

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE LIGAÇÕES DE
ENXOFRE EM AMINOÁCIDOS UTILIZANDO MECÂNICA MOLECULAR,
DEGRADAÇÃO TÉRMICA E TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.

LYGIA SILVA DE MORAES

Laboratório de Impacto de Fótons e Elétrons

Departamento de Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Gerardo Gerson Bezerra de Souza

Rio de Janeiro

2014

AGRADECIMENTOS

À minha família e meus verdadeiros amigos (incluindo os amigos do Instituto de Química) por todo amor, paciência, apoio e motivação nestes anos de graduação.

Ao professor e orientador Gerardo Gerson Bezerra de Souza por me acolher, pela amizade e principalmente pela compreensão durante os momentos difíceis.

Aos meus amigos e companheiros do LIFE pelo auxílio e amizade.

Ao Laboratório de Análise Térmica do Polo de Xistoquímica da UFRJ, ao Laboratório de Instrumentos e Pesquisa do IQ/UFRJ e ao Laboratório Multiusuário de RMN de Sólidos do IQ-UFRJ pela disponibilização das análises.

Aos integrantes da banca examinadora, professor Rafael Berrelho Bernini (IFRJ) e professora Maria Luiza Rocco Duarte Pereira (DFQ-IQ/UFRJ).

Aos professores de todos os departamentos do Instituto de Química da UFRJ aos quais nutri uma bela amizade.

À “tia” Sônia, secretária da graduação do Instituto de Química, por me aturar todos esses anos resolvendo problemas burocráticos.

Ao Ary e ao “Seu” Luiz, antigos secretários do DQI e DQO, respectivamente, pela enorme amizade, que deixa muitas saudades.

A todos vocês, muito obrigada.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE LIGAÇÕES DE ENXOFRE EM AMINOÁCIDOS UTILIZANDO MECÂNICA MOLECULAR, DEGRADAÇÃO TÉRMICA E TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.

ALUNO: Lygia Silva de Moraes

ORIENTADOR(ES): Gerardo Gerson Bezerra de Souza, DFQ-Instituto de Química-UFRJ

COLABORADOR(ES): Laboratório de Análise Térmica, Polo de Xistoquímica-UFRJ; Laboratório de Instrumentos e Pesquisa, DQI-Instituto de Química-UFRJ; e Laboratório Multiusuário de RMN de Sólidos, DQO-Instituto de Química-UFRJ

Os aminoácidos, proteínas e outras estruturas biológicas são, muitas vezes, submetidas a elevadas cargas de radiações como o ultravioleta, raios-x, elétrons de alta energia, etc. Essas radiações, em sua maioria, modificam estruturalmente tais moléculas, e são muito empregadas na constituição de biomateriais buscando um aumento da biocompatibilidade com o organismo. As moléculas orgânicas contendo enxofre possuem ampla atividade biológica. O aminoácido Cisteína e sua forma oxidada, a Cistina possuem importante papel na estabilização da conformação proteica e mudanças nas suas estruturas, podem destruir, desnaturar ou mutar estas estruturas, causando danos para a proteína e, conseqüentemente, para a célula.

O uso da modelagem molecular permite gerar estruturas de forma a determinar o comprimento de ligações e a barreira de potencial energético. Partindo de um modelo inicial simples utilizando mecânica molecular para facilitar a otimização de geometria pode-se chegar a uma estrutura plausível tanto dos dois aminoácidos e ainda pode-se utilizar a modelagem para prever a barreira de potencial energético para o rompimento das ligações contendo enxofre.

A análise termogravimétrica é uma técnica utilizada para observar a variação da perda massa de uma substância em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada, permitindo determinar as faixas de temperatura onde ocorrem a degradação da amostra.

A espectroscopia vibracional no infravermelho e a ressonância magnética nuclear baseiam-se na absorção de radiação eletromagnética por átomos ou moléculas, enquanto a fluorescência de raios-x baseia-se nas transições eletrônicas entre níveis atômicos internos dos átomos que ocorrem ao incidir raios-x sobre a amostra. Com a utilização destas técnicas em conjunto é possível caracterizar as amostras de L-Cisteína e L-Cistina com maior precisão e prever o comportamento das ligações de enxofre nestes aminoácidos na presença diferentes formas de radiação eletromagnéticas.

O estudo das ligações do enxofre nestes aminoácidos é fundamental para compreender o envolvimento destas moléculas em sistemas biológicos. No presente trabalho serão caracterizadas as ligações enxofre-hidrogênio e enxofre-carbono no aminoácido L-Cisteína e das ligações enxofre-enxofre e enxofre-carbono no aminoácido L-Cistina na presença de radiação eletromagnética utilizando espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e fluorescência de raios-x; análise térmica das amostras utilizando termogravimetria e termogravimetria derivada; e determinação estrutural teórica dos aminoácidos utilizando como metodologia a mecânica molecular (MM+), incluindo o cálculo da energia potencial das ligações.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 QUÍMICA TEÓRICA	8
1.2 ANÁLISE TÉRMICA	11
1.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	12
1.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	13
1.4.1 A técnica do High Resolution - Magic Angle Spinning (MAS)	14
1.4.2 Cálculo do deslocamento químico teórico de ¹³C	15
1.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	15
2 OBJETIVOS	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 AMOSTRAGEM	19
3.1.1 L-Cisteína	19
3.1.2 L-Cistina	19
3.2 CÁLCULOS TEÓRICOS	19
3.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	19
3.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	20
3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	20
3.6 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 CÁLCULOS TEÓRICOS	21
4.1.1 Modelagem molecular	21
4.1.2 Energia Potencial das ligações	25
4.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	29
4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	33
4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C	37
4.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	41
5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As biomoléculas são as moléculas envolvidas com a formação e viabilidade da menor unidade viva: a célula [1, 2]. Estas moléculas, quando observadas individualmente, seguem todas as leis da física e química descritas para a matéria inanimada, porém conferem características especiais aos seres vivos quando elas passam a agir em conjunto com uma grande organização, como pode ser mostrado na figura 1.

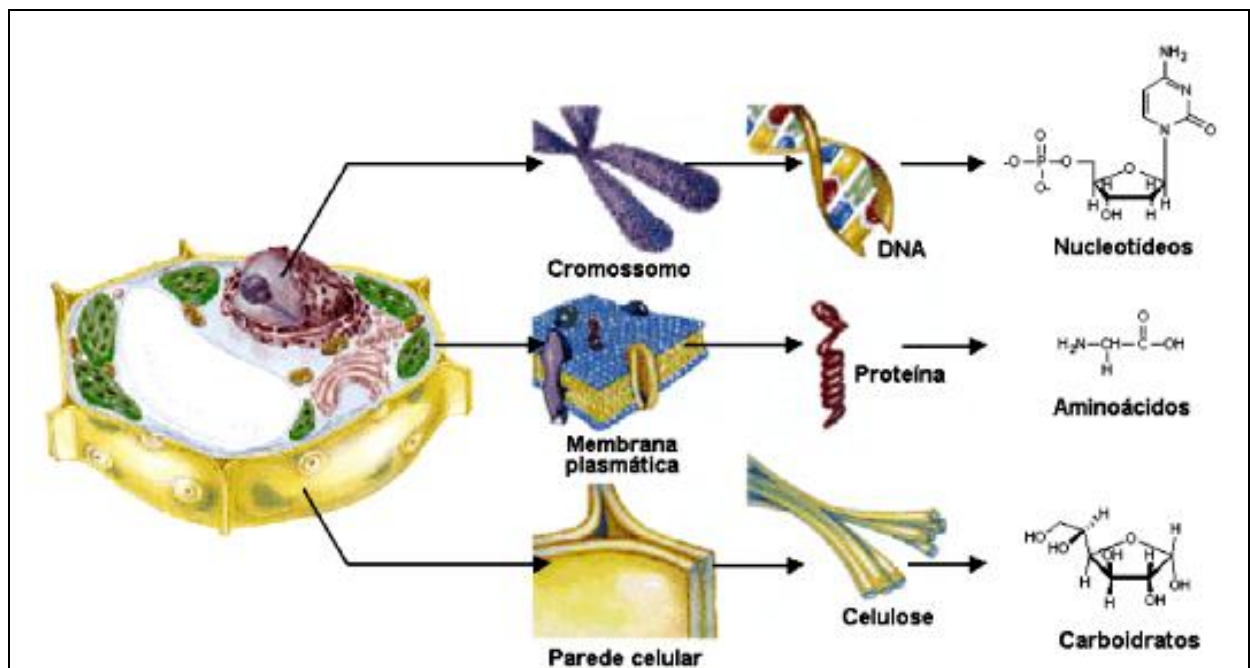


Figura 1 Hierarquia estrutural na organização molecular de uma célula vegetal.

As principais biomoléculas são os carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos. Estas, juntamente com outras moléculas regulatórias como vitaminas e minerais atuam nos mecanismos de geração de energia, síntese e divisão celular [3].

Os elementos principais que constituem as biomoléculas são o carbono, o hidrogênio, o oxigênio e o nitrogênio. Também estão presentes elementos menos abundantes tais como fósforo, enxofre. Os grupos funcionais básicos existentes nestas biomoléculas são álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, amidas.

Aspectos estruturais e funcionais são importantes para entendermos como estas estruturas estão envolvidas com os mecanismos de transformação ou

metabolismo, permitindo a adaptação da célula ao ambiente. Para isto é necessário fornecer tanto a energia necessária ao metabolismo, quanto matéria para formação, crescimento e reparação dessas moléculas e regular dos processos metabólicos para funcionamento das células, órgãos e aparelhos [4].

Os aminoácidos são unidades básicas das proteínas e estas, por sua vez, são constituintes importantes dos organismos. Por definição, um α -aminoácido é constituído de um grupamento amino, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um grupamento R característico de cada aminoácido, todos eles ligados à um átomo de carbono, denominado carbono α [5].

A atividade ótica dos aminoácidos deve-se ao arranjo tetraédrico dos quatro grupamentos diferentes ao redor do carbono α , permitindo que estas moléculas tenham duas formas especulares que podem ser diferenciadas pelo desvio que ocorre na luz quando estas amostras são submetidas a um feixe de luz polarizada. Quando o desvio do feixe de luz polarizada é para a direita as moléculas possuem denominação D (dextrogiro) enquanto as moléculas com desvio do feixe de luz polarizada para a esquerda são denominadas de isômeros L (levogiro) [6]. Somente os aminoácidos L constituem as proteínas, como é exemplificado na figura 2.

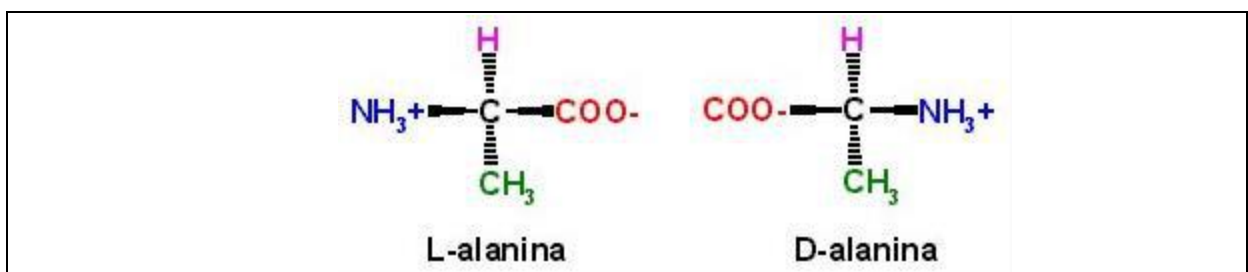


Figura 2 Diferenças espacial dos isômeros L-alanina e D-alanina.

Uma pequena quantidade de aminoácidos numa dieta equilibrada já é o suficiente para suprir as necessidades do organismo em suas mais diversas atividades. As necessidades de aminoácidos são geralmente muito específicas, visto suas limitações do organismo na capacidade de sintetizar essas moléculas.

A seguir serão descritas as principais características do aminoácido L-Cisteína e sua forma oxidada L-Cistina. O estudo das ligações do enxofre nestes aminoácidos é fundamental para compreender o envolvimento destas moléculas em sistemas biológicos.

A Cisteína é um dos aminoácidos codificados pelo código genético e é

principalmente encontrado em proteínas e no tripeptídeo glutationa [7]. É denominada aminoácido antioxidante, porque tem uma grande capacidade de inativar os radicais livres. É originária da Metionina, sendo necessária a presença do cofator piridoxina para que ocorra a conversão da Metionina em L-Cisteína. A Cisteína é fundamental para o desenvolvimento da pele e dos cabelos e é utilizada como suplemento alimentar [8]. É um aminoácido não-essencial de fórmula molecular $C_3H_7NO_2S$ e possui um grupo tiol na sua cadeia lateral, como pode ser visto na figura 3. Este grupo tiol tem caráter nucleofílico. A Cistina possui pK_A para a ionização do grupo $-SH$ da cadeia lateral igual a 8,18, ou seja, a sua atividade química pode ser regulada pelo ambiente em que se enquadra. [9]. Sua nomenclatura IUPAC é ácido 3-tiol-2-amino-propanóico.



Figura 3 Estruturas do aminoácido Cisteína. Legenda: Branco – hidrogênio; Azul claro – carbono; Amarelo – enxofre; Vermelho – Oxigênio; Azul escuro – Nitrogênio.

A Cistina exerce importante papel na estabilização da conformação proteica [10]. Assim como a Cisteína é um aminoácido não-essencial e o mais insolúvel dos aminoácidos, possuindo fórmula molecular $C_6H_{12}N_2O_4S_2$. É encontrada na queratina, em grandes concentrações e obtida a partir do cabelo humano, que contém aproximadamente 12% de L-Cistina [11]. A estrutura da L-Cistina pode ser observada na figura 4. Seu nome IUPAC é ácido 3,3'-ditio-bis-2-amino-propanóico.

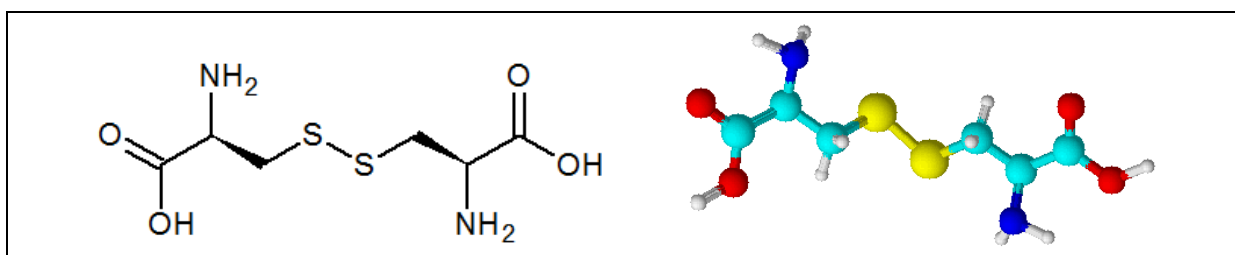


Figura 4 Estrutura da Cistina. Legenda: Branco – hidrogênio; Azul claro – carbono; Amarelo – enxofre; Vermelho – Oxigênio; Azul escuro – Nitrogênio.

A Cistina é um dímero obtido a partir da oxidação da Cisteína, quando ocorre

exposição da Cisteína ao ar e sob determinadas condições fisiológicas (incluindo no interior da proteína). A ligação entre 2 moléculas de Cisteína ocorre por uma ligação dissulfeto, como é ilustrado na figura 5. A reação de oxidação da Cisteína é reversível, com a Cistina podendo novamente ser reduzida [12].

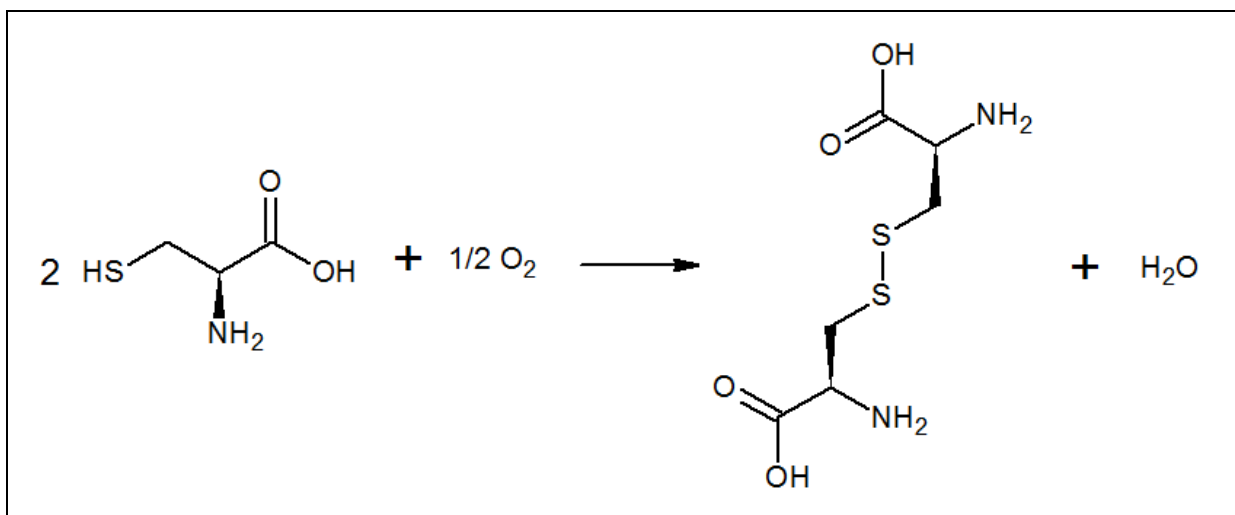


Figura 5 Reação de formação da Cistina.

1.1 QUÍMICA TEÓRICA

Com o aumento do desempenho tecnológico nas últimas décadas houve o crescimento do interesse na modelagem molecular utilizando recursos computacionais. Segundo a IUPAC, modelagem molecular é a investigação de estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias [13].

A base da modelagem molecular está em relacionar todas as propriedades moleculares importantes, ou seja, estabilidade, reatividade e propriedades eletrônicas com a estrutura molecular. Desta forma é possível desenvolver algoritmos capazes de calcular uma estrutura molecular com uma estereoquímica específica e correlacioná-la com as propriedades moleculares apresentadas pela substância.

Existem três principais categorias de cálculos teóricos: método de orbital molecular ab initio, método de orbital molecular semi-empírico e cálculos de campo de força empírico também conhecido como mecânica molecular. A mecânica molecular é um dos métodos que, principalmente por razões de simplicidade

computacional e eficiência, tem sido o mais utilizado para modelar estruturas moleculares e energias conformacionais na elucidação de problemas experimentais em química e bioquímica [14].

Dentro do amplo tópico de Química computacional iremos nos limitar apenas à Mecânica Molecular, que usa leis da física clássica para prever estruturas e suas propriedades moleculares. Na mecânica molecular, as moléculas são descritas como um conjunto de “átomos conectados”, ignorando os elétrons do sistema, calculando a energia do sistema como função das posições nucleares. O modelo da mecânica molecular é justificável porque os parâmetros associados a conjuntos de átomos permanecem razoavelmente constantes entre estruturas diferentes, desde que a hibridação dos átomos envolvidos sejam os mesmos. De fato, tabelas de distâncias e ângulos “normais” ou “naturais” de ligação, determinados experimentalmente, são facilmente encontradas na literatura de química. O que se faz no modelo da mecânica molecular é desenvolver o chamado campo de força, um conjunto de funções de energia que determinam penalidades energéticas para o afastamento da estrutura desses valores “normais” [15]. Vários outros termos precisam ser incluídos para uma descrição adequada da estrutura através deste modelo; os campos de força modernos têm dezenas de termos, incluindo termos que combinam duas ou mais funções (termos cruzados) e termos para interações eletrostáticas e de van der Waals entre átomos não ligados.

A maioria dos campos de força da modelagem molecular em uso hoje em dia para sistemas moleculares, GROMOS, AMBER, MM2/MM3/MM4, podem ser interpretados em termos de um simples conjunto de quatro componentes correspondentes às forças intra e intermoleculares dentro do sistema. Penalidades energéticas estão associadas ao desvio de ângulos e ligações de seus valores de referência ou de equilíbrio. Há uma função que descreve como a energia varia quando as ligações são giradas e, por fim, o campo de forças contém termos que descrevem a interação entre partes não ligadas do sistema. Campos de força mais sofisticados podem incluir termos adicionais, mas eles invariavelmente contêm estes quatro componentes. Uma característica atrativa desta representação é que os vários termos podem ser relacionados a variações em coordenadas internas específicas tais como comprimentos de ligações, rotação de ligações ou movimentos de átomos em relação a outros átomos. Isto torna mais fácil o entendimento de como variações nos parâmetros do campo de forças afetam sua performance e também ajudam no

processo de parametrização.

O termo de energia para o estiramento de ligações químicas na região próxima ao mínimo é o termo de maior interesse para a maioria dos estudos de modelagem molecular. Este termo reproduz o movimento vibracional entre pares de átomos. Ele é mostrado na equação 1 como uma simples função quadrática envolvendo a interação entre dois átomos ligados por meio de um potencial harmônico (lei de Hooke),

$$E = \frac{1}{2} \cdot \sum k_b \cdot (r - r_0)^2 \quad \text{Equação 1}$$

Onde k_b é a constante de força associada a uma “mola” que representa a ligação química entre dois átomos e r_0 é a distância padrão para essa ligação química; o somatório inclui todos os pares de átomos quimicamente ligados do sistema molecular.

A minimização de energia é um processo no qual através de um algoritmo matemático adequado busca-se reduzir em conjunto essas penalidades, ou seja, a energia, a um mínimo. Os algoritmos são capazes de calcular uma estrutura molecular com uma estereoquímica específica e correlacioná-la com as propriedades moleculares apresentadas pela substância. Dependendo da parametrização do campo de força, os resultados obtidos podem ser tão acurados quanto os melhores métodos quânticos [16]. O cálculo da energia potencial de ligações permite a criação de um gráfico de energia potencial em função do comprimento da ligação, como exemplificado na figura 6. Estes gráficos ilustram a energia onde ocorre repulsão das ligações, a energia de otimização e a energia de atração de van der Waals [17].

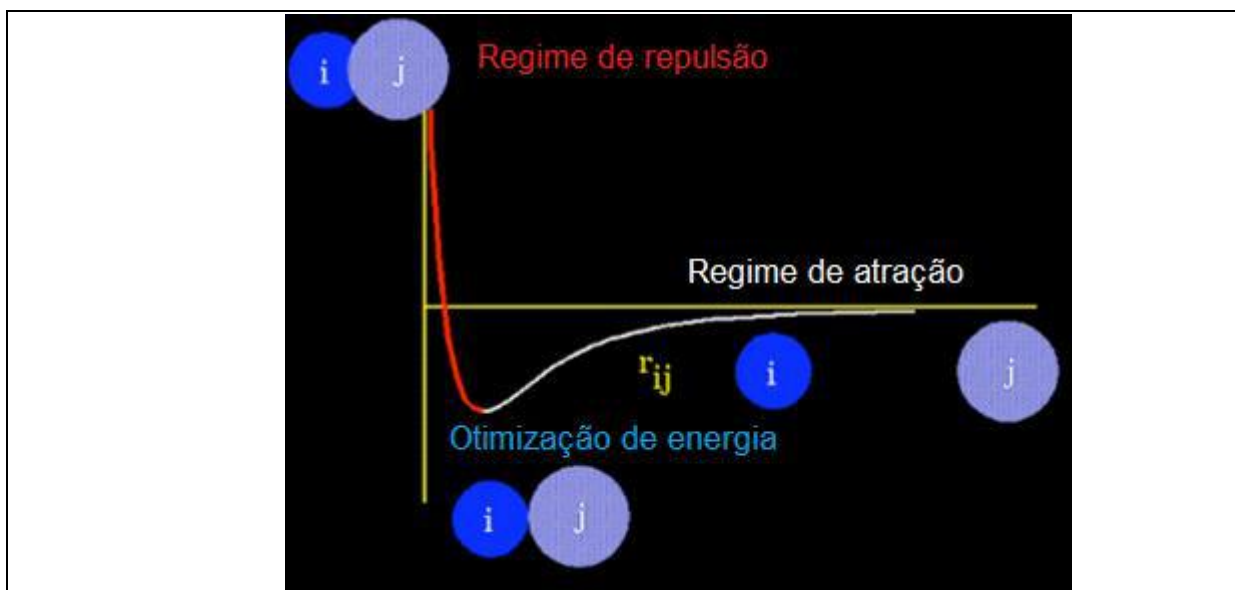


Figura 6 Gráfico de energia potencial em função do comprimento da ligação.

1.2 ANÁLISE TÉRMICA

As análises térmicas incluem um conjunto de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada [18].

O programa pode ser de aquecimento ou resfriamento, segundo incrementos de temperatura selecionados (experimento dinâmico) ou, ao contrário, a amostra pode ser mantida a uma determinada temperatura constante por um certo tempo (experimento estático-isotérmico). Adicionalmente, combinações desses experimentos podem ser utilizados. No presente trabalho serão utilizadas termogravimetria (TGA) e a termogravimetria derivada (DTG) como técnicas de análise térmica.

A termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. Estas mudanças de massa ocorrem devido à interação com a atmosfera, vaporização e decomposição [18]. Já a termogravimetria derivada é o arranjo matemático no qual a derivada da massa em função do tempo (dm/dt) é registrada em função da temperatura ou do tempo, ou seja, é a primeira derivada da termogravimetria.

Dentre as aplicações da TGA estão a corrosão de materiais em várias atmosferas, destilação e evaporação de líquidos, determinação da pressão de vapor e entalpia de vaporização de aditivos voláteis, determinação da umidade, volatilidade, e composição de cinzas, estudo da cinética das reações envolvendo espécies voláteis, estudo da desidratação e da higroscopicidade, identificação de polímeros novos, conhecidos e intermediários, propriedades magnéticas como temperatura Curie, suscetibilidade magnética e taxas de evaporação e sublimação.

1.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A absorção da radiação eletromagnética por átomos ou moléculas exige que os átomos ou moléculas possuam energia apropriada, e que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia. O mecanismo apropriado para a excitação vibracional é proporcionado pela variação periódica de dipolos elétricos na molécula durante as vibrações; a transferência de energia ocorre por interação destes dipolos oscilatórios da luz, radiação infravermelha, desde que a frequência com que ambos variam seja a mesma [19].

Moléculas diatômicas homonucleares não possuem momento de dipolo elétrico, qualquer que seja a respectiva energia vibracional. Apenas as moléculas diatômicas heteronucleares têm espectros de absorção vibracional (espectros no infravermelho). No caso de moléculas poliatômicas sem dipolo elétrico existem certas vibrações que produzem dipolos flutuantes [20]. Em regra, a excitação de vibrações de variação angular exige menor energia do que a de vibrações de estiramento [21].

O movimento dos átomos que constituem as moléculas resulta em rotações e vibrações moleculares. Então além das transições entre níveis eletrônicos, deve-se levar em consideração também as transições devido às rotações e vibrações. Porém, como as energias envolvidas nas diferentes formas de rotação são muito semelhantes, apenas as vibrações são geralmente consideradas [22].

Basicamente, as vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos: vibrações de deformação axial (*stretching*) – estiramento simétrico e assimétrico – e de deformação angular (*bending*), como pode ser visto na figura 7. As deformações axiais, ou estiramentos, são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, enquanto as deformações angulares envolvem variações dos ângulos entre as

ligações ou, como no modo de deformação assimétrica fora do plano, alterações do ângulo entre o plano que contém as ligações e um plano de referência. Além das frequências associadas às vibrações normais, outras frequências podem aparecer no espectro, como resultado das bandas de combinação e sobretons.

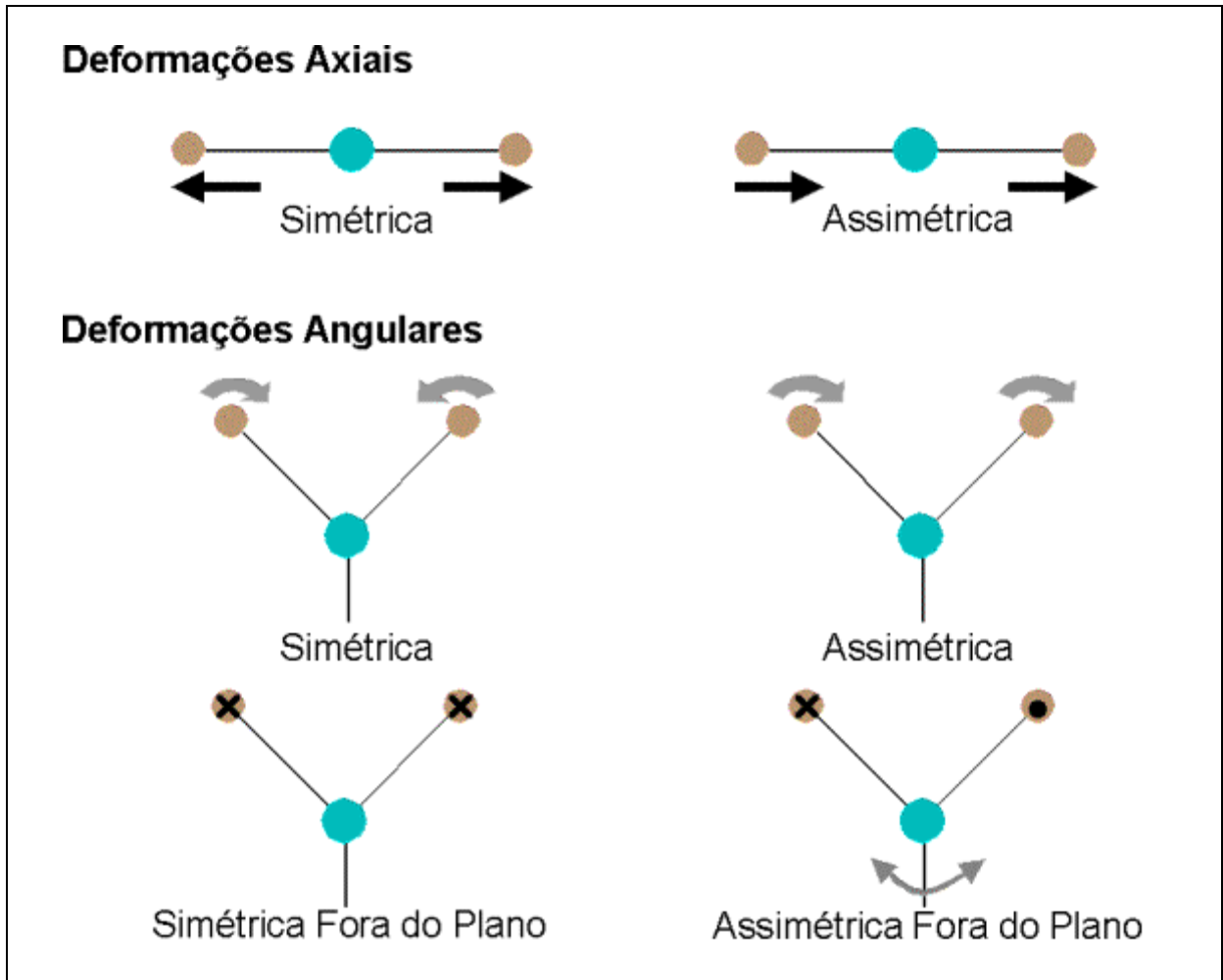


Figura 7 Modos de vibração molecular.

1.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Núcleos que possuem momentos magnéticos diferentes de zero podem se orientar em campos magnéticos e suas energias vão depender dessa orientação. Quando incide sobre a amostra radiação com comprimento de onda adequado, a orientação do núcleo pode mudar, passando de uma de menor energia para outra de energia mais elevada, sendo a diferença de energia igual à energia da radiação absorvida. Como exemplos de átomos com núcleos cujo momento magnético é

diferente de zero, temos: hidrogênio, deutério, ^{13}C , ^{14}N , ^{19}F , ^{31}P [23]. Dada a abundância com que átomos de hidrogênio aparecem nos seres vivos, o tipo de ressonância magnética nuclear mais utilizado é a ressonância magnética nuclear de prótons ou de hidrogênio. No presente trabalho utilizaremos ressonância magnética nuclear de ^{13}C [24].

Embora o ^{13}C corresponda a apenas 1,1% do carbono natural, o fato de o núcleo desse isótopo do carbono provocar um sinal de RMN tem grande importância para a análise de compostos orgânicos. O ^{12}C , principal isótopo do carbono, não tem spin magnético, e por isso não gera sinais de RMN. Devido ao fato do ^{13}C existir naturalmente em porcentagem tão baixa, os sinais de RMN gerados pelos seus núcleos não poderiam ser visualizados no espectro [25]. Porém, a técnica utilizada nos aparelhos de RMN ^{13}C consiste em irradiar um pulso curto e potente de radiofrequência, que excita todos os núcleos de ^{13}C existentes na amostra. Os dados são digitalizados automaticamente e guardados em computador e uma série de pulsos repetidos, que acumula os pulsos, construindo os sinais.

Um aspecto que simplifica bastante a interpretação do espectro de RMN ^{13}C é o fato de cada tipo de átomo de carbono produzir apenas um pico (singleto). Não há acoplamentos carbono-carbono que provoque o desdobramento do sinal em picos múltiplos. Embora não ocorram interações carbono-carbono, os núcleos dos hidrogênios ligados ao carbono podem interferir e desdobrar os sinais de ^{13}C em picos múltiplos. É possível, entretanto, eliminar os acoplamentos H-C por uma técnica que irradiação seletiva (técnica de desacoplamento). Eliminadas as interações próton-carbono, num espectro de RMN ^{13}C completamente desacoplado, cada tipo de carbono produz apenas um pico.

1.4.1 A Técnica do High Resolution - Magic Angle Spinning (MAS)

Nos espectros de RMN no estado sólido são observados os efeitos anisotrópicos ou dependência da orientação nas interações. Os espectros de RMN de alta resolução pode proporcionar o mesmo tipo de informação que está disponível a partir do correspondente espectro RMN de soluções, mas uma série de técnicas especiais/equipamentos são necessários, incluindo o ângulo mágico de giro (MAS), polarização cruzada, experimentos especiais em duas dimensões, aprimoramento eletrônico da sonda, etc [26]. Para que o método MAS seja bem sucedido, a amostra

deve ser girada com velocidade igual ou maior do que a largura de linha dipolar (que pode ser igual a muitos kHz de largura) [27].

1.4.2 Cálculo do deslocamento químico teórico de ^{13}C

O deslocamento químico teórico na ressonância magnética nuclear pode ser calculado utilizando a fórmula

$$\delta = -2,5 + \sum nA \quad \text{Equação 2}$$

Onde o deslocamento químico do ^{13}C do metano é igual a -2,5ppm, n é o número de átomos de carbono que causam os efeitos de substituição e A é o parâmetro de deslocamento aditivo, em ppm [28].

1.4 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Os raios-X podem ser definidos como radiações eletromagnéticas com comprimento de onda compreendido entre 10 e 0,1 nm. A radiação eletromagnética pode ser produzida de diversas formas: transições eletrônicas entre níveis atômicos internos dos átomos, desaceleração de elétrons de alta energia, decaimento radiativo e aceleração de elétrons em órbitas circulares com velocidades próximas à luz [29].

Os raios-X, ao incidirem sobre os átomos da amostra, ejetam os elétrons das camadas de valência mais próximas do núcleo. A vacância criada tende ser preenchida por elétrons das camadas mais externas imediatamente. O sistema rearranjado fica com excesso de energia e emite raios-X (fluorescentes ou secundários) para se estabilizar, como pode ser visto na figura 8. A energia dos raios-x emitidos corresponde à diferença entre as energias dos níveis e subníveis das transições eletrônicas envolvidas [30].

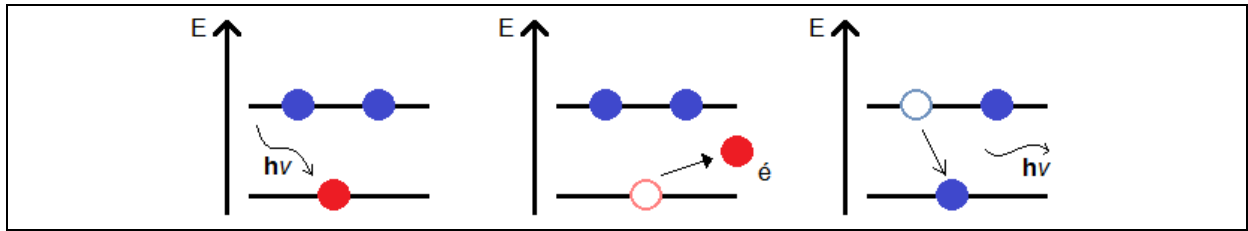


Figura 8 Esquema simplificado dos eventos que ocorrem na fluorescência de raios-x.

Os níveis eletrônicos são denominados K, L, M, N, sequencialmente a partir do núcleo. Uma vacância na camada (ou nível) K pode ser preenchida por elétrons de diferentes subníveis das camadas L ou M. Cada transição entre esses subníveis possui uma energia específica, portanto, possui uma denominação única. A vacância na camada K pode ser preenchida por elétrons de dois subníveis da camada L, o que origina raios-X com dois valores de energia: $K\alpha_1$ e $K\alpha_2$ [31, 32]. Elétrons da camada M também podem ocupar a vacância da camada K e tal transição dá origem a raios-X $K\beta$, como mostrado na figura 9.

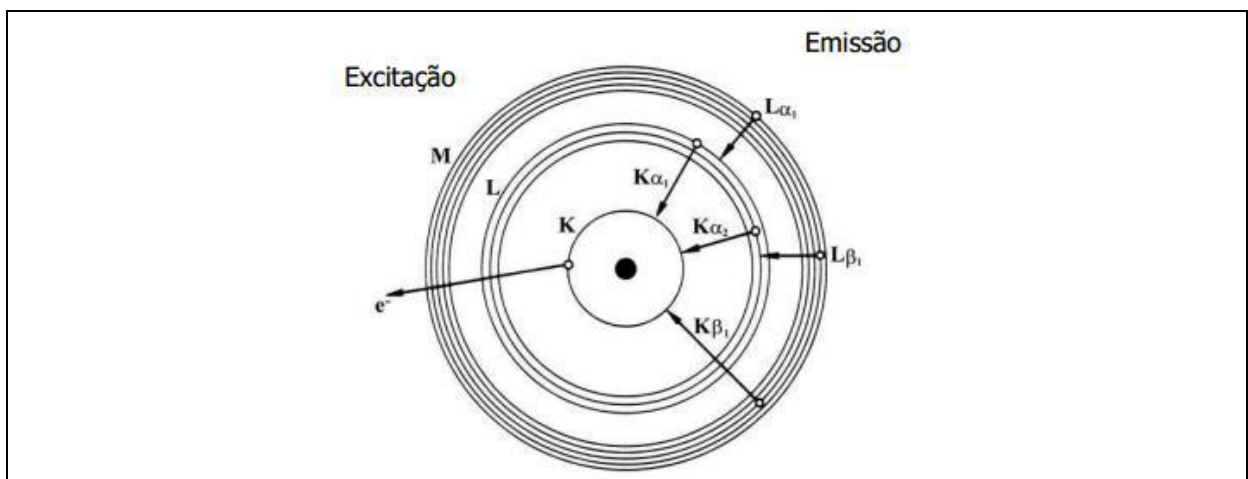


Figura 9 Excitação dos níveis eletrônicos internos, com a ejeção de um elétron da camada K e possibilidades de preenchimento da vacância com elétrons dos níveis mais externos, com a consequente emissão de raios X e a notação correspondente.

Não são todos os átomos que possuem sua camada interna ionizada que retornam ao estado fundamental emitindo raios-X. A energia também pode ser liberada através da emissão de um elétron. Este processo de relaxação compete com a fluorescência de raios e é conhecido como transição não radiativa ou efeito Auger, em que o elétron liberado é chamado de elétron Auger [33]. O processo é mostrado na figura 10.

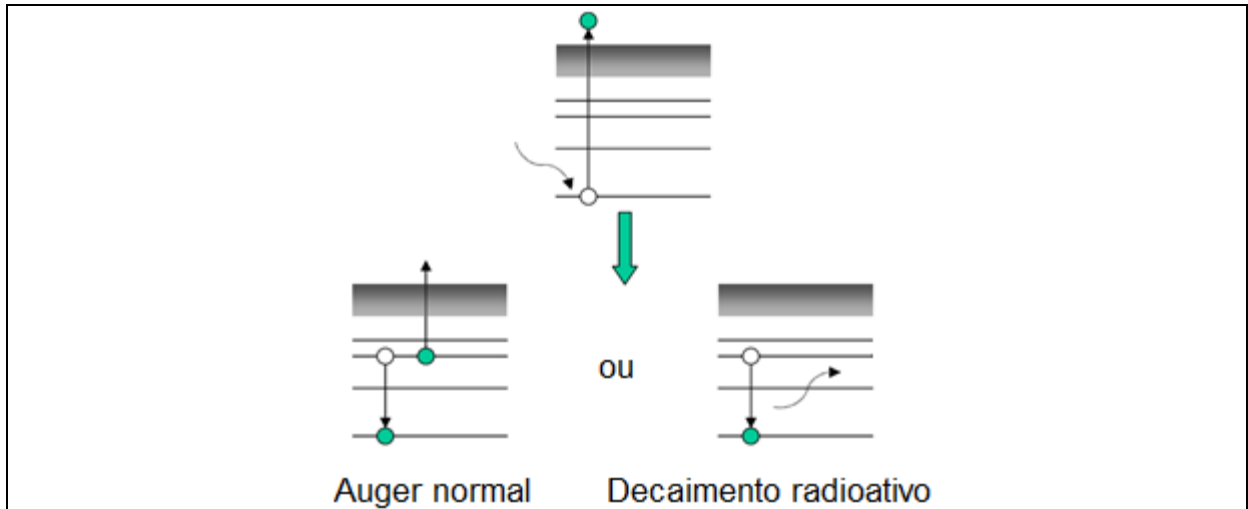


Figura 10 Um elétron Auger é emitido pelo excesso de energia quando um elétron externo cai para um nível de energia mais baixo.

A probabilidade de um processo não radiativo ocorrer em detrimento de um processo radiativo está relacionada com o número atômico do elemento. Para átomos mais pesados o processo radiativo é predominante. Já para átomos mais leves a probabilidade de ocorrer o efeito Auger é mais significativa, visto na figura 11.

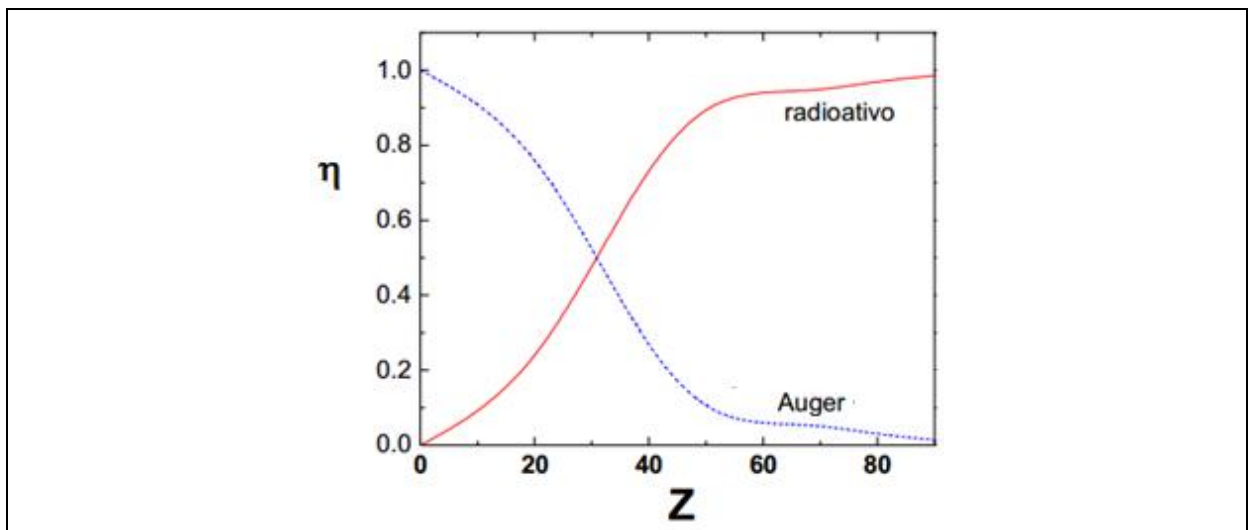


Figura 11 Eficiência quântica para a emissão de raios-X (decaimento radioativo) em função do número atômico.

2 OBJETIVOS

Estudar o comportamento das ligações enxofre-hidrogênio e enxofre-carbono no aminoácido L-Cisteína e das ligações enxofre-enxofre e enxofre-carbono no aminoácido L-Cistina na presença de radiação eletromagnética utilizando espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e fluorescência de raios-x; análise térmica das amostras utilizando termogravimetria e termogravimetria derivada; e determinação estrutural teórica dos aminoácidos utilizando como metodologia a mecânica molecular (MM+), incluindo o cálculo da energia potencial das ligações.

3 METODOLOGIA

Serão descritas as metodologias utilizadas na realização deste trabalho: Amostragem, técnicas espectroscópicas e cálculos teóricos.

7.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1 L-Cisteína

A amostra L-Cisteína (CAS 52-90-4) utilizada neste trabalho é da marca SIGMA-ALDRICH, fonte não-animal, testado em cultivo celular e lote 077K0043.

3.1.2 L-Cistina

A amostra de L-Cistina (CAS 56-89-3) utilizada neste trabalho é da marca SIGMA-ALDRICH, com lote 51908023.

3.2 CÁLCULOS TEÓRICOS

O programa utilizado foi o Hyperchem, que é um software de modelagem e simulação molecular que permite realizar complexos cálculos químicos. Dentro do Hyperchem, foram utilizados para a otimização de geometria a mecânica molecular.

O método de mecânica molecular utilizado foi o MM+. Esse método é o mais geral de cálculos de mecânica molecular desenvolvido principalmente para moléculas orgânicas. A energia da molécula antes da otimização foi calculada a partir da função single point energy. A otimização da geometria foi feita utilizando a função Geometry Optimization e usando o algoritmo de Polak-Ribière; Os gráficos de energia potencial foram obtidos a partir da função Potential Plot.

3.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A análise termogravimétrica dos compostos foi realizada no Laboratório de Análise Térmica no Polo de Xistoquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em um analisador Perkin-Elmer TGA 7, em atmosfera de nitrogênio, na faixa 20 a 800

°C de temperatura, utilizando taxa de aquecimento de 20 °C/min e sob vazão do gás de arraste igual a 20 mL·min⁻¹. Para o aminoácido L-Cisteína foram utilizados 8.240 mg de amostra, enquanto para o aminoácido L-Cistina foram utilizados 12.05 mg de amostra.

3.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros na região do infravermelho foram realizados no Laboratório de Instrumentos e Pesquisa, Departamento de Química Inorgânica, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e foram obtidos em pastilha de KBr, utilizando um espectrofotômetro Infravermelho com transformada de Fourier, modelo IR Affinity, marca SHIMADZU, em um intervalo entre 400 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, 32 scans e plotados utilizando o programa OriginPro 8.

3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear com ângulo mágico de giro de ¹³C unidimensionais no estado sólido foram realizados no Laboratório Multiusuário de RMN de Sólidos, Departamento de Química Orgânica, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III, operando a 9,4T. A frequência utilizada foi igual a 100,62 MHz e o experimento foi realizado com velocidade de giro igual a 10 KHz.

3.6 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Os espectros de fluorescência de raios-x foram obtidos em um espectrômetro Bruker Tiger S8. As amostras em estado sólido foram compactadas em uma fita dupla face de carbono e as análises foram feitas nas condições operacionais: colimador - 8 mm, atmosfera - svac, modo de aquisição – Best Detection e linha analítica - K α .

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Impacto de Fótons e Elétrons, Departamento de Físico-Química, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da modelagem molecular, análise termogravimétrica, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e fluorescência de raios-x para as ligações de enxofre do aminoácido L-Cisteína e a L-Cistina podem ser observados a seguir. Neste caso foram analisadas ligações enxofre-hidrogênio, enxofre-carbono e enxofre-enxofre destes aminoácidos.

4.1 CÁLCULOS TEÓRICOS

A determinação estrutural teórica dos aminoácidos L-Cisteína e a L-Cistina, assim como a análise da energia potencial das ligações enxofre-hidrogênio, enxofre-carbono e enxofre-enxofre serão detalhadas nos próximos tópicos.

4.1.1 Modelagem molecular

Na construção do modelo estrutural da Cisteína obteve single point energy igual a 2,087 kcal/mol com gradiente igual a 14,76. Após a otimização da estrutura obteve-se energia equivalente a -4,840 kcal/mol com gradiente igual a 0,010 e conversão completa. Para a determinação estrutural do aminoácido Cistina obteve-se single point energy igual a 1,817 kcal/mol com gradiente igual a 14,36. Na otimização da estrutura a energia foi igual a -16,84 kcal/mol com gradiente igual a 0,009 e conversão completa. A estrutura resultante dos cálculos é observada na figura 12 para a Cisteína e na figura 13 para a Cistina.

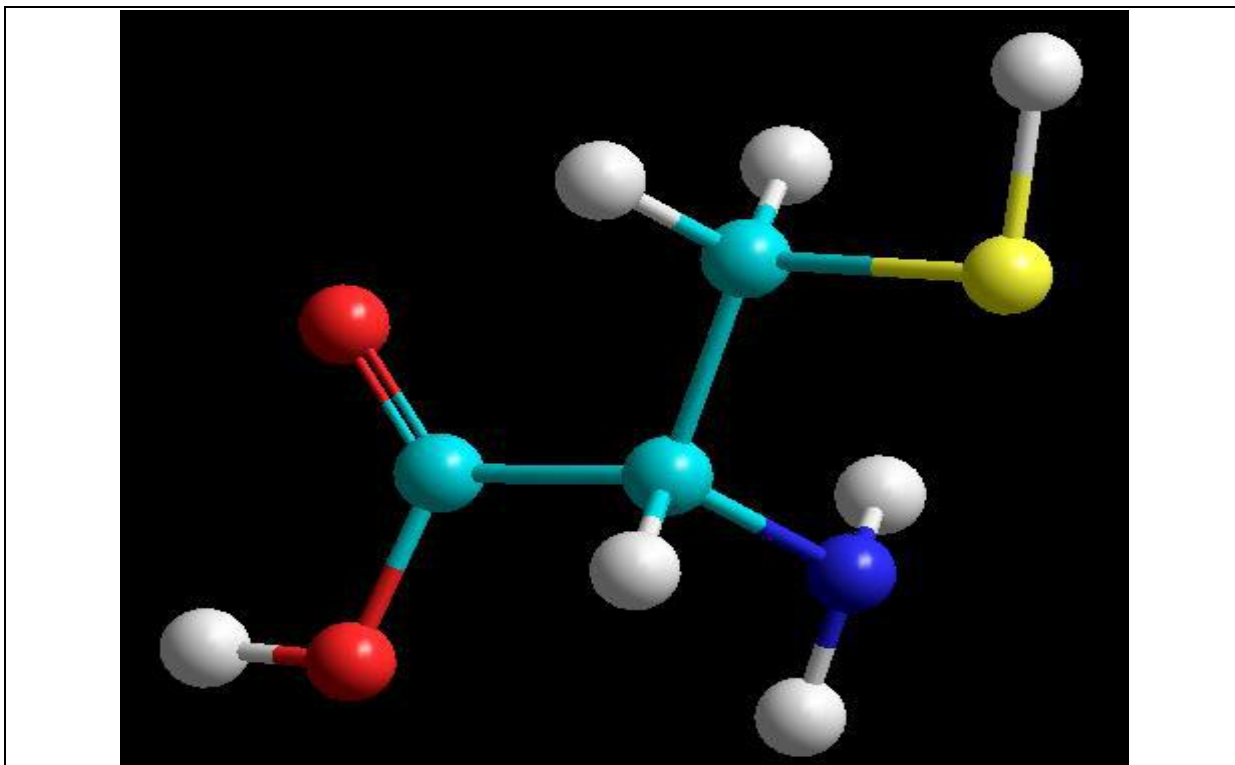


Figura 12 Estrutura calculada da L-Cisteína - Legenda: Branco - hidrogênio; Azul claro - carbono, Amarelo - enxofre; Vermelho - Oxigênio; Azul escuro – Nitrogênio.

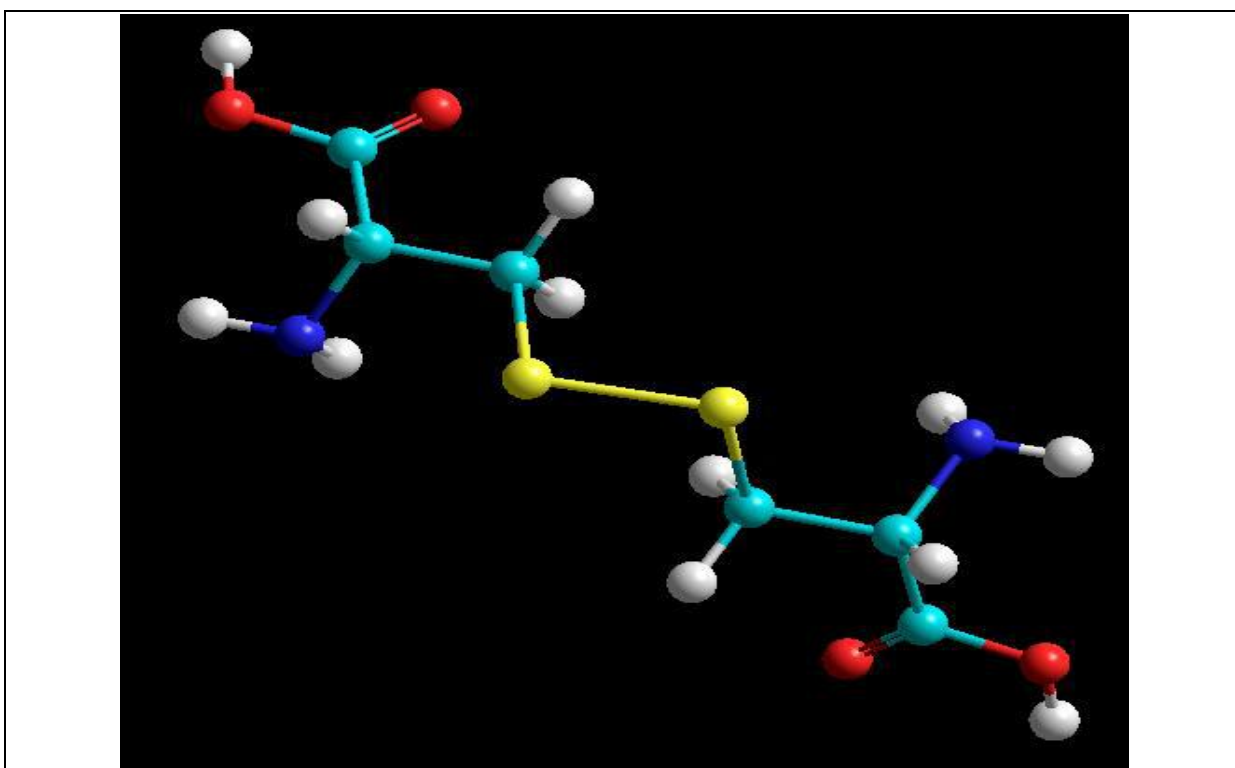


Figura 13 Estrutura calculada da Cistina - Legenda: Branco - hidrogênio; Azul claro - carbono, Amarelo - enxofre; Vermelho - Oxigênio; Azul escuro - Nitrogênio

Ao enumerarmos as estruturas calculadas tanto para a Cisteína quanto para a Cistina podemos obter o comprimento das ligações que compõem as moléculas. Para a Cisteína (figura 14) a ligação enxofre-carbono (1-2) foi igual a 1,829 Å enquanto o comprimento da ligação calculado para a ligação enxofre-hidrogênio (1-8) foi igual 1,346 Å, enquanto para a Cistina (figura 15), o comprimento das ligações enxofre-carbono (1-2 e 8-9) foram iguais a 1,826 Å enquanto o comprimento da ligação calculado para a ligação enxofre-enxofre (1-8) foi igual 2,028 Å.

Os comprimentos de ligação calculados para as ligações de enxofre da Cisteína e na Cistina estão de acordo com os valores encontrados na literatura [34]: ligação enxofre-hidrogênio igual a 1,34 Å e ligação enxofre-carbono igual a 1,82 Å e ligação enxofre-enxofre igual a 2,00 Å. A literatura nos mostra os valores típicos das ligações nas moléculas em fase gasosa e podem ser aproximados para moléculas mais simples, variando entre 1 e 2% com o resultado experimental.

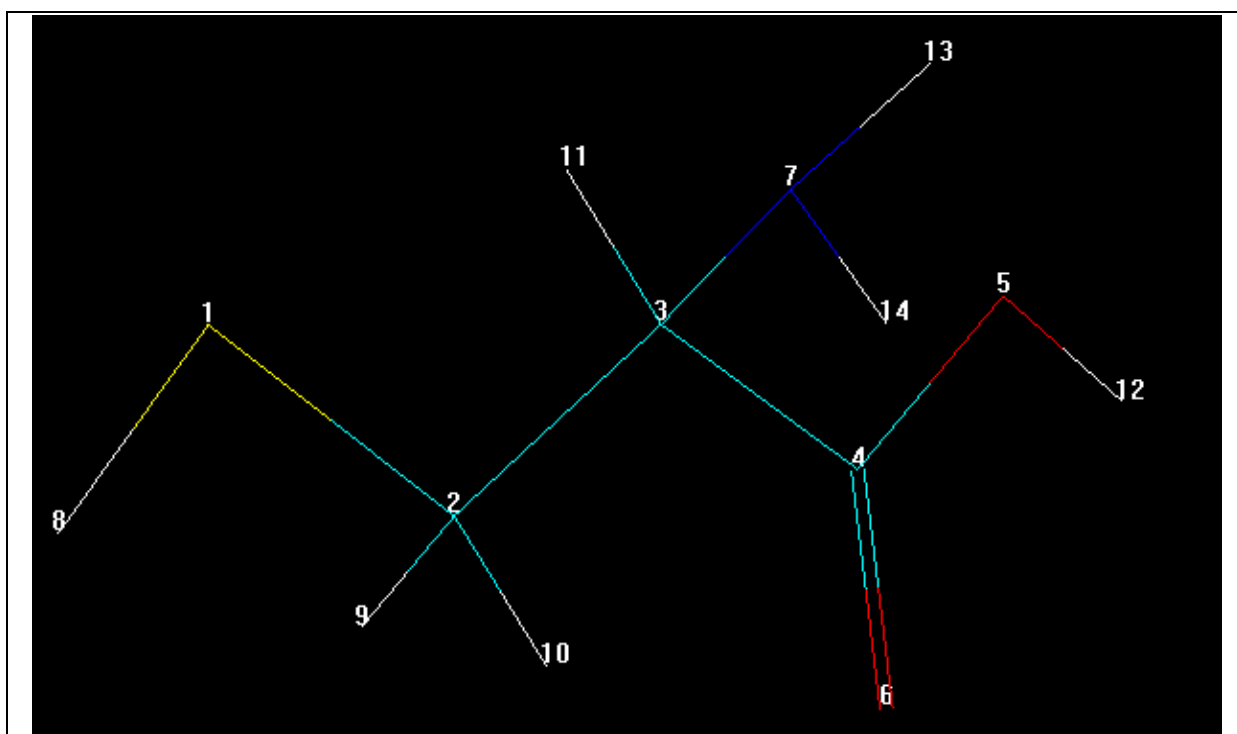


Figura 14 Estrutura calculada da Cisteína enumerada - Legenda: Branco - hidrogênio; Azul claro – carbono; Amarelo - enxofre; Vermelho - Oxigênio; Azul escuro – Nitrogênio.

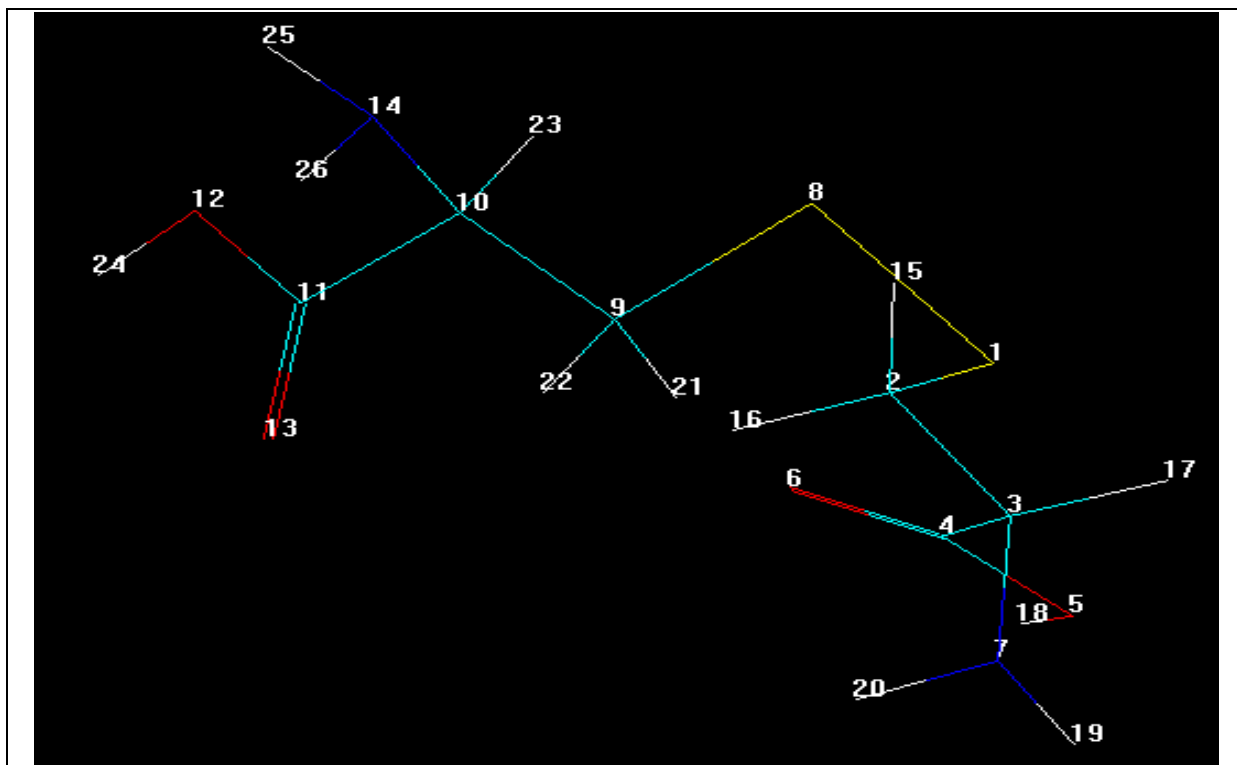


Figura 15 Estrutura calculada da Cistina - Legenda: Branco - hidrogênio; Azul claro - carbono, Amarelo - enxofre; Vermelho - Oxigênio; Azul escuro - Nitrogênio

Os resultados completos dos comprimentos de ligação dos átomos presentes na Cisteína e na Cistina podem ser vistos na tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 Comprimento das ligações interatômicas da Cisteína.

LIGAÇÃO	DISTÂNCIA INTERATÔMICA (Å)
1-2	1,829
1-8	1,346
2-3	1,539
2-9	1,115
2-10	1,115
3-4	1,516
3-7	1,440
3-11	1,116
4-5	1,333
4-6	1,206
5-12	0,9721
7-13	1,020
7-14	1,020

Tabela 2 Comprimento das ligações interatômicas da Cistina

LIGAÇÃO	DISTÂNCIA INTERATÔMICA (Å)
1-2	1,826
1-8	2,028
2-3	1,539
2-15	1,115
2-16	1,115
3-4	1,517
3-7	1,440
3-17	1,116
4-5	1,333
4-6	1,206
5-18	0,9720
7-19	1,020
7-20	1,020
8-9	1,826
9-10	1,539
9-21	1,115
9-22	1,115
10-11	1,516
10-14	1,440
10-23	1,116
11-12	1,333
11-13	1,206
12-24	0,9721
14-25	1,020
14-26	1,020

4.1.2 Energia Potencial das ligações

O gráfico de energia potencial para a ligação enxofre-hidrogênio (1-8) e para ligação enxofre-carbono (1-2) da Cisteína foram calculados com limite de 500 kcal/mol e com comprimento de ligação variando entre 0,846 Å e 5,846 Å, enquanto para as ligações enxofre-enxofre (1-8) e enxofre-carbono (1-2) da Cistina foram calculados com limite de 500 kcal/mol e com comprimento de ligação variando entre 0.846 e 6.846 Å. Os gráficos de energia potencial podem ser vistos nas figuras 16 a 19.

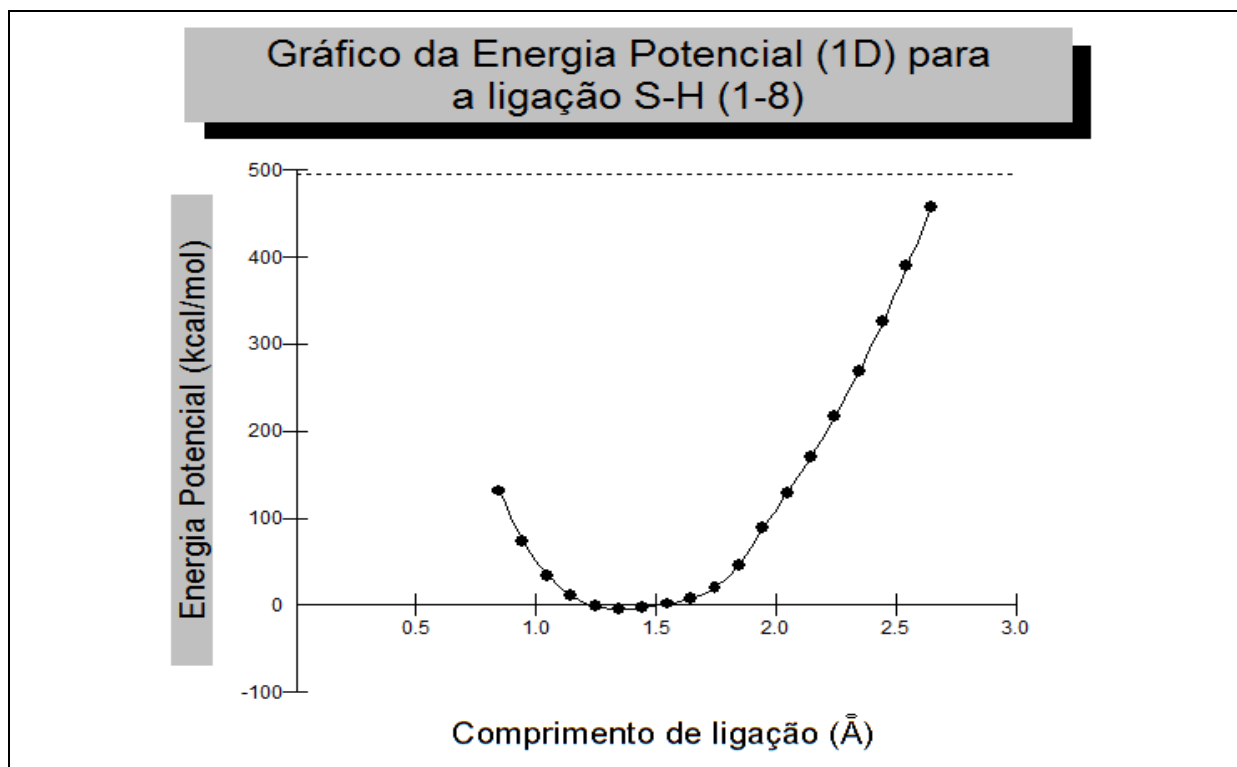


Figura 16 Energia potencial (kcal/mol) em função do comprimento de ligação (Å) na ligação S-H (1-8) da Cisteína.

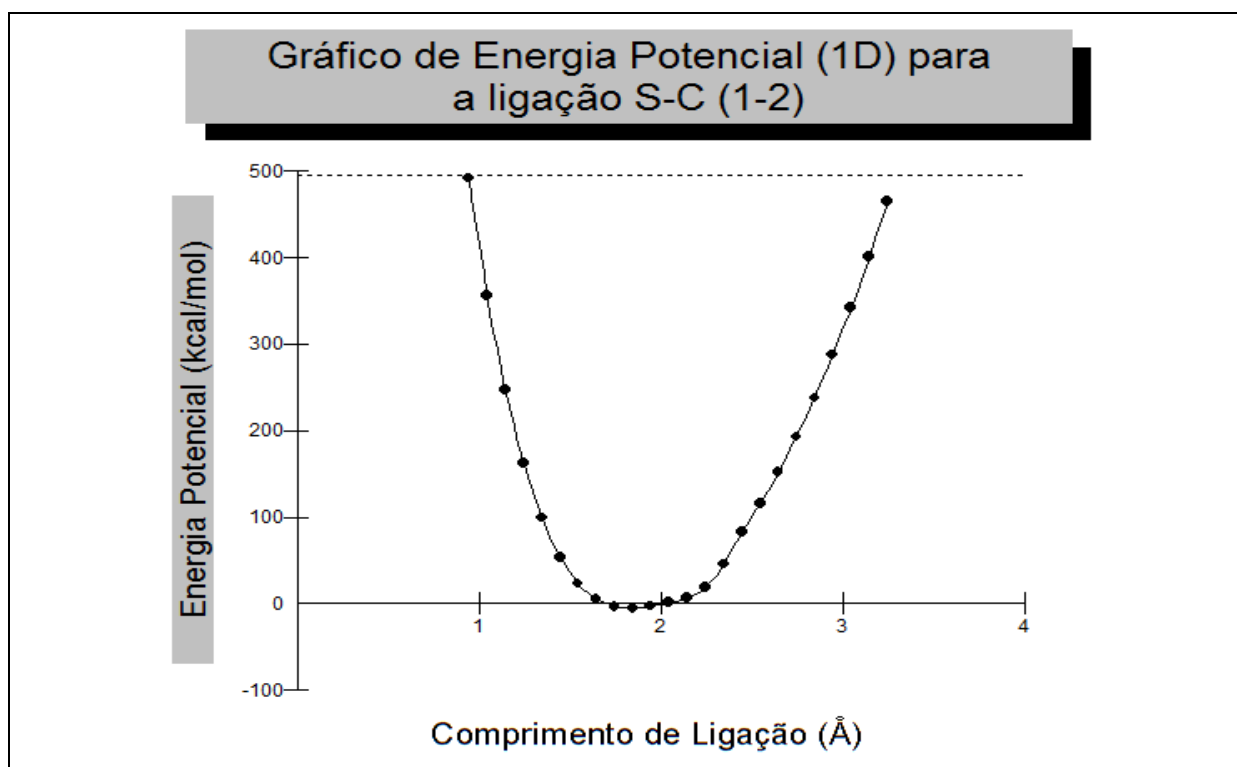


Figura 17 Energia potencial (kcal/mol) em função do comprimento de ligação (Å) na ligação S-C (1-2) da Cisteína.

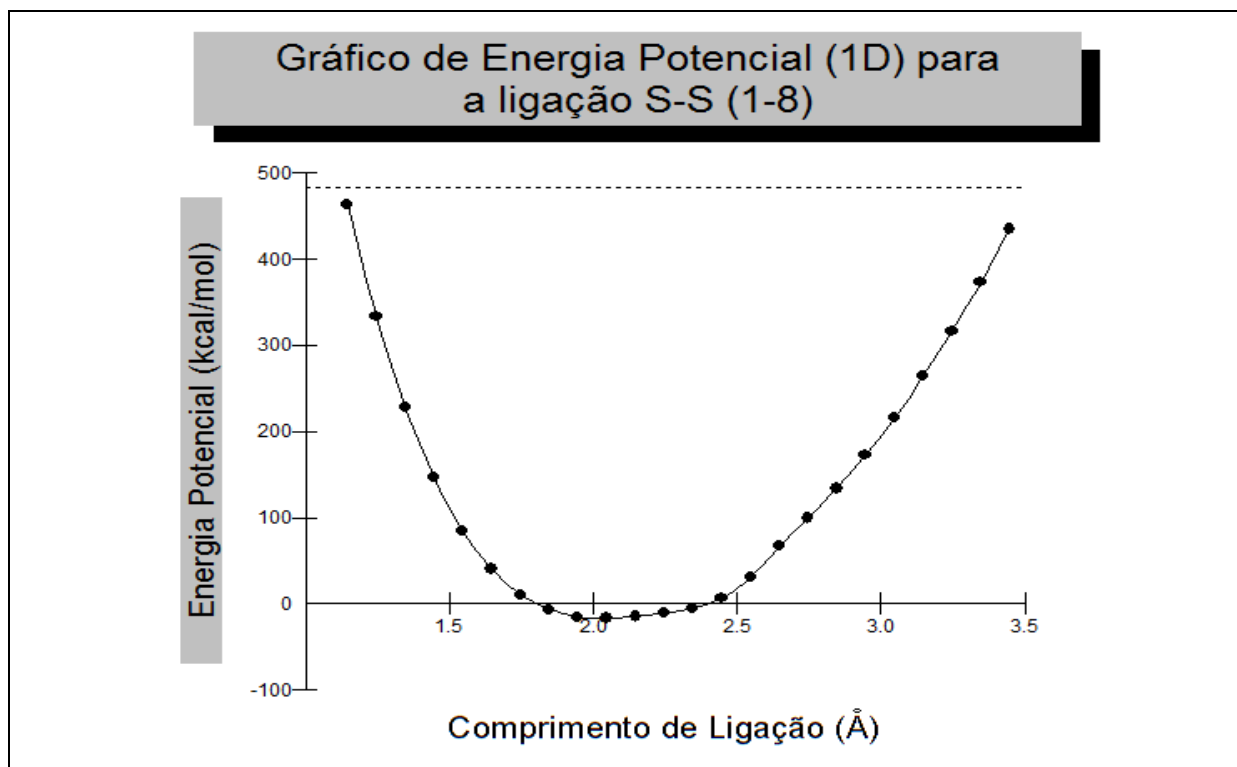


Figura 18 Energia potencial (kcal/mol) em função do comprimento de ligação (Å) na ligação S-S (1-8) da Cistina.

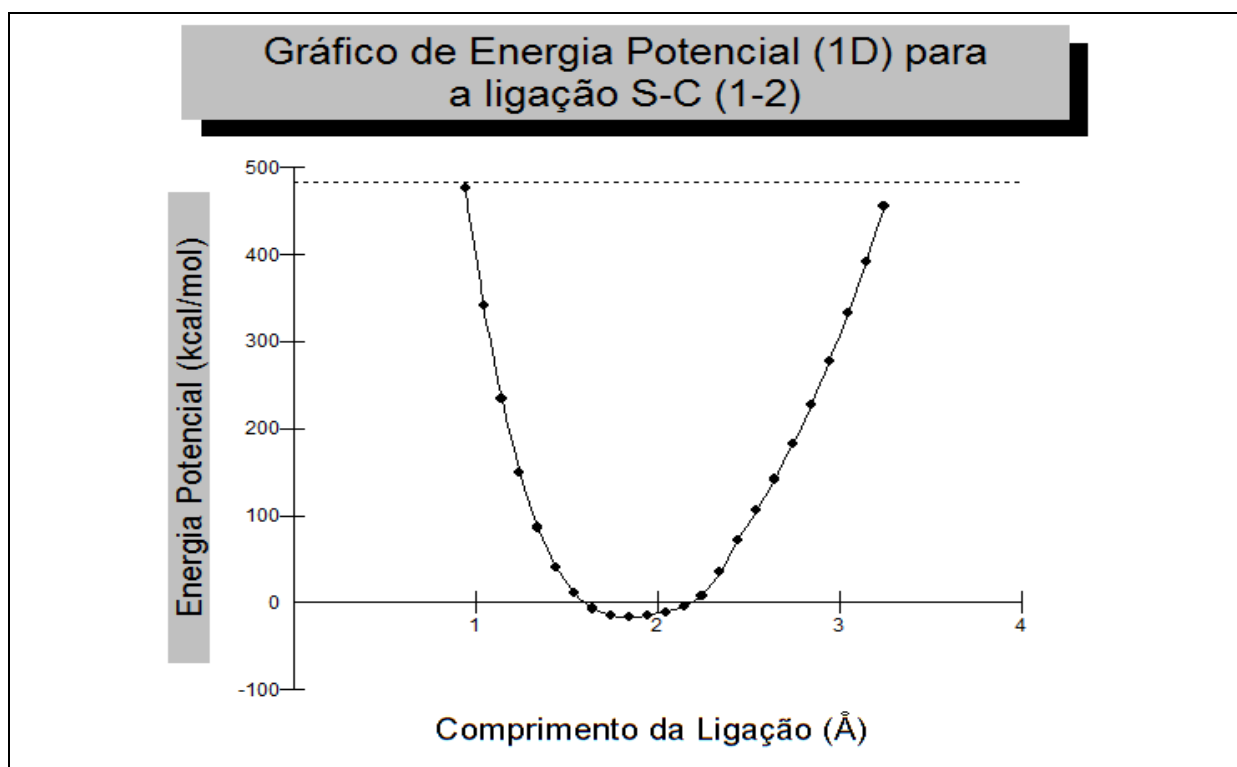


Figura 19 Energia potencial (kcal/mol) em função do comprimento de ligação (Å) na ligação S-C (1-2) da Cistina.

A partir da energia de dissociação das ligações obtidas na literatura [35, 36] e dos gráficos de energia potencial calculados, podemos interpolar graficamente valores de comprimento da ligação limites para que esta ligação se rompa. O resultado completo pode ser visto na tabela 3.

Tabela 3 Energia de dissociação e comprimento limite das ligações.

LIGAÇÃO	ENERGIA DE DISSOCIAÇÃO		COMPRIMENTO DA LIGAÇÃO (Å)
	KJ/mol	Kcal/mol	
S-H	353,57 ± 0,30	84,45	1,91
S-C	713,3 ± 1,2	170,4	2,7
S-S	425,30	101,6	2,8

Para a ligação S-H da Cisteína o valor da energia de dissociação é igual a 84,45 Kcal/mol, com o comprimento para que a ligação se rompa deve ser maior que 1,91 Å. A energia de dissociação da ligação S-S da Cistina é igual a 101,6 Kcal/mol, então a ligação S-S deve ser maior do que 2,8 Å para se romper. Tanto para a ligação C-S da Cisteína quanto a ligação C-S da Cistina a energia de dissociação é igual a 170,4 Kcal/mol, e comprimento da ligação limite é aproximadamente 2,7 Å.

As figuras a seguir (20 a 23) mostram a interpolação dos gráficos de energia potencial de acordo com as energias de dissociação definidas pela literatura a fim de obter o comprimento da ligação no qual ocorre rompimento desta ligação.

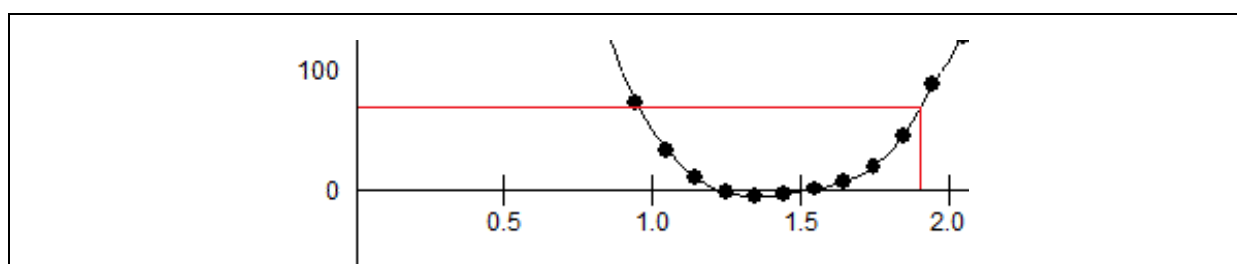


Figura 20 Determinação gráfica do comprimento da ligação S-H da Cisteína.

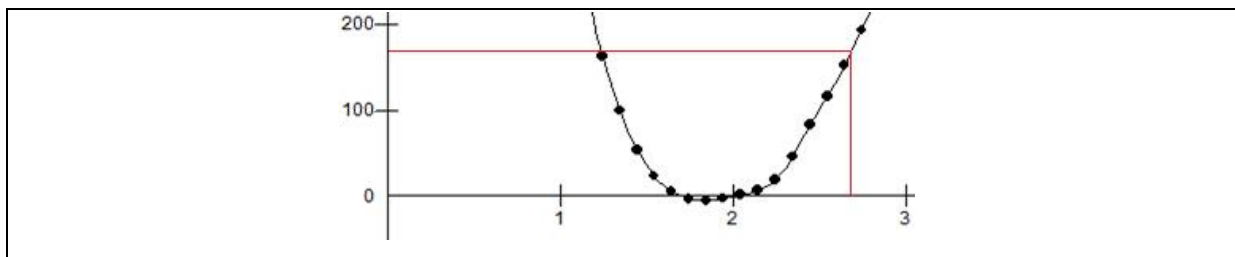


Figura 21 Determinação gráfica do comprimento da ligação C-S da Cisteína.

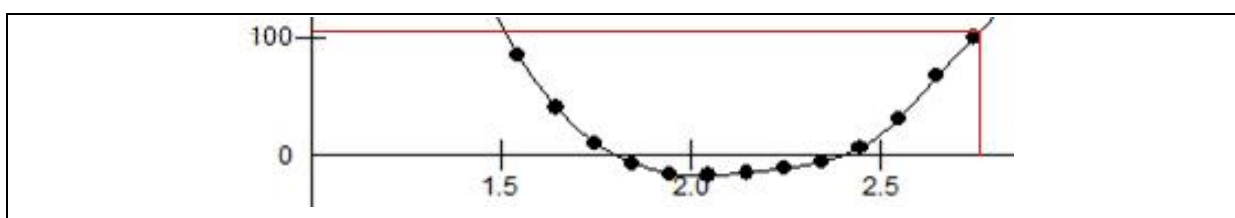


Figura 22 Determinação gráfica do comprimento da ligação S-S da Cistina.

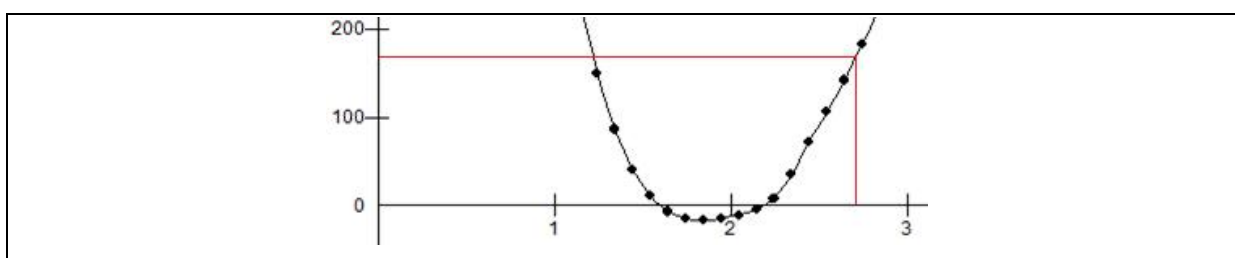


Figura 23 Determinação gráfica do comprimento da ligação C-S da Cistina.

4.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

O estudo da degradação térmica da Cisteína (massa molecular 121,154 g/mol) ocorreu em três etapas: Chamamos o intervalo compreendido (190 – 275) °C de etapa 1. Nesta etapa a curva da termogravimetria derivada é igual a 241,12 °C e ocorre a perda de massa molar igual a 105,194 g/mol, correspondente à eliminação de $C_3H_5O_2$ e enxofre. A segunda etapa possui temperatura compreendida entre (450 – 650) °C, a curva da termogravimetria derivada com temperatura igual 585,69 °C e perda de massa molar igual a 15,202 g/mol. Nesta etapa ocorre a perda de NH. A perda de massa na etapa 3 (temperatura acima de 800 °C) possui massa molar igual a 0,757 g/mol e indica a presença de impurezas. Na tabela 4 estão as propostas de fragmentação da Cisteína.

Tabela 4 Resultados da análise térmica da Cisteína.

ETAPA	ΔT (°C)	DTG (°C)	% PERDA	MASSA PERDIDA EXPERIMENTAL	FRAGMENTO
1	190 – 275	241,12	86,827	7,15mg	$C_3H_5O_2$, S
2	450 – 650	585,69	12,548	1,03mg	NH
3	800 –		0,625	0,05mg	Impurezas

O estudo da degradação térmica da Cistina (massa molecular 240,292 g/mol) ocorreu em duas etapas: Chamamos o intervalo compreendido (200 – 310) °C de etapa 1. Nesta etapa a curva da termogravimetria derivada é igual a 265,03 °C e ocorre a perda de massa molar igual a 222,811 g/mol, onde ocorre a eliminação de dois mols de $C_3H_5O_2$, um mol de NH e dois mols de enxofre. A segunda etapa possui temperatura acima de 800 °C possui massa molar igual a 17,481 g/mol e indica a presença de NH e impurezas. Na tabela 5 estão as propostas de fragmentação da Cistina.

Tabela 5 Resultados da análise térmica da Cistina.

ETAPA	ΔT (°C)	DTG (°C)	% PERDA	MASSA PERDIDA EXPERIMENTAL	FRAGMENTO
1	200 – 310	265,03	92,725	11,17	$2C_3H_5O_2$, 2S, NH
2	800 –		7,275	0,88	NH + Impurezas

A análise térmica destes aminoácidos nos mostra dois comportamentos diferentes para o enxofre ligados a estas moléculas: Para a Cisteína a faixa térmica de eliminação do enxofre varia entre (190 – 275) °C enquanto para o aminoácido Cistina a faixa de temperatura varia entre (200 – 310) °C. Os espectros experimentais da análise termogravimétrica e a termogravimetria derivada encontram-se nas figuras 24 e 25 para a Cisteína e a Cistina, respectivamente

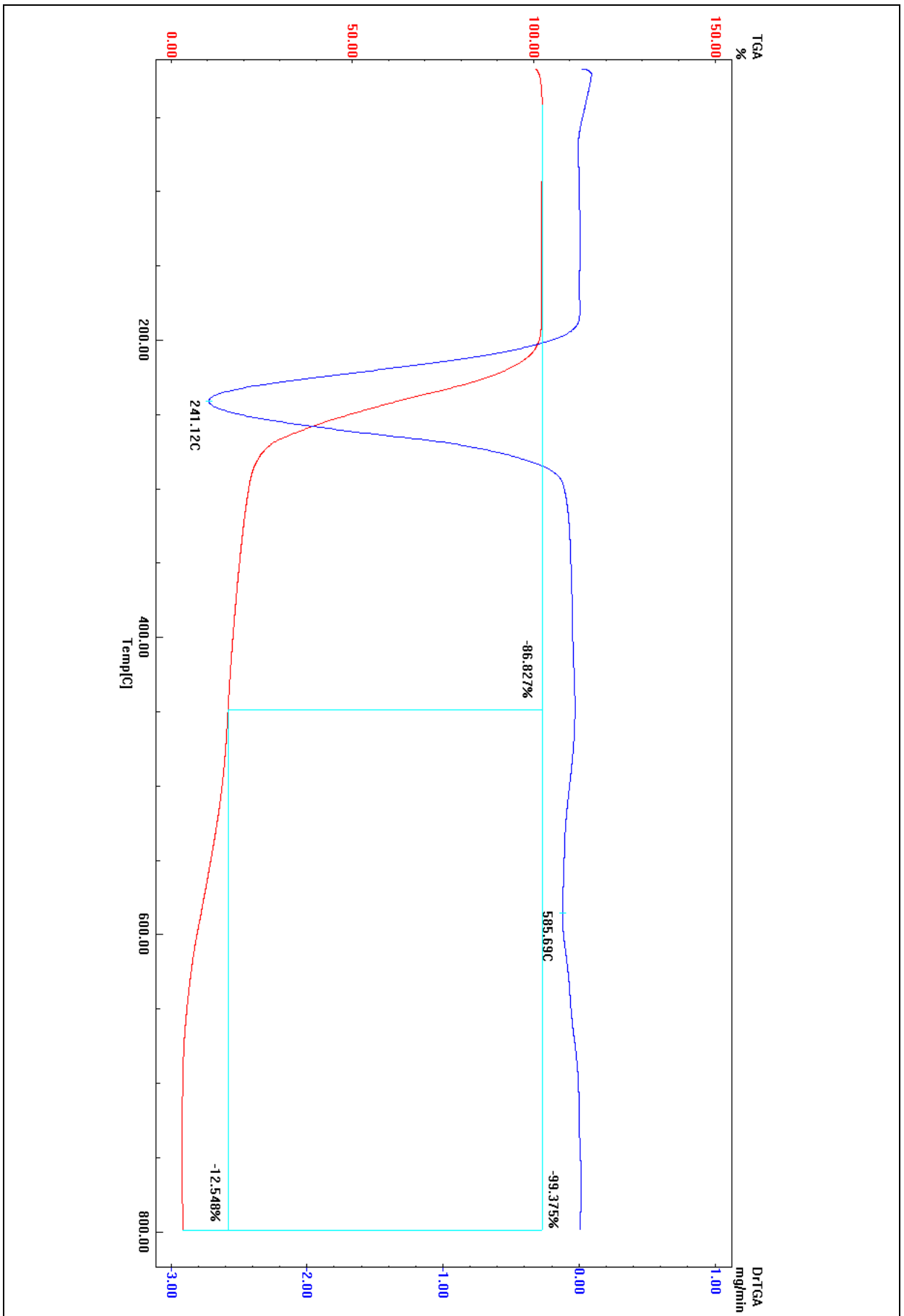


Figura 24 Espectro experimental de análise termogravimétrica da Cisteína.

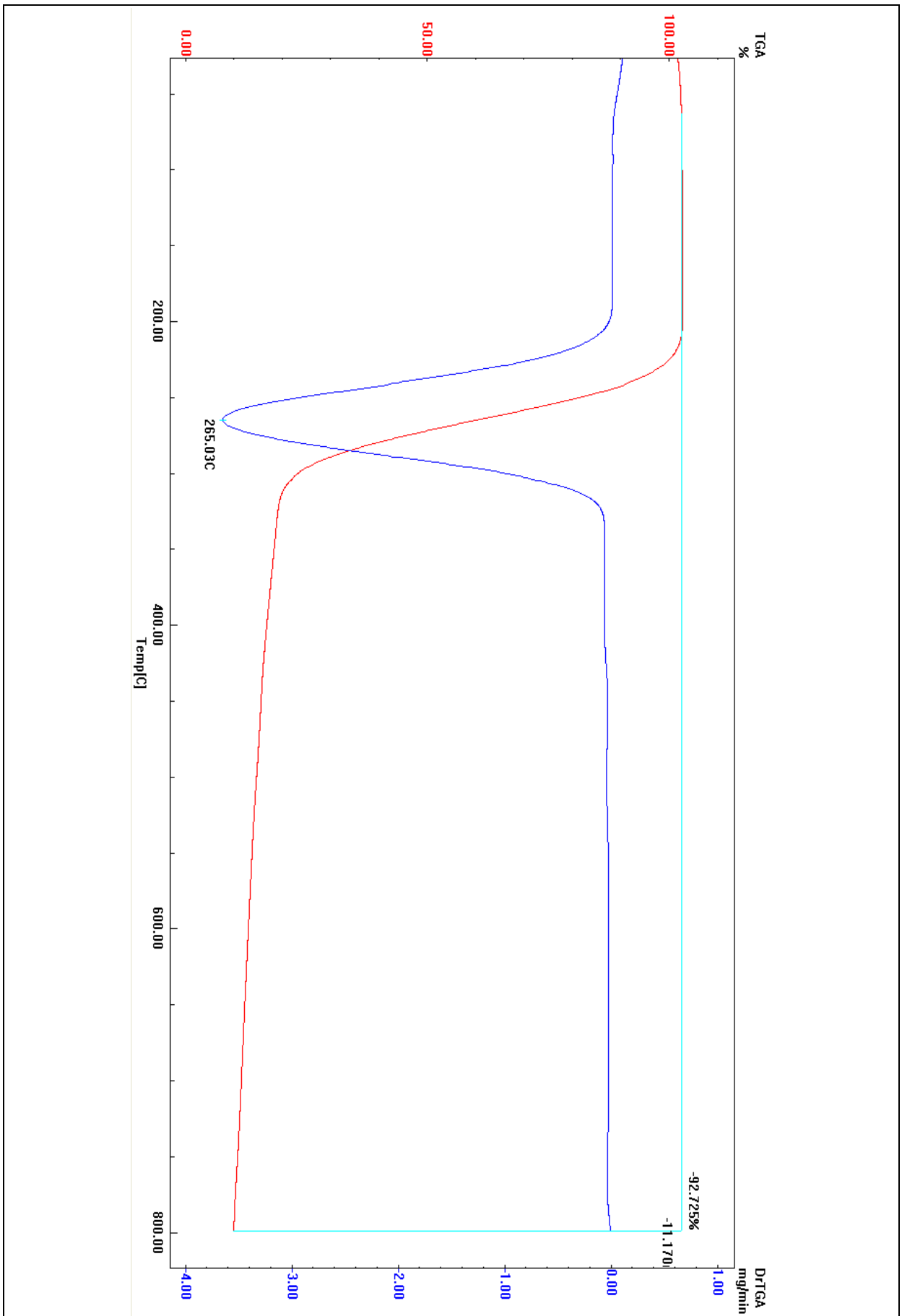


Figura 25 Espectro experimental de análise termogravimétrica da Cistina.

4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

As bandas de estiramento axial para ligações S-H estão compreendidas na região entre (2600-2550) cm^{-1} [8.5] Para a Cisteína os valores encontrados para $\nu(\text{S-H})$ foram 2594 cm^{-1} , 2552 cm^{-1} e 2507 cm^{-1} . Para a ligação S-C a literatura indica que as bandas de estiramento axial se encontram na região entre (700-600) cm^{-1} [37]. Para o $\nu(\text{C-S})$ o valor encontrado foi igual a 638 cm^{-1} . A análise espectroscópica vibracional das principais bandas no espectro no infravermelho pode ser encontrada na tabela 6.

Tabela 6 Principais bandas atribuídas utilizando espectroscopia de infravermelho da Cisteína.

FREQUÊNCIA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3179	$\nu(\text{O-H}), \nu(\text{N-H})$
2963	$\nu(\text{C-H})$
2594, 2552, 2507	$\nu(\text{S-H})$
1605, 1425	$\nu(\text{C=O})$
1547	$\delta(\text{N-H})$
1393	$\delta(\text{H-C-H})$
1348	$\delta(\text{C-N})$
1296, 1269	$\nu(\text{C-O})$
941	$\delta(\text{O-H})$
638	$\nu(\text{C-S})$

As bandas de estiramento axial para ligações S-S estão compreendidas na região entre (400-500) cm^{-1} [8.5]. Para a Cistina o valor encontrado para $\nu(\text{S-S})$ foi 453 cm^{-1} . Para a ligação S-C a literatura indica que as bandas de estiramento axial foram 673 cm^{-1} . A análise espectroscópica vibracional das principais bandas no espectro no infravermelho pode ser encontrada na tabela 7.

Tabela 7 Principais bandas atribuídas utilizando espectroscopia de infravermelho da Cistina

FREQUÊNCIA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3429, 3021	$\nu(\text{O-H})$
2972, 2916	$\nu(\text{C-H})$
1624, 1485	$\nu(\text{C=O})$
1585	$\delta(\text{N-H})$
1406, 1381	$\delta(\text{H-C-H})$
1335	$\delta(\text{C-N})$
1294	$\nu(\text{C-O})$
961	$\delta(\text{O-H})$
673	$\nu(\text{C-S})$
453	$\nu(\text{S-S})$

A literatura não indica o número de onda no qual ocorrem as deformações angulares das ligações de enxofre, sendo necessária uma atribuição comparativa entre valores teóricos e experimentais para obtermos um resultado quantitativo.

Para entendermos melhor as alterações que ocorreram na oxidação da Cisteína em Cistina, foi plotado um espectro comparativo, figura 26. Em preto temos o espectro da Cisteína, enquanto o espectro da Cistina está em vermelho. Percebe-se uma clara diminuição no espectro da Cistina, na região entre (2600 – 2550) cm^{-1} caracterizada pelas ligações de estiramento axial S-H, por conta da perda do hidrogênio na oxidação. Ocorre também a presença de um estiramento axial S-S.

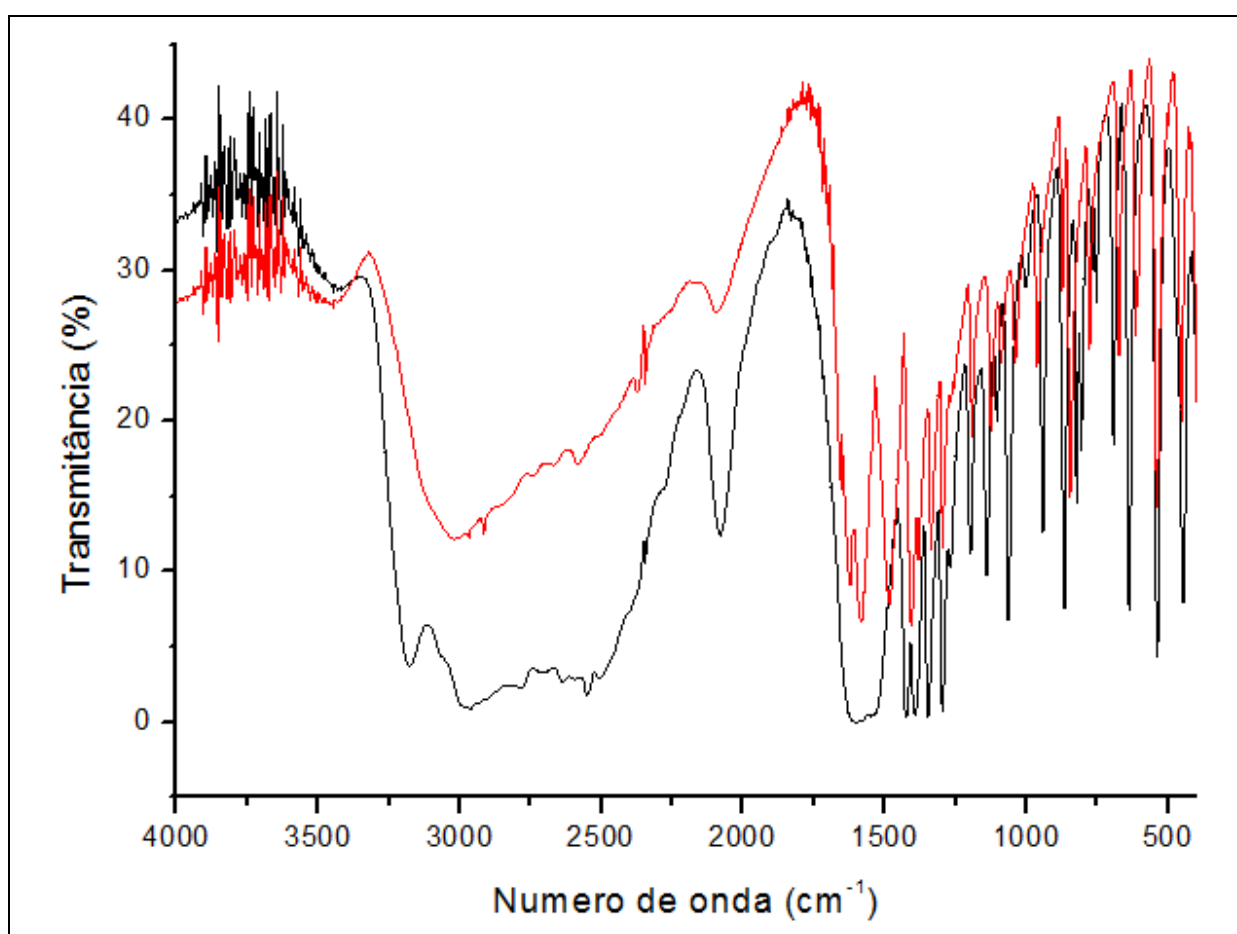


Figura 26 Espectros no infravermelho entre a Cisteína (preto) e a Cistina (vermelho).

Os espectros no infravermelho para a L-Cisteína e L-Cistina podem ser observados nas figuras 27 e 28, respectivamente.

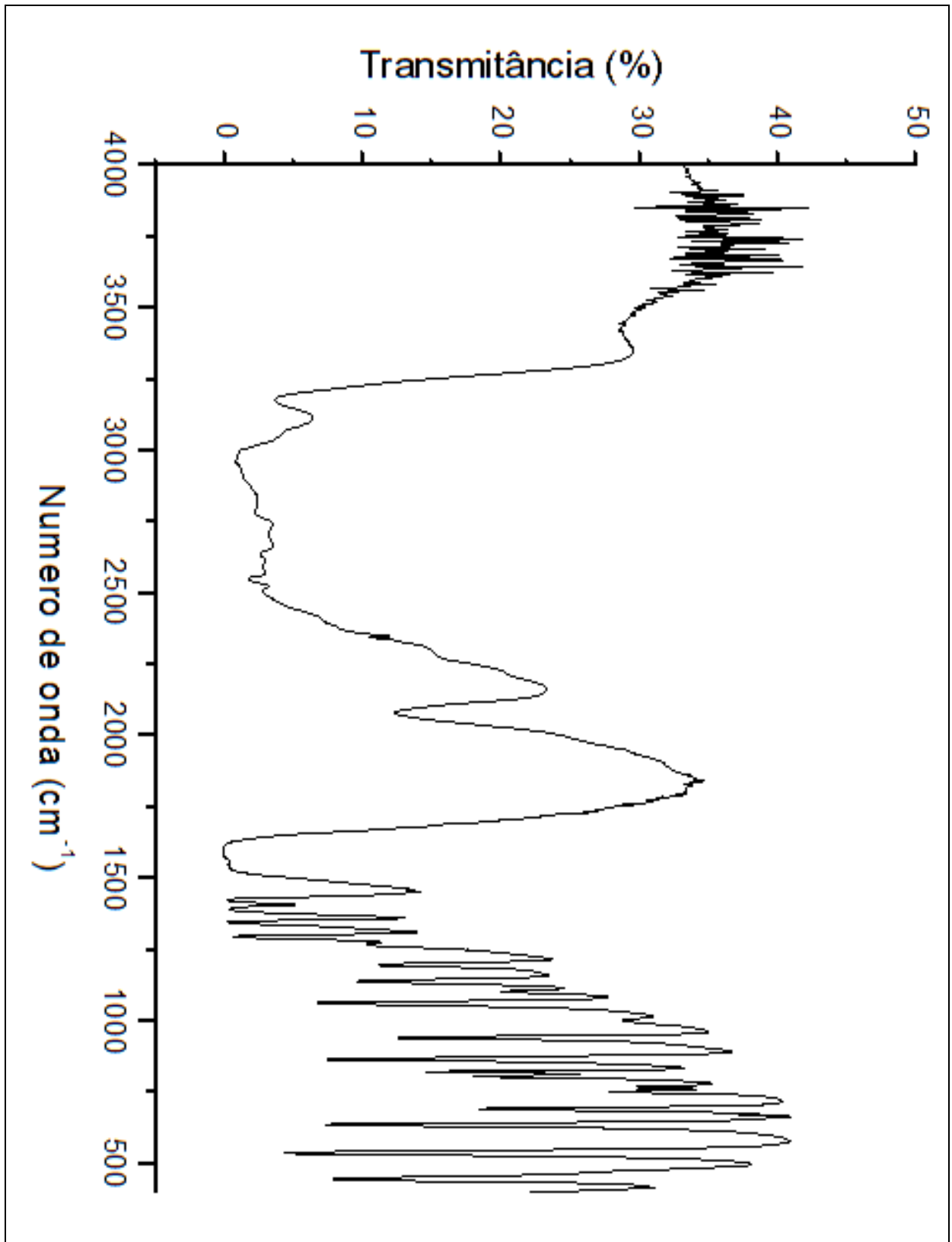


Figura 27 Espectro Infravermelho experimental do aminoácido L-Cisteína.

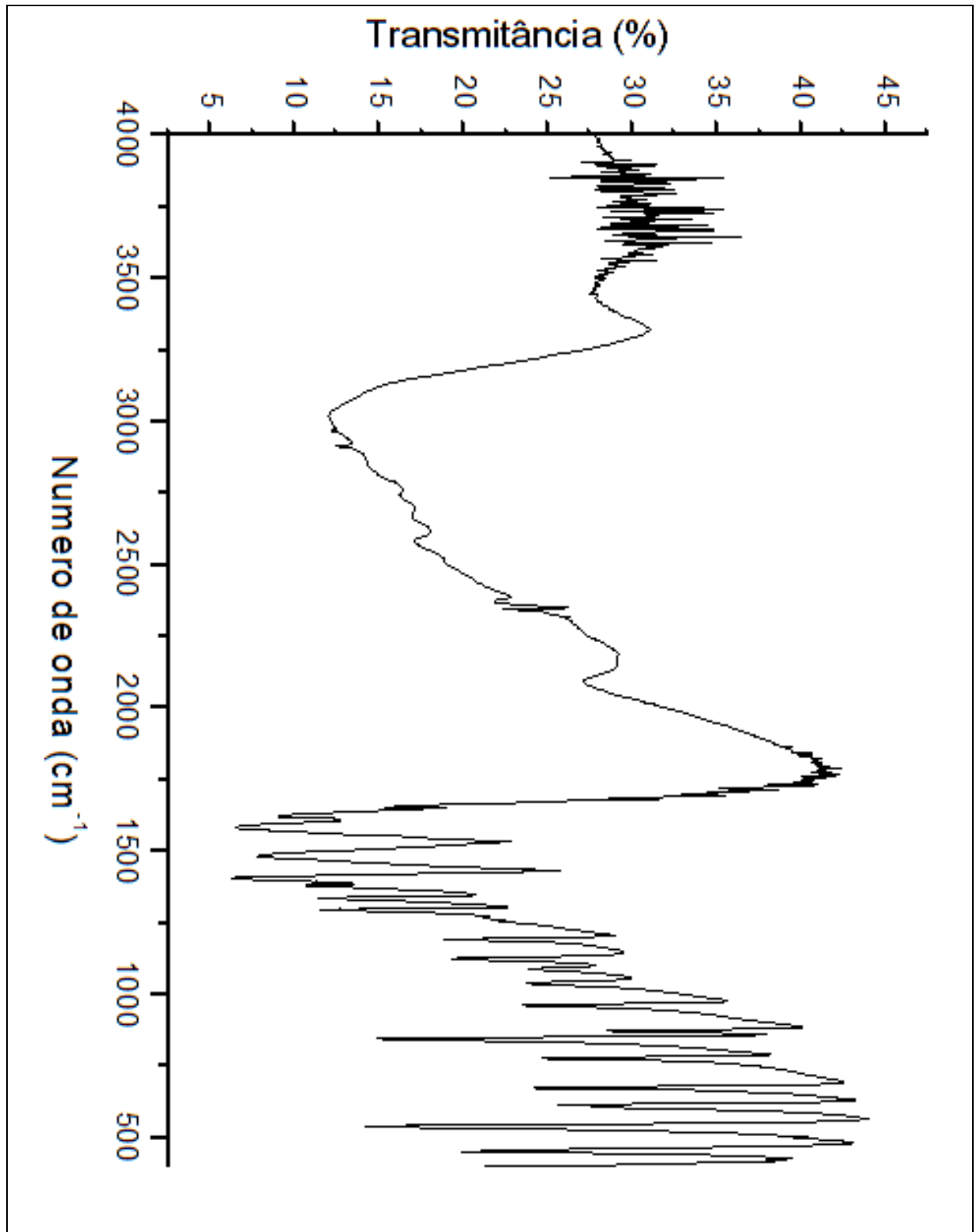


Figura 28 Espectro Infravermelho experimental do aminoácido L-Cistina.

4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C

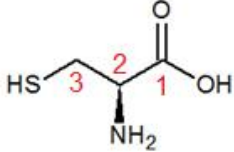
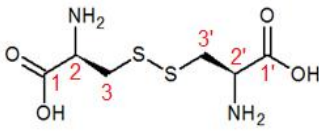
A ressonância magnética nuclear de ^{13}C experimental foi comparada ao resultado calculado na literatura [38]. Para o carbono 1 da L-Cisteína, com uma dupla ligação com o oxigênio e uma ligação simples com uma hidroxila, obteve-se deslocamento químico equivalente a 173,13 ppm, com erro percentual igual a 1,9 %. Os mesmos carbonos para a L-Cistina (carbonos 1 e 1') obtiveram deslocamento químico equivalente a 174,70 ppm, com erro percentual igual a 1,0 %. Para o carbono 2 da L-Cisteína, ligado à amina, o deslocamento químico experimental foi igual a 55,71 ppm, um erro percentual igual a 8,2 % em comparação com o valor calculado, enquanto para os carbonos 2 e 2' da L-Cistina o deslocamento químico experimental foi igual a 53,28 ppm, um erro percentual igual a 3,5 %.

Para o carbono 3 da L-Cisteína, ligado ao grupamento tiol, o deslocamento químico foi igual a 27,69 ppm, obtendo um erro percentual igual a 4,9 % em comparação com o valor calculado e para os carbonos 3 e 3' da L-Cistina, ligado ao grupamento S-S o deslocamento químico foi igual a 35,85 ppm e erro percentual igual a 5,1 %.

Como a eletronegatividade do enxofre é pequena, se comparada a eletronegatividade do oxigênio, por exemplo, é esperado que o deslocamento químico quando existe o grupamento tiol ligado ao carbono não seja muito alto, o que foi observado tanto calculado (26,4 ppm) quanto experimentalmente (27,69 ppm) para a Cisteína (carbono 3). Também ocorre um aumento do deslocamento químico experimental para os carbonos 3 e 3' da Cistina esperado pela literatura (experimentalmente: 34,85 ppm; calculado: 34,1 ppm) por conta da presença da ligação S-S.

O resultado completo da análise espectroscópica do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C pode ser observado na tabela 8.

Tabela 8 Deslocamentos químicos dos carbonos nas moléculas de Cisteína e Cistina.

COMPOSTO	CARBONO	DESLOCAMENTO QUÍMICO (ppm)		ERRO
		EXPERIMENTAL	CALCULADO	
	1	173,13	176,5	1,9 %
	2	55,71	51,5	8,2 %
	3	27,69	26,4	4,9 %
	1, 1'	174,70	176,5	1,0 %
	2, 2'	53,28	51,5	3,5 %
	3, 3'	34,85	34,1	5,1 %

Os espectros experimentais da ressonância magnética de ^{13}C para as moléculas de L-Cisteína e L-Cistina encontram-se, respectivamente, nas figuras 29 e 30.

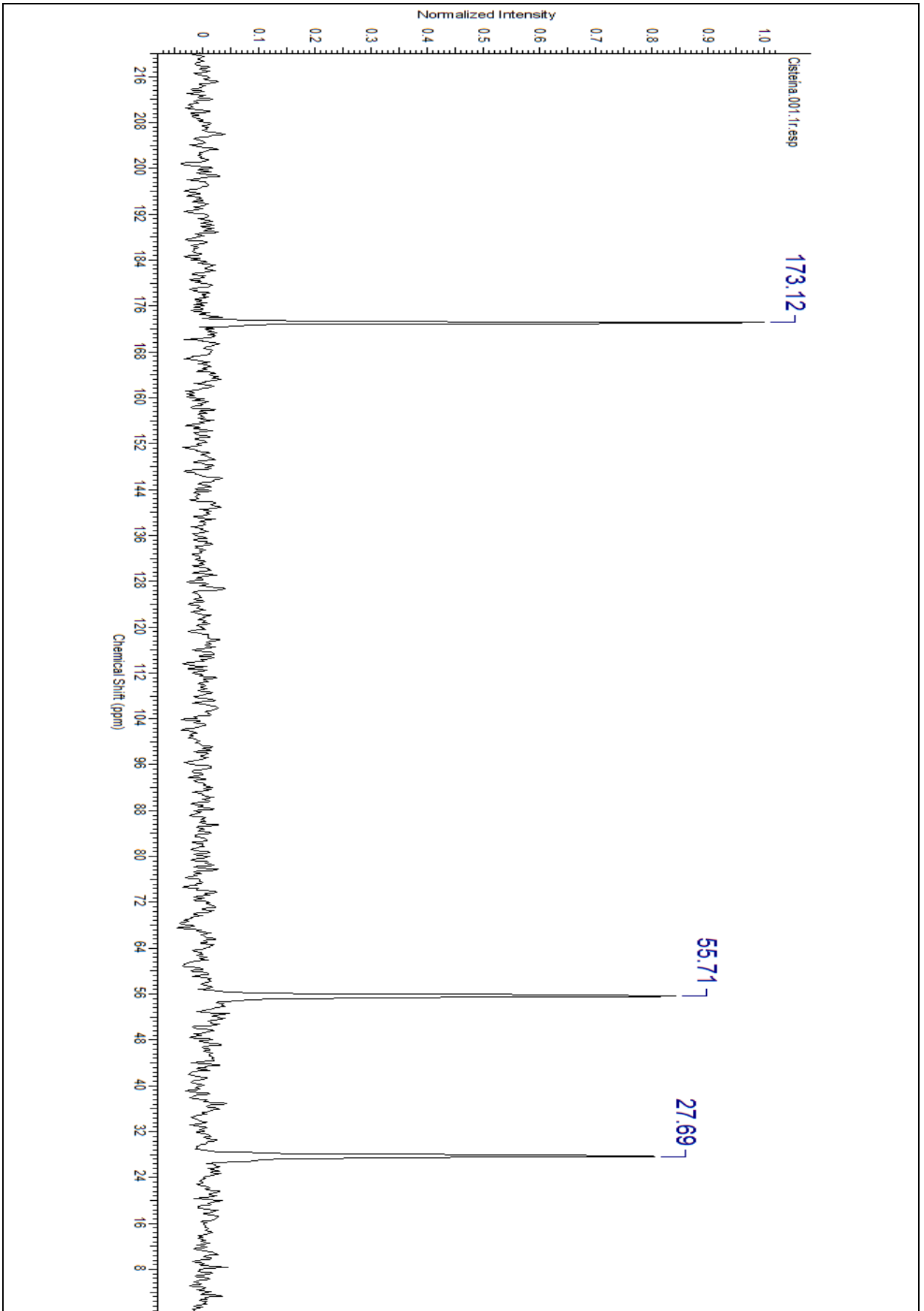


Figura 29 Espectro RMN ^{13}C experimental do aminoácido L-Cisteína.

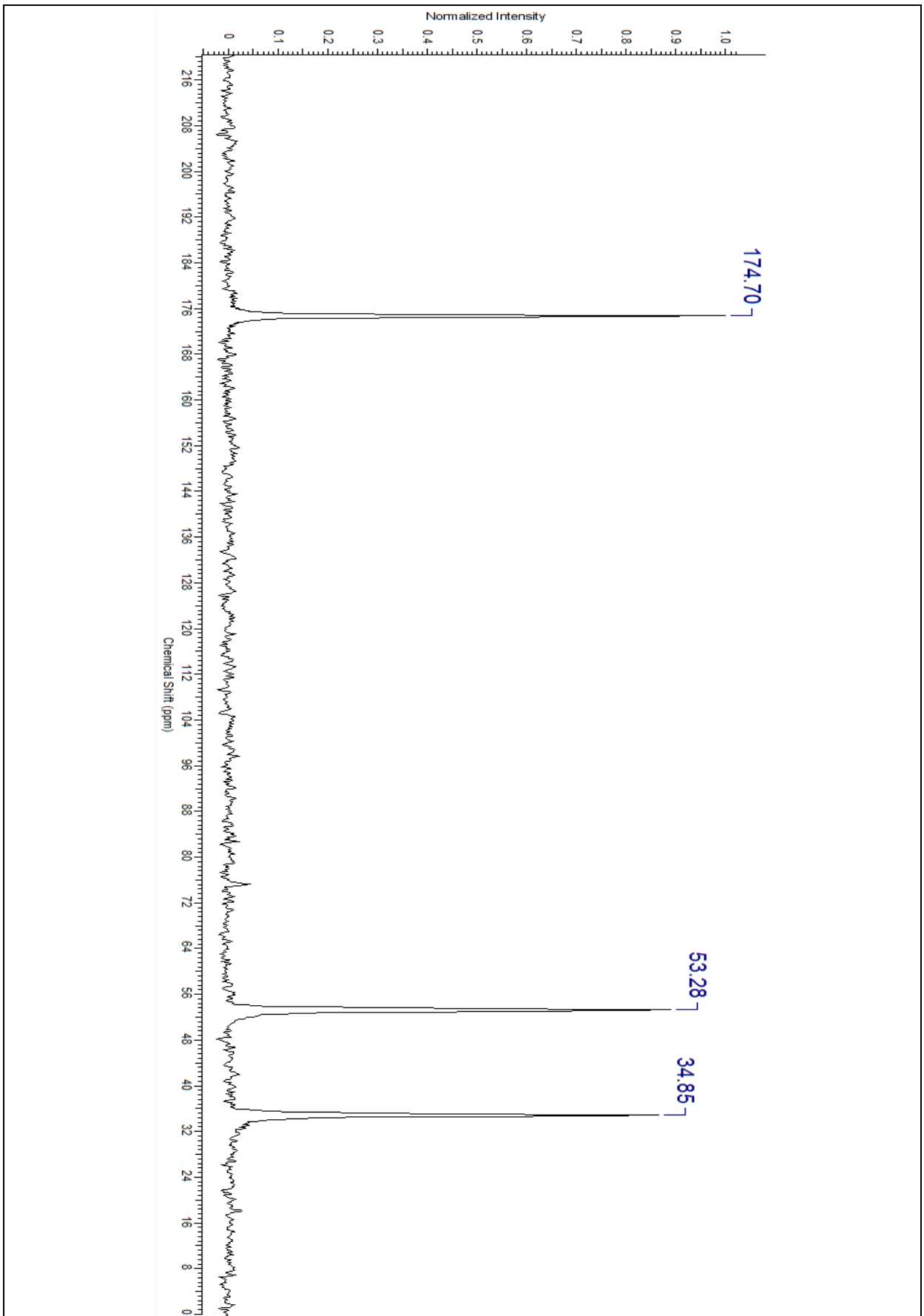


Figura 30 Espectro RMN ^{13}C experimental do aminoácido L-Cistina.

4.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

A análise por fluorescência de raios-x da L-Cisteína e da L-Cistina foi realizada com o objetivo obter sua composição completa. Utilizando o espectro da amostra de L-Cisteína (figura 8.20) podemos observar que a energia dos picos para o átomo de enxofre é 2,30 keV para o $K_{\alpha 1}$ e 2,50 keV para o $K_{\beta 1}$, enquanto para a L-Cistina (figura 8.21) a energia dos picos para o átomo de enxofre é 2,35 keV para o $K_{\alpha 1}$ e 2,50 keV para o $K_{\beta 1}$. Os resultados na literatura para os picos do enxofre são 2,31 keV para o $K_{\alpha 1}$ e 2,46 keV para o para o $K_{\beta 1}$, ou seja, os valores teóricos e experimentais possuem grande concordância.

O teor de enxofre observado experimentalmente a partir da fluorescência de raio-x para a Cisteína foi igual a 6,07 %, enquanto o teor de enxofre teórico, calculado a partir da análise elementar, é 26,46 %. Para a Cistina o teor de enxofre experimental foi igual a 5,66 % e o teor do enxofre teórico na Cistina é 26,68 %. Podemos observar uma discrepância com os valores dos teores obtidos na fluorescência de raios-x em comparação com os calculados na análise elementar. Isto ocorre porque foi utilizada uma fita de carbono para a medição das amostras, o que aumentou o teor de carbono na análise.

A composição completa da amostra de L-Cisteína pode ser observada na tabela 9.

Tabela 9 Resultado da fluorescência de raios-x para o aminoácido de Cisteína.

	NÚMERO DE FÓTONS DETECTADOS (KCps)	CONCENTRAÇÃO
S	14,8	6,07 %
Ca	0,1	0,04 %
La	0,0	0,02 %
Al	0,0	0,02 %
Fe	0,2	0,02 %
I	0,0	0,02 %
Mn	0,1	0,02 %
Cu	0,0	0,01 %
Zn	0,2	89 ppm
V	0,0	45 ppm

O resultado da fluorescência de raios-x para a L-Cistina é observado na tabela 10.

Tabela 10 Resultado da fluorescência de raios-x para o aminoácido de Cistina.

	NÚMERO DE FÓTONS DETECTADOS (KCps)	CONCENTRAÇÃO
S	14,1	5,66 %
Fe	0,2	0,02 %
Mn	0,1	0,01 %
Zn	0,2	83 ppm
Ti	0,0	55 ppm

Os valores da análise elementar teórica, tanto para a L-Cisteína, quanto para a L-Cistina, podem ser vistos na tabela 11.

Tabela 11 Teor dos elementos nas amostras de Cisteína e Cistina.

AMOSTRA	TEOR (%)				
	C	H	O	N	S
L-CISTEÍNA	29,74	5,82	26,41	11,56	26,46
L-CISTINA	29,99	5,03	26,63	11,66	26,68

Os espectros experimentais de fluorescência de raios-x encontram-se nas figuras 31 e 32 para as moléculas de L-Cisteína e L-Cistina, respectivamente.

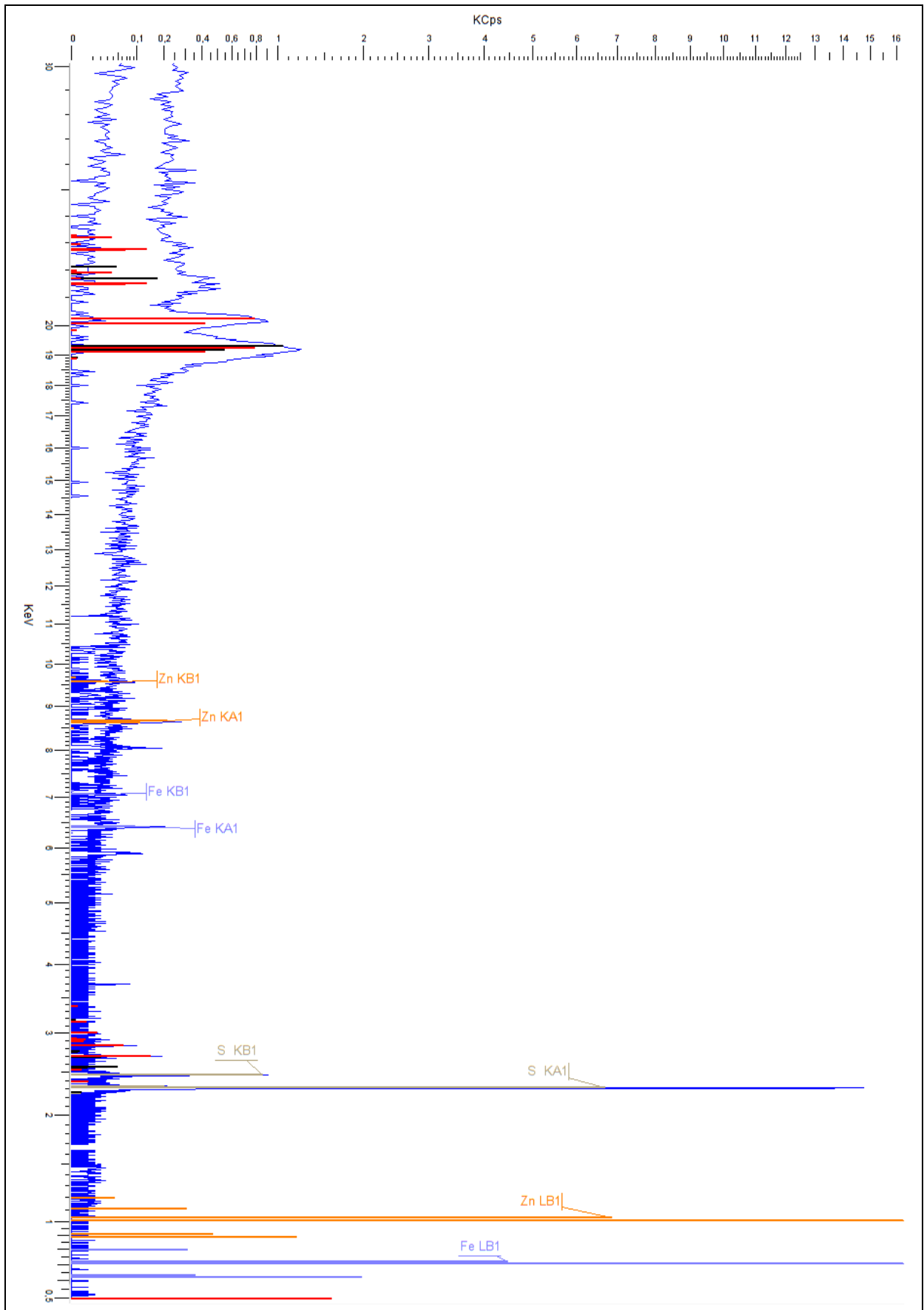


Figura 31 Espectro experimental de XRF para a Cisteína.

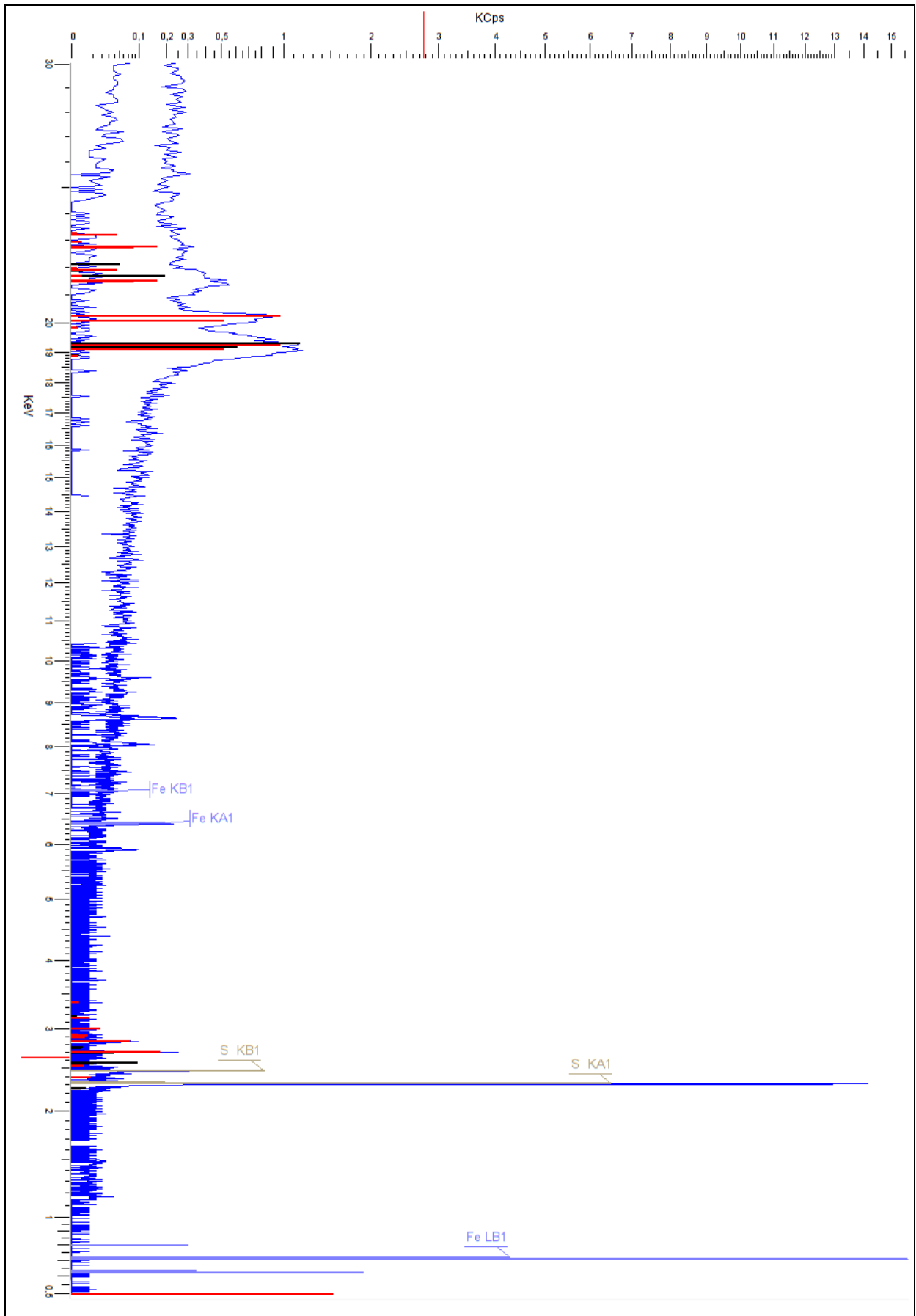


Figura 32 Espectro experimental de XRF para a Cistina.

5 CONCLUSÃO

O estudo do comportamento das ligações de enxofre dos aminoácidos L-Cisteína e L-Cistina pode ilustrar como ocorrem as diversas interações entre os átomos de carbono, hidrogênio e enxofre na Cisteína e os átomos de enxofre e carbono na Cistina, o que pode facilitar sua caracterização em diversos sistemas biológicos.

O uso da modelagem molecular permite gerar estruturas de forma a determinar o comprimento de ligações e a barreira de potencial energético. Partindo de um modelo inicial simples utilizando mecânica molecular para facilitar a otimização de geometria pode-se chegar a uma estrutura plausível tanto dos dois aminoácidos e ainda pode-se utilizar a modelagem para prever a barreira de potencial energético para o rompimento das ligações contendo enxofre.

Os comprimentos das ligações dos átomos presentes em ambos os aminoácidos foram concordantes com os valores encontrados na literatura. Com a oxidação da Cisteína em Cistina, ocorre uma diminuição do comprimento da ligação enxofre-carbono de 1,829 Å para 1,826 Å. Isto ocorre por conta da coordenação entre S-S presente na Cistina, onde os elétrons do enxofre tendem tornar a ligação C-S ligeiramente mais forte, aumentando a energia de ligação entre estes átomos. Os comprimentos de ligação encontrados para a ligação S-H foi 1,346 Å, enquanto para a ligação S-S foi igual a 2,028 Å.

Traçando um comparativo com os valores obtidos na literatura, energia para que haja a quebra da ligação C-S tanto da Cisteína quanto da Cistina é a mesma (170,4 Kcal/mol), com o comprimento de ligação equivalente a 2,7 Å. Para a Cisteína, é necessária uma energia igual 84,45 Kcal/mol e que a ligação S-H seja maior do que 1,91 Å para se romper, enquanto para a ligação S-S da Cisteína é necessário um comprimento maior do que 2,7 Å e energia igual a 101,6 Kcal/mol.

A análise térmica destes aminoácidos nos mostra dois comportamentos diferentes para o enxofre ligados a estas moléculas: Para a Cisteína a faixa térmica de eliminação do enxofre varia entre (190 – 275) °C (DTG = 241,12 °C), enquanto para a Cistina a faixa de temperatura varia entre (200 – 310) °C (DTG = 265,03 °C). A degradação térmica de ambos os aminoácidos gerou como produtos nesta faixa de temperatura $C_3H_5O_2$ e S, enquanto apenas a Cistina gerou como coproduto o NH.

Com a comparação entre os espectros no infravermelho da Cisteína e da

Cistina foi possível perceber uma diminuição na intensidade das bandas na região entre (2600 – 2550) cm^{-1} , caracterizada pelas ligações de estiramento axial S-H, por conta da perda de hidrogênio na oxidação. As bandas nesta região do aminoácido Cisteína ocorreram no número de onda: 2594 cm^{-1} , 2552 cm^{-1} e 2507 cm^{-1} . É mostrada também a diferença no estiramento axial C-S para a Cisteína e a Cistina. Enquanto para a Cisteína o estiramento C-S ocorre em 638 cm^{-1} , para a Cistina ocorre em 673 cm^{-1} . A presença de um estiramento axial S-S na Cistina é indicada em 453 cm^{-1} .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C experimental para a L-Cisteína e L-Cistina obtiveram alguns pontos em comum, como para os carbonos ligados ao grupo funcional ácido carboxílico, o deslocamento químico foi equivalente a 173,13 ppm para a Cisteína e 174,70 ppm para a Cistina, ambos os valores próximos ao calculado (176,5 ppm). Para os carbonos ligados ao grupo funcional amina, o deslocamento químico foi igual a 55,71 ppm para a Cisteína e 53,28 ppm para a Cistina (calculado: 51,5 ppm). Enquanto para os carbonos ligados ao enxofre os resultados são diferentes. Para a molécula de Cisteína o carbono ligado ao tiol obteve deslocamento químico igual a 27,69 ppm e valor calculado igual a 26,4 ppm. Para os carbonos ligados grupamento S-S da Cistina o deslocamento químico foi igual a 35,85 ppm e o valor calculado igual a 34,1 ppm. É esperado que o deslocamento químico, quando existe o grupamento tiol, não seja muito alto para a Cisteína e o aumento do deslocamento químico experimental para os carbonos ligados ao enxofre da Cistina por conta da presença da ligação S-S.

As análises por fluorescência de raios-x da L-Cisteína e da L-Cistina revelaram, também, valores bem semelhantes. Para a Cisteína a energia dos picos para o átomo de enxofre é 2,30 keV para o $K_{\alpha 1}$ e 2,50 keV para o $K_{\beta 1}$, enquanto para a Cistina, a energia dos picos para o átomo de enxofre é 2,35 keV para o $K_{\alpha 1}$ e 2,50 keV para o $K_{\beta 1}$, todos os resultados são concordantes com a literatura. Também foi calculado o valor do teor do enxofre teórico nas amostras utilizando análise elementar, obtendo na Cisteína é 26,46 % de S, enquanto que para a Cistina 26,68 % S. Os espectros XRF foram obtidos com o objetivo obter a composição completa das amostras.

Com a utilização destas técnicas foi possível caracterizar as amostras de L-Cisteína e L-Cistina, incluindo sua determinação estrutural teórica e cálculo da energia potencial, analisando com maior precisão o comportamento das ligações de enxofre nestes aminoácidos na presença diferentes formas de radiação eletromagnéticas e análises térmicas.

REFERÊNCIAS

- [1] ALVES, L. M. C. Bioquímica. Disponível em: < <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/tecnologia/LUCIAMARIACARARETOALVES/aula-1---bioquimica-i.pdf> > Acesso em 22/11/14.
- [2] FÁTIMA, A. Baptistella, L. H. B. Pilli, R. A. MODOLO, L. V. Ácidos siálicos – da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000200023 > Acesso em 22/11/14.
- [3] As biomoléculas. Disponível em: < <http://www.fmh.utl.pt/agon/cpfmh/docs/documentos/recursos/206/IBQ20122013GliLip.Pdf> > Acesso em 21/11/14.
- [4] SANTOS, A. P. S. A. Bioquímica prática. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufma.br:8080/jspui/bitstream/1/445/1/Livro%20de%20Bioquimica%20Pratica.Pdf> > Acesso em 22/11/14.
- [5] JUNIOR, W. E. F. Francisco, W. Proteínas: Hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química. Disponível em: < <http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc24/ccd1.Pdf> > Acesso em 23/11/14.
- [6] SOQ. Disponível em < <http://www.soq.com.br/conteudos/em/isomeria/p5.Php> > Acesso em 23/11/14.
- [7] FARMACAM. Glutariona. Disponível em: < <http://www.farmacam.com.br/monografias/glutinationafarmacam.Pdf> > Acesso em 23/11/14.
- [8] FARMACAM. L-Cisteína HCl. Disponível em: < <http://www.farmacam.com.br/monografias/cisteinafarmacam.pdf> >
- [9] CAREY, F. A. Química Orgânica. 7 ed. Porto Alegre. BOOKMAN, 2008. p. 748.
- [10] AUTOLAB. Bioquímica básica. Disponível em: < <http://www.gilvan.pro.br/aminoe-proteinas.Pdf> > Acesso em 23/11/14.
- [11] FARMACAM. Cistina. Disponível em: <http://www.farmacam.com.br/monografias/ICistina%20farmacam.pdf> > Acesso em 23/11/14.
- [12] MARTINS, P. G. A. Bortolotto, T. Bioquímica para Engenharia Sanitária e Ambiental. Disponível em: < <http://ppgbqa.ufsc.br/files/2011/06/2-Amino%C3%A1cidos-e-prote%C3%ADnas-respostas.Pdf> > Acesso em 24/11/14.
- [13] GABRIEL, J. E. Figueiredo, D. D. L. G. Farias, R. P. A caracterização estrutural e funcional de biomoléculas e as ferramentas de bioinformática. Disponível em: < <http://fiponline.edu.br/coopex/pdf/1278044099.Pdf> > Acesso em 24/11/14.
- [14] COELHO, L. W. Junqueira, G. M. Herrera, J. O. M. Machado, S. P. Machado, B. C. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v22n3/1093.Pdf> > Acesso em 24/11/14.
- [15] Burkert, U. e Allinger, N. L. Molecular Mechanics. ACS Monograph no 177, American Chemical Society, Washington, 1982.
- [16] VERLI, H. Métodos de mecânica molecular. Disponível em: < http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/aula_6.Pdf > Acesso em 26/11/14.
- [17] SILVA, D. M. Rodrigues, J. F. Seidl, P. R. Modelagem Molecular: Simulação de Interações entre Modelos de Asfaltenos. Disponível em: < http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_X_jic_2002/Daniel.Pdf > Acesso em 26/11/14.
- [18] FIGUEIREDO, K. Ribeiro, D. Análises Térmicas. Disponível em: < http://www.quimica.ufpb.br/monitoria/Disciplinas/termodinamica2/material/M7_Analises_termicas.pdf > Acesso em 21/11/14.
- [19] HOLLAS, J. M. Modern Spectroscopy. John Wiley & Sons, 1987
- [20] ATHINKSM, P. W. Molecular Quantum Mechanics, Oxford University Press, 1989

- [21] HERZBERG, G. Spectra of diatomic molecules. D. Van Nostrand, 1951
- [22] LEAL, K. Espectroscopia. Disponível em: < [http:// www. uff. br/ fisicoquimica/ docentes/ katialeal/ didatico/ Capitulo4. pdf](http://www.uff.br/fisicoquimica/docentes/katialeal/didatico/Capitulo4.pdf) > Acesso em 21/11/14.
- [23] ITO, J. M. Técnicas espectroscópicas em biofísica. Disponível em: < [http:// dfis. uefs. br/ caderno/ vol3n1/ Ito_ OK. Pdf](http://dfis.uefs.br/caderno/vol3n1/Ito_OK.Pdf) > Acesso em 27/11/14.
- [24] Técnicas espectroscópicas. Disponível em: < [http:// www2. dbd. puc- rio. br/ pergamum/ tesesabertas/ 0321127_ 05_ cap_ 04. Pdf](http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0321127_05_cap_04.Pdf) > Acesso em 27/11/14.
- [25] ROCHA, X. V. Espectrometria de RMN do carbono 13. Disponível em: < [http:// www. oocities. org/ vienna/ choir/ 9201/ espectrometria4. Htm](http://www.oocities.org/vienna/choir/9201/espectrometria4.Htm) > Acesso em 28/11/14.
- [26] Introduction to solid state NMR. Disponível em: < [http:// mutuslab. cs. uwindsor. ca/ schurko/ ssnmr/ ssnmr_ schurko. Pdf](http://mutuslab.cs.uwindsor.ca/schurko/ssnmr/ssnmr_schurko.Pdf) > Acesso em 28/11/14.
- [27] BARISON, A. Emprego de RMN HR-MAS e análises quimiométricas no reconhecimento e avaliação de soja (Glycine max) geneticamente modificada. Disponível em: < [http:// www. btdt. ufscar. br/ htdocs/ tedeSimplificado// tde_ busca/ arquivo. php? codArquivo= 2714](http://www.btdt.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2714) > Acesso em 29/11/14.
- [28] SILVERSTEIN, M. Robert; WEBSTER, X. Francis; KIEMLE, J. David. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- [29] ENZWEILLER, J. Espectrometria de fluorescência de raios-x. Disponível em: < [http:// www. ige. unicamp. br/ site/ aulas/ 9/ FRX- texto. Pdf](http://www.ige.unicamp.br/site/aulas/9/FRX-texto.Pdf) > Acesso em 29/11/14.
- [30] Interação de fótons com a matéria. Disponível em: < [http:// www. if. ufrj. br/ ~toni/ capitulo_ 11. Pdf](http://www.if.ufrj.br/~toni/capitulo_11.Pdf) > Acesso em 30/11/14.
- [31] Fluorescência de raios-x. Disponível em: < [http:// www. ciul. ul. pt/ ~luisa/ PLDTR/ FLUORESCENCIA% 20DE% 20RAIOS% 20X. pdf](http://www.ciul.ul.pt/~luisa/PLDTR/FLUORESCENCIA%20DE%20RAIOS%20X.pdf) > Acesso em 30/11/14.
- [32] AMPETEC INC. X-ray fluorescence (XRF). Disponível em: < [http:// www. amptek. com/ pdf/ xrf. pdf](http://www.amptek.com/pdf/xrf.pdf) > Acesso em 01/12/14.
- [33] ARAÚJO, U. B. Desenvolvimento e caracterização de um sistema portátil de fluorescência de raios-x. Disponível em: < [http:// www. con. ufrj. br/ MSc% 20Dissertacoes/ 2008/ Dissertacao% 20Ubiratan. Pdf](http://www.con.ufrj.br/MSc%20Dissertacoes/2008/Dissertacao%20Ubiratan.Pdf) > Acesso em 01/12/14.
- [34] CRC Handbook of Chemistry and Physics. 23 ed, p. 9-46
- [35] CRC Handbook of Chemistry and Physics. 23 ed, p. 9-69
- [38] CRC Handbook of Chemistry and Physics. 23 ed, p. 9-65
- [37] SILVERSTEIN, M. Robert; WEBSTER, X. Francis; KIEMLE, J. David. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005, p. 106.
- [38] SILVERSTEIN, M. Robert; WEBSTER, X. Francis; KIEMLE, J. David. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005, p. 233.