

3/20

BOLETIM No - 258
QUÍMICA No - 6
SÃO PAULO (BRASIL)
1962

GIUSEPPE CILENTO

SÔBRE O MECANISMO DE AÇÃO DA TIROXINA ;
INTERAÇÃO DA DIODOTIROSINA COM ALGUNS
FATÔRES DA SEQÜÊNCIA RESPIRATÓRIA

Tôda correspondência deverá ser dirigida ao Departamento respectivo da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo — Caixa Postal 8 105, S. Paulo, Brasil.

All correspondence should be addressed to the Department concerned Caixa Postal 8 105 S. Paulo, Brasil.

Impresso na Secção Gráfica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo em 1962





GIUSEPPE CILENTO

**SÔBRE O MECANISMO DE AÇÃO DA TIROXINA;
INTERAÇÃO DA DIODOTIROSINA COM ALGUNS
FATÔRES DA SEQÜÊNCIA RESPIRATÓRIA**

**COMPOSTO E IMPRESSO NA SECÇÃO GRÁFICA DA
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

1962

AGRADECIMENTOS

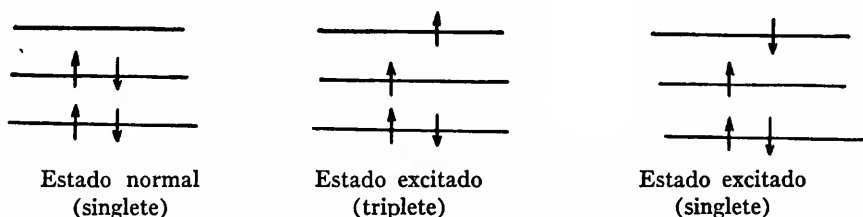
Ao Conselho Nacional de Pesquisas e à Rockefeller Foundation, pelos seus generosos auxílios em forma de aparelhagens e drogas ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo.

À Srta. Regina Gusmão de Andrade, pela sua eficiente colaboração, em especial, por ter datilografado o manuscrito.

PARTE I

Na maioria das moléculas os elétrons estão emparelhados, ou seja, existem dois deles em cada orbital. De acordo com o princípio de Pauli, os dois elétrons que ocupam uma mesma orbital têm spin opostos, que se anulam. A molécula será, pois, diamagnética; este estado é chamado *singlete*.

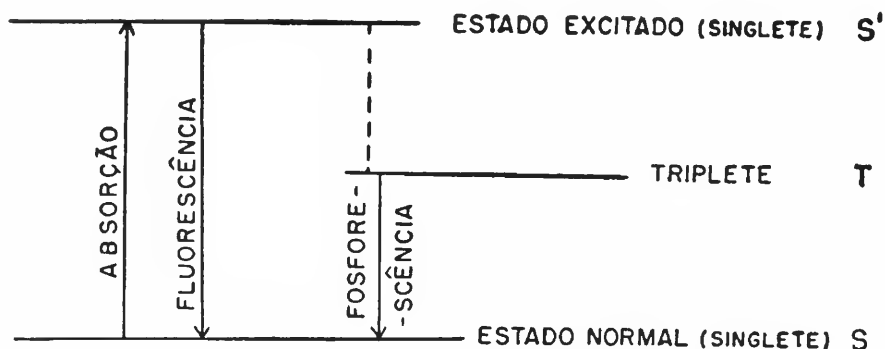
Suponhamos agora que um elétron de uma parilha seja excitado a uma outra orbital. Podem dar-se dois casos: o elétron excitado continua com spin oposto ao do seu antigo parceiro ou, então, poderá ter spin paralelo. Temos assim uma molécula excitada que no primeiro caso é diamagnética e no segundo caso paramagnética; estes dois estados são chamados respectivamente *singlete excitado* e *triplete*. Note-se que o estado *triplete* é um bi-radical. Os fatos acima podem ser assim esquematizados:



Estes dois estados excitados têm energia diferente, sendo que o *triplete* tem menor energia (regra de Hund).

É muito mais fácil excitar uma molécula ao estado *singlete* do do que ao *triplete*. A razão é que transições entre estados de diferente multiplicidade (e. g. *singlete* ao *triplete*, *triplete* ao *singlete*) são proibidas pela regra da conservação do spin. Explica-se assim porque as transições entre *singletes* dão origem a fortes bandas no espectro de absorção, ao passo que a banda correspondente à passagem para o *triplete* não é normalmente observada.

Consideremos agora o diagrama abaixo, também chamado diagrama de Jablonski:



A molécula excitada ao singlete S' poderá reemitir esta energia (fluorescência) ou poderá perdê-la por processos de desativação. Já que a passagem $S' \rightarrow S$ é permitida, a molécula não permanecerá muito tempo no estado S' (10^{-9} – 10^{-8} seg.) e terá boa oportunidade de reemitir esta energia antes que ela se dissipe por outros processos. Por esta razão o fenômeno da fluorescência não é raro.

A molécula no estado S' pode também passar por um processo não radioativo ao estado T, pois a regra de conservação do spin se modifica para processos não radioativos. Uma vez neste estado, não é fácil para a molécula sofrer uma transição radioativa ao estado normal ($T \rightarrow S$) e emitir assim a energia. Em outras palavras, é necessário um tempo muito longo (10^{-4} – 10^{-3} seg.) e, durante este tempo, há plena oportunidade para outros processos dissipativos. Por este motivo é que a fosforescência — emissão de luz na passagem de triplete a estado normal — é um processo usualmente muito raro. Ela é quase que exclusivamente observada em meios de alta viscosidade e baixa temperatura, pois nestas condições se inibem os processos dissipativos.

Estado triplete nas reações ativadas por colisões. A identificação da participação de estados triplete em tais reações é muito mais difícil do que no caso das reações fotoquímicas. As melhores indicações referem-se à conversão cis $\rightarrow$ trans em certos compostos etilênicos. A constante de velocidade para este processo monomolecular é:

$$k = Ae^{-E/RT}$$

Para estas reações, os valores de E (energia de ativação) e A (fator frequência) reúnem-se em dois grupos bem definidos ⁽¹⁾:

- 1) Valor de E baixo (ca 20 kcal); valor de A (medida do número de moléculas que tendo suficiente energia de fato isomerizam) anormalmente baixo.
- 2) Valor de E alto (ca 40 kcal); em compensação A tem valor usualmente encontrado na maioria das reações.

Ao que parece, as reações, em que os valores de E e A caem no primeiro grupo, passam por um estado de transição cuja estrutura é de triplete. A dificuldade das transições S-T deve ser atribuído o valor muito baixo de A.

Por outro lado, a baixa energia de ativação decorre do fato já mencionado que, dos estados excitados, o triplete é o de menor energia. *Falha da regra da conservação do spin*. A regra da conservação do spin aplica-se bastante rigidamente àquelas moléculas formadas de átomos leves. Entretanto, ela pode ser sobrepujada na presença de átomos pesados, ou de átomos contendo elétrons desemparelhados. Nestes casos tôdas as intercombinações entre os três estados eletrônicos quimicamente mais importantes (S, S', T) de uma molécula

$S \rightarrow T$ (absorção)

$T \rightarrow S$ (emissão)

$S' \rightarrow T$

aumentam de probabilidade e na mesma proporção sob o efeito da perturbação⁽²⁾.

No caso de átomos pesados, a perturbação pode ser descrita como uma interação de momento magnético do elétron rodopiante com o campo magnético não uniforme proveniente do movimento orbital do elétron através do campo elétrico do núcleo pesado (e de outros elétrons). Fala-se em interação ou perturbação spin-orbital.

Esta perturbação deve afetar da mesma maneira as intercombinações radioativas e aquelas não radioativas⁽³⁾.

O efeito apresentado pelos átomos pesados de facilitar intercombinações pode ser devidamente apreciado nos seguintes exemplos: Nos halogeno-naftalenos, a vida do triplete, isto é, do estado fosforescente, torna-se cada vez mais curta na série F, Cl, Br, I⁽⁴⁾, pois a transição $T \rightarrow S$ vai se tornando cada vez mais provável com o aumento do número atômico do substituinte. Da mesma forma, pode-se

detectar uma certa absorção no espectro correspondente à transição $S \rightarrow T$, absorção esta que aumenta na série Cl, Br, I ⁽⁵⁾.

É mesmo possível induzir transições $S \rightarrow T$ pela dissolução da substância em um solvente que contenha átomos pesados. Assim, Kasha ⁽²⁾ mostrou que a absorção $S \rightarrow T$ do α -cloronaftaleno, impossível de ser observada quando este está dissolvido em solventes comuns, pode ser detectada na sua solução em iodeto de etila. O inverso do efeito Kasha também já foi demonstrado ⁽⁶⁾: iodeto de etila como solvente aumenta a probabilidade da transição $T \rightarrow S$, por exemplo em dinitronaftalenos e coumarinas.

Eficientes transições $S \rightarrow T$ foram demonstradas por Kasha e Becker ⁽⁷⁾ em moléculas tipo porfirinas. Foi observado que, quando o íon central é diamagnético (p. ex. Mg^{++}), a fluorescência é muito forte; entretanto, quando o íon central é paramagnético (p. ex. Cu^{++}) observa-se então fosforescência, mas não fluorescência. Vê-se pois que o íon paramagnético favoreceu a conversão do singlete excitado em triplete e depois a conversão radioativa do triplete ao estado normal (fosforescência).

Mais um exemplo pode ser citado: a molécula do oxigênio é paramagnética. Na presença de oxigênio sob pressão, Evans ⁽⁸⁾ pôde detectar a absorção $S \rightarrow T$ de muitas moléculas, inclusive da do benzeno (3300 angstroms).

Importância biológica do estado triplete. O estado triplete, talvez por não ser normalmente detectado no espectro, tem sido negligenciado por parte dos bioquímicos na consideração do caminho de mais baixa energia de ativação, nas reações bioquímicas. Entretanto, já que os quanta de energia disponíveis nas reações bioquímicas são pequenos (ligações fosfato ricas de energia, da ordem de 10 kcal), é muito importante que estas reações prossigam pelo caminho de menor energia de ativação ⁽⁹³⁾. Deve-se, pois, supor que estados tripletes participem de reações bioquímicas. Outra razão muito importante é que a vida média do triplete é cerca de um milhão de vezes mais longa do que a do singlete excitado. Isto faz com que o triplete tenha muito maior oportunidade do que o singlete excitado de reagir com uma certa substância. De fato, se esta última existir em concentração extremamente baixa, como muitas vezes é o caso “in

vivo”, não haverá oportunidade de choque no tempo durante o qual a molécula permanece no estado excitado de singlete (10^{-9} – 10^{-8} seg).

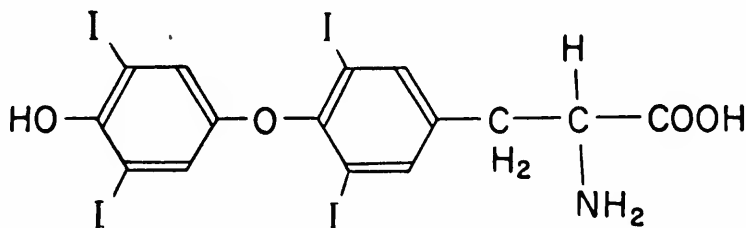
Segundo a escola de Szent-Györgyi ⁽¹⁰⁾, são os estados tripletes que primordialmente intervêm nos processos de transferência de energia em sistemas biológicos.

Deve-se, pois, indagar se existem “in vivo” condições que invalidem a regra da conservação do spin.

Segundo Reid ⁽¹¹⁾, uma das mais importantes diferenças entre as duas porfirinas mais comuns, clorofila e heme, vem do fato de que o íon Mg^{++} é diamagnético, ao passo que Fe^{++} é paramagnético e facilita, pois, a conversão singlete-triplete.

Outra possibilidade de se facilitar “in vivo” transições singlete-triplete, é através do campo magnético associado com a molécula de oxigênio. Esta poderia ser, segundo Reid ^(9b), a base do efeito fotodinâmico, ou seja, efeitos letais ou inibitórios produzidos em organismos vivos pela luz, oxigênio e qualquer substância sensibilizante, e. g., corantes. Em outras palavras, a espécie “tóxica” seria o triplete do sensibilizante, formado sob a influência do campo magnético do oxigênio.

No presente trabalho, analisa-se a possibilidade da regra da conservação do spin ser invalidada, “in vivo”, pela perturbação de átomos pesados. Dêstes, como vimos, é o iôdo muito eficiente. Pergunta-se, pois, se o hormônio tiroxina e similares, moléculas estas altamente iodadas, não exerceriam sua ação por um mecanismo essencialmente físico.



tiroxina

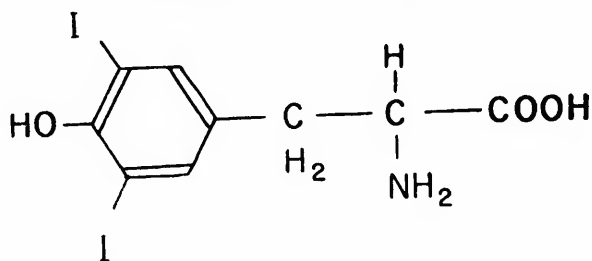
A perturbação spin-orbital poderia ocorrer na molécula do hormônio e, por meio desta, também em outras moléculas.

A possibilidade de intercumbinações decorrentes de perturbações abre — no dizer de Kasha e McGlynn ⁽¹²⁾ — novos horizontes

no estudo do desenvolvimento do mecanismo das reações químicas, devendo mesmo, em princípio, ser possível, catalisar reações por perturbações de origem molecular.

Poderia, pois, a tiroxina catalisar o aparecimento de estruturas tripletes como também destruir eventuais estruturas triplete tóxicas.

Esta possibilidade é agora investigada sob ângulos diferentes: (i) compatibilidade com o efeito da estrutura sobre a atividade (ii) existência de condições “in vivo” que facilitem uma perturbação spin-orbital de parte da tiroxina (iii) efeito da 3,5-diodotirosina, modelo da tiroxina, sobre a fluorescência da riboflavina e da vitamina K₃.



3,5-diodotirosina

Os resultados serão aqui apresentados e analisados.

Segue-se na Parte II uma discussão geral, uma vez que os resultados obtidos são também de interesse em outros campos.

A. ESTRUTURA E ATIVIDADE NA CLASSE DA TIROXINA

É bem sabido que tiroxina e vários análogos aumentam o consumo de oxigênio no homem e nos animais, bem como em tecidos destes; sabe-se também que tiroxina dissocia o processo de fosforilação do concomitante processo de oxidação nas mitocôndrias. É possível que nestes casos o efeito da tiroxina seja indireto, conseqüente a um entumescimento das mitocôndrias ⁽¹³⁾.

Já no caso de partículas sub-mitocôndriais (de fígado), a tiroxina mostra um efeito direto aumentando a velocidade inicial de oxidação de succinato ou do DPNH * e aumentando concomitantemente a eficiência da fosforilação ⁽¹⁴⁾.

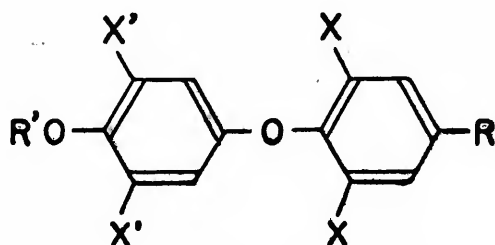
* DPNH é o difosfopiridino nucleótido reduzido.

Existem vários métodos para medir a atividade biológica na classe da tiroxina, métodos estes que não precisamos enunciar.

Em 1956 Bruce, Kharasch e Winzler ⁽¹⁵⁾ sugeriram a equação

$$\text{Log \% atividade} = k \sum f + C \quad (1)$$

para correlacionar estrutura com atividade em compostos do tipo



sendo atribuída à própria tiroxina o valor 100.

Na equação (1)

$$\sum f = (f_x + f_x + f_x + f_x + f_{or,})$$

Estas constantes dos substituintes, f_x , f_x , $f_{or,}$ são empíricas e foram selecionadas da mesma forma pela qual Hammett ⁽¹⁶⁾ determinou as constantes σ . Expressam elas o efeito do substituinte na atividade, independentemente da natureza dos outros substituintes. Naturalmente estas constantes expressam certos parâmetros e Bruce, Kharasch e Winzler sugerem que elas refletem a combinação de dois efeitos: (i) habilidade do substituinte de atrair ou repelir elétrons (ii) habilidade do substituinte de formar ponte de hidrogênio.

Esta última sugestão é por nós considerada errônea, uma vez que ela requer que a habilidade de formar ponte de hidrogênio nos fenóis orto-substituídos decresça assim ⁽¹⁵⁾



quando que a seqüência observada por alguns ⁽¹⁷⁾ é



e por outros ⁽¹⁸⁾



ou seja, o derivado iodado é o que forma a ponte mais fraca. Deve-se, pois, procurar qual o parâmetro físico, ou a combinação de

parâmetros, que pode ser empregado na racionalização das constantes dos substituintes.

Se o efeito da tiroxina é o de facilitar intercombinações, então estas mesmas constantes de substituintes deverão ser utilizáveis numa propriedade ou fenômeno estritamente ligado à transição entre estados de diferente multiplicidade. O fenômeno melhor estudado, que aqui se enquadra é a determinação, por McClure ⁽⁴⁾, do efeito de α e β substituintes na vida da fosforescência do naftaleno, estudo este ao qual já nos referimos anteriormente. McClure observou que ao se passar de naftaleno a fluoronaftaleno, e sucessivamente, até iodonaftaleno, o nível do triplete não se altera, mas a vida do estado triplete diminui grandemente, ou seja, aumenta muito a probabilidade da transição triplete $\rightarrow$ singlete. Já que, como dissemos, não há alteração na posição do triplete, o único fator que está influenciando é a capacidade do átomo pesado de permitir conversões triplete $\rightarrow$ singlete.

Na Fig. 1 está projetado o logaritmo da probabilidade da transição T $\rightarrow$ S (equivalente ao colog da vida da fosforescência) nos

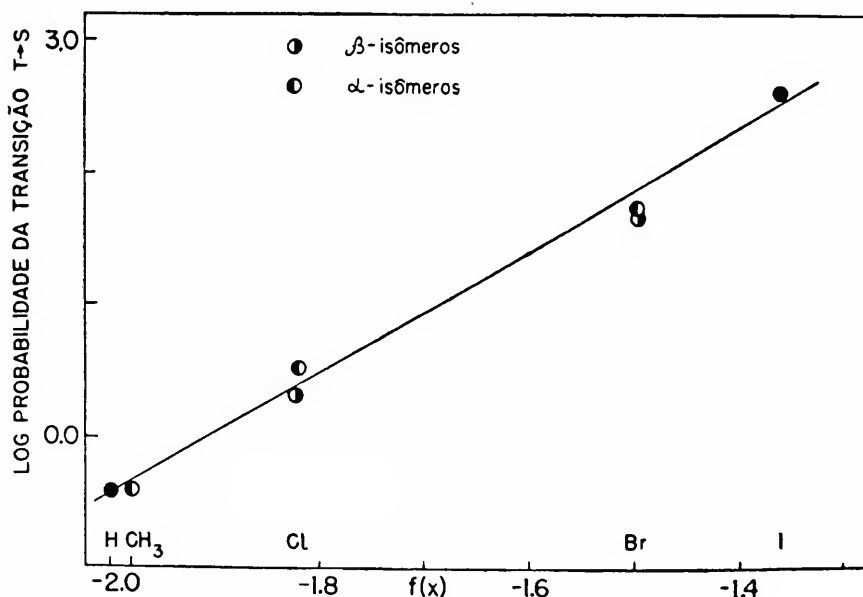


Fig. 1. Cologaritmo da vida do triplete do naftaleno e derivados monosubstituídos vs. a constante do substituinte calculada por Bruice, Kharasch e Winzler à base do efeito do substituinte na atividade biológica da tiroxina.

derivados do naftaleno vs. o valor f_x do substituinte, determinado, como vimos, a partir da atividade biológica. A relação linear observada vem indicar que as constantes dos substituintes, calculados a partir das propriedades biológicas da tiroxina e similares, podem ser empregadas num fenômeno dependente de intercombinação e vêm dar, portanto, forte apoio à hipótese de que a tiroxina age favorecendo transições entre estados de diferente multiplicidade.

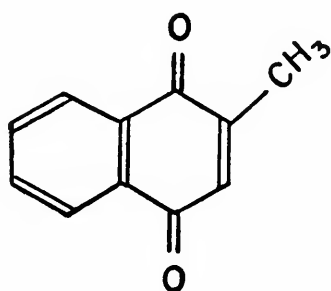
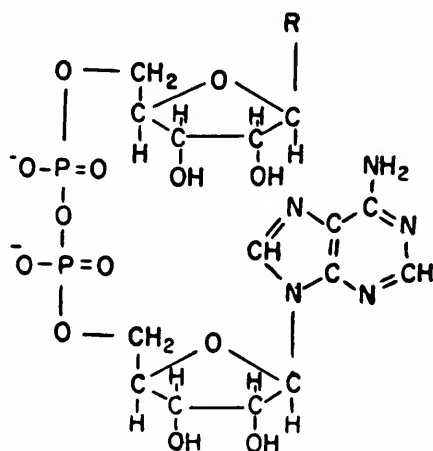
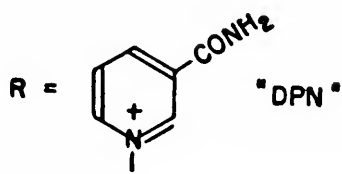
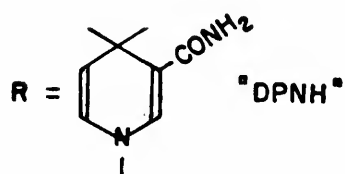
B. FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE MODELOS DA TIROXINA

A perturbação induzida por um átomo pesado é certamente mais eficiente quando este átomo se acha em contato íntimo com a molécula perturbada. De fato, para uma forte interação spin-orbital é necessário que o elétron π penetre nas proximidades do núcleo do átomo pesado. No caso de interação spin-orbital entre o elétron π aromático e o átomo de halogênio induzido colisionalmente (efeito Kasha), tal interação variará também diretamente com a duração e frequência das colisões⁽¹⁹⁾. É de se esperar, pois, forte perturbação numa molécula complexada com algum derivado iodado, desde que a união se faça pelo átomo de iôdo.

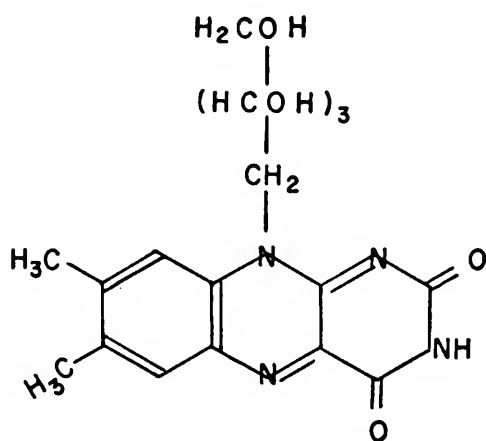
Tornou-se assim interessante verificar se tiroxina tem propriedades complexantes, especialmente em relação a substâncias de importância biológica. Devido à ação que a tiroxina exerce sobre o consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa, as substâncias que se apresentam num primeiro plano de importância são as coenzimas (ou suas partes funcionais, “as vitaminas”) da seqüência respiratória.

A própria tiroxina não pôde ser usada neste estudo devido à sua extrema insolubilidade em meio aquoso. É verdade que ela pode ser algo solubilizada em meio alcalino, mas nestas condições as coenzimas estudadas são decompostas. Usamos, pois, um modelo de tiroxina, a 3,5-diodotirosina, que é razoavelmente solúvel em meio ácido (HCl) aquoso.

Verificamos que a diiodotirosina modifica o espectro das três coenzimas ou vitaminas estudadas, difosfopiridino nucleotido oxidado (“DPN”), riboflavina e 2-metil-naftoquinona (vitamina K_3) (Figs. 2, 3, 4) mas não o do difosfopiridino nucleotido reduzido (DPNH).



2-metil-naftoquinona
"vitamina K₃"
"menadiona"



"vitamina B₂"
Riboflavina

As alterações, quando produzidas, são imediatas e não se acentuam com o decorrer do tempo, o que vem sugerir formação de complexos. Com base nestas alterações espectrais calculamos as constantes de associação para os três complexos (Figs. 5, 6, 7). Os dados importantes são apresentados na Tabela I.

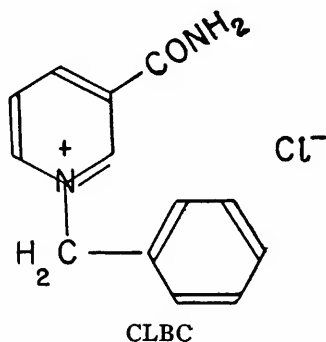
Tabela I

COMPLEXOS DE DIODOTIROSINA COM ALGUMAS VITAMINAS, COENZIMAS OU MODELOS				
Parceiro da diodotirosina	λ da luz usada; $m\mu$	K $l.mol^{-1}$	ϵ	Observações *
DPN	345	6.4	80	—
CLBC**	345	1.6	240	[CLBC] constante [diodotirosina] constante μ fixo
CLBC	340	2.0	240	
CLBC	340	2.0	240	
Riboflavina	380	50		HCl a 1.33%
	490	50		
Vitamina K ₃	380	20;20	1500	—

* Todos os complexos são formados na relação molar 1:1.

** Cloreto de 1-benzil-3-carboxamida piridônio.

Que a complexação da diodotirosina com a coenzima piridínica (DPN) se dá pela parte funcional desta última, isto é, pelo anel de piridônio, é indicado pelo fato de que a diodotirosina também complexa com sais de piridônio, p. ex., com o cloreto de 1-benzil-3-carboxamida piridônio (CLBC), modelo de DPN (Figs. 8 e 9).



A associação com este cation se dá também na relação 1:1. O valor encontrado para a constante é de $1.6 l.mol^{-1}$ quando a concentração do CLBC é mantida fixa (Fig. 9) (vide Parte Experimental) e $2.0 l.mol^{-1}$ quando a diodotirosina é mantida constante (Fig. 10). A força iônica não parece influenciar a complexação, pois os pontos experimentais coincidem com a mesma reta obtida

em experiência idêntica, na qual não se manteve constante a força iônica (Fig. 11).

Vemos, pois, que diodotirosina forma complexo moderadamente estável com DPN, razoavelmente forte com vitamina K₃ e bastante estável com riboflavina.

A fim de investigar a influência dos átomos de iôdo na complexação, substituímos a diodotirosina pela tirosina. Neste caso, também, ocorrem alterações espectrais indicativas de interações intermoleculares (Figs. 12, 13, 14). Os dados referentes ao estudo destes complexos são apresentados na Tabela II.

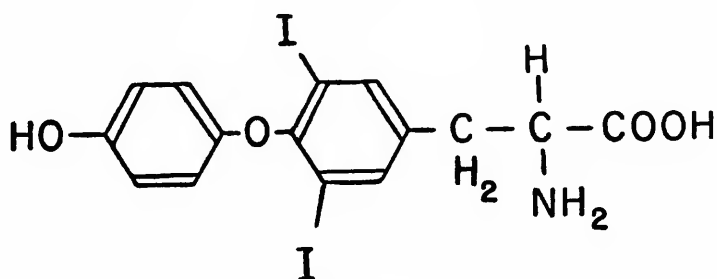
Tabela II

COMPLEXOS DE TIROSINA COM ALGUMAS VITAMINAS, COENZIMAS OU MODELOS					
Parceiro da tirosina	λ da luz usada; m μ	K l.mol ⁻¹	ϵ	Observações *	Figura
DPN	350	0.8	200	—	15
CLBC	340	0.9	220	[Tirosina] constante	16, 17
CLBC	350	0.6	250	[CLBC] const.	18
Riboflavina	390	10		HCl a 1.33%	19
	480	7			
Riboflavina	390	10		HCl a 0.53%	20
Vitamina K ₃	380	1.4	2000	—	21

* Todos os complexos são formados na relação molar 1:1.

Vemos, pois, que em todos os casos a ausência dos átomos de iôdo reduz a estabilidade dos complexos. O efeito é especialmente marcante no caso da vitamina K₃, onde o valor da constante de associação torna-se cerca de 15 vezes menor. Estes resultados vêm indicar que a complexação com diodotirosina se deve fazer principalmente pelos átomos de iôdo. De fato, se assim não fôsse, o valor da constante deveria baixar pela introdução de átomos de iôdo, pois sendo estes atraentes de elétrons dificultariam, com certeza, uma eventual complexação que se desse em qualquer outra região da molécula (vide Parte II).

3,5-Diodotironina é biològicamente muito menos ativa do que tiroxina.



3,5-Diodotironina

Ela é também dificilmente solúvel, porém em meio ácido aquoso-etanólico, poi possível obter-se uma solução de concentração suficiente para estudar a interação com CLBC, o modêlo de DPN (Fig. 22). A determinação usual da constante de equilíbrio mostrou que, neste caso, a reta passa pela origem (Fig. 23). Isto significa que apesar de haver interação, òbviamente refletida nas alterações espectrais, a constante de associação é zero. Explicação para êstes casos existe e é bastante recente: não se estabelecem complexos, mas apenas contatos ^(20, 21). Ê sòmente, pois, pelo efeito da colisão e durante esta que há interação.

Sem dúvida é a grande concentração de álcool no meio que suprime a complexação. De fato, o sistema CLBC-diodotirosina em meio aquoso-alcoólico mostra uma interação quase que exclusivamente de contato (Fig. 24); o valor da constante de associação é ca. 0.4 l.mol⁻¹, bem menor do que o valor 1.6-2.0 l.mol⁻¹ observado em meio puramente aquoso, ao passo que os coeficientes de extinção molar, e. g. $\epsilon_{325} = 700$, são bem mais altos do que aquêles encontrados para o sistema em água.

A fim de investigar o comportamento em meio exclusivamente alcoólico, e à vista da insolubilidade da diodotirosina, sintetisamos o 2,6-diodofenol. Êste modêlo não afeta absolutamente o espectro alcoólico das vitaminas K₃ e riboflavina em concentrações nas quais a diodotirosina altera o espectro aquoso das vitaminas.

A complexação da diodotironina com DPN, vitamina K₃ ou riboflavina não pôde ser estudada espectralmente, pois estas

substâncias não são suficientemente solúveis em meio aquoso-etanólico e, além do mais, absorvem fortemente, de maneira que uma eventual interação ficaria mascarada.

Em suma, vemos que existem “in vivo” condições favoráveis para que átomos de iôdo da tiroxina e similares induzam interações spin-orbital e facilitem assim intercombinações.

C. EFEITO DA DIODOTIROSINA SÔBRE A FLUORESCÊNCIA DA RIBOFLAVINA E DA VITAMINA K₃

Se uma molécula excitada (singlete) está em contato com outra que contenha átomos pesados — seja por causa de colisão ou por complexação — ficará favorecida a transformação não radioativa do singlete excitado em triplete. Uma vez neste estado, a molécula será desativada por colisões com o solvente. Vê-se, pois, que moléculas contendo átomos pesados devem suprimir a fluorescência (“fluorescence quenching”). Isto, porém, nem sempre é observado, e, na realidade, o “quenching” da fluorescência é um fenômeno de difícil explicação.

McLaughlin e Szent-Györgyi⁽²²⁾ observaram que halogeno-fenóis, inclusive tiroxina, são capazes de suprimir a fluorescência de Rodamina B. A atividade dos halogeno-fenóis aumenta na série $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$. Segundo os autores este “quenching” não poderia ser de natureza dinâmica, pois os halogeno-fenóis não absorvem radiações de frequência correspondente à da fluorescência da Rodamina. Propuseram, então, a formação de um complexo não fluorescente entre Rodamina e o halogeno-fenol.

Investigamos o efeito da diodotirosina sôbre a fluorescência da riboflavina e verificamos que o “quenching” obedece à equação

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K [Q] \quad (2)$$

onde I_0 é a fluorescência da riboflavina, I é a fluorescência da riboflavina em presença do “quencher” (diodotirosina) e Q é a concentração da diodotirosina.

Esta equação pode ser deduzida admitindo que a diodotirosina e a riboflavina formem um complexo não fluorescente⁽²³⁾. Neste caso, K representa a constante de associação do complexo. O valor de K calculado a partir da inclinação da reta obtida projetando-se I_0/I vs. $[Q]$ é de 115 l.mol^{-1} (Fig. 25). No pH desta experiência, 3.95, o grupo fenólico da diodotirosina está totalmente na forma não dissociada, pois seu pK é 6.36⁽²⁴⁾. Entretanto, valor de K, essencialmente idêntico foi obtido a pH 6.47, onde o grupo fenólico está mais do que 50% dissociado.

Já que em pH levemente ácido a diodotirosina não afeta sensivelmente o espectro de absorção da riboflavina (Fig. 26), a relação I_0/I representará também o quociente das eficiências da fluorescência na ausência e na presença do “quencher”⁽²³⁾. Esta eficiência ou rendimento quântico corresponde à relação

$$\frac{\text{quanta emitidas}}{\text{quanta absorvidas}}$$

A equação (2) toma neste caso o nome de Stern-Volmer e K representa a constante de “quenching”.

Em princípio, nos casos mais simples, o “quenching” pode ser devido a colisões ou a complexação. Para distinguir entre as duas possibilidades, analisa-se o efeito da temperatura sobre a eficiência do “quencher”. Se a dependência é positiva, então o processo é colisional, ou seja, depende da velocidade com que se difundem as moléculas; se, porém, a dependência for negativa, o processo deve envolver algum complexo intermediário⁽²⁵⁾.

Não dispondo de aparelhagem adequada, apenas nos foi possível realizar uma investigação qualitativa. Note-se (Fig. 27) que a dependência é negativa, o que vem confirmar a formação de complexo molecular entre diodotirosina e riboflavina. Entretanto o valor da constante determinada por via fluorimétrica, 115 l.mol^{-1} é cerca de duas vezes mais alto do que aquele determinado espectralmente, 50 l.mol^{-1} . Muito provavelmente, isto é devido à diferença das condições usadas; assim, na investigação fluorimétrica o grupo carboxila da diodotirosina está totalmente dissociado, ao passo que na investigação espectral ele está predominantemente na forma não ionizada.

2-Metil-naftoquinona em solução aquosa mostra uma fluorescência muito fraca, branco azulada. Esta tonalidade indica que a intensidade é tão baixa que não é alcançado o limiar da visão das cores ⁽²⁶⁾. Sob o efeito da irradiação, porém a fluorescência logo passa a aumentar até alcançar um máximo após vários segundos. A tonalidade da fluorescência é agora azul profunda. Obviamente sob o efeito da irradiação, forma-se algum produto que é mais fluorescente do que o material de partida. A fotoquímica das quinonas foi bem investigada por Bridge e Porter ⁽²⁷⁾; um dos produtos principais formados é a hidroquinona correspondente, inclusive no caso da naftoquinona.

Ao estudarmos o efeito da diodotirosina sobre a fluorescência da 2-metil-naftoquinona, observamos que ela inibe totalmente a reação fotoquímica, já em concentração 5×10^{-4} M.

É provável que a alteração fotoquímica da vitamina K₃ proceda através do estado triplete, pois observamos que o íon cloreto inibe esta reação — fato este já conhecido ⁽²⁸⁾ — sem, porém, afetar a fluorescência da vitamina, ou seja, os singletes excitados.

No caso da diodotirosina, a situação torna-se muito mais complicada, pois nas condições experimentais usadas, ela mesmo se apresenta fluorescente. De qualquer forma, esta ação inibitória da diodotirosina — quer ela se exerça sobre o singlete quer sobre o triplete da menadiona — é perfeitamente compatível com o “efeito de átomos pesados”.

D. COMENTÁRIOS

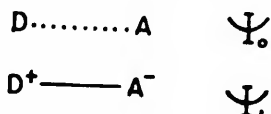
Os resultados apresentados são concordantes com a hipótese de que o mecanismo de ação da tiroxina é o de permitir transições entre estados de diferente multiplicidade.

É de se realçar o fato, bastante sugestivo, de que, durante a elaboração deste trabalho, foi pela primeira vez descrita na literatura ⁽²⁹⁾ uma tentativa de catálise química por substâncias iodadas, a cis-trans isomerização do dimetil-maleato em iodobenzeno. O resultado negativo obtido, na opinião dos próprios autores, não é significativo e demonstra, aliás, as dificuldades que se encontram neste campo ainda embrionário.

PARTE II

Introdução. A natureza da força intermolecular entre os componentes de um complexo tem sido — e até certo ponto ainda é — sujeito a conjecturas. Muitas teorias foram aventadas, mas hoje elas têm apenas interêsse histórico, com exceção da teoria de Mulliken ^(30, 31), também chamada teoria da transferência de carga, ou teoria da interação doador-receptor. Deve-se, porém, notar que a teoria de Mulliken — hoje amplamente aceita — é, em boa parte, uma síntese das teorias antigas.

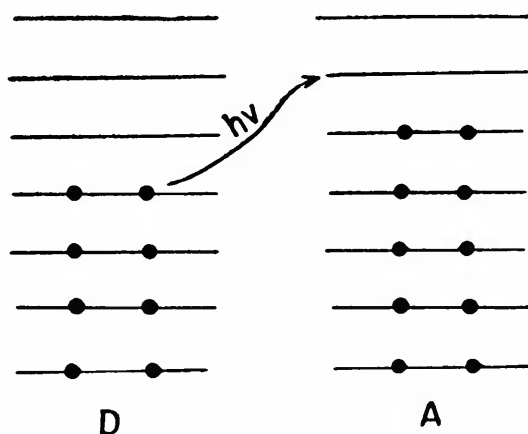
Segundo a teoria de Mulliken o estado normal de um complexo formado entre um doador D e um receptor A, é um híbrido de duas estruturas Ψ_0 e Ψ_1 , ao qual Ψ_0 contribui muito mais do que Ψ_1



Na estrutura Ψ_0 a ligação entre os componentes é efetuada por forças intermoleculares clássicas, tais como dipolo-dipolo, dipolo induzido-dipolo, etc., por pontes de hidrogênio e por forças de London. Ψ_1 corresponde à estrutura do complexo no qual um elétron foi transferido do doador para o receptor. Temos aqui uma ligação química entre os dois elétrons desemparelhados e também uma ligação iônica se A e D fôsem originalmente moléculas neutras.

Em outras palavras, podemos dizer que no estado normal apenas uma diminuta fração de elétron é transferida do doador para o receptor. Entretanto, sob efeito da luz de frequência apropriada, é possível obter o estado excitado e neste o elétron foi totalmente transferido do doador para o receptor. A absorção desta luz se traduz numa nova banda de absorção no espectro que é típica do complexo; aliás, é por esta razão que muitos complexos são coloridos.

Em suma, nestes complexos um elétron da orbital preenchida mais alta do doador é — ou será — transferido para a orbital vazia mais baixa do receptor. Estas orbitais são ditas “orbitais ativas”.



A própria teoria de Mulliken sugere que os complexos poderiam ser intermediários em muitas reações. Eles se formam instantaneamente, pois não requerem energia de ativação, mas se existe suficiente energia de ativação, podem ser irreversivelmente transformados nos produtos de uma reação química.

Mulliken ⁽³⁰⁾, já em 1952 predisse que as forças de transferência de carga deveriam ser importantes num grande número de sistemas diferentes e abrir novos caminhos para a compreensão de interações intermoleculares em sistemas biológicos.

Da mesma opinião é Szent-Györgyi ⁽³²⁾, o qual acredita que transferência de carga é uma ocorrência muito comum em sistemas biológicos, e é provavelmente a base do transporte de elétrons “in vivo” e do mecanismo de ação de certas drogas farmacologicamente ativas.

Nos laboratórios de Szent-Györgyi foram investigados vários casos de complexação entre substâncias biologicamente importantes, e. g., complexação de triptofano com flavinas ⁽³³⁾, pteridinas ⁽³⁴⁾ e coenzimas piridínicos oxidados ⁽³⁵⁾, e de flavin mono-nucleótidos com coenzimas piridínicos reduzidos ⁽³⁵⁾.

Dissemos que a complexação é determinada pelas orbitais ativas e, à base do que já foi exposto, torna-se evidente a impor-

tância dos cálculos de Pullman e Pullman⁽³⁶⁾ dos níveis energéticos das orbitais ativas em substâncias biologicamente importantes.

Dêstes cálculos, interessam para o presente trabalho as seguintes conclusões:

- i) os piridino nucleotidos oxidados (DPN⁺ e TPN⁺) e riboflavina são ótimos receptores⁽³⁷⁾;
- ii) dos aminoácidos aromáticos, triptofano é o doador mais eficiente, seguindo-se a êle tirosina e a esta, fenilalanina⁽³⁸⁾.

Já foram descritos complexos do anel piridônio com o íon iodeto^(39, 40), sulfoxilato⁽⁴¹⁾ e com o núcleo indólico^(35, 42, 43). Alguns complexos de flavinas já foram acima mencionados; outros de interesse biológico potencial são aqueles com fenol⁽⁴⁴⁾, 2,4-dinitro-fenol⁽⁴⁴⁾, clorotetraciclina⁽⁴⁵⁾ e cloropromazina⁽⁴⁶⁾.

Discussão geral dos resultados. A formação de complexos de tirosina com DPN, riboflavina e vitamina K₃ por nós observada, é de óbvia importância em relação ao problema da ligação das coenzimas às enzimas; de fato, é possível que a interação da coenzima com um resíduo de tirosina da proteína contribua para tais ligações.

No caso dos piridino nucleotidos a complexação com tirosina é acompanhada pelo aparecimento de uma nova banda de absorção no espectro (Fig. 12) e é, portanto com certeza um complexo de transferência de carga, ou seja, do tipo Mulliken. Por se tratar de uma banda bem ampla, deve-se supor que o complexo não é muito rígido ou seja, que existe apreciável movimento de uma parte em relação à outra⁽⁴⁷⁾.

Provar ou negar que tal complexação contribui para a união dos piridino nucleótidos com as desidrogenases é, em princípio, difícil, pois uma eventual banda nova apareceria na região onde os núcleos de triptofano da enzima absorvem fortemente. Aliás, já foi mencionado que triptofano também complexa com os piridino nucleótidos oxidados^(32, 42, 43), mas a nova banda aparece na fronteira com a região visível, zona esta isenta de outras absorções. Foi-nos assim possível, em colaboração com Giusti^(42, 43), provar que a interação triptotofano-DPN ocorre quando esta coenzima se liga à enzima gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase.

O complexo de DPN com tirosina é mais fraco do que aquele com triptofano, sendo a constante de associação 0.8 l.mol^{-1} no primeiro caso e 2.5 l.mol^{-1} no segundo ⁽⁴³⁾. Isto se deve ao fato, já mencionado, de que triptofano é um doador mais eficiente do que tirosina.

No caso da complexação de riboflavina com tirosina não se pode saber com certeza se se trata de um complexo de Mulliken, pois devido à forte absorção da riboflavina, foi necessário usar baixíssima concentração da vitamina e, nestas condições, não pode aparecer a banda de um eventual complexo. De fato, estas são geralmente fracas e só detectáveis em soluções relativamente concentradas.

Enquanto a constante de associação de riboflavina com triptofano é de 60 l.mol^{-1} ⁽³³⁾, valores bem mais baixos são encontrados quando o complexante é tirosina de acordo com o esperado. (Tabela II). Tarbury e Foley ⁽⁴⁸⁾ estudaram a interação de flavinas com fenóis, inclusive o éster etílico da L-tirosina, e encontraram que a constante de associação é menor do que 20 l.mol^{-1} , o que está de acordo com o nosso trabalho. Yagi e Matsuoka ⁽⁴⁹⁾ investigaram a complexação da riboflavina com fenol e acharam que a constante de equilíbrio é da ordem de 5 l.mol^{-1} .

Do mesmo modo que no caso da riboflavina, e pelas mesmas razões, não se pode dizer se o complexo da vitamina K₃ com tirosina é do tipo de Mulliken. Experimentalmente sabe-se que as quinonas são receptoras ⁽⁵⁰⁾, não havendo porém, cálculos teóricos.

A notável habilidade complexante da diodotirosina não é, de certo modo, surpreendente. De fato, é sabido que o próprio iodo, seja na forma molecular ^(20, 50, 51), iônica ⁽³⁹⁾ ou atômica ⁽⁵²⁾, forma complexos. Mais ainda, conhecem-se alguns complexos de substâncias iodadas ^(53, 54, 55).

Keefer e Andrews ⁽⁵⁴⁾ determinaram a constante de equilíbrio de complexos de bromo com halogenobenzenos em tetracloreto de carbono. Observaram que iodobenzeno forma um complexo algo mais estável e salientaram a possibilidade de que a molécula de bromo seja coordenada pelo átomo de iodo.

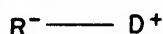
Andrews e Keefer ⁽⁵³⁾ investigaram também a constante de argentação dos halogenobenzenos. Aqui, porém, a constante no caso do iodobenzeno é muito maior do que com outros halogenobenzenos,

e mais uma vez Andrews e Keefer postularam que a coordenação se faz pelo átomo de iôdo.

Segundo Somayajalu e Palit ⁽⁵⁵⁾ — os quais investigaram o efeito do iodobenzeno e iodoetano em mistura com hidrocarbonetos sôbre o poder de dissolução do antraceno — existe entre iodobenzeno e antraceno interação notável, que conduz à formação de complexo molecular.

Em todos êstes complexos o iodobenzeno funciona como doador e pergunta-se, então, se o mesmo se dá nos complexos da diodotirosina ou diodotironina. Na associação com o anel de piridônio e com o núcleo naftoquinônico, êstes aminoácidos iodados devem funcionar como doadores, pois os anéis de piridônio e quinônicos são tipicamente receptores.

Já no caso da riboflavina a situação é algo diferente. O núcleo isoaloxazínico é um eficiente receptor, mas tem também certa habilidade de doador haja vista que riboflavina parece formar um auto-complexo ⁽³⁵⁾. É, pois, possível que o estado normal do complexo riboflavina-diodotirosina seja um híbrido de três estruturas



D, diodotirosina
R, riboflavina

Esta idéia está de acôrdo com o fato de que de todos os complexos aqui estudados, êste é o mais estável.

Analisemos a observação de que o complexo de diodotirosina com o anel piridônio torna-se menos estável ao se passar do meio aquoso ao meio aquoso-alcoólico. Assumindo que a complexação é do tipo Mulliken, esta terá o efeito de dispersar a carga positiva do cátion piridônio. Em analogia com o efeito da polaridade do solvente sôbre a velocidade daquelas substituições nucleófilas ⁽⁵⁶⁾, em cujo estado de transição há dispersão de carga, deveria esperar-se que a diminuição da polaridade do solvente conduzissem a uma estabilização do complexo, ainda que pequena. Deve-se, pois, concluir que na presença de etanol a estabilização dos componentes isolados

é maior do que aquela dos componentes complexados, isto é, do complexo. Situação análoga aparece no complexo de naftaleno com 1,3,5-trinitrobenzeno ⁽⁵⁷⁾.

Ainda alguns fatos restam a serem discutidos. Na complexação com diodotirosina, mas não com tirosina, DPN forma um complexo bem mais estável do que aquele formado pelo seu modelo, CLBC. Deve-se, pois, pensar que no complexo de DPN com diodotirosina, também a parte restante da coenzima deve de alguma forma contribuir para a estabilidade do complexo.

É, em princípio, perfeitamente possível que a complexação do DPN com diodofenóis, aqui descrita, tenha conexão com o efeito inibitório exercido pela tiroxina sobre certas desidrogenases ⁽⁵⁸⁾ e sobre o sistema da transhidrogenase ⁽⁵⁹⁾.

É por fim interessante observar que, embora diiodotirosina, em solução, forme com DPN um complexo mais estável do que aquele formado por triptofano, não conseguimos obter o complexo por via preparativa, ao passo que, nesses laboratórios, foi preparado sem maiores dificuldades o complexo DPN-triptofano ⁽⁴³⁾.

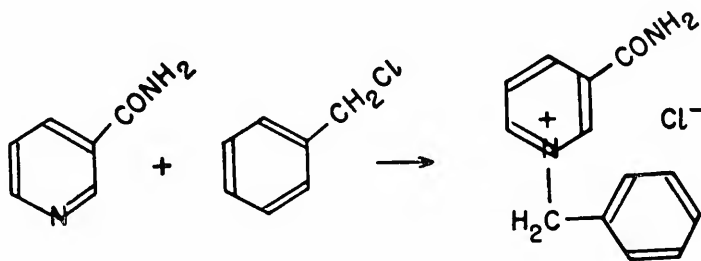
Comentários. O presente trabalho mostrou que diodotirosina é um complexante comparável, se não superior, ao triptofano. Esta descoberta é, potencialmente, um passo adiante na elucidação do mecanismo de ação da tiroxina, especialmente porque a associação se verifica com coenzimas ou vitaminas da cadeia respiratória. Deve-se também ter em mente que, com muita probabilidade, a formação de complexos será muito mais forte na célula do que “in vivo”, não somente por causa da possibilidade de ulteriores ligações, mas especialmente devido ao alto grau de acondicionamento e ordem, e. g. das mitocôndrias ⁽³³⁾

PARTE III

“EXPERIMENTAL”

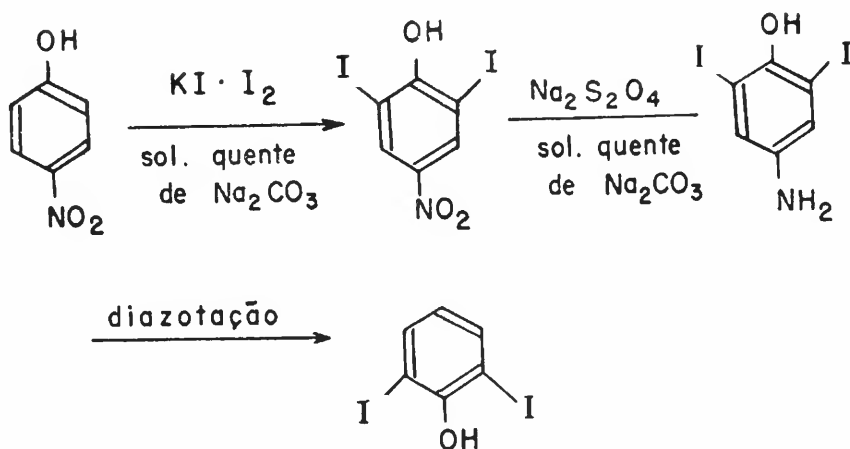
Drogas. Os seguintes produtos, suficientemente puros para as finalidades dêste trabalho, foram adquiridos comercialmente: β -DPN (“Sigma Chemical Co.”), L-(–)-tirosina (“Eastman Organic Chemicals”), riboflavina (“American Cyanamid Co.”), 3,5-diodo D,L-tironina (“Aldrich Chemical Co.”), 3,5-diodo-L-tirosina (“Eastman Organic Chemicals”). As propriedades desta última substância — de fundamental importância neste trabalho — são descritas adiante. A vitamina K₃ (“Eastman Organic Chemicals”) suficientemente pura para fins espectrofotométricos, foi, para a investigação fluorimétrica, recristalizada de ligroina (P. F. 106-107°).

O cloreto de 1-benzil-3-carboxamida piridônio (CLBC) foi preparado pela reação de nicotinamida e cloreto de benzila, segundo as indicações de Karrer e Stare ⁽⁶⁰⁾.



O produto foi várias vezes recristalizado de acetona aquosa: P.F. = 234° (indicado ⁽⁶⁰⁾ 236°).

2,6-Diodofenol foi preparado segundo indicações da literatura ⁽⁶¹⁾, pela seguinte série de reações:



A fim de obter o produto puro (P.F = 67°), foi necessário destilar com vapor de água e recrystalizar três vèzes (álcool-H₂O; ácido acético; álcool-água).

Determinação da rotação ótica da 3,5-diiodo-L-tirosina

0.1005 gr dissolvidos em HCl a 4%; volume final, 5 ml. Comprimento do tubo = 2 dm

$$\alpha = 0.12$$

$$[\alpha]_D = \frac{0.12}{\frac{0.1005}{2 \times \frac{5}{5}}} = 2.98$$

$$[\alpha]_D \text{ esperado }^{(62)} = 2.89$$

Análise espectral da 3,5-diiodo-L-tirosina. Qualitativa e quantitativamente o espectro mostrou ser idêntico àquele descrito na literatura ⁽²⁴⁾

	esperado	encontrado
ϵ_{285}	2720	2600

Investigação espectral de interações intermoleculares

Tôdas as medidas espectral de interações inclusive aquelas para determinar as constantes de associação foram feitas no espectrofotômetro de Beckman D. U. à temperatura ambiente (25 ± 2°C) com celas de 3 cm³ de capacidade. A não ser quando especificado, as celas usadas tinham 1 cm de caminho óptico.

*Determinação espectrofotométrica da constante de associação dos complexos **

Já que em geral os complexos absorvem na mesma região dos componentes a absorção destes últimos deve ser descontada ^{33, 34, 48)}.

Seja

ϵ_c , o coeficiente de extinção molar do complexo

ϵ_a , o coeficiente de extinção molar do receptor

ϵ_d , o coeficiente de extinção molar do doador

D , a absorção total

D_a , a absorção devida ao receptor

D_d , a absorção devida ao doador

Quando se forma um mol de complexo a variação de absorção será

$$\epsilon_c = (\epsilon_d + \epsilon_a)$$

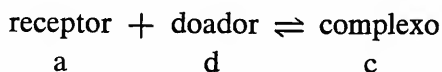
A variação da absorção

$$D = (D_a + D_d) = \Delta D$$

que é medida experimentalmente corresponderá então a uma concentração molar c do complexo. Temos pois:

$$c = \frac{\Delta D}{\epsilon_c - (\epsilon_d + \epsilon_a)} \quad (1)$$

Agora,



* É lembrado aqui que o coeficiente de extinção molar é dado pela equação

$$\epsilon = \frac{1}{cd} \log \frac{I_0}{I} = \frac{1}{cd} D$$

onde c é a concentração molar do soluto, d é o caminho óptico da cela, I_0 e I a intensidade da luz transmitida respectivamente pelo solvente e pela solução.

Suponhamos que um dos participantes do complexo esteja em concentração muito superior ao outro, por exemplo, a concentração inicial do doador, d_0 , muito mais alta do que a_0 . Admitindo que o complexo se forme na relação 1:1 ao equilíbrio teremos:

$$\frac{c}{(a_0 - c) d_0} = K$$

pois a concentração relativamente alta do doador não foi praticamente alterada pela complexação.

Desta equação resulta

$$\frac{1}{d_0} = \frac{Ka_0}{c} - K$$

e substituindo o valor de c por aquele expresso pela equação (1), teremos

$$\frac{1}{d_0} = Ka_0[\epsilon_c - (\epsilon_d + \epsilon_a)] \frac{1}{\Delta D} - K \quad (2)$$

O significado físico desta equação é o seguinte: Quando se projeta o inverso da concentração do doador, vs. o inverso da variação da absorção, deve resultar uma reta desde que o complexo se forme na relação 1:1. O cruzamento desta reta no eixo das ordenadas corresponde ao negativo da constante de equilíbrio. É óbvio que equação totalmente análoga à (2) é obtida usando o receptor como o componente de concentração muito mais alta. O método torna-se cada vez menos sensível com a diminuição do grau de associação.

Na prática, prepara-se uma série de soluções tendo tôdas elas concentração idêntica de um dos componentes. Adiciona-se depois o outro componente em quantidades variáveis, mas em concentração sempre bem mais alta do que aquela do componente mantido fixo. Deve-se, também, preparar soluções que contenham apenas os componentes isolados a fim de medir a absorção destes. Note-se que para determinar simplesmente K não é necessário conhecer a concentração do componente mantido constante.

Quando o complexo absorve numa região onde a absorção do componente mantido constante é desprezível, pode-se usar a equação de Foster, Hammick e Wardley ⁽⁶³⁾, ligeiramente modificada:

$$\frac{\Delta D}{a_0} = K d_0 \epsilon - K \Delta D$$

Assim, por exemplo, mantendo o doador constante, e variando o receptor, a projeção de $\frac{\Delta D}{a_0}$ vs. ΔD deverá dar uma reta, cujo coe-

ficiente angular é o negativo da constante de equilíbrio. Apenas um exemplo desta projeção aparece no presente trabalho.

Cálculo dos coeficientes de extinção molar

Note-se que na equação (2) a expressão

$$K a_0 [\epsilon_c - (\epsilon_d + \epsilon_a)]$$

representa a inclinação da reta. Desde que se conheça o coeficiente de extinção molar dos parceiros e a concentração do componente mantido constante, pode-se facilmente calcular ϵ_c , o coeficiente de extinção molecular do complexo.

ϵ_c é usualmente chamado coeficiente de extinção molar aparente, pois êle se refere não somente ao complexo, mas também aos contatos. Quando a constante de associação é baixa, a contribuição dos contatos a ϵ_c é grande; porém, quando a associação é forte, ϵ_c representa realmente o coeficiente de extinção molar do complexo.

Nós, sistematicamente, calculamos êstes coeficientes de extinção molar aparente.

No caso da equação de Foster, Hammick e Wardley ⁽⁶³⁾, o coeficiente de extinção molar do complexo pode ser calculado a partir do valor no qual a reta corta os eixos das abcissas. Neste caso temos

$$\frac{\Delta D}{a_0} = 0 \text{ e conseqüentemente,}$$

$$\epsilon = \frac{\Delta D}{[\text{concentração do componente fixo}]}$$

Determinação fluorimétrica da constante de associação

Tôdas as medidas fluorimétricas foram feitas no Fotofluorômetro Coleman ("Electronic Photofluorometer, Coleman Instruments, Inc.").

A determinação da constante de equilíbrio baseia-se na presunção de que a substância fluorescente e o "quencher" formam um complexo não fluorescente.

Sejam:

R_0 , a concentração inicial da substância fluorescente

Q , a concentração do "quencher",

C , a concentração do complexo,

I_0 , a fluorescência da substância,

I , a fluorescência da substância em presença do "quencher".

A perda de I_0 unidades de fluorescência, isto é, supressão total da fluorescência, significará que

$$C = R_0.$$

A perda de $I_0 - I$ unidades de fluorescência significará que

$$C = \frac{I_0 - I}{I_0} R_0$$

Desta última equação resulta:

$$R_0 - C = R_0 \frac{I}{I_0}$$

No equilíbrio teremos:

$$\frac{C}{(R_0 - C) Q} = K$$

desde que a concentração do “quencher” seja muito mais alta do que a da substância fluorescente.

Substituindo os valores apropriados e simplificando resulta:

$$\frac{\frac{I_0 - I}{I_0} R_0}{R_0 \frac{I}{I_0} Q} = K \quad \text{donde} \quad \frac{I_0}{I} = 1 + K Q$$

O significado físico desta equação é óbvio. Projetando-se $\frac{I_0}{I}$

vs. a concentração do “quencher”, deve-se obter uma reta que corta as ordenadas em 1 e cujo coeficiente angular expressa a constante de equilíbrio. Note-se que, para a determinação de K não é necessário conhecer a concentração da substância fluorescente.

Na prática prepara-se então uma série de soluções, tôdas elas contendo a mesma concentração da substância fluorescente. Adicionam-se quantidades variáveis do “quencher”; êste deve estar sempre em concentração muito mais alta do que a substância fluorescente. Prepara-se também uma solução sem “quencher” e opera-se de forma que a fluorescência desta, I_0 , tenha o valor 100.

Preparo das soluções. Tôdas as soluções foram preparadas por pesagem, exceto aquelas de solutos dificilmente solúveis. Estas últimas foram preparadas por agitação em frasco escuro e filtração. A concentração foi determinada espectrofotometricamente. No caso de soluções de riboflavina usaram-se os coeficientes de extinção molar publicados por Whitby ⁽⁶⁴⁾.

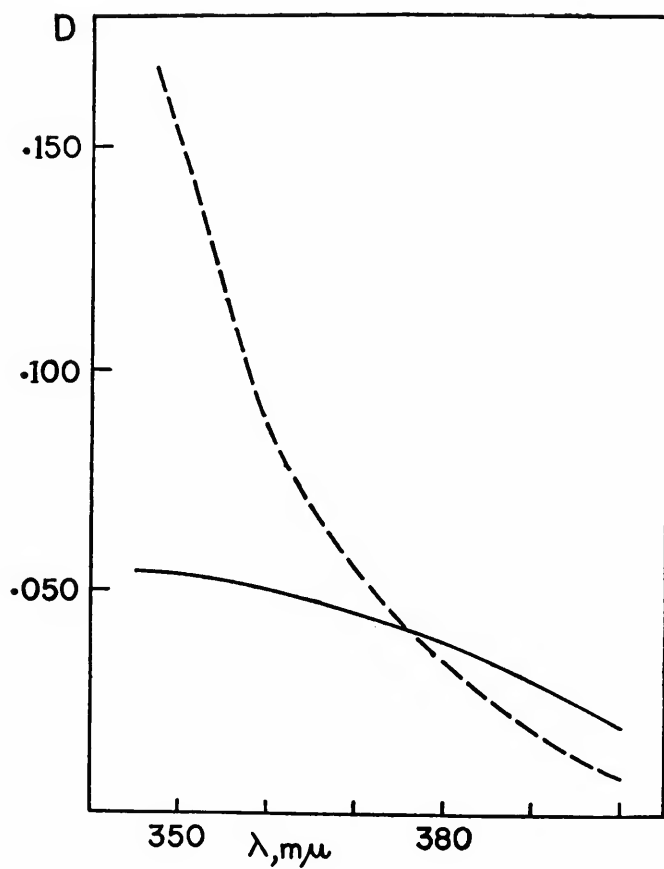


Fig. 2. — Espetro de absorção de uma solução $3.5 \times 10^{-3}M$ de DPN em ácido clorídrico aquoso a 0.9%; ---- idem, em presença de 3,5-diodotirosina 0.156 M.

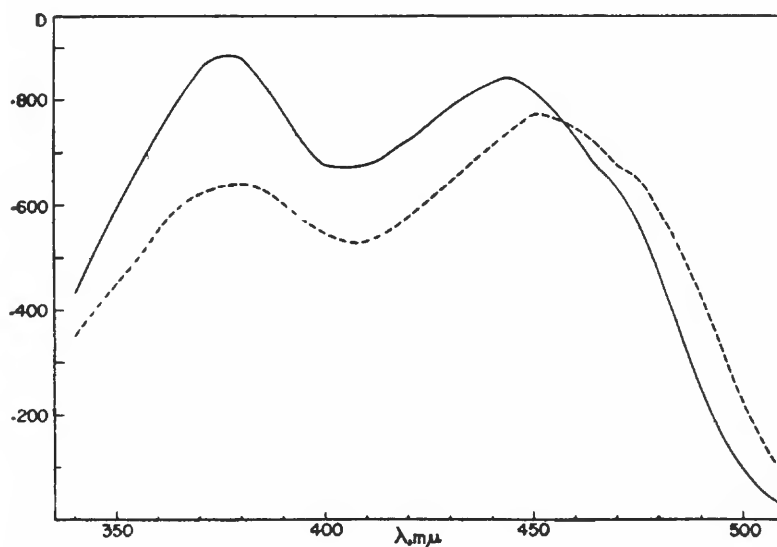


Fig. 3. — Espetro de absorção de uma solução aproximadamente 6.7×10^{-5} M de riboflavina em ácido clorídrico aquoso o a 2%;
--- idem, em presença de 3,5-diodotirosina 0.051 M.

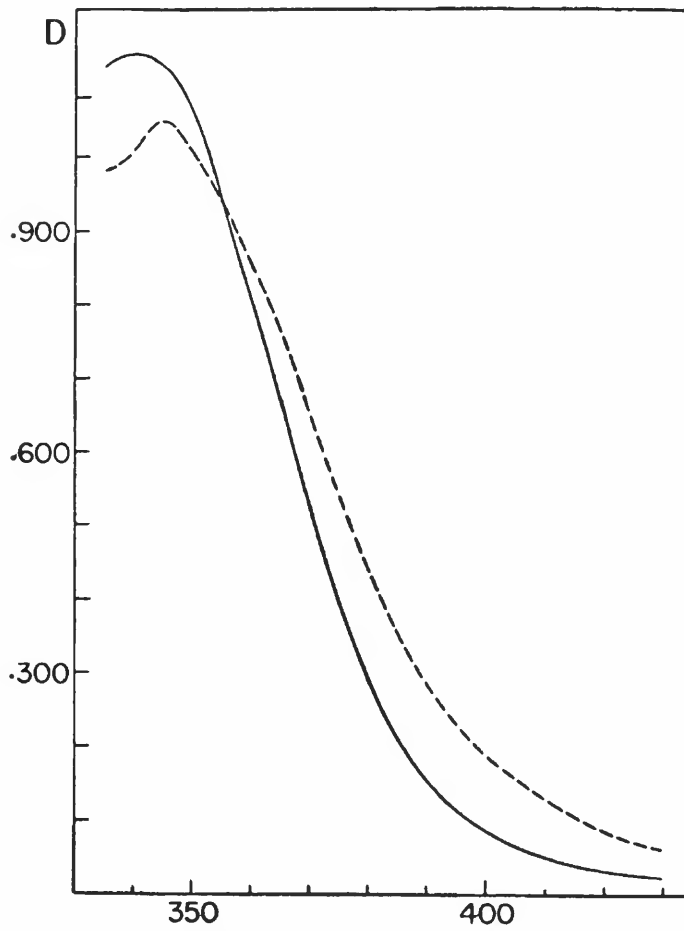


Fig. 4-A. — Espetro de absorção na região 335-430 m μ de uma solução 4.1×10^{-4} M de vitamina K₃ em ácido clorídrico aquoso a 0.33%; — — — — idem, em presença de 3,5-diodotirosina 0.035 M.

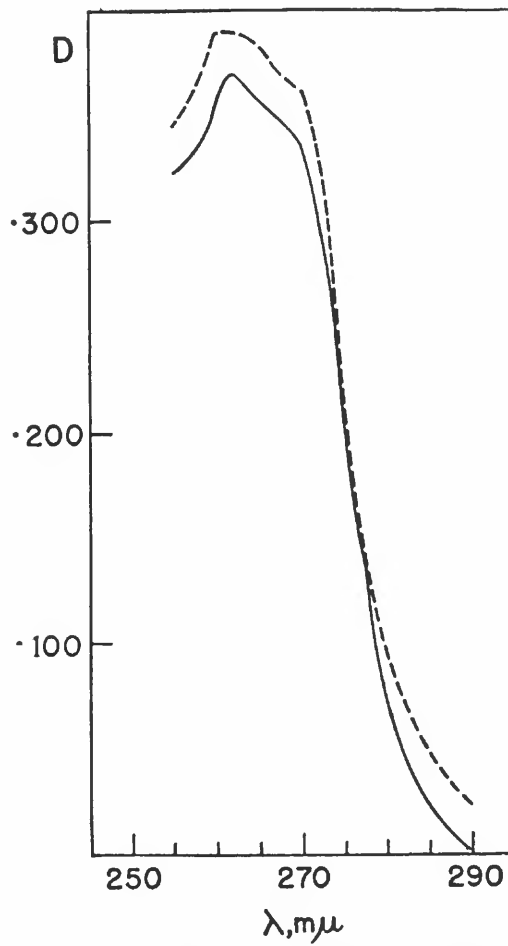


Fig. 4-B. ——— Espetro de absorção na região 255-290 $m\mu$ de uma solução 2.1×10^{-5} M de vitamina K₃ em HCl aquoso a 0.33%; — — — — idem, em presença de 3,5-diodotirosina 2.9×10^{-4} M.

*Determinação da constante de equilíbrio do complexo
DPN-diodotirosina*

Solução de diodotirosina: 0.268 M em HCl a 4%

Solução de DPN: 0.0215 M

O protocolo, as leituras já corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. A representação gráfica (Fig. 5) indica que a constante de equilíbrio é cerca de 6.4 l.mol^{-1} . Sendo a inclinação da reta 1.62, a concentração do DPN 0.0036 M , ϵ_{345} do DPN e da diodotirosina próximos de 2 e 6 respectivamente, deduz-se que ϵ_{345} do complexo é 80.

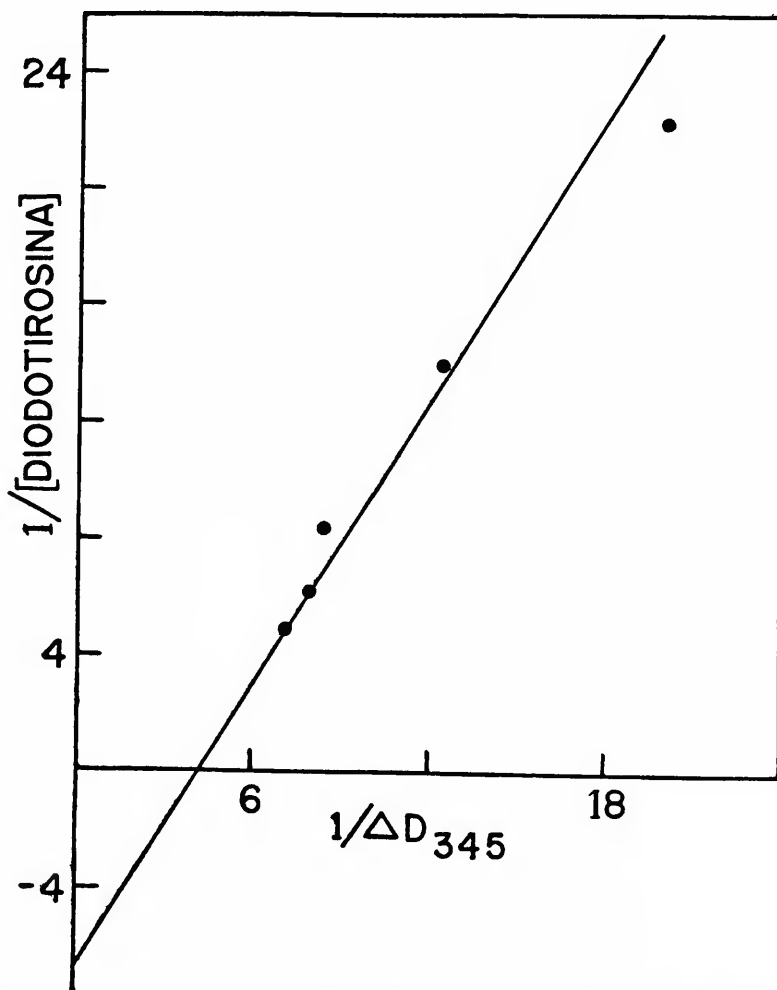


Fig. 5. Determinação espectrofotométrica da constante de associação do complexo de DPN com 3,5-diodotirosina.

DETERMINAÇÃO DA CONSTATANTE DE EQUILÍBRIO DO COMPLEXO DPN — DIODOTIROSINA

<i>Protocolo</i>	<i>“Blank”</i>									
Sol. de DPN	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
Sol. de diodotirosina	2.3	1.8	1.3	0.8	0.5	—	—	2.0	—	—
HCl a 4%	0.2	0.7	1.2	1.7	2.0	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5
H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5
D ₃₄₅	1.580	1.265	.953	.613	.400	.048	1.210	—	—	—
ΔD ₃₄₅	0.141	0.128	0.119	.081	.050					
1/ΔD ₃₄₅	7.09	7.81	8.40	12.34	20.0					
1/[Diodotirosina]	4.87	6.18	8.58	13.95	22.35					

*Determinação da constante de associação do complexo
riboflavina — diodotirosina*

Solução de riboflavina. Usou-se solução aquosa aproximadamente 1.3×10^{-4} M.

Solução de diodotirosina. Usou-se solução 0.1327 M em HCl aquoso a 4%.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos desta experiência são apresentados na página seguinte. A representação gráfica (Fig. 6) indica para a constante de associação o valor de 50 l.mol^{-1} , e isto seja à base das medidas a $380 \text{ m}\mu$ como daquelas a $490 \text{ m}\mu$.

Devido à incerteza na concentração da espécie complexante de riboflavina em meio ácido, não é possível calcular os coeficientes de extinção molar do complexo.

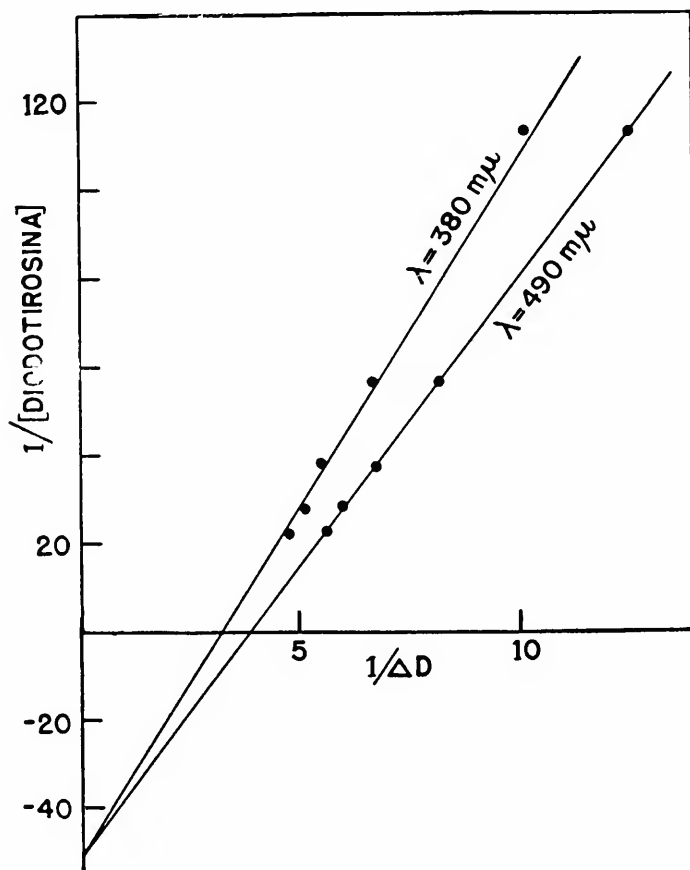


Fig. 6. Determinação espectrofotométrica da constante de associação do complexo riboflavina-diodotirosina.

DETERMINAÇÃO DA CONSTATANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO RIBOFLAVINA — DIODOTIROSINA

<i>Protocolo</i>	<i>“Blank”</i>									
Sol. de riboflavina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	—	—	2.0	2.0	—
Sol. de diodotirosina	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	1.0	0.4	—	—	—
HCl a 4 %	—	0.2	0.4	0.6	0.8	—	0.6	1.0	1.0	1.0
H ₂ O	—	—	—	—	—	2.0	2.0	—	—	2.0
D ₃₈₀	.850	.834	.817	.818	.840	.150	.066	.910	.907	
D ₄₉₀	.507	.488	.458	.422	.370	.050	.022	.281	.280	
ΔD_{380}	.209	.195	.182	.151	.099					
ΔD_{490}	.177	.167	.148	.122	.080					
1/ ΔD_{380}	4.78	5.12	5.49	6.62	10.1					
1/ ΔD_{490}	5.65	5.98	6.75	8.20	12.5					
1/[Diodotirosina]	22.62	28.27	37.70	56.55	113.1					

*Determinação da constante de associação do complexo
vitamina K₃ — diodotirosina*

1.^a Determinação

Solução de vitamina K₃: aquosa, 6.3×10^{-4} M.

Solução de diodotirosina: 0.1037 M em HCl a 4% .

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos desta experiência são apresentados na página seguinte. A representação gráfica indica que a constante de associação é 20 l. mol^{-1} (Fig. 7). Sendo a inclinação da reta 7.4, a concentração da vitamina 4.2×10^{-4} M, ϵ_{380} da vitamina 670, encontra-se que ϵ_{380} do complexo é 1500.

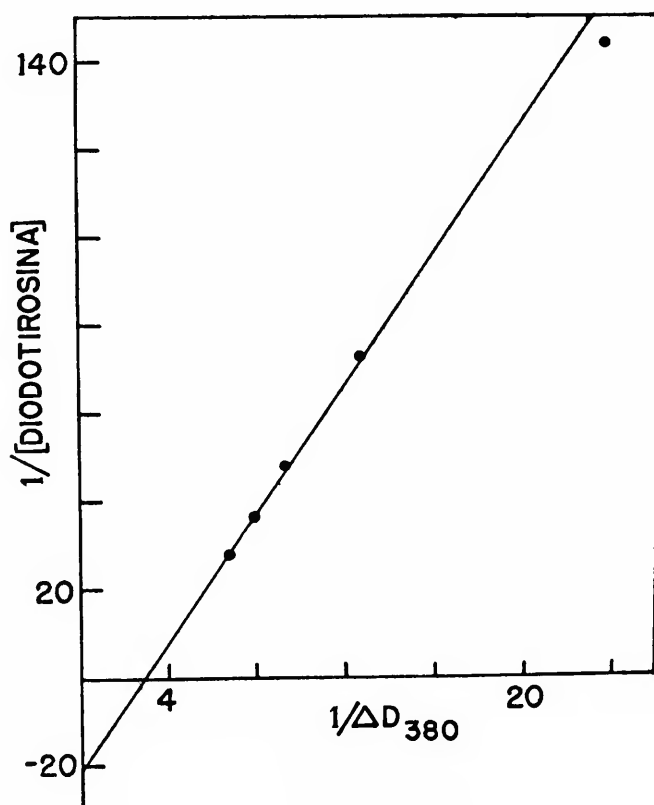


Fig. 7. Determinação espectrofotométrica da constante de associação do complexo menadiona-diodotirosina.

1.^a DETERMINAÇÃO DA CONSTATANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO VITAMINA K₃ — DIODOTIROSINA

<i>Protocolo</i>	<i>“Blank”</i>									
Sol. de vit. K ₃	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	—	—	2.0	2.0	—
Sol. de diodotirosina	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	1.0	0.2	—	—	—
HCl a 4%	—	0.2	0.4	0.6	0.8	—	0.8	1.0	1.0	1.0
H ₂ O	—	—	—	—	—	2.0	2.0	—	—	2.0
D ₃₈₀	0.560	0.519	0.462	0.417	0.358	0.115	0.023	0.288	0.292	
D ₃₉₀	0.390	0.352	0.305	0.261	0.219	0.098	0.020	0.153	0.155	
ΔD ₃₈₀	0.155	0.137	0.103	0.081	0.045					
ΔD ₃₉₀	0.138	0.120	0.092	0.067	0.046					
1/ΔD ₃₈₀	6.45	7.30	9.71	12.34	22.2					
1/ΔD ₃₉₀	7.24	8.33	10.8	14.9	21.7					
[Diodotirosina]	0.03457	0.02765	0.02074	0.01382	0.00691					
1/[Diodotirosina]	28.92	36.16	48.21	72.3	144.					

2.^a determinação

Solução de vitamina K₃: 5.82×10^{-4} M.

Solução de diodotirosina: 0.1037 M em HCl a 4% .

O protocolo, as medidas já corrigidas e os cálculos desta determinação são apresentados na página seguinte. A representação gráfica indica que a constante de associação é de 20 l.mol^{-1} em completo acôrdo com a primeira determinação. A inclinação da reta sendo 6.4, a concentração da vitamina 3.88×10^{-4} M e ϵ_{380} desta última 670, encontra-se que ϵ_{380} do complexo é 1500, em acôrdo com o valor da primeira determinação.

2.^a DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO VITAMINA K₃ — DIODOTIROSINA

<i>Protocolo</i>	<i>"Blank"</i>											
Sol. de vitamina K ₃	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	—	—	2.0	2.0	2.0	—	—
Sol. de diodotirosina	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	1.0	0.4	—	—	—	—	—
HCl a 4%	—	0.2	0.4	0.6	0.8	—	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O	—	—	—	—	—	2.0	2.0	—	—	—	2.0	2.0
D ₃₈₀	0.521	0.478	0.436	0.385	0.325	0.112	0.047	0.259	0.263			
D ₄₀₀	0.257	0.229	0.195	0.156	0.118	0.081	0.033	0.071	0.072			
ΔD_{380}	0.148	0.127	0.108	0.079	0.042							
ΔD_{400}	0.105	0.093	0.075	0.053	0.031							
1/ ΔD_{380}	6.75	7.87	9.26	12.65	23.8							
1/ ΔD_{400}	9.52	10.75	13.33	18.86	32.2							
1/[Diodotirosina]	28.92	36.16	48.21	72.3	14.4							

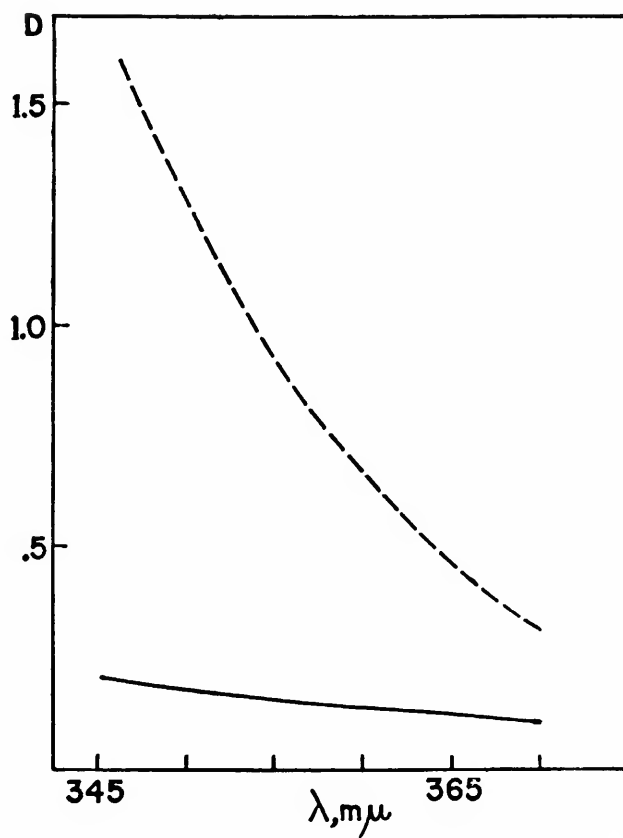


Fig. 8. ——— Espetro de absorção de uma solução 3.04×10^{-2} M de diiodotirosina em HCl aquoso a 1%; ---- idem, em presença de CLBC 0.193 M.

*Determinação da constante de equilíbrio do complexo
CLBC – diodotirosina*

(mantendo constante CLBC)

Solução de CLBC *: 0.029 M.

Solução de diodotirosina: 0.268 M em HCl a 4% .

O protocolo, as leituras e os cálculos aparecem na página seguinte. A projeção gráfica (Fig. 9) indica que a constante de equilíbrio é aproximadamente 1.6 l.mol^{-1} e que a inclinação da reta é 1.86. Levando em conta que a concentração do CLBC é 4.8×10^{-3} deduz-se que $\epsilon_{345} = 240$.

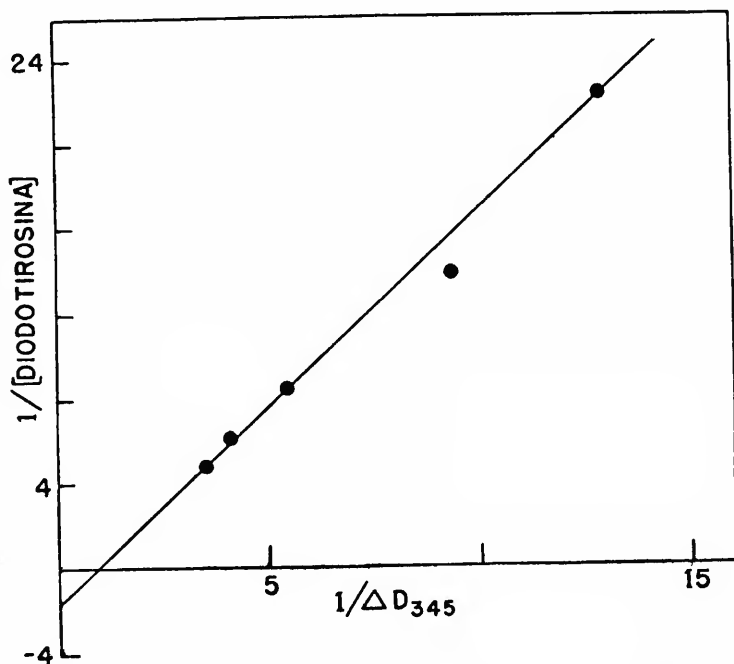


Fig. 9. Determinação da constante de equilíbrio do complexo CLBC-diodotirosina, mantendo constante a concentração do CLBC e variando aquela do aminoácido.

* E' lembrado que CLBC é o cloreto de 1-benzil-3-carboxamida piridônio.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANCE DE EQUILÍBRIO DO COMPLEXO CLBC — DIODOTIROSINA
(mantendo constante CLBC)

Protocolo

	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—	—
Sol. de CLBC	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—	—
Sol. de diodotirosina	2.3	1.8	1.3	0.8	0.5	—	2.0	—	—
Sol. de HCl a 4%	0.2	0.7	1.2	1.7	2.0	2.5	1.0	3.0	—
D_{345}	1.680	1.340	.973	.591	.380	.001	1.210	—	—
ΔD_{345}	.289	.251	.187	.107	.078				
$1/\Delta D_{345}$	3.46	4.00	5.34	9.34	12.82				
$1/[Diodotirosina]$	4.87	6.18	8.58	13.95	22.35				

"Blank"

*Determinação da constante de associação do complexo
diodotirosina — CLBC*

(mantendo constante a diodotirosina)

Solução de diodotirosina: Usou-se solução 0.030 M em HCl aquoso a 4% .

Solução de CLBC: Solução aquosa 0.568 M.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. A representação gráfica (Fig. 10) mostra que K vale 2.0 l.mol^{-1} e que a inclinação da reta é 2.41. Sabendo que $[\text{diodotirosina}] = 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, acha-se $\epsilon_{340} = 240$.

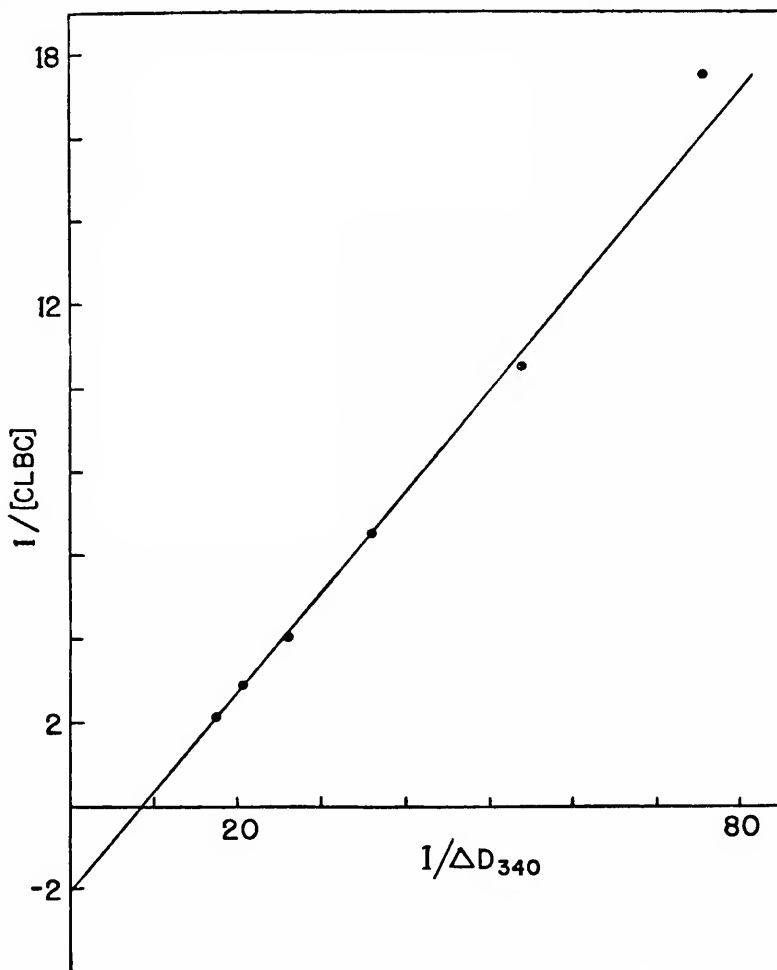


Fig. 10. Determinação espectrofotométrica da constante de associação do complexo CLBC-diodotirosina, mantendo constante a concentração do aminoácido e variando aquela do CLBC.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO DIODOTIROSINA — CLBC
(mantendo constante a diodotirosina)

<i>Protocolo</i>		<i>"Blank"</i>									
Sol. de diodotirosina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
Sol. de CLBC	2.5	1.8	1.3	0.8	0.5	0.3	—	—	—	2.0	—
H ₂ O	—	0.7	1.2	1.7	2.0	2.2	2.5	2.5	2.5	0.5	v.0
HCl a 4%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	—
D ₃₄₀	.830	.682	.536	.393	.272	.203	.047	.044	.170	—	—
ΔD_{340}	.573	.484	.381	.280	.185	.133					
1/ ΔD_{340}	1.74	2.06	2.62	3.57	5.40	7.52					
1/[CLBC]	2.11	2.90	4.06	6.60	10.56	17.58					

*Determinação da constante de associação do complexo
diodotirosina — CLBC mantendo fixa a força iônica*

Solução de diodotirosina: 0.030 M em HCl aquoso a 4% .

Solução de CLBC: aquosa 0.568 M.

Solução de perclorato de sódio: aquosa 0.568 M.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. As misturas centrais turvaram-se pela presença de perclorato de sódio e tiveram pois de ser abandonadas. A representação gráfica (Fig. 11) em conjunto com aquela de experiência idêntica mas sem manter constante a força iônica, indica que esta última não tem efeito, pois os pontos das duas experiências caem sobre a mesma reta.

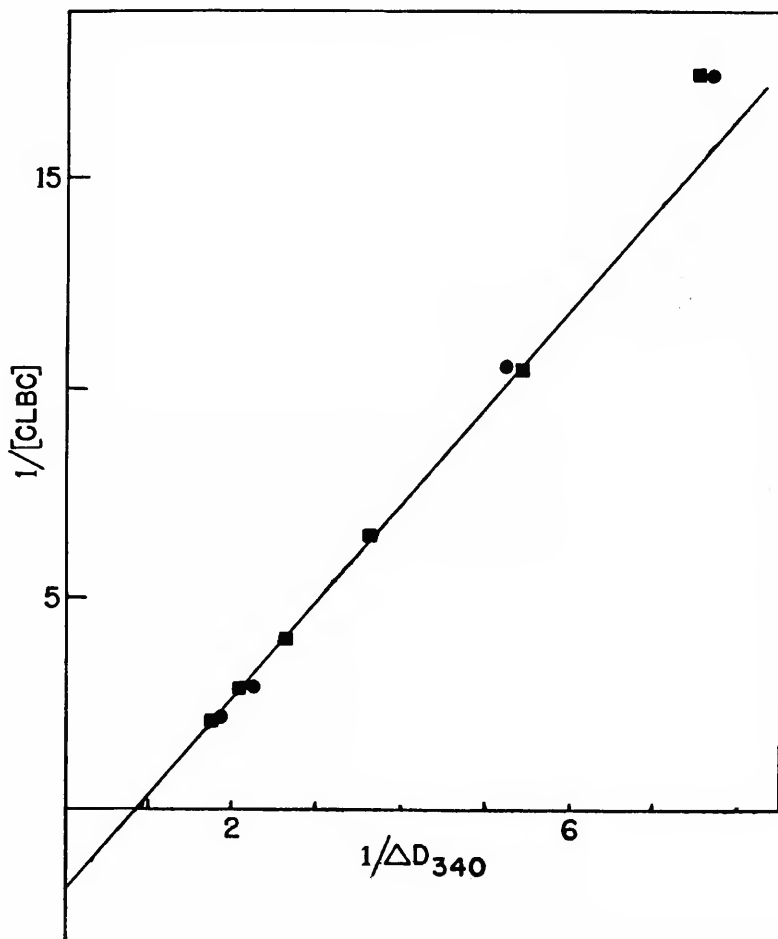


Fig. 11. Determinação da constante de equilíbrio do par diodotirosina-CLBC mantendo fixa a força iônica (●).

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO DIODOTIROSINA — CLBC MANTENDO
FIXA A FORÇA IÔNICA

<i>Protocolo</i>	<i>“Blank”</i>									
Sol. de diodotirosina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
Sol. de CLBC	2.3	1.8	1.3	0.8	0.5	0.3	—	—	2.0	—
Sol. de NaClO ₄	0.2	0.7	1.2	1.7	2.0	2.2	2.3	0.5	0.5	2.5
H ₂ O	—	—	—	—	—	—	0.2	2.0	—	—
HCl a 4%	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5
			← turvação →							
D ₃₄₀	0.538	0.447	—	—	0.191	0.131	0.038	0.035	0.170	—
1/ΔD ₃₄₀	1.86	2.25	—	—	5.23	7.63				
1/[CLBC]	2.11	2.90	4.06	6.60	10.56	17.58				

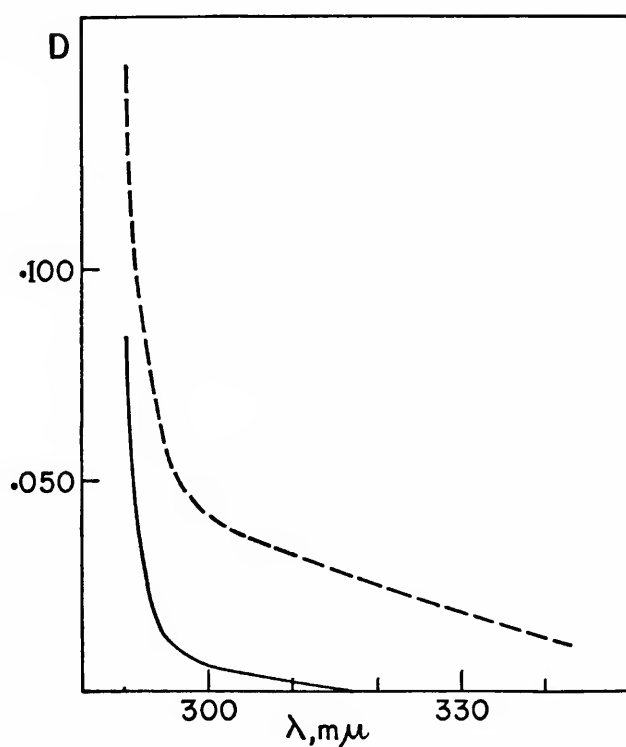


Fig. 12. ——— Espetro de absorção de uma solução 1.9×10^{-3} M de tirosina em HCl aquoso a 2%; ——— idem, em presença de 5.2×10^{-2} M CLBC. As celas foram equipadas com redutores de quartzo, os quais encurtam o caminho óptico de 1 cm para 0.05 cm.

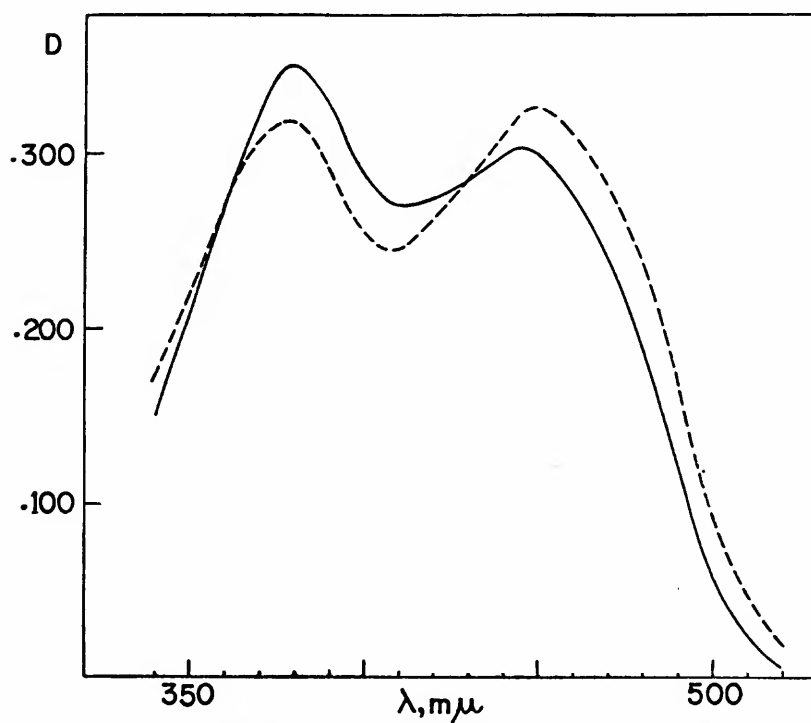


Fig. 13. — Espetro de absorção de uma solução aproximadamente 3×10^{-5} M de riboflavina em HCl aquoso 1.33%; ---- idem, em presença de 9.1×10^{-2} M tirosina.

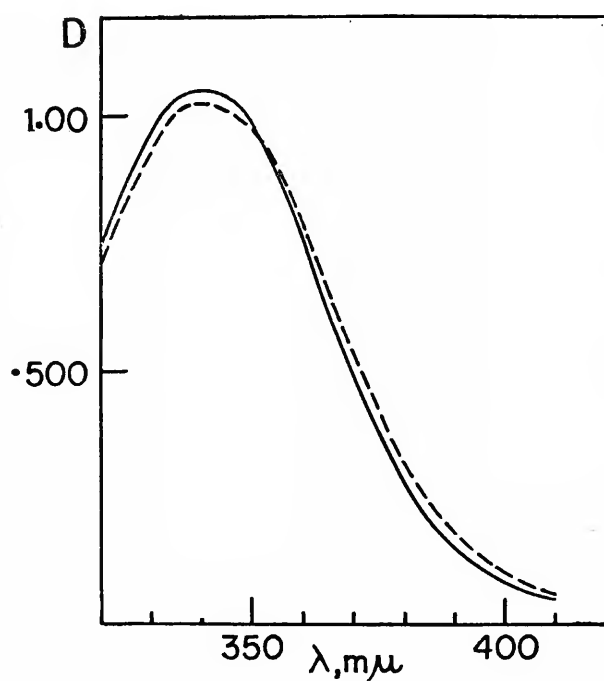


Fig. 14. — Espetro de absorção de uma solução 4.0×10^{-4} M de menadiona em ácido clorídrico aquoso; — — — idem, em presença de 4.1×10^{-2} M tirosina.

Determinação da constante de equilíbrio do complexo

L-tirosina — DPN

Solução de L-tirosina: 0.8056 M em HCl a 7.2% .

Solução de DPN: 0.0408 M.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. O valor da constante de equilíbrio, determinado gráficamente (Fig. 15) é 0.8 l.mol^{-1} . O coeficiente angular da reta sendo 1.06, a concentração do DPN $6.8 \times 10^{-3} \text{ M}$, deduz-se que $\epsilon_{c350} = 200$.

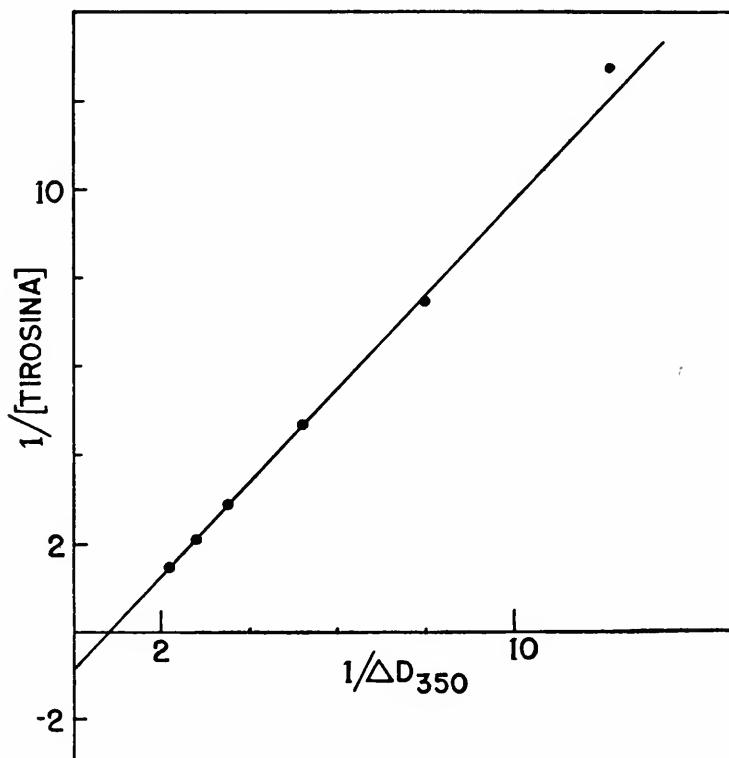


Fig. 15. Determinação espectrofotométrica da constante de equilíbrio do complexo L-tirosina — DPN.

DETERMINAÇÃO DA CONSTATANTE DE EQUILÍBRIO DO COMPLEXO L-TIROSINA — DPN

<i>Protocolo</i>	<i>"Blank"</i>									
Sol. de DPN	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
Sol. de tirosina	2.5	1.8	1.3	0.8	0.5	0.3	—	2.0	—	—
Sol. de HCl a 7.2%	—	0.7	1.2	1.7	2.0	2.2	2.5	0.5	2.5	2.5
H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5
D ₃₅₀	.695	.561	.449	.338	.254	.202	.103	.098	—	—
ΔD_{350}	.467	.368	.281	.195	.126	.084				
1/ ΔD_{350}	2.14	2.71	3.55	5.13	7.93	11.90				
1/[Tirosina]	1.49	2.06	2.86	4.65	7.45	12.4				

*Determinação da constante de equilíbrio do complexo
CLBC — L-tirosina
(mantendo constante a tirosina)*

Solução de L-tirosina: 0.0684 M em HCl a 4% .

Solução de CLBC: 0.568 M em água.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. A representação gráfica usual (Fig. 16) mostra

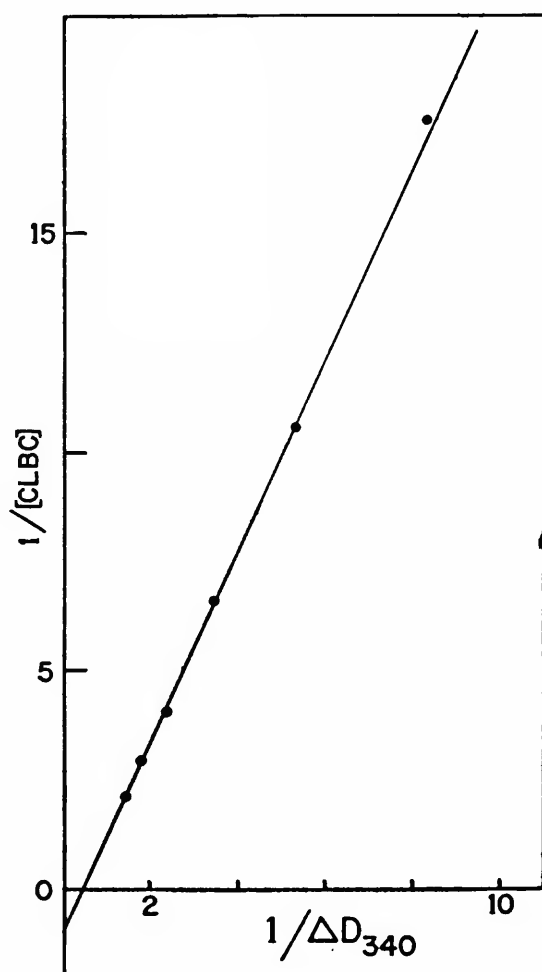


Fig. 16. Determinação espectrofotométrica da constante de associação do complexo CLBC — L-tirosina mantendo constante a concentração de tirosina e variando aquela do CLBC.

DETERMINAÇÃO DA CONSTATANTE DE EQUILÍBRIO DO COMPLEXO L-TIROSINA — CLBC
(mantendo constante tirosina)

<i>Protocolo</i>	<i>“Blank”</i>									
Sol. de tirosina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
Sol. de CLBC	2.5	1.8	1.3	0.8	0.5	0.5	0.3	—	2.0	—
H ₂ O	—	0.7	1.2	1.7	2.0	2.2	2.5	2.5	0.5	2.5
HCl a 4%	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5
D ₃₄₀	.957	.733	.548	.362	.235	.148	.003	.190	—	—
ΔD_{340}	.720	.562	.425	.286	.188	.120				
1/ ΔD_{340}	1.39	1.77	2.35	3.49	5.32	8.33				
1/[CLBC]	2.11	2.90	4.06	6.60	10.56	17.58				
$\Delta D_{340}/[\text{CLBC}]$	1.519	1.629	1.725	1.887	1.985	2.109				

que K vale 0.9 l.mol^{-1} . Já que a L-tirosina, componente mantido constante, não absorve na região investigada, pôde-se também aplicar a equação de Foster, Hammick e Wardley ⁽⁶³⁾. A representação gráfica (Fig. 17) indica para a constante de equilíbrio o valor aproximado de 0.86 l.mol^{-1} . Sendo o coeficiente angular da reta (na Fig. 16) 2.18, a concentração da tirosina 0.0114 , deduz-se que $\epsilon_{c340} = 220$. O mesmo valor é obtido a partir do gráfico da Fig. 17.

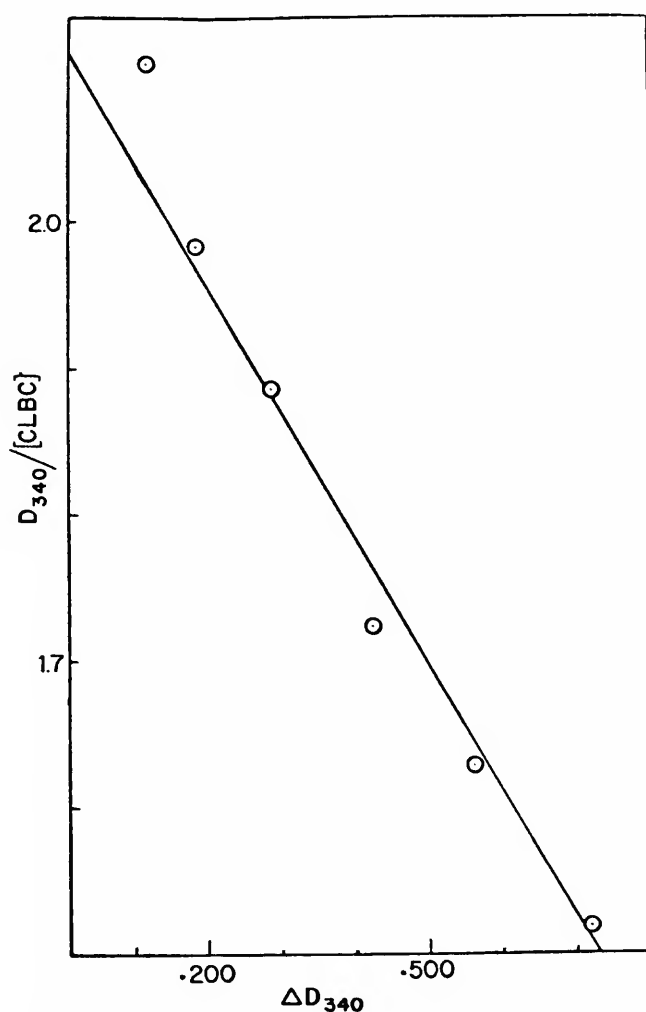


Fig. 17. Determinação espectrofotométrica pela equação de Foster, Hammick e Wardley da constante de equilíbrio do complexo CLBC — L-tirosina. A concentração do aminoácido foi mantida constante e aquela da CLBC foi variada.

Determinação da constante de associação do complexo

L-tirosina — CLBC

(mantendo constante CLBC)

Solução de L-tirosina: 0.8056 M em HCl a 7.2% .

Solução de CLBC: aquosa 0.0636 M.

O protocolo, as leituras corrigidas, e os cálculos aparecem na página seguinte. A representação gráfica (Fig. 18) indica que K vale 0.6 l.mol^{-1} . Sendo o coeficiente angular da reta 1.58, a concentração do CLBC 0.0106 M, encontra-se que $\epsilon_{c350} = 250$.

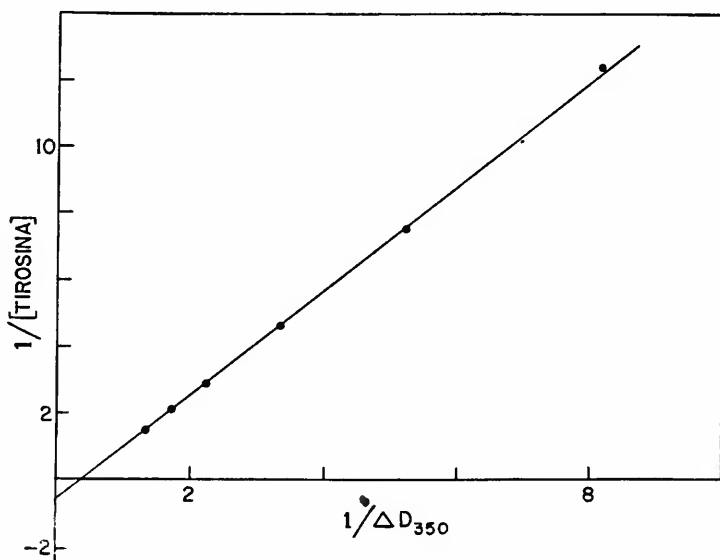


Fig. 18. Determinação espectrofotométrica do complexo L-tirosina — CLBC, A concentração de CLBC foi mantida fixa e aquela do aminoácido variada.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE EQUILÍBRIO DO COMPLEXO L-TIROSINA — CLBC

(mantendo constante CLBC)

<i>Protocolo</i>											<i>Blank</i> "
Sol. de CLBC	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	5.0	—	—
Sol. de tirosina	2.5	1.8	1.3	0.8	0.5	0.5	0.3	—	—	2.0	—
Sol. de HCl a 7.2%	—	0.7	1.2	1.7	2.0	2.2	2.5	1.0	2.5	1.0	2.5
H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5
D ₃₅₀	0.904	.700	.528	.356	.230	.151	.013	.100			
ΔD_{350}	.766	.597	.450	.303	.192	.123					
1/ ΔD_{350}	1.30	1.67	2.22	3.30	5.21	8.13					
1/[Tirosina]	1.49	2.06	2.86	4.65	7.45	12.40					

*Determinação da constante de equilíbrio do complexo
riboflavina — L-tirosina
(em HCl aquoso a 1.33%)*

Sol. de riboflavina: Solução aquosa 2.2×10^{-4} M.

Sol de L-tirosina: 0.3166 M em HCl aquoso a 2.66%. Esta solução é saturada e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente, diluindo uma alíquota e comparando a absorção a $275 m\mu$ com aquela de uma solução de tirosina de concentração conhecida.

O protocolo, as leituras já corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. A projeção gráfica (Fig. 19) mostra que o valor de K depende do comprimento de onda da luz empregada,

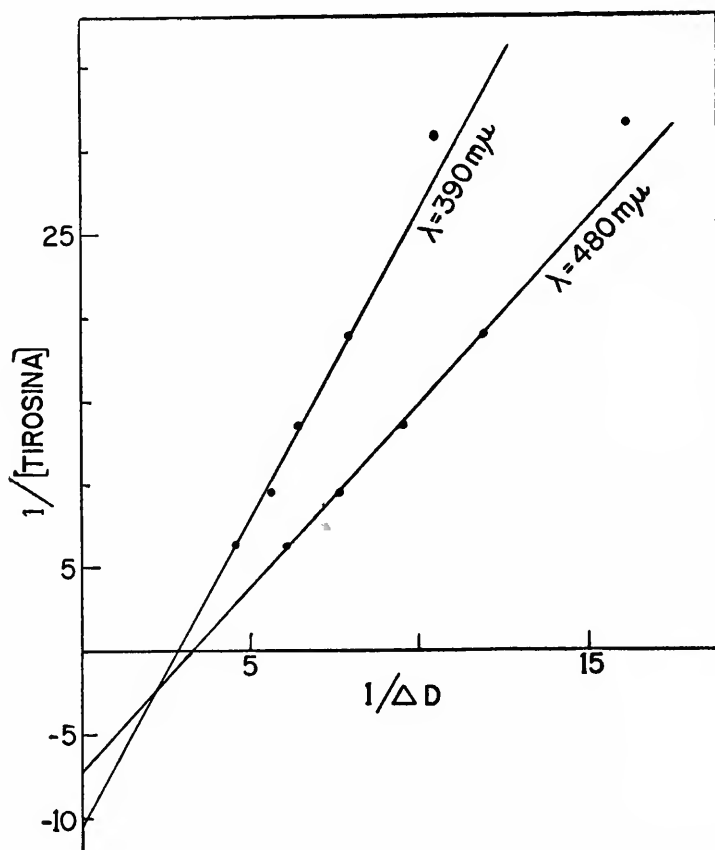


Fig. 19. Determinação espectrofotométrica da constante de equilíbrio do complexo riboflavina — L-tirosina em HCl aquoso a 1.33%.

DETERMINAÇÃO DA CONSTATANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO RIBOFLAVINA — L-TIROSINA EM
HCl AQUOSO A 1.33%

<i>Protocolo</i>	<i>"Blank"</i>									
Solução de riboflavina	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	—
Solução de tirosina	1.5	1.0	0.7	0.5	0.3	—	1.5	1.5	1.5	—
HCl aquoso a 2.66%	—	0.5	0.8	1.0	1.2	1.5	—	1.5	1.5	—
H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	1.5	1.5	—
D ₃₉₀	.830	.856	.885	.912	.945	1.032	.019	.019	.019	—
D ₄₈₀	.751	.714	.686	.664	.641	.577	.008	.008	.008	—
ΔD_{390}	.221	.189	.156	.126	.091					
ΔD_{480}	.166	.132	.105	.084	.062					
1/ ΔD_{390}	4.52	5.29	6.41	7.93	10.9					
1/ ΔD_{480}	6.02	7.57	9.52	11.90	16.13					
1/[Tirosina]	6.32	9.48	13.54	18.96	31.6					

obtendo-se os valores 10 l.mol^{-1} e 7 l.mol^{-1} com luzes de $390 \text{ m}\mu$ e $480 \text{ m}\mu$ respectivamente. Pequenas discrepâncias são às vezes observadas ⁽⁶⁵⁾.

*Determinação da constante de equilíbrio do complexo
riboflavina — L-tirosina
(em HCl a 0.53%)*

Solução de riboflavina: aquosa, $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Solução de L-tirosina: 0.1825 M em HCl aquoso a 1.6%. Esta solução é saturada e sua concentração foi determinada medindo a absorção a $275 \text{ m}\mu$ de uma alíquota diluída e comparando-a com aquela de uma solução de tirosina de concentração conhecida.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. Já que os valores de ΔD são muito baixos e calculados a partir de altas densidades ópticas, o método torna-se aqui muito pouco sensível. Assim, a projeção gráfica (Fig. 20) mostra que, se bem que se possa passar uma reta pelos pontos determinados com luz de $390 \text{ m}\mu$ (.), não se pode fazer o mesmo com os pontos ($\square$) obtidos com luz de $480 \text{ m}\mu$.

A constante de equilíbrio é de cerca de 10 l.mol^{-1} .

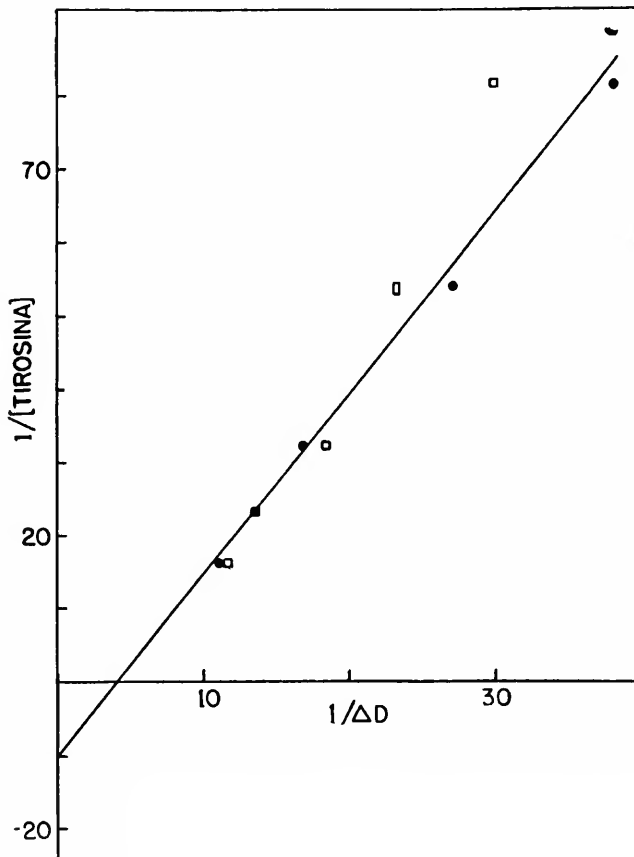


Fig. 20. Determinação da constante de equilíbrio do complexo riboflavina — L-tirosina em HCl aquoso a 0.53%. Os pontos representados por bolas pretas (●) foram obtidos com luz de 390 $m\mu$ e aqueles representados por quadradinhos (□) com luz de 480 $m\mu$.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE EQUILÍBRIO DO COMPLEXO RIBOFLAVINA — L-TIROSINA EM
HCl 0.53%

<i>Protocolo</i>	<i>"Blank"</i>									
Solução de riboflavina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	—	—
Solução de tirosina	1.0	0.7	0.5	0.3	0.2	—	—	1.0	—	—
HCl aquoso a 1.6%	—	0.3	0.5	0.7	0.8	1.0	—	—	1.0	1.0
H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	2.0	2.0	2.0
D ₃₉₀	1.045	1.060	1.070	1.095	1.105	1.130	1.130	.007	—	—
D ₄₈₀	0.960	.945	.923	.910	.900	.867	.867	.003	—	—
ΔD ₃₉₀	.092	.075	.060	.037	.026	—	—	—	—	—
ΔD ₄₈₀	.090	.076	.055	.043	.033	—	—	—	—	—
1/ΔD ₃₉₀	10.8	13.3	16.6	27.0	38.4	—	—	—	—	—
1/ΔD ₄₈₀	11.1	13.2	18.2	23.2	30.0	—	—	—	—	—
1/[Tirosina]	16.43	23.5	32.8	54.7	82.1	—	—	—	—	—

*Determinação da constante de associação do complexo
vitamina K₃ — tirosina*

Solução de tirosina: Preparou-se uma solução 0.790 M em HCl aquoso a 7.2%.

Solução de vitamina K₃: aquosa 6.6×10^{-4} M.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos desta experiência são apresentados na página seguinte. A representação gráfica (Fig. 21) indica para a constante de associação o valor de 1.4 l.mol^{-1} . De outro lado, sendo a inclinação da reta igual a 0.82, a concentração da vitamina na cela 4.4×10^{-4} , ϵ_{380} da vitamina 670, deduz-se para o coeficiente de extinção molar do complexo o valor aparente de 2000.

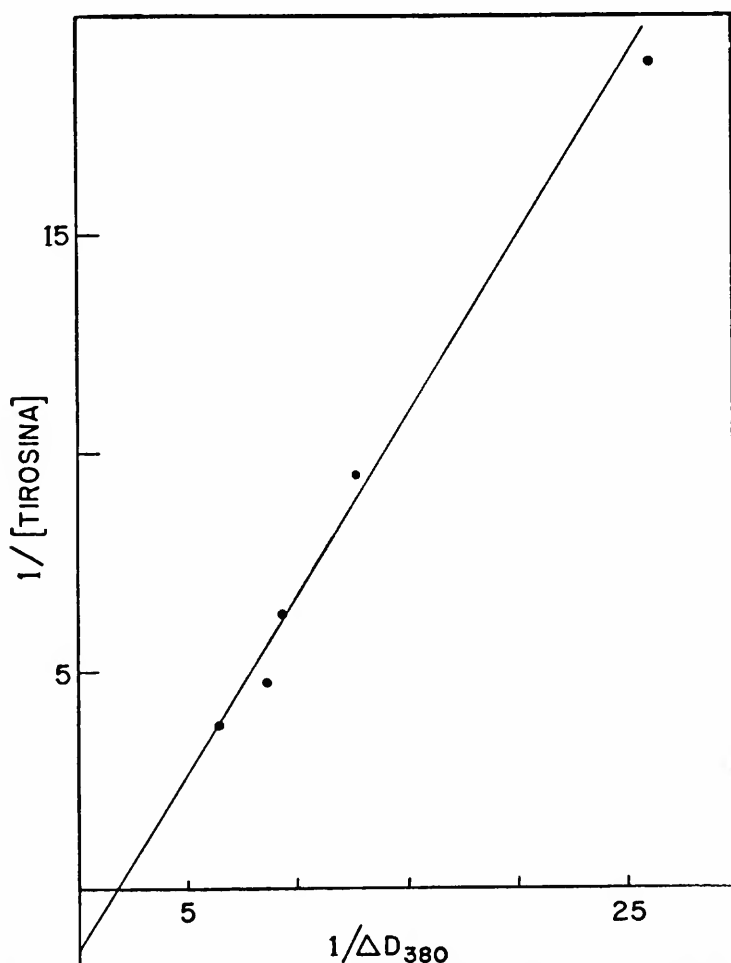


Fig. 21. Determinação da constante de associação do complexo vitamina K₃ — tirosina.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO VITAMINA K₃ — TIROSINA

<i>Protocolo</i>												<i>"Blank"</i>
Sol. de vit. K ₃	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	—	—	2.0	2.0	—	—	—
Sol. de tirosina	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	1.0	0.4	—	—	—	—	—
HCl 12/5 N	—	0.2	0.4	0.6	0.8	—	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O	—	—	—	—	—	2.0	2.0	—	—	—	2.0	2.0
D ₃₈₀	0.516	0.462	0.441	0.400	0.346	0.062	0.023	0.298	0.294			
ΔD_{380}	0.158	0.116	0.108	0.080	0.038							
1/ ΔD_{380}	6.33	8.62	9.26	12.50	26.3							
[Tirosina]	0.2633	0.2106	0.1580	0.1053	0.0526							
1/[Tirosina]	3.79	4.74	6.32	9.49	18.98							

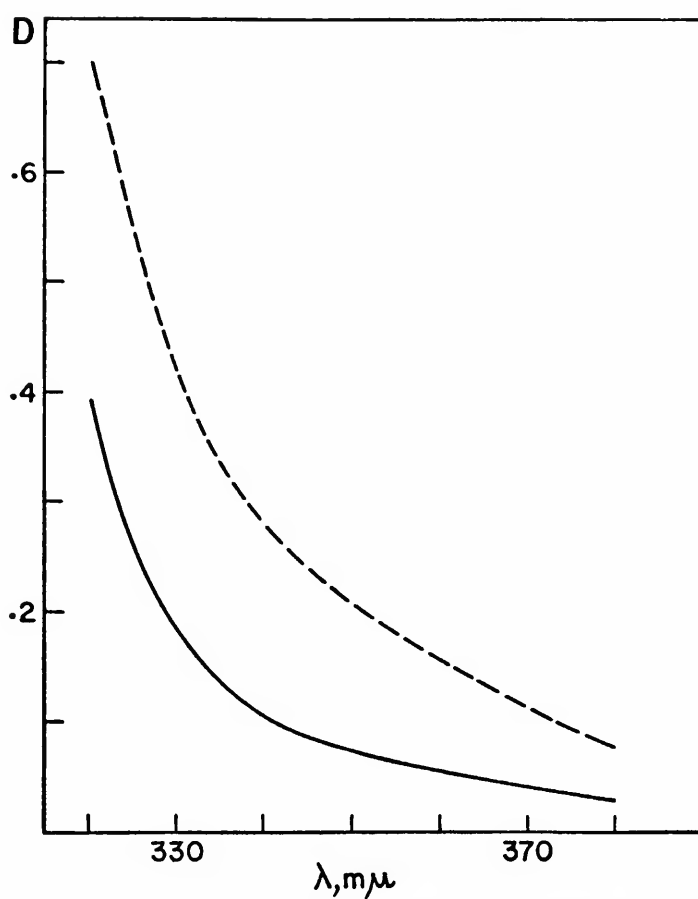


Fig. 22. — Espetro de absorção de uma solução ácida aquoso-etanólica 4.1×10^{-3} M de diiodotironina; — em presença de CLBC 0.263 M.

*Determinação da constante de associação do complexo
3,5-diodotironina — CLBC em álcool aquoso*

Solução de 3,5-Diodotironina: 0.0793 gr de diodotironina foram pesados num balão volumétrico de 5 ml. Juntou-se 0.5 ml de etanol, em seguida 0.1 ml de HCl concentrado e completou-se até a marca com 1:1 (v/v) EtOH-H₂O.

$$[\text{diodotironina}] = 0.030 \text{ M}$$

Solução de CLBC: 0.390 M em 1:1 (v/v) EtOH-H₂O.

Solução clorídrica aquoso-etanólica: 0.1 ml HCl concentrado adicionado a 4.9 ml de 1:1 EtOH-H₂O.

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos são apresentados na página seguinte. A representação gráfica (Fig. 23) mostra que a reta passa pela origem, ou seja, que o equilíbrio é desprezível e que a interação é de contato.

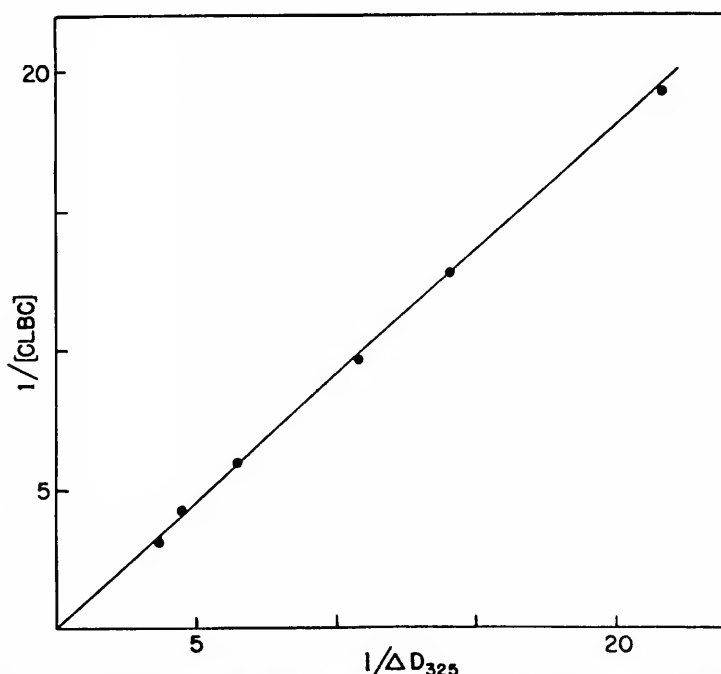


Fig. 23. Determinação espectrofotométrica da constante de associação do complexo 3,5-diodotironina — CLBC em álcool aquoso.

*Determinação da constante de associação do complexo
diodotirosina — CLBC em álcool aquoso*

Solução de diodotirosina: Pesaram-se 0.0724 gr do dihidrato da diodotirosina num balão volumétrico de 5 ml. Adicionou-se 0.5 ml de etanol, 0.1 ml de HCl concentrado e completou-se até a marca com 1:1 (v/v) EtOH-H₂O.

$$[\text{diodotirosina}] = 0.0308 \text{ M.}$$

Solução de CLBC: 0.390 M em 1:1 (v/v) EtOH-H₂O.

Solução clorídrica aquoso-etanólica: 0.2 ml de HCl concentrado adicionados a 9.8 ml de (1:1) EtOH-H₂O.

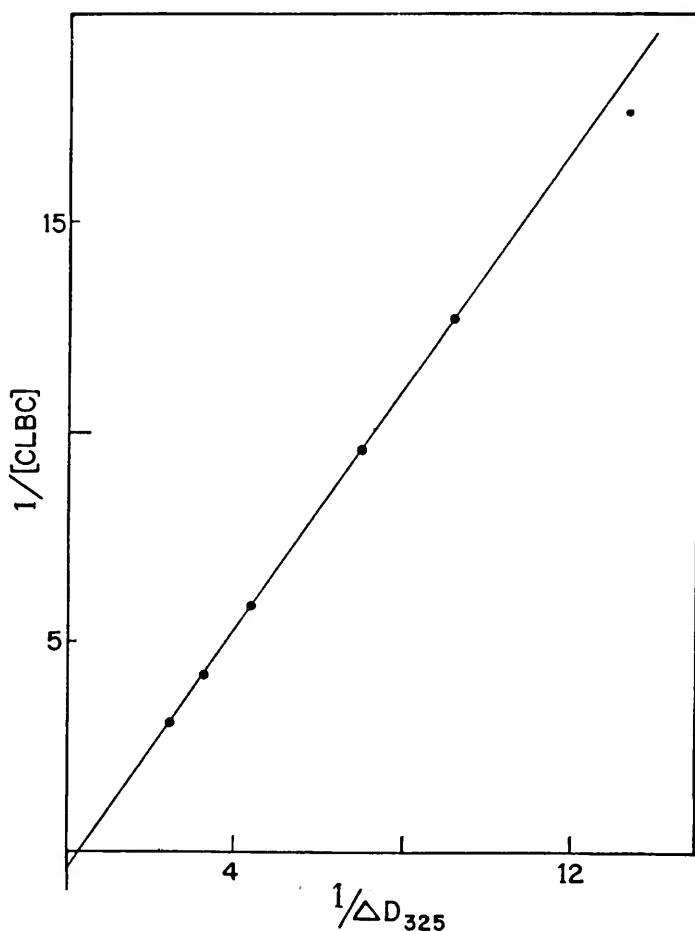


Fig. 24. Determinação espectrofotométrica da constante de associação do complexo diodotirosina — CLBC em álcool aquoso.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO DIODOTIROSINA — CLBC EM
ETANOL AQUOSO

<i>Protocolo</i>												<i>"Blank"</i>
Sol. de diodotirosina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
Sol. de CLBC	2.5	1.8	1.3	0.8	0.6	0.4	—	—	—	—	2.0	—
1:1 (v/v) EtOH-H ₂ O	—	0.7	1.2	1.7	1.9	2.1	2.5	2.5	2.5	2.5	0.5	2.5
Sol. clorídr. aq. etanólica	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5
D ₃₂₅	1.270	.968	.757	.537	.447	.352	.174	.177	.543	—	—	—
D Δ_{325}	.417	.304	.229	.144	.109	.068	—	—	—	—	—	—
1/ ΔD_{325}	2.40	3.29	4.36	6.94	9.17	14.7	—	—	—	—	—	—
1/[CLBC]	3.07	4.22	5.91	9.60	12.74	19.20	—	—	—	—	—	—

O protocolo, as leituras corrigidas e os cálculos aparecem na página seguinte. A representação gráfica (Fig. 24) mostra que a associação é muito pequena, valendo K aproximadamente 0.4 l.mol^{-1} . Sendo $[\text{diodotirosina}] = 5.1 \times 10^{-3} \text{ M}$, a inclinação da reta 1.43, deduz-se para ϵ_{c325} o valor aproximado de 700.

Influência da diodotirosina sobre a fluorescência da riboflavina

Solução de riboflavina: Solução aquosa $7.05 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Solução de diodotirosina: Solução aquosa aproximadamente saturada.

A concentração foi determinada espectrofotometricamente, pela absorção a $285 \text{ m}\mu$, e encontrada ser $1.37 \times 10^{-3} \text{ M}$.

O protocolo, as leituras e os cálculos aparecem na página seguinte. A Fig. 25 mostra que projetando-se I_0/I vs. a concentração da diodotirosina, obtem-se uma reta cujo coeficiente angular é 115 l.mol^{-1} .

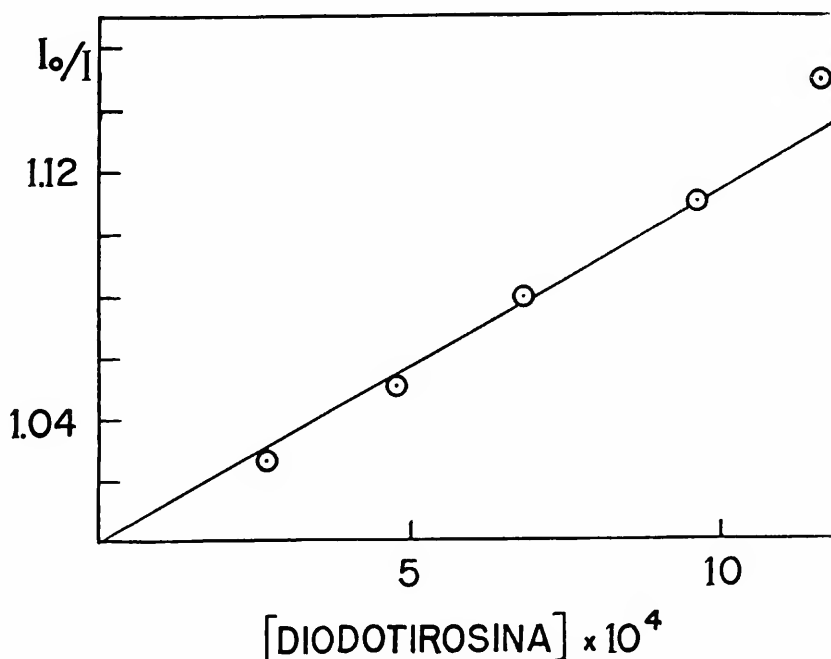


Fig. 25. "Quenching" da fluorescência da riboflavina pela diodotirosina.

EFEITO DA DIODOTIROSINA SOBRE A FLUORESCÊNCIA DA RIBOFLAVINA

Sol. de riboflavina	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—
Sol. de diodotirosina	8.5	7.0	5.0	3.5	2.0	—	—
Tampão acetato, 0.2 M, pH 4.59	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
H ₂ O	—	1.5	3.5	5.0	6.5	8.5	9.5
Fluorescência	87	90	92 1/2	95	97 1/2	100	0
I ₀ /I	1.15	1.11	1.08	1.05	1.02	—	—
[Diodotirosina]x10 ⁴	11.64	9.59	6.85	4.80	2.74	—	—
[Riboflavina]x10 ⁶	← 3.93	3.95	7.05	→ 3.96	3.95	3.95	3.95
pH							

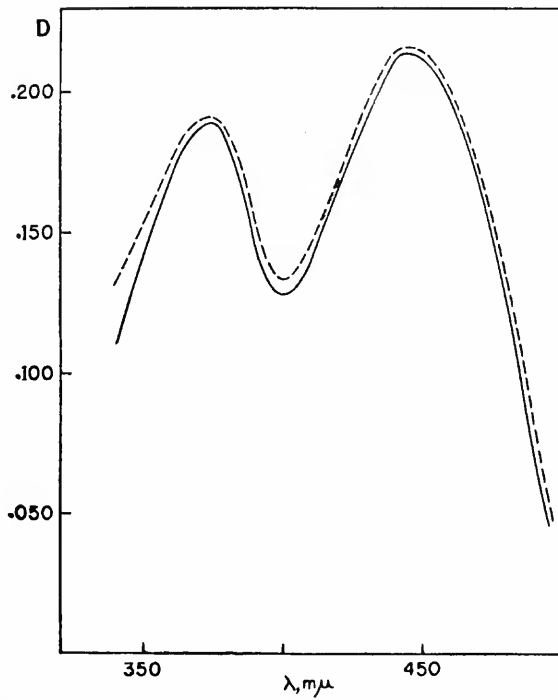


Fig. 26. ——— Espetro de absorção de uma solução aquosa 1.83×10^{-5} M de riboflavina; — — — — idem, em presença de diiodotirosina 1.26×10^{-3} M; pH das soluções, 5.15.

Influência da temperatura sobre a supressão da fluorescência da riboflavina pela diodotirosina

Solução de riboflavina: aquosa, 1.83×10^{-4} M.

Solução de diodotirosina: aquosa, 1.49×10^{-3} M.

Tampão acetato: 0.2 M, pH 5.05.

O protocolo, as leituras e os cálculos aparecem na página seguinte. A Fig. 27 mostra que o coeficiente angular da reta

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K Q$$

diminui com o aumento da temperatura. Assim, a 17°C, K vale 140 l.mol^{-1} e a 65°, 77 l.mol^{-1} . Estes valores são, porém, aproximados.

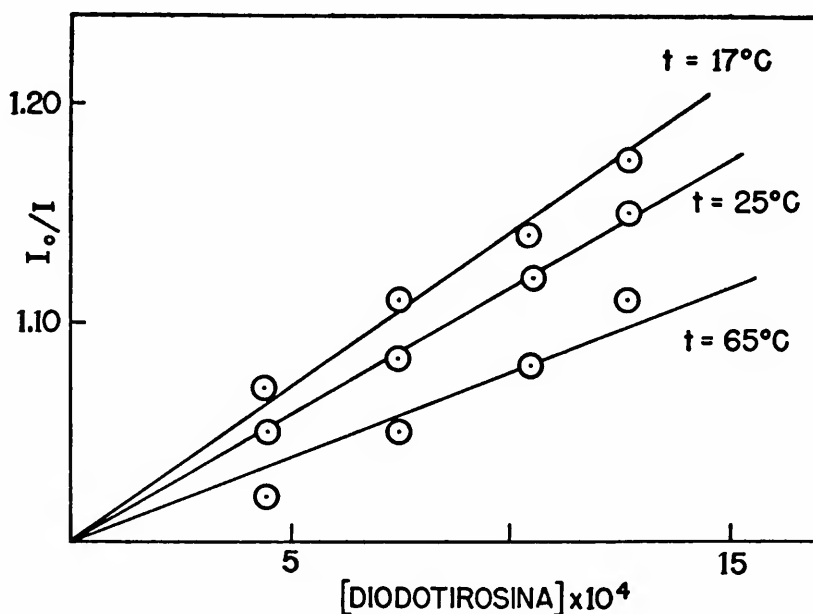


Fig. 27. "Quenching" da fluorescência da riboflavina pela diodotirosina a diferentes temperaturas.

INFLUENCIA DA TEMPERATURA SOBRE A SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA DA RIBOFLAVINA
PELA DIODOTIROSINA

Sol. de riboflavina	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—	—
Sol. de diodotirosina	8.5	7.0	5.0	3.0	—	8.5	—
Tampão acetato	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
H ₂ O	—	1.5	3.5	5.5	8.5	1.0	9.5
pH	← 5.15 →						
[Riboflavina]x10 ⁵	← 1.83 →						
[Diodotirosina]x10 ⁴	12.66	10.43	7.45	4.47	—	12.66	—
Fluorescência a 17°C	85	87.5	90	93.5	100	0	—
I ₀ /I a 17°C	1.17-1.18	1.14	1.11	1.07	100	0	—
Fluorescência a 25°C	87	89	92.5	95.5	100	0	—
I ₀ /I a 25°C	1.15	1.12	1.08	1.05	100	0	—
Fluorescência a 65°C	90	92.5	95	98	100	0	—
I ₀ /I a 65°C	1.11	1.08	1.05	1.02	100	0	—

*Efeito da diodotirosina e do íon cloreto sobre a reação
fotoquímica da menadiona*

Solução de menadiona: aquosa, aproximadamente 6×10^{-4} M.

Solução de diodotirosina: aquosa, aproximadamente 1.5×10^{-3} M.

Tampão acetato: 0.2 M, pH 5.05.

Solução de cloreto de sódio: 0.300 gr de um produto puríssimo (E. Merck Darmstadt) em 100 ml de água.

O protocolo e as leituras referentes a esta experiência aparecem na página seguinte. O tubo contendo diodotirosina e menadiona serviu como “standard”, pois sua fluorescência é relativamente alta e não se altera pelo efeito da irradiação. Também a fluorescência da solução contendo cloreto é estável; entretanto, aquela contendo simplesmente a vitamina aumenta sob o efeito da irradiação até alcançar 63 unidades, após o que, deixada em repouso, cai outra vez a valor ligeiramente superior àquele inicial.

EFEITO DA DIDOTIROSINA E DO ÍON CLORETO SOBRE A REAÇÃO FOTOQUÍMICA DA MENADIONA

Solução de vitamina K ₃	4.0	4.0	—	—	—
Solução de didotirosina	5.5	—	5.5	—	—
Tampão acetato	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solução de cloreto de sódio	—	5.5	—	5.5	—
H ₂ O	—	—	4.0	4.0	9.5
Fluorescência	60	15	91	0	0
	60	63*	—	—	—
[diodotirosina]x10 ⁴	8.2	—	8.2	—	—
[Cl ⁻]x10 ²	—	2.8	—	2.8	—

* Sob o efeito da irradiação

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

No presente trabalho analisou-se a possibilidade do hormônio tiroxina agir por um mecanismo essencialmente físico, qual seja o de facilitar transições entre estados de diferente multiplicidade. Esta hipótese foi investigada sob três diferentes ângulos e mostrou ser compatível com o resultado das três investigações.

A evidência mais positiva e direta é aquela fornecida pelo efeito da variação da estrutura sobre a atividade, pois foi demonstrado que as constantes dos substituintes calculados a partir dos efeitos hormonais podem ser utilizadas na expressão de um fenômeno que depende da transição entre estados de diferente multiplicidade.

A formação de complexos moleculares de modelos da tiroxina com certos fatores da sequência respiratória também fornece forte apoio, especialmente se ficar confirmado que a complexação se dá realmente pelos átomos de iodo, como é indicado pelos resultados experimentais.

Ulterior evidência é a supressão da fluorescência da riboflavina e a inibição da reação fotoquímica da vitamina K₃ pela diodotirosina.

Entretanto, ulteriores e amplas investigações são necessárias para confirmar a presente hipótese. Neste sentido, é de se notar que a catálise por substâncias contendo átomos pesados é um fenômeno predizível, que somente agora começa a ser pesquisado e do qual ainda não se conhecem exemplos.

Ao lado e independentemente da presente hipótese, os resultados aqui apresentados têm importância de ordem mais geral. Torna-se, assim potencialmente possível que a interação de fatores da sequência respiratória com grupos fenólicos das enzimas contribua para a ligação destes fatores às enzimas. A complexação de modelos da tiroxina com estes fatores é, de outro lado, de potencial importância com respeito à elucidação dos múltiplos efeitos biológicos da tiroxina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) S. Glasstone, K. J. Laidler e H. Eyring, "The Theory of Rate Processes", McGraw-Hill, New York, 1941. Extraído de C. Reid, ref. (11).
- (2) M. Kasha, *J. Chem. Phys.* 20, 71 (1952).
- (3) E. H. Gilmore, G. E. Gibson e D. S. McClure, *J. Chem. Phys.* 20, 829 (1952).
- (4) D. S. McClure, *J. Chem. Phys.* 17, 905 (1949).
- (5) D. S. McClure, N. W. Blake e P. L. Hanst, *J. Chem. Phys.* 22, 255 (1954).
- (6) I. J. Graham-Bryce e J. M. Corkill, *Nature* 186, 965 (1960).
- (7) M. Kasha e R. S. Becker, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 3669 (1955).
- (8) D. F. Evans, *Nature* 173, 536 (1956); *J. Chem. Soc.* 1351 (1957).
- (9) C. Reid, "Excited States in Chemistry and Biology", Butterworths Scientific Publications, Londres, 1957; (a) pg. 93; (b) pg. 104.
- (10) G. Karreman, R. H. Steele e A. Szent-Györgyi, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 44, 140 (1958).
- (11) C. Reid, *Quart. Revs.* 12, 205 (1958).
- (12) M. Kasha e S. P. McGlynn, *Annual Review of Physical Chemistry* 7, 403 (1956).
- (13) R. Duncan Dallam e J. M. Reed, *J. Biol. Chem.* 235, 1183 (1960).
- (14) J. Ramsey Bronk, *Ann. New York Acad. Sci.* 86, 494 (1960).
- (15) T. C. Bruice, N. Kharasch e R. J. Winzler, *Arch. Biochem. and Biophys.* 62, 305 (1956).
- (16) L. P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.* 59, 96 (1937).
- (17) A. W. Baker e W. W. Kaeding, *J. Am. Chem. Soc.* 81, 5904 (1959).
- (18) D. A. K. Jones e J. G. Watkinson, *Chem. and Ind.* 661 (1960).
- (19) W. W. Robertson e R. E. Reynolds, *J. Chem. Phys.* 29, 138 (1958).
- (20) Veja-se S. P. McGlynn, *Chem. Revs.* 58, 1113 (1958).
- (21) Veja-se por exemplo M. Chowdhury e S. Basu, *J. Chem. Phys.* 32, 1450 (1960).
- (22) J. A. McLaughlin e A. Szent-Györgyi, *Enzymol.* 16, 384 (1954).
- (23) G. Weber, *Biochem. J.* 47, 114 (1950).
- (24) C. L. Gemmill, *Archiv. Biochem. and Biophys.* 54, 359 (1955).
- (25) J. P. Simons, *Quart. Revs.* 13, 3 (1959).
- (26) D. Bertrand, *Bull. Soc. Chim. France* 5.a série, 1010 (1945).
- (27) N. K. Bridge e G. Porter, *Proc. Roy. Soc. A*, 244, 259, 276 (1958).
- (28) R. H. Davis, A. L. Mathis, D. R. Howton, H. Schneiderman e J. F. Mead, *J. Biol. Chem.* 179, 383 (1949).
- (29) E. F. McCoy, S. S. G. Parfitt e I. G. Ross, *J. Phys. Chem.* 64, 1079 (1960).

- (30) R. S. Mulliken, *J. Am. Chem. Soc.* 74, 811 (1952).
- (31) R. S. Mulliken, *J. Phys. Chem.* 56, 801 (1952).
- (32) A. Szent-Györgyi, *Discussion Faraday Soc.* 27, 111 (1959).
- (33) I. Isenberg e A. Szent-Györgyi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, 857 (1958).
- (34) E. Fujimori, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 133 (1958).
- (35) I. Isenberg e A. Szent-Györgyi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 1229 (1959).
- (36) B. Pullman e A. Pullman, "Results of Quantum Mechanical Calculations of the Electronic Structure of Biochemicals", University of Paris, Paris.
- (37) B. Pullman e A. Pullman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 136 (1959).
- (38) B. Pullman e A. Pullman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, 1197 (1958).
- (39) E. M. Kosower e P. E. Klinedinst, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3493 (1956).
- (40) E. M. Kosower e J. A. Skorz, *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2195 (1960).
- (41) E. M. Kosower e S. W. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2191 (1960).
- (42) G. Cilento e P. Giusti, *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3801 (1959).
- (43) G. Cilento e P. Tedeschi, *J. Biol. Chem.* 236, 907 (1961).
- (44) K. Yagi, T. Ozawa e K. Okada, *Biochim. Biophys. Acta* 35, 102 (1959).
- (45) K. Yagi, J. Okuda, T. Ozawa e K. Okada, *Biochim. Biophys. Acta* 34, 372 (1959).
- (46) K. Yagi, T. Ozawa e T. Nagatsu, *Nature* 184, 982 (1959).
- (47) L. E. Orgel, *Quart. Revs.* 8, 422 (1954).
- (48) H. A. Harbury e K. A. Foley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, 662 (1958).
- (49) K. Yagi e Y. Matsuoka, *Biochem. Z.* 328, 138 (1956).
- (50) L. J. Andrews, *Chem. Revs.* 54, 713 (1954).
- (51) H. Yamada e K. Kozimo, *J. Am. Chem. Soc.* 82, 1543 (1960).
- (52) R. L. Strong, S. J. Rand e J. A. Britt, *J. Am. Chem. Soc.* 82, 5053 (1960).
- (53) L. J. Andrews e R. M. Keefer, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 3113 (1950).
- (54) R. M. Keefer e L. J. Andrews, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4677 (1950).
- (55) G. R. Somayajulu e S. R. Palit, *J. Phys. Chem.* 58, 417 (1954).
- (56) C. K. Ingold, "Structure and Mechanism in Organic Chemistry", Cornell University Press, Ithaca, New York, 1953, pg. 347.
- (57) S. D. Ross e M. M. Labes, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4916 (1955).
- (58) J. Wolff e E. C. Wolff, *Biochim. Biophys. Acta* 26, 387 (1957).
- (59) E. C. Ball e O. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43, 357 (1957).
- (60) P. Karrer e F. J. Stare, *Helv. Chim. Acta* 20, 418 (1937).
- (61) G. H. Wollett, F. M. Davis, C. N. Jones e M. Neill, *J. Am. Chem. Soc.* 59, 861 (1937).
- (62) "The Merck Index", Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., 7.a edição, pg. 364.
- (63) R. Foster, D. L. Hammick e A. A. Wardley, *J. Chem. Soc.* 3817 (1953).
- (64) L. G. Whitby, *Biochem. J.* 54, 437 (1953).
- (65) C. P. Nash, *J. Phys. Chem.* 64, 950 (1960).

ÍNDICE

PARTE I	5
Estado triplete nas reações ativadas por colisões	6
Falha da regra da conservação do spin	7
Importância biológica do estado triplete	8
Estrutura e atividade na classe da tiroxina	10
Formação de complexos de modelos da tiroxina	13
Efeito da diodotirosina sobre a fluorescência da riboflavina e da vitamina K ₃	18
Comentários	20
PARTE II	21
Introdução	21
Discussão geral dos resultados	23
Comentários	26
PARTE III (PARTE EXPERIMENTAL)	27
Drogas	27
Rotação ótica da 3,5-diodo-L-tirosina	28
Análise espectral da 3,5-diodo-L-tirosina	28
Investigação espectrofotométrica das interações intermoleculares	28
Determinação espectrofotométrica da constante de associação dos complexos	29
Cálculo dos coeficientes de extinção molar	31
Determinação fluorimétrica da constante de associação dos complexos	32
Preparo das soluções	33
Influência da diodotirosina sobre o espectro do DPN (Fig. 2)	34
Influência da diodotirosina sobre o espectro da riboflavina em meio ácido (Fig. 3)	35
Influência da diodotirosina sobre o espectro da vitamina K ₃ na re- gião 335-430 m μ (Fig. 4A)	36
Influência da diodotirosina sobre o espectro da vitamina K ₃ na re- gião 255-290 m μ (Fig. 4B)	37
Determinação da constante de equilíbrio do complexo DPN — dio- dotirosina	38
Determinação da constante de associação do complexo riboflavina — diodotirosina	40
Determinação da constante de associação do complexo vitamina K ₃ — diodotirosina	42

Influência do CLBC sobre o espectro de absorção da diodotirosina (Fig. 8)	46
Determinação da constante de equilíbrio do complexo CLBC — diodotirosina	
Mantendo constante CLBC	47
Mantendo constante a diodotirosina	49
Mantendo fixa a força iônica	51
Influência do CLBC sobre o espectro da tirosina (Fig. 12)	53
Influência da tirosina sobre o espectro de absorção da riboflavina em meio ácido (Fig. 13)	54
Influência da tirosina sobre o espectro de absorção da menadiona (Fig. 14)	55
Determinação da constante de equilíbrio do complexo L-tirosina — DPN	56
Determinação da constante de equilíbrio do complexo CLBC — L-tirosina	
Mantendo constante a tirosina	58
Mantendo constante o CLBC	61
Determinação da constante de equilíbrio do complexo riboflavina — L-tirosina	
Em HCl aquoso a 1.33%	63
Em HCl aquoso a 0.53%	65
Determinação da constante de associação do complexo vitamina K ₃ — tirosina	68
Influência do CLBC sobre o espectro de absorção da diodotironina .	70
Determinação da constante de associação do complexo 3,5-diodotironina — CLBC	71
Determinação da constante de associação do complexo diodotirosina — CLBC em álcool aquoso	73
Influência da diodotirosina sobre o fluorescência da riboflavina	75
Influência da diodotirosina sobre o espectro de absorção da riboflavina a pH 5.15	77
Influência da temperatura sobre a supressão da fluorescência da riboflavina pela diodotirosina	78
Efeito da diodotirosina e do ion cloreto sobre a reação fotoquímica da menadiona	80
SUMÁRIO E CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Reitor: — Prof. Dr. Antônio Barros de Ulhôa Cintra

Vice-Reitor: — Prof. Dr. Luiz Antonio Gama e Silva

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS

Diretor: — Prof. Dr. Mário Guimarães Ferri

Vice-Diretor: — Prof. Dr. Cândido Lima da Silva Dias

Secretário-Substituto: — Lic. Eduardo Marques da Silva Ayrosa

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Diretor: Prof. Dr. Simão Mathias

CADEIRA DE QUÍMICA GERAL E INORGÂNICA

Professor: Dr. Ernesto Giesbrecht (catedrático)

Assistentes: Dra. Madeleine Perrier

Dr. Geraldo Vicentini

CADEIRA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Professor: Dr. Paschoal Américo Ernesto Senise (contratado)

Assistentes: Dr. Luiz Roberto de Moraes Pitombo

Dra. Lília Rosaria Sant'Agostino

Eduardo Fausto de Almeida Neves

José Salvador Barone

CADEIRA DE QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA

Professor: Dr. Giuseppe Cilento (catedrático)

Assistentes: Dra. Blanka Wladislaw (livre-docente)

Dra. Aurora Catharina Giora Albanese

Divo Leonardo Sanioto

CADEIRA DE FÍSICO QUÍMICA E QUÍMICA SUPERIOR

Professor: Dr. Simão Mathias (catedrático)

Assistentes: Dr. Eurico de Carvalho Filho

Renato Giovanni Cecchini