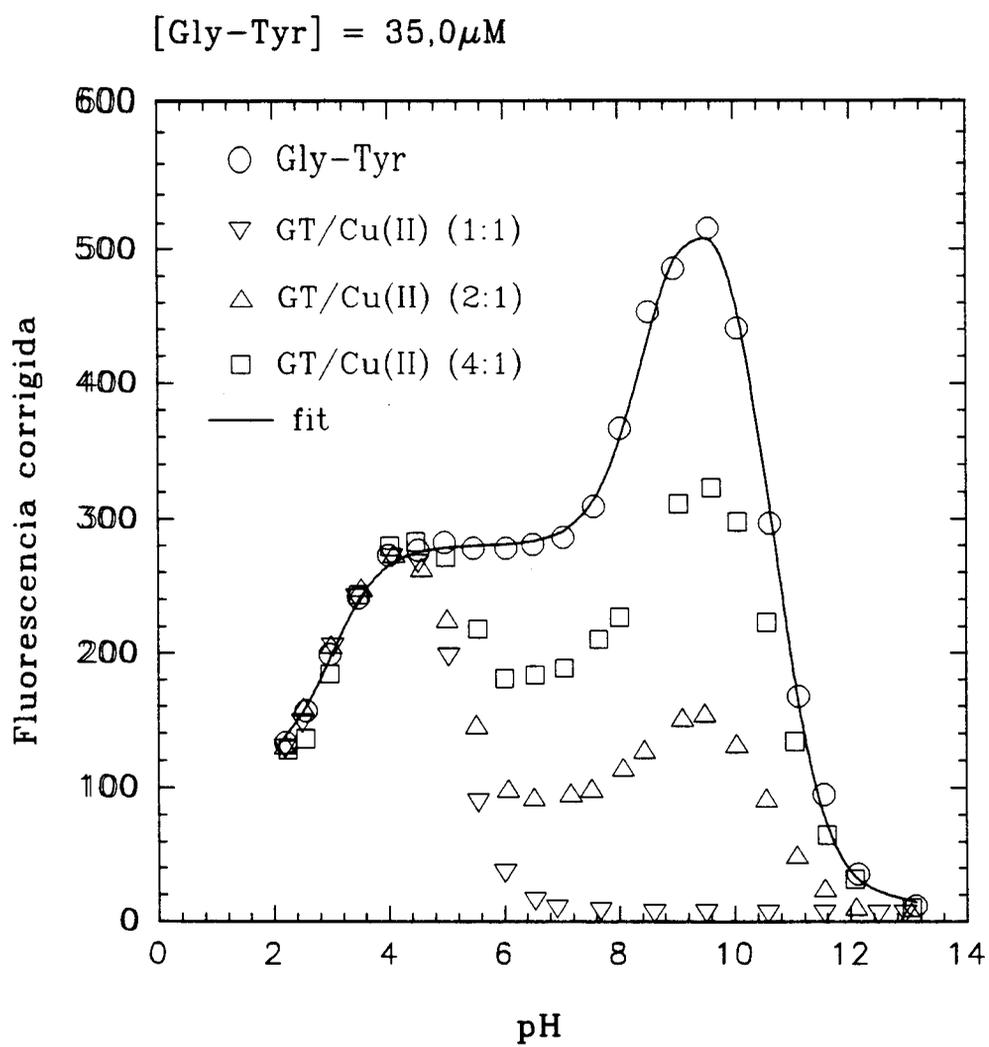


Fig.38 Intensidade da fluorescência de gly-tyr em função do pH na ausência e na presença de cobre. O ajuste da curva foi feito através do modelo descrito no apêndice.

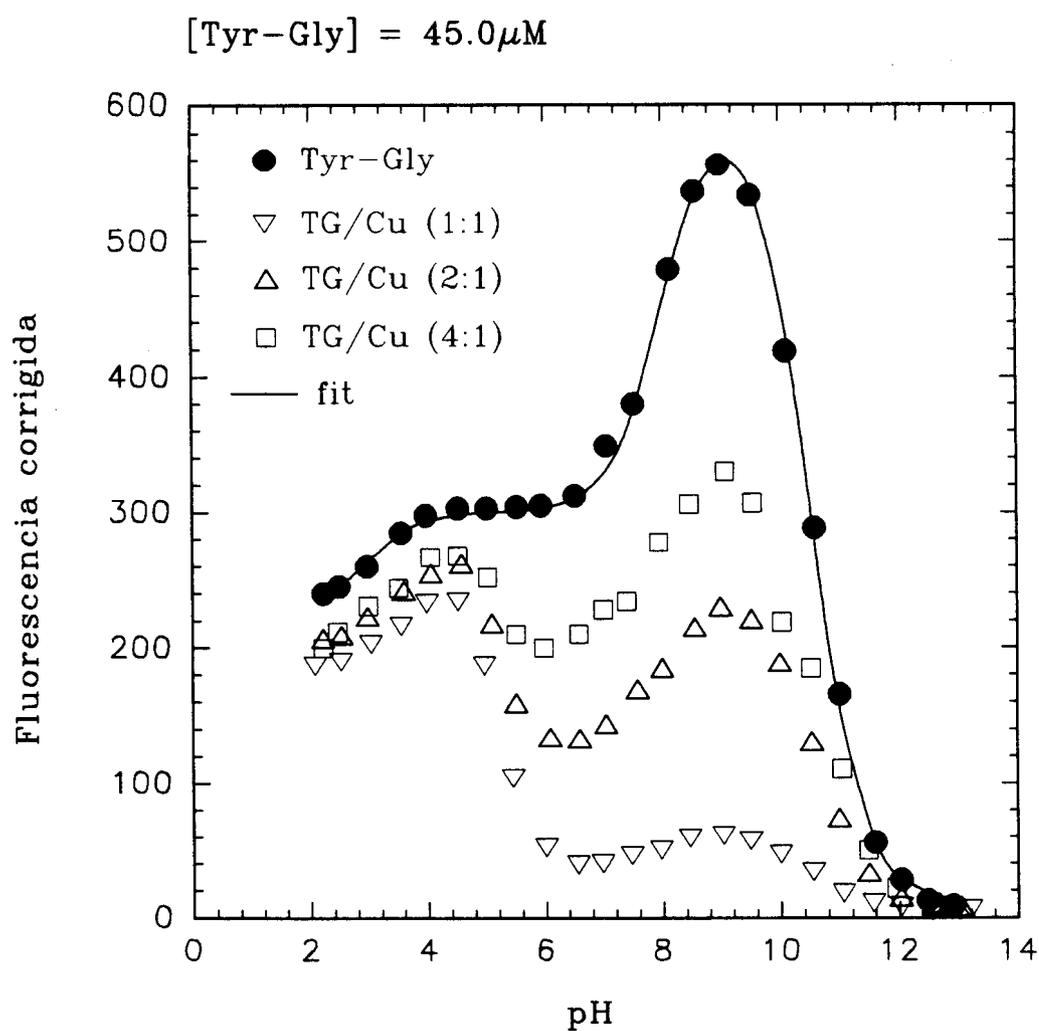


Fig.39 Intensidade da fluorescência de tyr-gly em função do pH na ausência e na presença de cobre. O ajuste da curva foi feito através do modelo descrito no apêndice.

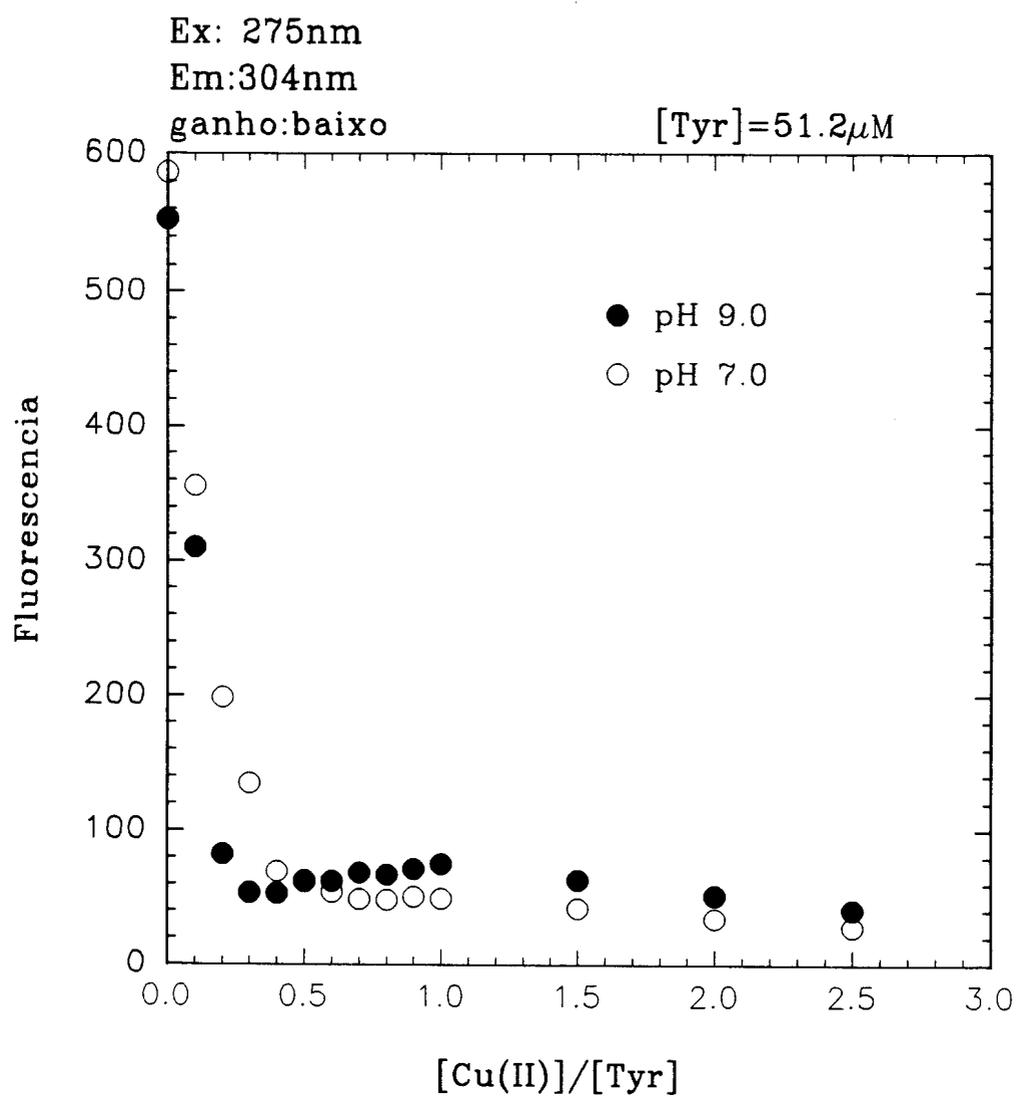


Fig.40 Intensidade da fluorescência em função da relação  $[Cu^{2+}]/[tyr]$  em dois pHs fixos (pH 7,0 e 9,0).

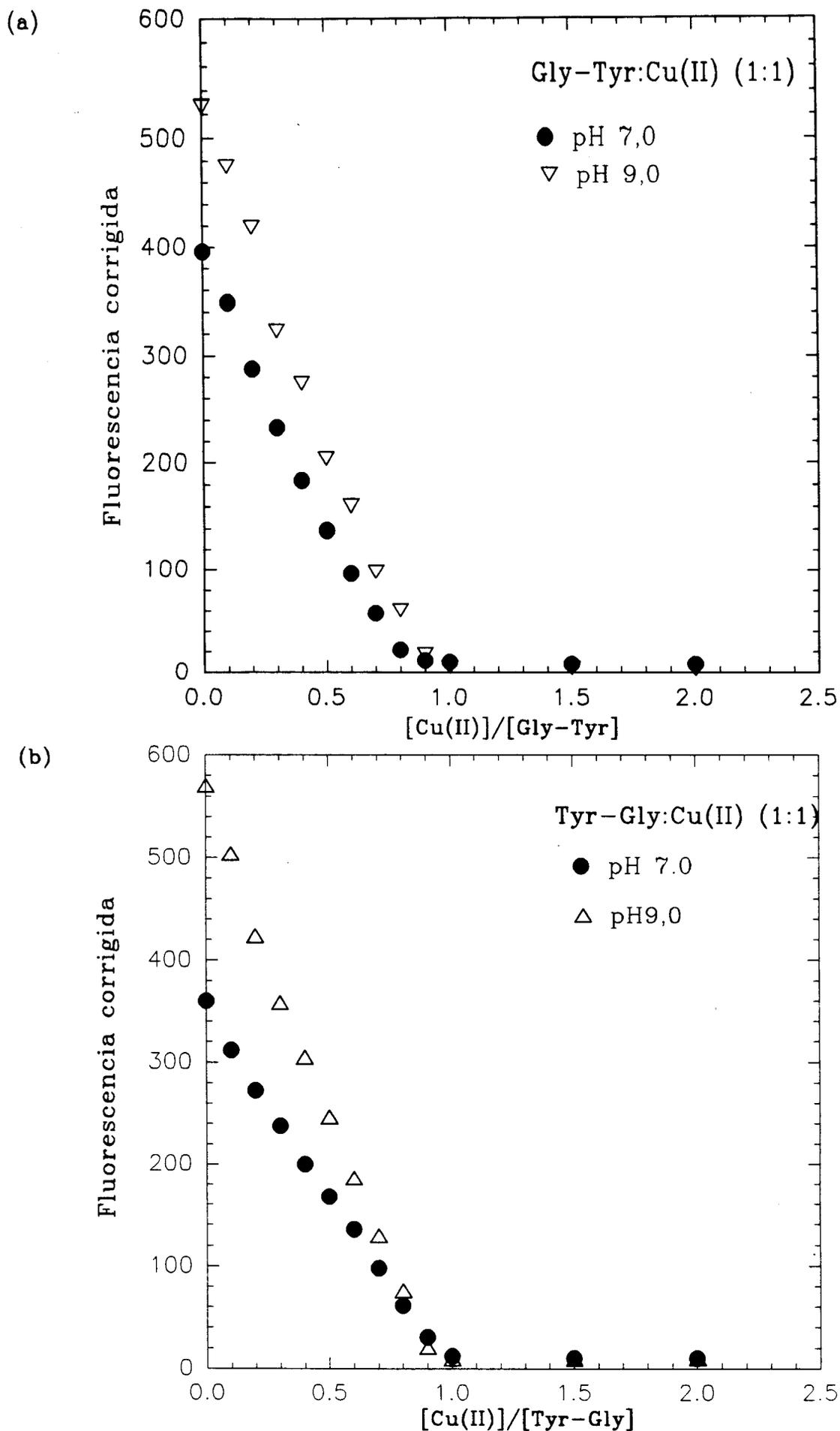


Fig.41 Intensidade da fluorescência dos peptídeos em função da  $[Cu^{2+}]$  em dois pHs fixos (pH 7,0 e 9,0). A concentração de gly-tyr foi de  $35,0 \mu M$  e de tyr-gly foi de  $45,3 \mu M$ . O ajuste das curvas foram feitos através de um modelo de equilíbrio descrito no apêndice.

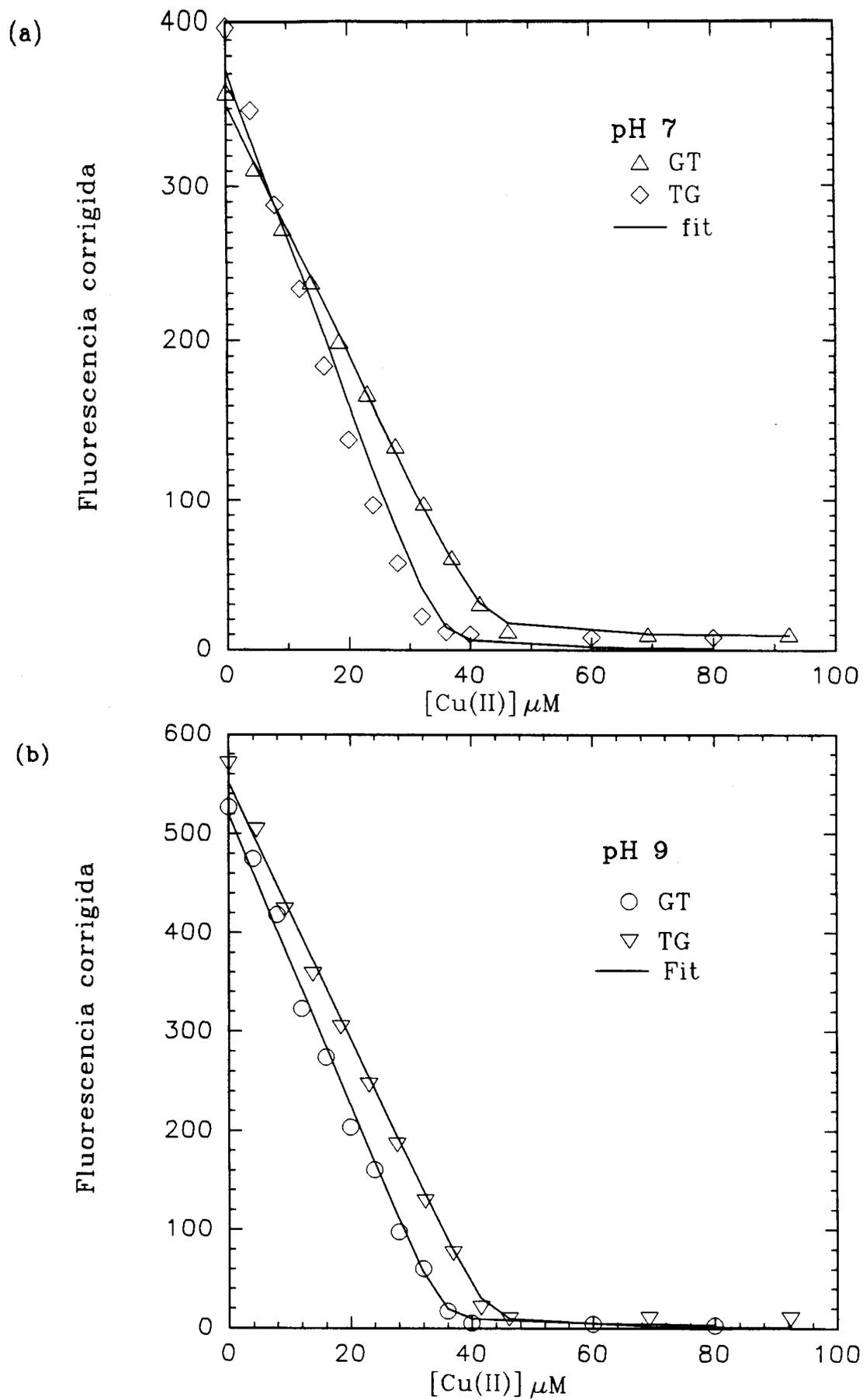


Fig.42 Intensidade da fluorescência dos peptídeos em função da relação  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{dipeptídeos}]$  em dois pHs fixos (pH 7,0 e 9,0). A concentração de gly-tyr foi de  $35,0 \mu\text{M}$  e de tyr-gly foi de  $45,3 \mu\text{M}$ . O ajuste das curvas foram feitos através de um modelo descrito no apêndice.

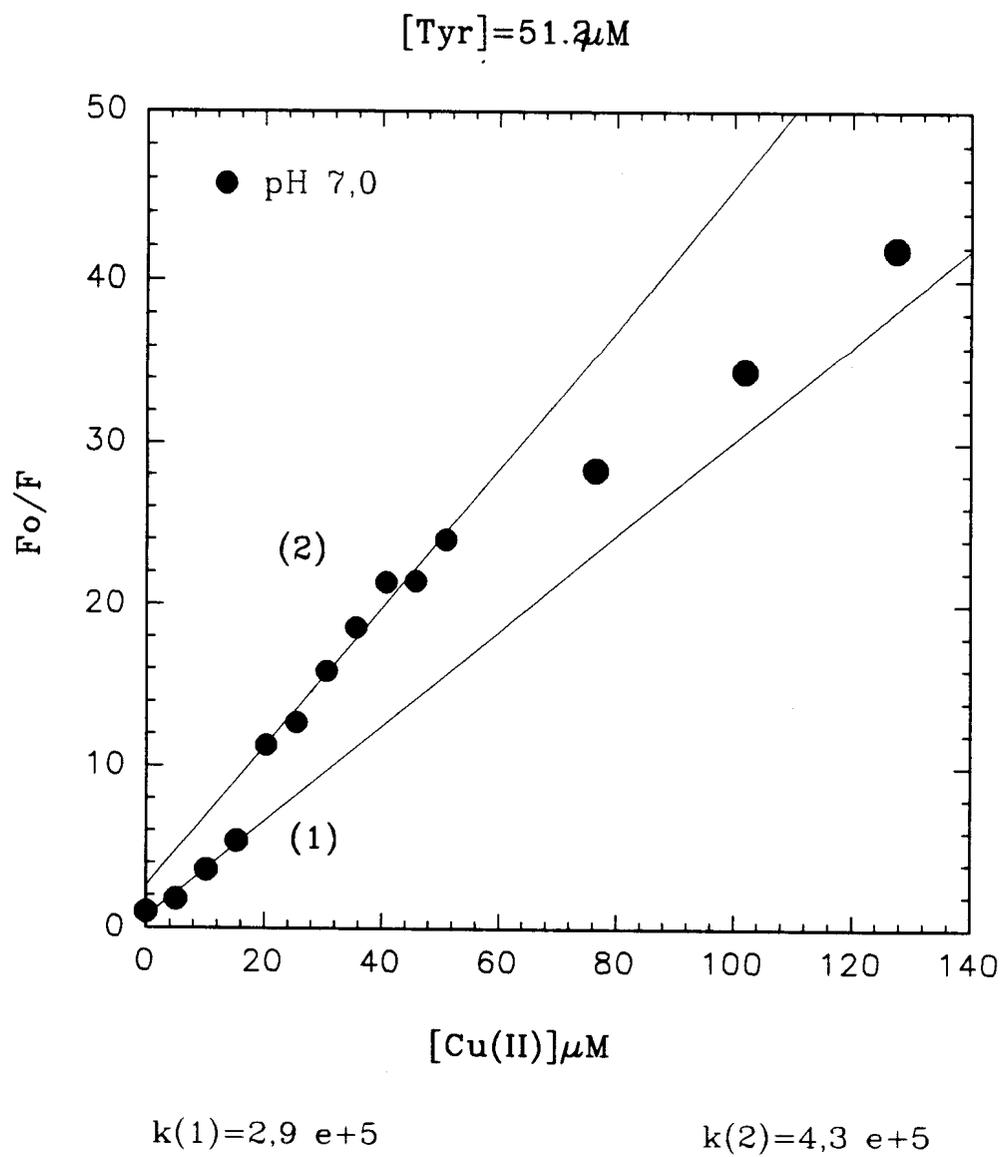


Fig.43 Gráfico de Stern-Volmer para tyr em pH 7,0.

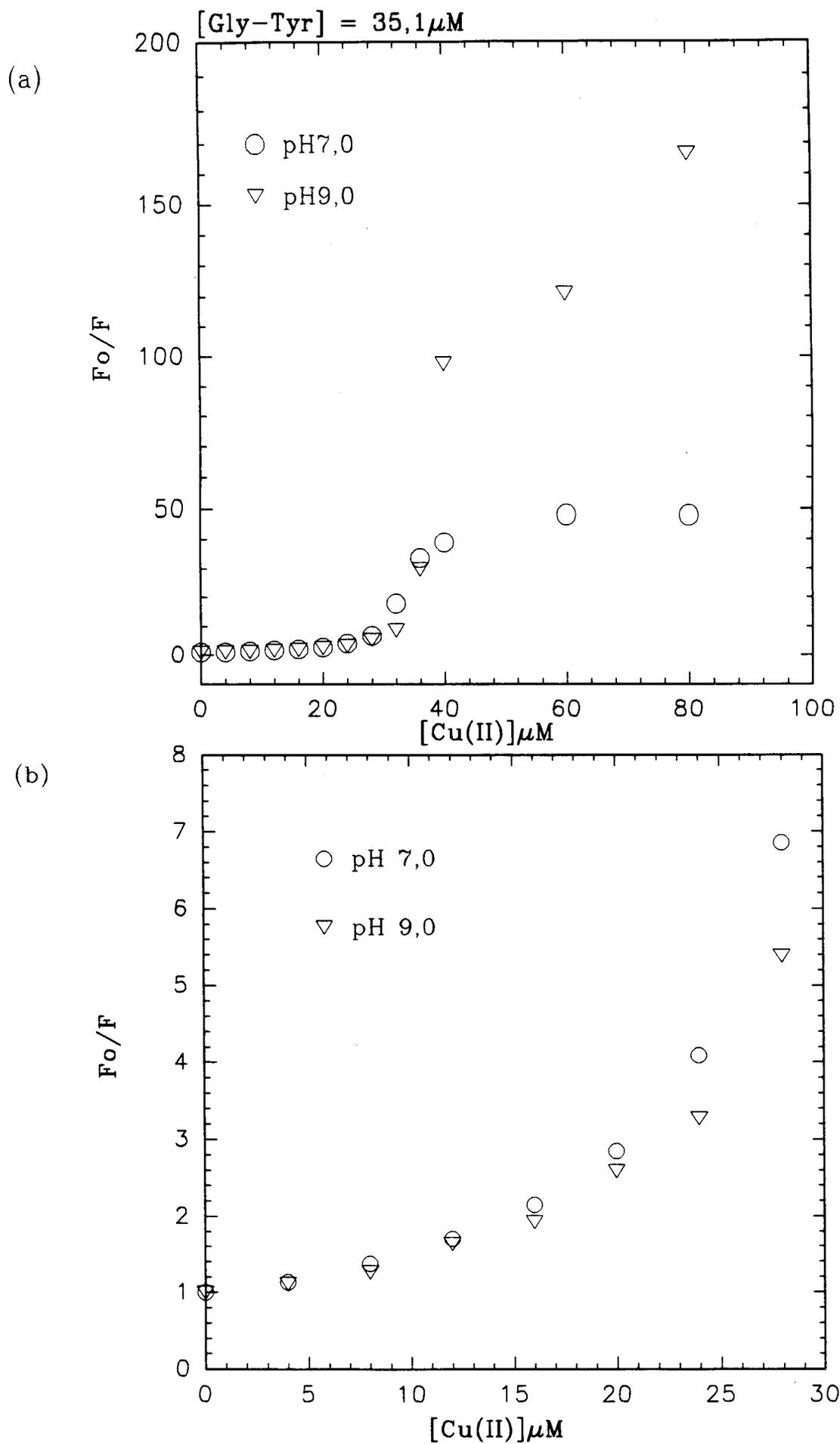


Fig.44 (a) Gráfico de Stern-Volmer para gly-tyr nos pHs 7,0 e 9,0;  
(b) gráfico ampliado.

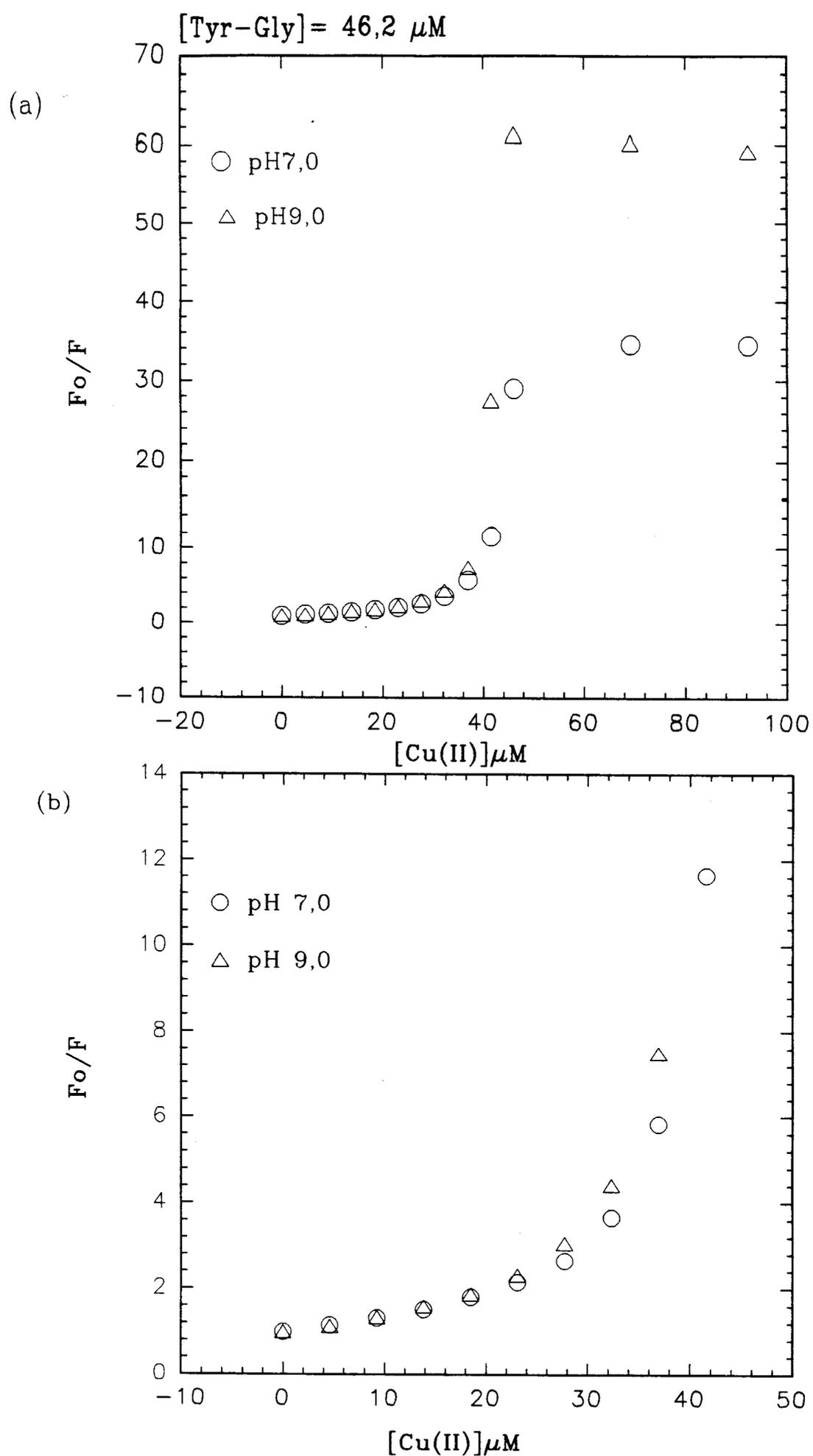


Fig.45 (a) Gráfico de Stern-Volmer para tyr-gly nos pHs 7,0 e 9,0; (b) gráfico ampliado.

## CAPÍTULO VI-DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

### 6.1 Absorção ótica

Ambos dipeptídeos apresentam bandas largas de absorção típicas para complexos de cobre com uma dependência de pH que evidencia o equilíbrio em solução de várias espécies (tipos de complexos).

Nossos resultados sugerem a existência de pelo menos 3 complexos distintos além da presença de cobre hidratado nos pHs mais ácidos. Na faixa de pH entre 8,0 e 9,5 possivelmente o complexo formado envolve os dois nitrogênios dos grupos amina e amido, o carboxilato e uma molécula de água sendo o complexo  $\text{CuLH}_2\text{O}$ . A tentativa de obter as energias das transições produzidas entre os níveis desdobrados pelo campo cristalino originou nas tabelas IXa e IXb. Pode-se notar que em pH 8,5 temos  $D_1 = 1,535 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$  e  $D_2 = 1,711 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$  para o complexo  $\text{tyr-gly:Cu}^{2+}$  sendo que no  $\text{gly-tyr:Cu}^{2+}$   $\Delta_1 = 1,561 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$  e  $\Delta_2 = 1,703 \cdot 10^4$ . Supondo que o estado fundamental é um  $d_{x^2-y^2}$ , temos  $\Delta_1$  que corresponde a transição  $d_{x^2-y^2} \rightarrow d_{xz,yz}$  e  $\Delta_2$  a transição  $d_{x^2-y^2} \rightarrow d_{xy}$  que ocorre em simetria axial. Esses dados permitem como veremos mais adiante a estimativa de parâmetros relacionados com a estrutura eletrônica dos complexos e são complementares às medidas de ressonância eletrônica. Convém mencionar também que os dados de concentração de cobre livre em pHs ácidos obtidos nos ajustes dos espectros de RPE foram utilizados nas determinações dos parâmetros (simulação por gaussianas) apresentados nas tabelas VII e VIII. Desta forma a concentração de cobre livre em

equilíbrio com os complexos diminui sensivelmente na região de pH 3,0 - 5,0 enquanto que a concentração de complexos aumenta na mesma proporção (figuras 17 e 18).

## 6.2 Ressonância paramagnética eletrônica

As medidas com o aminoácido foram realizadas em concentração mais baixa (2mM de aminoácido e 0,2mM de  $\text{Cu}^{2+}$ ) devido à baixa solubilidade da tyr em pHs abaixo de 8,0. Isso obviamente torna difícil a análise dos espectros especialmente os congelados. Os resultados com o aminoácido sugerem a existência de pelo menos 2 complexos em meio ácido e de um único complexo acima de pH 6,0 e que provavelmente é o  $\text{CuL}_2$ . Os parâmetros dos espectros em solução sugerem que  $g_0$  varia muito pouco numa ampla faixa de pH (5,5 - 12,0) aumentando bastante para pHs abaixo de 5,0; por outro lado  $A_0$  é constante na faixa de pH 7,5 e 10,0 e a variação observada para pHs ácidos (abaixo de 6,5) é provavelmente devida à superposição de vários complexos em solução (pelo menos dois). Os espectros dos peptídeos foram medidos a temperatura ambiente e a  $-150^\circ\text{C}$ . A temperatura ambiente os espectros são semelhantes em toda a faixa de pH. Estrutura superhiperfina devida a dois nitrogênios evidencia a coordenação de ambos os nitrogênios amina e amida que fica bem evidente em pHs altos (acima de 11,0). Na região acima de pH 4,0 - 6,5 aparece a estrutura superhiperfina porém menos resolvida. A dependência de  $g_0$  e  $A_0$  com o pH para ambos os dipeptídeos é bastante similar sugerindo uma gradual redução da quantidade de cobre livre e formação de complexos. Nota-se pelo menos 3 regiões características onde há : a) mistura de

$\text{Cu}^{2+}$  livre e complexos de peptídeo em meio ácido b) uma região onde  $g_0$  é constante e próximo ao valor da tyr ( $g_0=2,12$ ) , e c) uma região de pH acima de 11,0 onde  $g_0$  aumenta ligeiramente. O valor de  $A_0$  nessa ultima região é bastante reduzido implicando uma delocalização do elétron desemparelhado do cobre. No caso dos espectros congelados nota-se uma diferença grande nos parâmetros dos peptídeos ( $g_{//}$  e  $A_{//}$ ) tanto em pHs ácidos (3,0 - 5,0) quanto altos (acima de 11,0. O comportamento de  $g_{//}$  e  $A_{//}$  é compatível com o descrito para complexos de cobre em proteínas azuis e modelos onde a diminuição de  $A_{//}$  está acompanhada pelo aumento de  $g_{//}$  . Na região entre pH 7,0 e 11,0 não há muita diferença evidenciando que o complexo  $\text{CuLH}_2\text{O}$  deve ser muito semelhante para os dois dipeptídeos, pouco sensível a posição do residuo aromático.

Uma questão interessante que convém mencionar está relacionada com a obtenção dos espectros puros dos complexos existentes em solução.

No caso da tyr observou-se que a pH 5,12 existe uma mistura de cerca 60% do complexo observado em meio ácido e o restante (40%) deve-se ao complexo de pH alto. Os parâmetros medidos de  $g_0$  e  $A_0$  para o espectro puro correspondente ao complexo de pH intermediário foram  $g_0 = 2,129$  e  $A_0 = 68$  gauss o que é um pouco diferente dos valores medidos diretamente do espectro experimental (tabela X). A análise dos espectros congelados e o uso de subtrações espectrais permitiu definir a existência de 3 complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  para os dipeptídeos na faixa de pH estudada. Assim para pHs ao redor de 4,5 tem-se  $\text{CuL}_2$  , na faixa entre pH 7,0 - 12 tem-se  $\text{CuLH}_2\text{O}$  e acima de pH 12,0 o  $\text{CuL}(\text{OH})_2^{2-}$  para o Gly-tyr. No caso do tyr-gly o complexo  $\text{CuLH}_2\text{O}$

ocorre na faixa entre pH 6,5 - 11,0, um pouco menor que para o gly-tyr. Os parâmetros para os dois dipeptídeos são extremamente similares. As subtrações espectrais permitiram obter parâmetros para o complexo puro em pH ácido (em torno de 6,0) ligeiramente diferentes dos medidos no espectro experimental :  $g_{//} = 2,256$  e  $A_{//} = 168$  gauss. As tentativas de ajuste dos espectros em pH alto (13,15) não deram resultados satisfatórios indicando que provavelmente esse espectro corresponde a mistura de mais de uma espécie em solução ou como o sistema tem baixa simetria os eixos dos tensores  $g$  e  $A$  podem não ser coincidentes.

No caso de tyr-gly as subtrações espectrais foram feitas em um pH um pouco menor do que para o gly-tyr. O resultado mostrou que os parâmetros espectrais correspondentes ao espectro puro em meio ácido (pH 5,0)  $g_{//} = 2,257$  e  $A_{//} = 168$  gauss são muito parecidos aos obtidos para o gly-tyr por um lado e por outro lado diferentes daqueles medidos nos espectros que contém mistura (tabela X). Tendo em mãos os parâmetros medidos de absorção ótica, energias de desdobramentos no campo cristalino, os parâmetros medidos de RPE para os complexos de cobre em função do pH foi possível determinar os parâmetros de redução orbital (grau de covalência) associados aos complexos em função do pH. Assumindo simetria aproximadamente axial tem-se as expressões para os valores de  $g$  dos complexos :

$$g_{//} = g_e - \frac{8\lambda K_{//}^2}{\Delta_1}$$

$$g_{\perp} = g_e - \frac{2\lambda K_{\perp}^2}{\Delta_2}$$

onde  $g_e = 2,0023$

Na tabela IXa e IXb os valores  $K_{//}$  e  $K_I$  de estão apresentados para os dois dipeptídeos em função do pH. Nota-se que para o gly-tyr  $K_{//}$  acima de pH 7,0 mantém-se essencialmente constante em torno de 0,72 enquanto que para o tyr-gly  $K_{//}$  é menor, 0,70 até pH 11,0. Acima de pH 11,0  $K_{//}$  diminui o que sugere o aumento do grau de covalência. A variação de  $K_I$  é bem maior o que deve estar associado à imprecisão nos valores de  $g_1$ . No caso do gly-tyr observa-se um máximo para  $K_I$  em torno de pH 9,0 e a sua redução em pHs ácidos e alcalinos. Para o tyr-gly  $K_I$  mantém-se constante em torno de 0,85 até pH 10,5 aumentando para 0,95 acima de pH 12,0. nossos resultados sugerem que a natureza dos complexos em pHs alcalinos (acima de 11,0) é bem diferente para os dois dipeptídeos.

### 6.3 Fluorescência

Os resultados obtidos demonstram claramente o efeito do metal de transição,  $Cu^{2+}$ , como supressor de fluorescência da tyr e seus dipeptídeos. As titulações do aminoácido e dipeptídeos puros em função do pH permitiram a determinação dos valores de pks dos grupos ionizáveis e os dados disponíveis na literatura que são esparços concordam razoavelmente bem com os nossos. Na tyr o pKa do grupo amino é mascarado pela grande mudança na desprotonação do grupo OH fenólico tornando difícil a sua determinação. Observa-se ainda para o aminoácido que o efeito de  $Cu^{2+}$  na fluorescência é o de supressão significativa

a pHs onde o grupo carboxílico está desprotonado. O experimento controle de supressão do fenol em presença de  $\text{Cu}^{2+}$  sugere que o metal essencialmente não interage com esse composto, sugerindo então que o complexo de  $\text{Cu}^{2+}$ -tyr envolve os grupos carboxílico e amino do aminoácido. Titulações em função da concentração do metal mostraram que a estequiometria do complexo é 2:1 (L:M) consistente com a espécie  $\text{CuL}_2$ . Finalmente os valores extrapolados dos gráficos de Stern-Volmer para as constantes de associação metal-ligante estão na faixa de  $(2,9 - 4,3) \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$  o que certamente é uma aproximação grosseira já que existem em equilíbrio pelo menos duas espécies  $\text{CuL}$  e  $\text{CuL}_2$  e no gráfico de Stern-Volmer isso não é levado em conta. Convém mencionar que o formalismo de Stern-Volmer é em geral utilizado para analisar supressão dinâmica de fluorescência, isto é, supressão colisional que assume-se que ocorre a difusão colisional entre fluoróforo e supressor no tempo de vida de fluorescência. A constante de Stern-Volmer  $K_{sv}$  pode ser decomposta no produto  $k_q \cdot \tau$  como já foi mencionado acima e onde  $k_q$  é a constante bimolecular. Supondo  $\tau = 3\text{ns} = 3 \cdot 10^{-9} \text{s}$  o tempo de vida da tyr e usando o valor de  $K_{sv}$  acima tem-se que  $k_q = 10^{14} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  o que é muito maior do que os valores obtidos no limite difusional (Lakowiks, 1983). Isto significa que  $k_{sv}$  só pode ser associada a uma constante de supressão estática, neste caso a constante de associação  $\text{Cu}^{2+}$ -tyr (Tabak et al, 1989, 1990). Claro que essa seria uma constante média que não leva em conta o equilíbrio de várias espécies presentes em solução.

No caso dos dipeptídeos as titulações possibilitaram a determinação dos valores de pKs dos grupos ionizáveis evidenciando pequenas diferenças dependendo da proximidade do

resíduo aromático do amino terminal. Para o gly-tyr o efeito de supressão de fluorescência só é observado após a desprotonação do grupo carboxílico enquanto que no tyr-gly a presença do metal leva à redução de fluorescência mesmo nos pHs mais ácidos. Na proporção metal:ligante 1:1 acima de pH 6,0 a fluorescência é praticamente 100% suprimida. Foi desenvolvido um modelo simples de equilíbrio que permitiu ajustar os dados experimentais de fluorescência em função de concentração de cobre e a obtenção das constantes de associação para ambos dipeptídeos. Os valores das constantes são próximas de  $10^7 \text{ M}^{-1}$  evidenciando uma complexação extremamente forte. Além disso no caso do gly-tyr as constantes são um pouco maiores do que para o tyr-gly evidenciando uma maior afinidade do peptídeo pelo metal quando o resíduo aromático está mais afastado do amino terminal. Convém mencionar que na ausência de metal a fluorescência de ambos os peptídeos é bastante similar sugerindo que não existem efeito de supressão intramolecular como ocorre como os derivados do triptofano. A estequiometria dos complexos dos dipeptídeos com  $\text{Cu}^{2+}$  é 1:1 o que reforça a suposição de que em uma ampla faixa de pH o complexo formado é o  $\text{CuLH}_2\text{O}$  envolvendo o nitrogênio amina, o nitrogênio amida, o carboxilato e uma molécula de água. O fato de que em pHs altos o tyr-gly recupera parcialmente a fluorescência concorda com o enfraquecimento do complexo observado pelos dados de RPE, onde a pHs altos os valores de  $A_{\parallel}$  para o tyr-gly aumentam de forma significativa.

A tentativa de usar o formalismo de Stern-Volmer não permitiu obter dados confiáveis para as constantes de associação que apesar de altas, na faixa de  $4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  são

bastante menores que aquelas obtidas do ajuste baseado no modelo de equilíbrio. A não linearidade das curvas está associada ao fato de que, neste formalismo geralmente utiliza-se concentração de supressores livres, supõe-se que a concentração de supressores é muito maior que a concentração de fluoróforo ou seja, a concentração inicial de supressores é igual à concentração de supressores livres. O que não é verdade na situação deste trabalho, onde foi utilizado concentrações de supressores e fluoróforo com a mesma ordem de grandeza.

#### 6.4 Conclusões

1) A decomposição dos espectros de absorção ótica dos dipeptídeos Gly-tyr e Tyr-Gly permitiu a obtenção dos valores dos desdobramentos produzidos pelo campo cristalino com simetria próxima da axial.

2) As medidas de RPE em solução em função do pH a temperatura ambiente e a  $-150^{\circ}\text{C}$  permitiu a detecção de pelo menos 3 espécies diferentes de complexos de cobre com os dipeptídeos em equilíbrio, cada um deles prevalecendo numa faixa limitada de pH. Ficou evidenciada a participação de dois nitrogênios, amina e amida, bem como do grupo carboxilato formando o complexo,  $\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})$  numa ampla faixa de pHs entre 7,0 e 11,0. Através do uso de subtração espectral, os espectros dos complexos puros foram obtidos e os parâmetros de RPE e de absorção ótica indicam um grau de covalência acentuado em ambos os complexos sendo maior para o Gly-Tyr.

3) As medidas de fluorescência foram extremamente informativas permitindo obter a estequiometria dos complexos (relação ligante:metal) em pH 7,0 e pH 9,0 que é 1:1 no caso dos dipeptídeos e 2:1 no caso do aminoácido. Essas estequiometrias são similares às observadas para derivados do triptofano. Um modelo simples de equilíbrio foi utilizado no caso dos dipeptídeos obtendo-se constantes de associação na faixa de  $10^7\text{M}^{-1}$ .

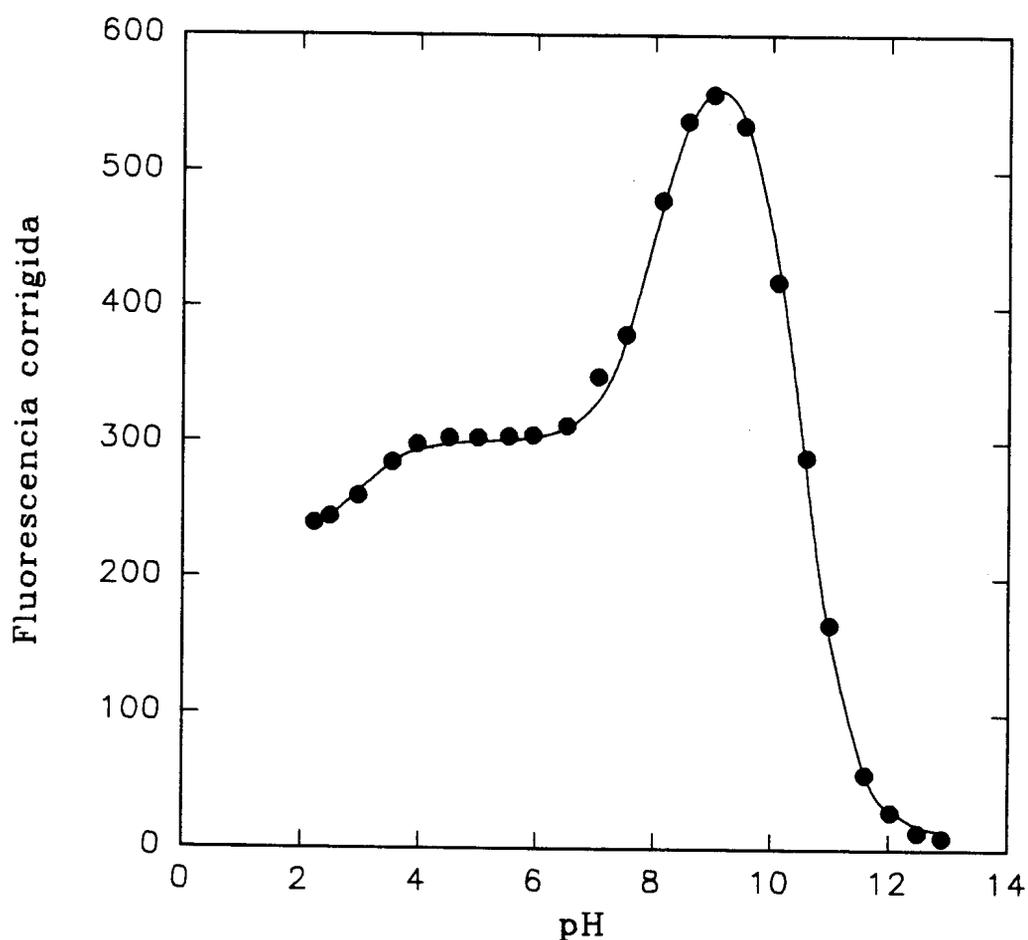
4) Finalmente é interessante notar a boa concordância entre os dados obtidos das medidas de fluorescência onde a concentração de peptídeos é de  $4 \cdot 10^{-5}\text{M}$  e dos dados de RPE onde

a concentração é de  $10^{-2}$  M, ou seja, cerca de três ordens de grandeza maior.

## APÊNDICE

## 1. Equação para determinação de pKs

A figura abaixo apresenta uma titulação de tyr-gly já mostrado anteriormente (fig.39), o ajuste da curva corresponde aos dados experimentais.



onde  $F_4$  é a fluorescência onde todos os grupos estão protonados,  $F_3$  onde grupo carboxílico está desprotonado,  $F_2$  é a fluorescência onde o grupo amino esta desprotonado e  $F_1$  é a fluorescência onde o grupo fenólico está desprotonado.

A fluorescência total  $F$  será dada pela contribuição de todos os "patamares":

$$F = F_4 + \Delta f_1(\text{pH}) + \Delta f_2(\text{pH}) + \Delta f_3(\text{pH}) \quad (\text{A1})$$

onde  $\Delta f_1 = F - F_4$ ,  $\Delta f_2 = F_2 - F_3$  e  $\Delta f_3 = F_1 - F_2$

Determinação de  $\Delta f_1$ ,  $\Delta f_2$  e  $\Delta f_3$  :

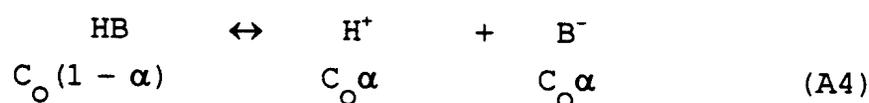
A constante de dissociação de uma reação é dada por:



∴

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{B}^-]}{[\text{HB}]} \Rightarrow \frac{K}{[\text{H}^+]} = \frac{[\text{B}^-]}{[\text{HB}]} \quad (\text{A3})$$

Podemos escrever a equação (A3) em função de  $\alpha$ , onde  $\alpha$  é a fração do composto que foi dissociada.



onde  $C_0$  é concentração

Então a equação (A3) em função de  $\alpha$  será:

$$\frac{K}{[\text{H}^+]} = \frac{C_0\alpha}{C_0(1 - \alpha)} \quad (\text{A5})$$

Isolando  $\alpha$  temos:

$$\alpha = \frac{K}{[\text{H}^+] + K} \quad (\text{A6})$$

$\alpha$  em termos da fluorescência experimental será dada por:

$$\alpha = \frac{F - F_4}{F_3 - F_4} = \frac{\Delta f_1}{F_3 - F_4} \quad (\text{A7})$$

$$\therefore \Delta f_1 = \alpha_1 (F_3 - F_4) = \frac{K_1}{[H^+] + K_1} \quad (\text{A8})$$

Analogamente:

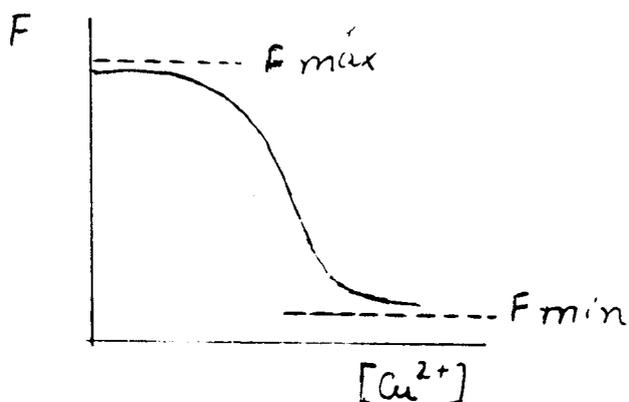
$$\Delta f_2 = \alpha_2 (F_2 - F_3) = \frac{K_2}{[H^+] + K_2} \quad (\text{A9})$$

$$\Delta f_3 = \alpha_3 (F_1 - F_2) = \frac{K_3}{[H^+] + K_3} \quad (\text{A10})$$

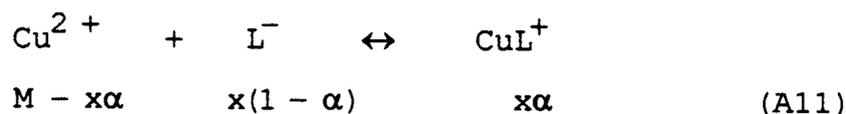
Determinando-se  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_3$  teremos os pKs de todos os grupos, pois  $\text{pK} = -\log K$

## 2. Determinação de constante de equilíbrio

A figura abaixo representa esquematicamente um titulação de uma solução de dipeptídeos com um solução de cobre.



O equilíbrio da reação pode ser representado pela equação:



onde M é a concentração total de cobre; x é a concentração total de ligante,  $\alpha$  é a fração de ligante complexado em relação à quantidade total presente na amostra.

A constante de equilíbrio será dada pela equação:

$$K = \frac{[\text{CuL}^{+}]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{L}^{-}]} = \frac{x\alpha}{(\text{M} - x\alpha)x(1 - \alpha)} \quad \text{(A12)}$$

$$x\alpha = K(\text{M} - x\alpha)x(1 - \alpha) \quad \text{(A13)}$$

$$(Kx^2)\alpha^2 - (KMx + Kx^2 + x)\alpha + KMx = 0 \quad \text{(A14)}$$

Seja  $A = Kx^2$ ,  $B = KMx + Kx^2 + x$  e  $C = KMx$ , então temos:

$$\alpha = \frac{-B \pm \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \quad \text{(A15)}$$

mas

$$\alpha = \frac{\text{ligante}_{(\text{ligado})}}{\text{ligante}_{(\text{total})}} = \frac{\Delta F}{\Delta F_{\text{max}}} = \frac{F_{\text{max}} - F}{F_{\text{max}} - F_{\text{min}}} \quad (\text{A16})$$

$$\alpha = \frac{F_{\text{max}} - F}{F_{\text{max}} - F_{\text{min}}} \quad (\text{A17})$$

$$\therefore F = F_{\text{max}} - \alpha(F_{\text{max}} - F_{\text{min}}) \quad (\text{A18})$$

onde  $\alpha$  é dado pela equação A15.

Fazendo-se o ajuste das curvas por meio da equação 18 determinaremos os valores das constantes de equilíbrio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAND, L.; WITHOLT, B.: "Methods in Enzimology", 87,  
Academic Press, N.Y.
- BRILL, A.S.: "Transition Metal in Biochemistry"-Springer-  
Verlag, NY (1977)
- CANTOR, C.R.;SCHIMEL, P.R.: "Biophysical chem. part II:  
techniques for the estudy of Biological structure  
and function". W.H. Freeman and Company, (1980)
- CASAS-FINET, J.R.C.; WILSON, S. H.; KARPEL, R. L.; Anal.  
Bioch..205, 27 (1991)
- CHEN, R.F.: Analytical Letters, 19, 963, (1986)
- COWGILL, R.W.: "Biochemical fluorecence: Concepts", 2,  
chap.9, Marcel Dekker, Inc. (1976)
- DWAINE, O.C.; DRISCO, R.L.: "Elements of Organic  
Photochemistry, 8, Plenum Press, N.Y. (1976)
- EDELHOCH, H.; PERLMAN, R.L.; WILCHEK,M.: Biochemistry, 7,  
3893 (1968)
- FAYET, M.; WAHL, P.: Biochem. Biophys. Acta, 299, 102  
(1971)

- HATHAWAY, B.J.; BILLING, D.E.: *Helvetica Chimica Acta*, 53, 143 (1970)
- HITCHMAN, M.A.; KWAN, L.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 457 (1987)
- HUGGINS, T.G.; WELLS-KNECHT, M.C., DETORRES, N.A.; BAYNES, J.W.; THORPE, S.R.: *J. Biol. Chem.*, 268, 17, 12341 (1993)
- KOZLOWSKI, H: *Chem. Phys. Letters*, 46, 519 (1977)
- LAKOWICZ, J.R.: "Principles of fluorescence spectroscopy, chap. Plenum Press, NY (1983)
- LIN, W. Y., EADS, C.D.; VILLAFRANCA, J.J.: *Biochemistry*, 30, 3421 (1991)
- MELO, W.L.B.; TABAK, M.; NASCIMENTO, O.R.: *Química Nova*, 15(1), 77 (1992)
- NASCIMENTO, O.R.; TABAK, M.: *J. Inorg. Biochem.*, 23, 13 (1985)
- NASCIMENTO, O.R.: "Complexos do dipeptídeo glicil-triptofano com íon  $\text{Cu}^{2+}$ : Caracterização por medidas de Abs. Eletrônica no visível e por RPE" - Tese de Livre-Docência-IFQSC-USP
- PAKE, G.E.; ESTLE, T.L.: "The physical principles of

- Electron Paramagnetic Resonance", W.A. Benjamin, Inc.  
(1973)
- PINTÃO, C.A.F.; " Estudos dos complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  com trp-gly utilizando a técnica de RPE " Tese - Mestrado - IFQSC  
- USP - 1989
- SARKAR, B.: " Metal ions in Biological Systems ", vol. 2,  
chap. 6, Marcel Dekker, inc New York and Basel (1981)
- SIGEL, H.: "Metals ions in Biological Systems", Chap.9, -  
Marcel Dekker, inc. NY (1981)
- SPORTELLI, L.; NEUBACHER, H.; LOHMANN, W.: Rad. and  
Environm. Biophys. 13, 305 (1976)
- SPORTELLI, L.; NEUBACHER, H.; LOHMANN, W.: Biophys.  
Struct. Mech., 3, 317 (1977)
- SZABO, A.G.: "The enzyme catalysis process" - Plenum  
Pub. corporation (1989)
- TABAK, M.; SARTOR, G., NEYROZ, P.; SPISNI, A.; CAVORTA, P.:  
J.Luminescence, 46, 291 (1990)
- TADAKI, D.K.; NIYOGI, S.K.: J. Biol. Chem., 268, 14,  
10114 (1993)
- VÄNGÅRD, T.: "Copper proteins", In: Biological

Applications of Eletron Spin Resonance, chap.9. Swartz,  
H.M.;Balton,J.R. Borg, D.C. (eds) N.Y., London: Wiley-  
Interscience (1972)

-WELLS-KNECHT, M.C.; HUGGISN, T.G.; DYER, D.G. THORPE,  
S.R.; BAYNES, J.W.: J. Biol. Chem., 268, 17, 12348 (1993)

-WHITE, A.: Biochem. J., 71, 217 (1959)