



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PEDRO FRANCISCO ANGELO JÚNIOR

ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DA AGREGAÇÃO
MOLECULAR DAS FIBRAS DE COLÁGENO POR FTIR

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a):

Pedro Francisco Angelo Junior

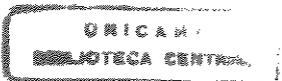
e aprovada pela Comissão Julgadora.

02/08/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
Para obtenção do Título de Mestre em Biologia
Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

422950000



UNIDADE	3e		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	An43a		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	42896		
PROC.	16-278100		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC@	R\$ 11,00		
DATA	24/10/00		
N.º CPD			

CM-00147012-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Angelo Júnior, Pedro Francisco

An43a Análise das alterações da agregação molecular das fibras de colágeno por FTIR/ Pedro Francisco Angelo Júnior. -- Campinas, SP:[s.n.], 2000
57f: ilus.

Orientador: Benedicto de Campos Vidal
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Colágeno. 2. FTIR, spectroscopy. 3. Tendões.
I. Vidal, Benedicto de Campos. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

CAMPINAS, 02 DE AGOSTO DE 2000.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. **BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL**



Prof. Dr. **JOSÉ CAMILLO NOVELLO**



Prof. Dr. **ÁUREO TATSUMI YAMADA**

Profa. Dra. **NILCE CORRÉA MEIRELLES**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça de ter me possibilitado a realização deste trabalho;

Aos meus pais por terem me apoiado nesta etapa;

Ao prof. Orlando Fedeli por ter me dado a luz em meio a tão vasta escuridão;

Ao Dr. Benedito de Campos Vidal pela orientação;

Ao técnico responsável do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Catalíticos da Faculdade de Engenharia Química (LDPC-FEQ), Sandro Pioli Zela, por ter me orientado na interpretação dos espectros e na conclusão dos dados;

Aos meus amigos do IQ-UNICAMP pelas sugestões fornecidas;

As bibliotecárias do Instituto de Química da UNICAMP por terem me orientado na elaboração do capítulo Referências Bibliográficas;

Ao amigo José Cicero Calheiros por ter fornecido o suporte técnico necessário a execução da Tese;

A todos os amigos por terem me ensinado a ser resistente na defesa, implacável no ataque e humilde na vitória.

ÍNDICE

Siglas	05
Resumo	07
Abstract	08
1 Introdução	09
2 Materiais e Métodos	27
2.1 Obtenção da Amostra	27
2.2 Preparação das Amostras	27
2.3 Desidratação das Amostras	27
2.4 Preparo da Pastilha	28
2.5 Análise Espectral	28
2.6 Amostragem	29
3 Resultados	30
4 Discussão	36
5 Conclusão	50
6 Referências Bibliográficas	51

SIGLAS

FTIR spectroscopy – (Fourier Transform by Infrared Spectroscopy)

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

S – (stretching) estiramento

Ss – (symetric stretching) estiramento assimétrico

As – (assymetric stretching) estiramento assimétrico

B – (bending) deformação

R – (rock) deformação tipo rock

Sc – (scissoring) deformação tipo tesoura

Tw – (twist) deformação fora do plano

W – (wagging) deformação no plano

μ - momento dipolar

E - campo energético

L – comprimento da ligação

ε - energia

h – constante de Planck ($6,624 \times 10^{-24}$)

ν - frequência de onda

λ - comprimento de onda

π - orbital pi ligante

π^* - orbital pi antiligante

σ - orbital sigma ligante

σ^* - orbital sigma antiligante

μ - massa reduzida

ν - número de onda

K – constante de força

C – átomo de carbono

H – átomo de hidrogênio

N – átomo de nitrogênio

O – átomo de oxigênio

RESUMO

A técnica espectrométrica de FTIR vem sendo amplamente utilizada como método diagnóstico devido a sua rapidez, sensibilidade e capacidade de analisar os biomateriais de modo não destrutivo. Este trabalho visa analisar a possibilidade de utilização desta técnica no estudo da agregação molecular das fibras de colágeno, bem como determinar a existência de algum indicador deste fenômeno, uma vez que a agregação destas fibras está relacionada a uma série de fenômenos fisiológicos como ossificação, inflamação e envelhecimento. Foram analisadas quatro tipos de amostras: tendão sem tratamento, tendão tratado com condroitin sulfato, tendão tratado com papaína e gelatina. Foi observado um aumento da intensidade da banda amida I (estiramento do grupo C=O) no espectro do tendão tratado com condroitin sulfato e uma diminuição da mesma nos espectros da gelatina e do tendão tratado com papaína em relação ao espectro sem tratamento. Estes resultados sugerem uma relação inversa entre a intensidade da banda amida I e o grau de agregação molecular das fibras de colágeno. Portanto, pode-se afirmar que a técnica de FTIR é capaz de detectar alterações no estado de agregação molecular das fibras de colágeno e que a banda de amida I é o indicador deste fenômeno.

Palavras chaves: espectroscopia de FTIR, colágeno e tendão.

ABSTRACT

The FTIR spectroscopy technique has been largely used as a diagnosis method because of its speed, sensivity anda capability to analyse the biomaterials in a non destructive way. This researchs aim is to analyse the possibility of using that technique to study collage fibers molecular agregation, as well as to determine the existence of something that indicates this phenomenon, since the collection is related to several physiological phenomenons as ossification, inflammation and aging. Four types of samples were analysed: non treated tendon, tendon treated with sulfate condroitin, tendon treated with papin and gelatin. It was noticed a rise in intensity of the amide I band (stretching C=O group) in the spectrum of the tendon treated with sulfate condroitin and it's reduction of the gelatin and the tendon treated with papain's spectrum im comparasion with the non treated spectrum. These results suggest an inverse relation between the low intensity of amide I band and the level of collagen fibers molecular agregation. Therefore, it's possible to affirm that FTIR technique is able to detect alterations in the collagen fibers molecular agregation state and that the amide I band is the indicãtor for this phenomenon.

Key words: FTIR spectroscopy, collagen and tendon.

1 INTRODUÇÃO

Chama-se espectroscopia o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética pode ser dividida em diferentes regiões energéticas que correspondem as diferentes técnicas espectroscópicas.

A região de 4000 a 400 cm^{-1} é considerada a região de infravermelho médio onde as bandas vibracionais são observadas ¹. Chama-se espectrômetro de FTIR o aparelho que analisa as transições entre os diferentes níveis de energia vibracional ¹.

Se uma molécula pudesse perder toda sua energia vibracional, sua posição e seu momento seriam simultaneamente conhecidos. No entanto, isto violaria o Princípio da Incerteza de Heisenberg, um dos axiomas fundamentais da mecânica quântica. A dualidade partícula-onda da matéria requer que haja uma função de onda ψ que considere a amplitude como uma função da localização da partícula. Born fornece uma interpretação física para a amplitude atribuindo ao fator ψ^2 a probabilidade de uma partícula estar em determinada posição. Se a partícula em questão for um elétron, a região do espaço onde existe a maior probabilidade de encontrá-lo chama-se orbital ¹.

Considerando a dualidade partícula-onda da matéria, podemos associar uma função de onda a estas partículas. A equação que serve como modelo matemático para os elétrons é conhecida como equação de Schrödinger. A expressão desta equação para o átomo de hidrogênio é mostrada abaixo ²

uma função de onda a estas partículas. A equação que serve como modelo matemático para os elétrons é conhecida como equação de Schrödinger. A expressão desta equação para o átomo de hidrogênio é mostrada abaixo²

:

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2} + \frac{8\pi^2 m}{h^2} (E - V) \psi = 0$$

Onde

m = a massa do elétron

E = a energia total

V = a energia potencial

h = a constante de Planck

ψ = probabilidade da partícula ser encontrada no sistema cartesiano (x, y e z).

Para o átomo de hidrogênio, a energia potencial é:

$$V = - \frac{Ze^2}{r}$$

Onde

V = energia potencial

r = distância entre o núcleo e o elétron

e = carga do elétron

Z = carga do núcleo

A solução da equação de Schrödinger que corresponde ao estado de

$$\psi = \frac{1}{(\pi)^{1/2}} \left| \frac{Z}{a_0} \right|^{3/2} e^{-Zr/a_0}$$

Onde

$$a_0 = \frac{h^2}{4\pi^2 m e^2}$$

A energia correspondente a esta solução é ²:

$$E = \frac{-2\pi^2 m Z^2 e^4}{h^2}$$

No caso dos átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio, a equação permite mais de uma solução. As três mais comuns são ²:

$$\psi = \frac{1}{(32\pi)^{1/2}} \left| \frac{Z}{a_0} \right|^{5/2} r e^{-Zr/2a_0} \cos \theta$$

$$\psi = \frac{1}{(64\pi)^{1/2}} \left| \frac{Z}{a_0} \right|^{3/2} r e^{-Zr/2a_0} \sin \theta \cos \phi$$

$$\psi = \frac{1}{(64\pi)^{1/2}} \left| \frac{Z}{a_0} \right|^{3/2} r e^{-Zr/2a_0} \sin \theta \sin \phi$$

A função de onda associada ao átomo de hidrogênio corresponde a um orbital cuja densidade eletrônica é simetricamente distribuída em torno do núcleo. Para os demais átomos (C, N e O), a equação resultante representa um orbital cuja distribuição da densidade eletrônica é assimétrica ao longo dos eixos

cartesianos ².

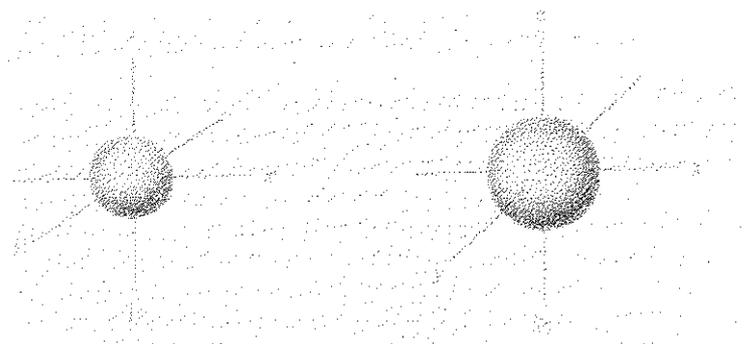
Como consequência da resolução da equação de Schrödinger, cada orbital tem associado consigo três números quânticos: n , l e m ¹.

O número quântico principal " n " determina o tamanho do orbital e o nível de energia em que ele se encontra.

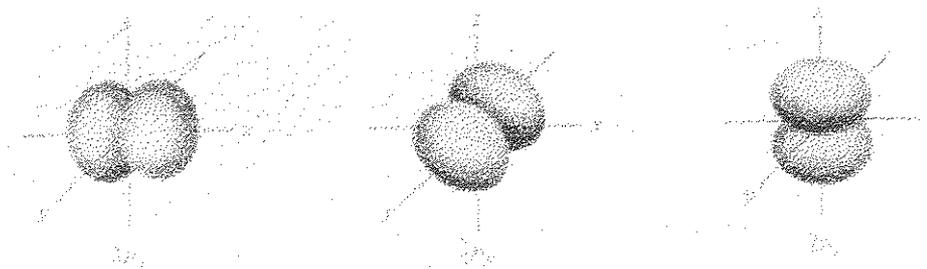
O número quântico secundário " l " determina a forma do orbital ¹. Quando $l = 0$ temos um orbital esférico, simétrico e sem propriedades direcionais denominado " s ". Quando $l = 1$ temos um orbital assimétrico, em forma de halteres e disposto nos 3 eixos: x , y e z denominado " p ". Ambos orbitais estão expostos na figura 1 ³.

Figura 1 – Representação esquemática dos orbitais s e p

Orbitais s



Orbitais p



O número quântico azimutal “m” está relacionado com a orientação espacial dos orbitais nos eixos cartesianos ¹.

Segundo a teoria da Perturbação dos Orbitais Moleculares (PMO), dois orbitais atômicos constituem um sistema não perturbado. A perturbação é decorrente da interação entre eles. Quando a interação entre dois orbitais atômicos é íntima temos a formação de um orbital molecular do tipo σ , quando a interação ocorre a distância, temos a formação de um orbital molecular do tipo π . Esta interação pode ser mensurada pela integral $h_{AB} = \int \chi_A h^{\text{eff}} \chi_B d\tau$ ⁴.

O valor da integral h_{AB} afere a quantidade de energia que pode ser ganha se o “overlap” das funções de onda dos orbitais A e B formarem uma interferência construtiva (denominada orbital ligante BMO) ou dissipada se a interferência for destrutiva (denominada orbital antiligante ABMO) ⁴. A figura 2 ilustra a formação de orbitais ligantes e antiligantes

Figura 2A – Representação esquemática de um orbital σ ligante ³



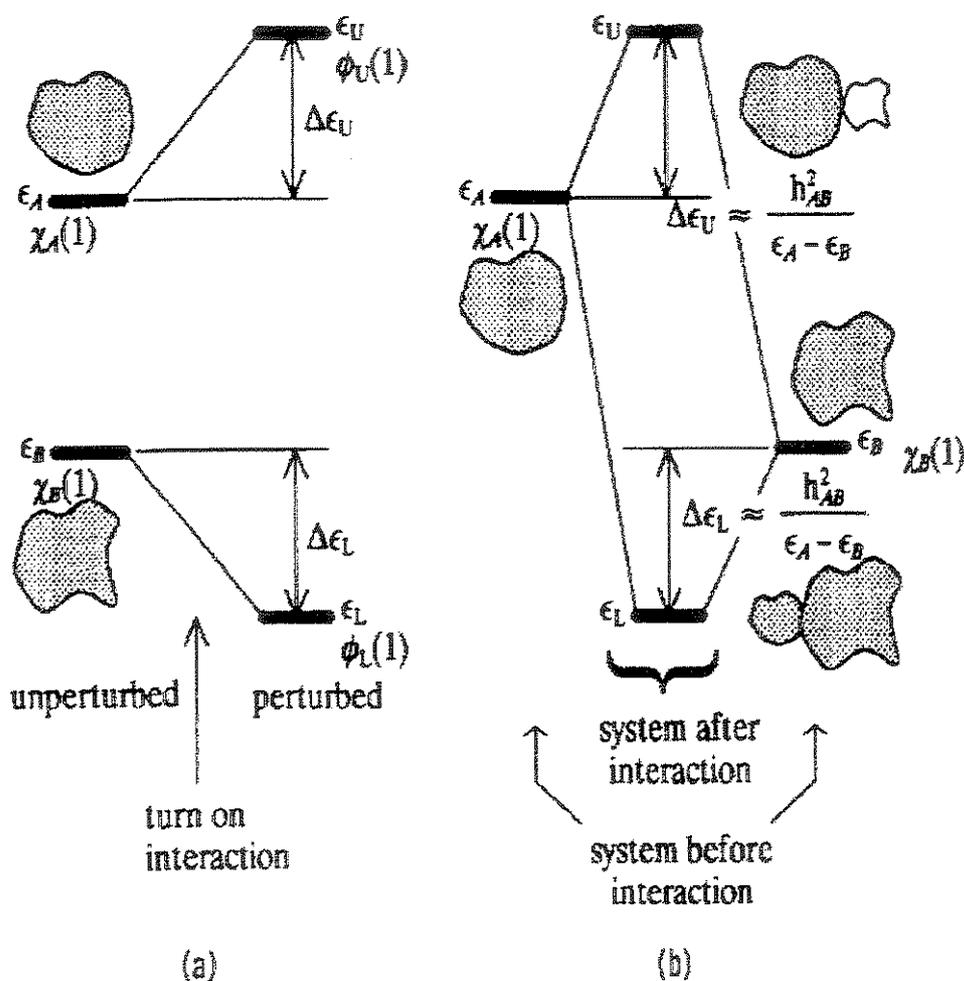
Figura 2B – Representação esquemática de um orbital σ antiligante ³



A magnitude do "overlap" reflete a diferença entre os estados estabilizado e desestabilizado e a polarização resultante dos orbitais moleculares ϕ_L e ϕ_U . O ganho energético resultante desta interação dos dois orbitais é expresso pela equação $^4 \Delta E = n_U \epsilon_U + n_L \epsilon_L - n_A \epsilon_A - n_B \epsilon_B$, conforme demonstrado pela figura 3.

Figura 3 – Diagrama de representação da interação entre orbitais

Moleculares com diferentes níveis energéticos ²⁵

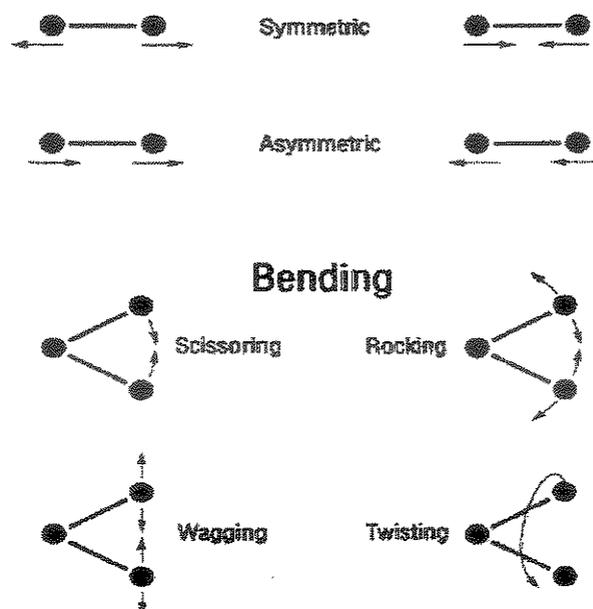


Como conseqüência, os átomos tendem a se unir através da formação de orbitais moleculares ligantes, uma vez que estes orbitais proporcionam a minimização de seus níveis de energia.

Segundo o modelo do oscilador harmônico, os níveis de energia dos orbitais estão igualmente espaçados. A absorção no IV ocorre quando a molécula for excitada ao estado vibracional imediatamente superior ou a múltiplos dele. A freqüência correspondente a esta excitação ($\Delta v = 1$) é denominada modo de vibração fundamental ou normal ¹.

Dois tipos de vibrações moleculares correspondem aos modos de vibração normal da molécula ou grupo químico: estiramento e deformação. Estiramento é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, pode ser simétrico e assimétrico. Vibrações de deformação alteram o ângulo da ligação entre dois átomos ou o movimento de um grupo de átomos, relativo ao restante da molécula. As vibrações de deformação são de quatro tipos: "rocking", "scissoring", "twisting" e "wagging". Os modos de vibração estão esquematizados na figura 4 ¹:

Figura 4 – Representação esquemática dos modos de vibração normal de uma molécula



A cada modo de vibração de uma molécula ou grupo químico estão associados, no espectro de FTIR, duas características: momento dipolar e frequência.

Chama-se momento dipolar a propriedade resultante da diferença de eletronegatividade dos átomos envolvidos na ligação ². Seu valor é igual ao produto da carga elétrica pelo comprimento da ligação ², conforme mostrado pela fórmula abaixo:

$$\mu = EL$$

Onde:

μ = momento dipolar

E = constante elétrica

L = comprimento da ligação

O momento dipolar de um grupo químico é representado, no espectro de FTIR, pela intensidade da banda. Embora a intensidade seja uma característica da banda, a formação de ligações de hidrogênio pode alterar sua magnitude, uma vez que a formação destas ligações tende a diminuir a densidade eletrônica dos grupos aceptores de elétrons (C=O, por exemplo) e a aumentar o momento dipolar dos grupos doadores de elétrons (N-H, C-H, por exemplo). Como resultado, observa-se que o momento dipolar dos grupos aceptores diminui ao passo que nos grupos doadores observa-se um aumento.

Como consequência do momento dipolar da ligação, o átomo menos eletronegativo tende a ser atraído pelo átomo mais eletronegativo. Em decorrência da diminuição da distância interatômica há um aumento da força de repulsão nuclear entre os dois átomos. Este conjunto de forças antagônicas (atração e repulsão) dentro de um grupo químico gera um movimento rítmico cuja repetitividade ao longo do tempo é denominado frequência.

Defini-se frequência como o número de ciclos executados por uma onda na unidade de tempo. Segundo Planck, a frequência de uma onda está relacionada a sua energia, conforme expresso na fórmula abaixo¹:

$$\varepsilon = h\nu$$

onde:

ε = energia

h = constante de Planck

ν = freqüência de onda

Em ligações químicas, a freqüência é expressa em função de sua constante de força e de sua massa reduzida ¹ conforme demonstrado pela fórmula abaixo:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{c}{m_r}}$$

onde:

ν = freqüência

c = constante de força

m_r = massa reduzida

A combinação das duas fórmulas anteriores expressa a energia das ligações analisadas ¹ :

$$\varepsilon = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{c}{m_r}}$$

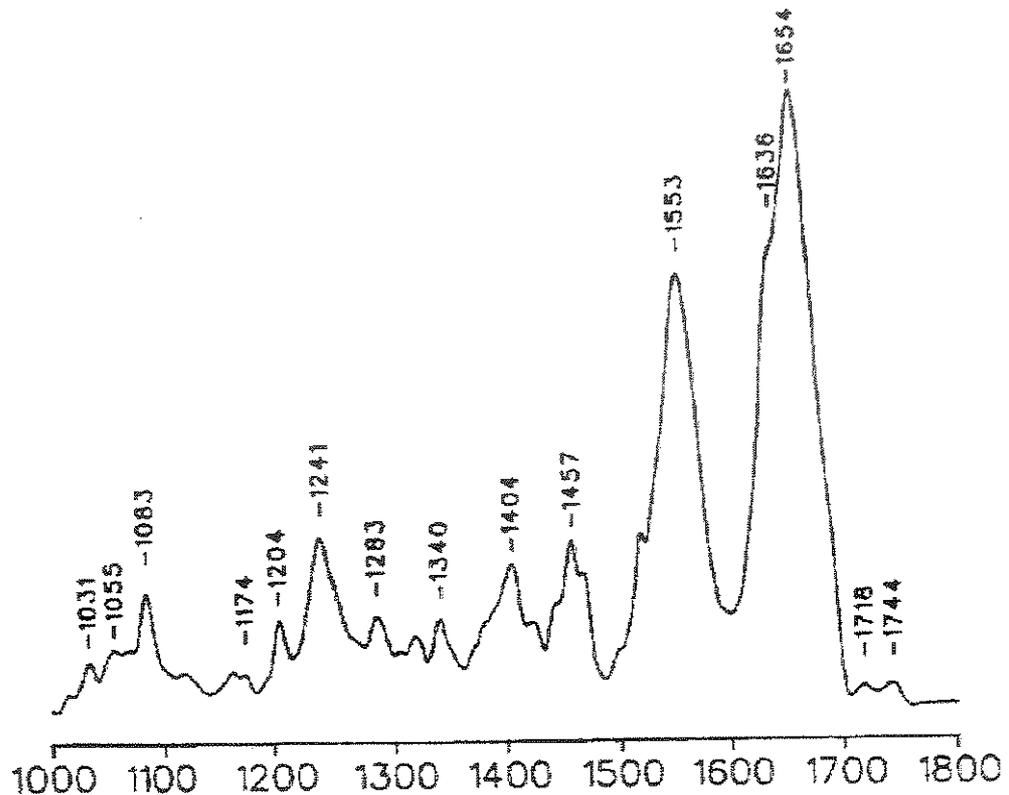
A exemplo do momento dipolar, a freqüência também é influenciada pelas ligações de hidrogênio de modo que estas tendem a limitar as vibrações de estiramento (porque o grupo químico fica "preso") e a aumentar a força das vibrações de deformação, uma vez que os grupos químicos procuram minimizar a força das ligações de hidrogênio através do aumento da distância entre os dipolos, seja através de movimentos de rotação, seja através da alteração do ângulo do

grupo químico envolvido na ligação. Como resultado, observa-se uma diminuição da frequência de estiramento dos grupos O-H (hidroxila) de 3600–3650 cm^{-1} para 3500–3600 cm^{-1} e um aumento da frequência de suas vibrações de deformação.

O espectro de FTIR, portanto, fornece basicamente três informações: a energia das ligações químicas (frequência), seus momentos dipolares (intensidade) e a presença ou não de ligações de hidrogênio.

Atualmente, a técnica de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) vem sendo aplicada como método diagnóstico devido a sua rapidez, sensibilidade e capacidade de analisar biomateriais de modo não destrutivo [6-9]. Constitui um método especialmente interessante aos patologistas, uma vez que permite quantificar as modificações na composição molecular dos tecidos [10-11]. Estudos preliminares têm sugerido a possibilidade do uso desta técnica para detectar alterações em escala molecular e supramolecular de artrites, esclerose múltipla, e várias formas de câncer (ver figura 5) ¹².

Figura 5 – Espectro de FTIR de carcinoma invasivo de mama



Jackson e cols.¹² propõem que a compreensão do espectro de tecidos conjuntivos e o diagnóstico das doenças que os afetam pode se basear na análise das bandas presentes no espectro do colágeno, uma vez que fibras de colágeno estão presentes no tecido conjuntivo conferindo-lhes suas propriedades quando predominantes¹³.

Entende-se por colágeno uma família de proteínas fibrosas altamente conservadas do ponto de vista evolutivo, sem a qual não haveria pele, veias e tendões¹⁴.

Elliot ¹³ demonstra que a flexibilidade e a grande resistência a tração dos tendões consiste de um arranjo hierarquizado de macromoléculas que associadas dão origem a fibrilas, fibras e feixes de fibras dispostos em paralelo ao seu eixo maior constituído principalmente por colágeno. Em associação ao esqueleto protéico formado pelas fibras de colágeno, ocorrem as glicosaminoglicanas ácidas (GAGs) e glicoproteínas estruturais (GPE) ¹³.

Em função do arranjo hierarquizado de agregados fibrilares de cadeias polipeptídicas de colágeno, proteoglicanas e GPE, os tendões apresentam características biofísicas de ordem molecular que lhes conferem a qualidade de estrutura polimérica anisotrópica (ausência de simetria interna) por exibirem mais de um índice de refração para direções determinadas e diferentes de propagação da luz ^[15-17].

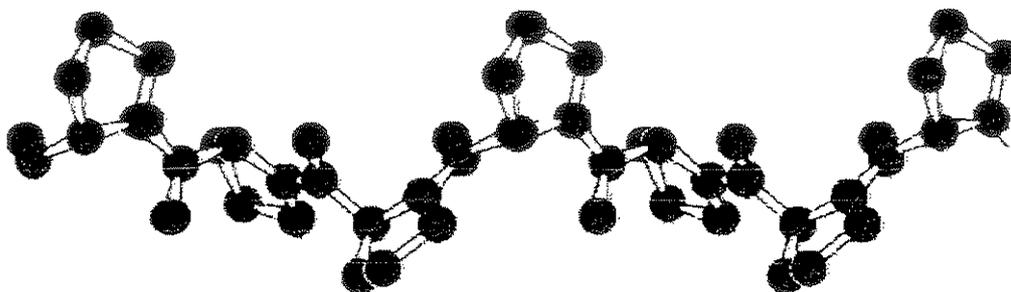
O estudo das propriedades anisotrópicas (dicroísmo e birrefringência) permite determinar as modificações do nível de agregação dos biopolímeros, possibilitando uma interpretação das bases moleculares e do arranjo dos componentes da matriz extracelular envolvidos em processos como fibrilogênese, ossificação, inflamação e envelhecimento. A técnica de microscopia de polarização possibilita o estudo destes processos, embora seja incapaz de descrever o comportamento dos diferentes grupos químicos. Lazarev e cols. ¹⁸ sugerem que a técnica de FTIR possa ser utilizada no estudo das alterações da agregação molecular das fibras de colágeno e que a banda amida I [C=O_(s)] seja um indicador adequado deste fenômeno.

Como a técnica de FTIR é incapaz de elucidar a estrutura química de um

composto, torna-se necessário conhecer a estrutura química das fibras de colágeno a fim de se interpretar corretamente seu espectro.

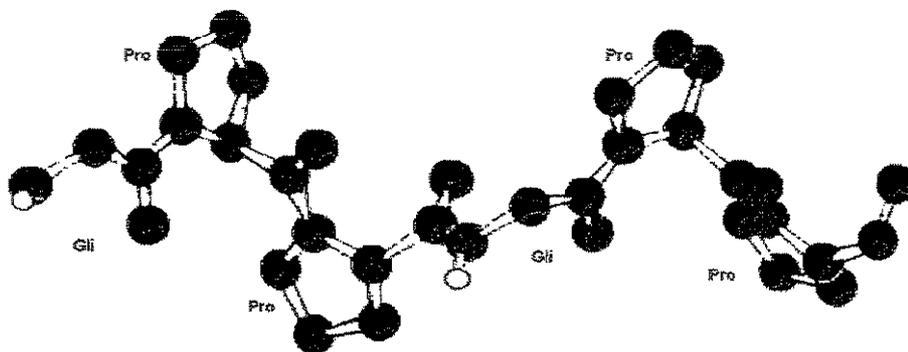
Moléculas de colágeno são caracterizadas pela seqüência de tripletes Gly-X-Y e por um alto teor de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina). A unidade estrutural básica da fibra de colágeno tipo I é formada por três cadeias polipeptídicas em conformação helicoidal que enrolam-se um em torno do outro formando um cabo rígido ¹⁹. O padrão helicoidal das cadeias individuais é bem ilustrado pela poli-L-prolina, um polipeptídeo sintético estabilizado pela repulsão estérica dos anéis de pirrolidona (ver figura 6) ¹⁹.

Figura 6 – Padrão helicoidal das cadeias individuais de poli-L-prolina¹⁹



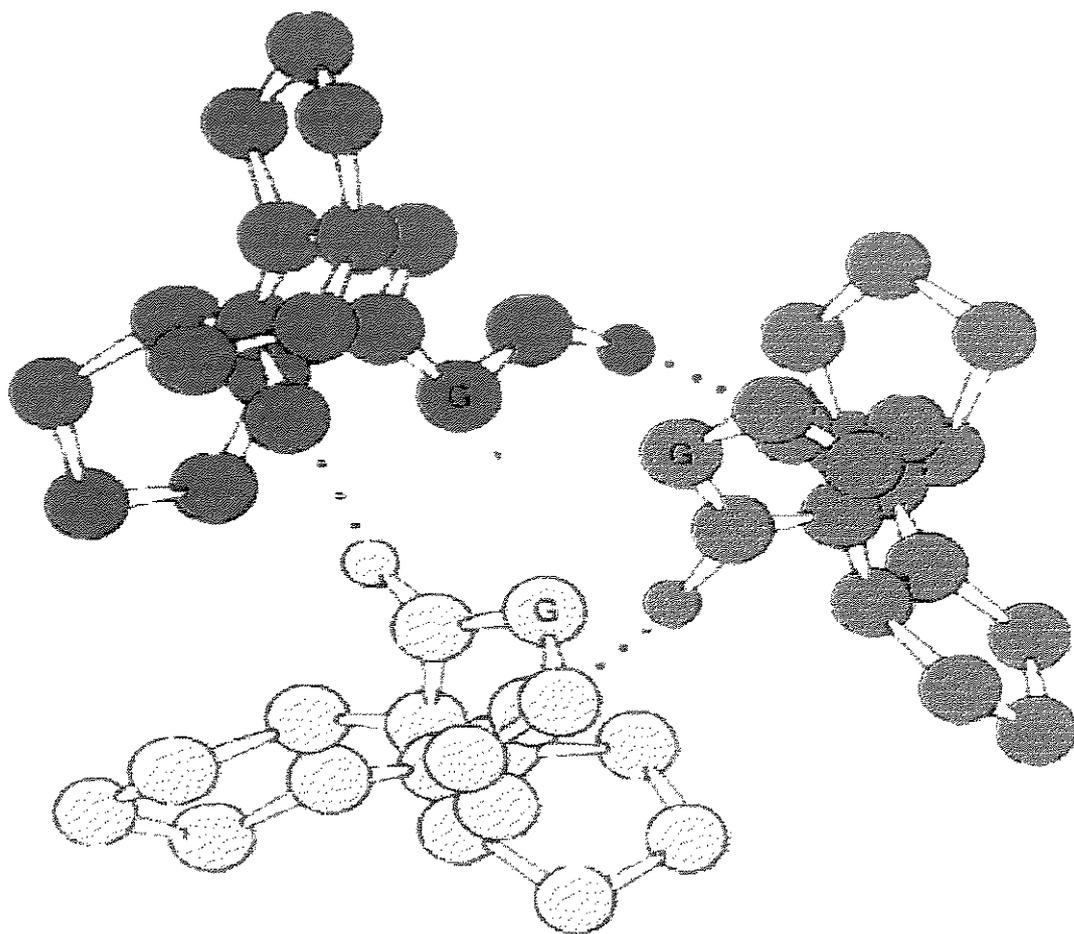
Em moléculas de colágeno, cada filamento tem uma conformação semelhante a da poli-L-prolina (ver figura 7)¹⁹.

Figura 7 – Conformação dos filamentos individuais de colágeno¹⁹



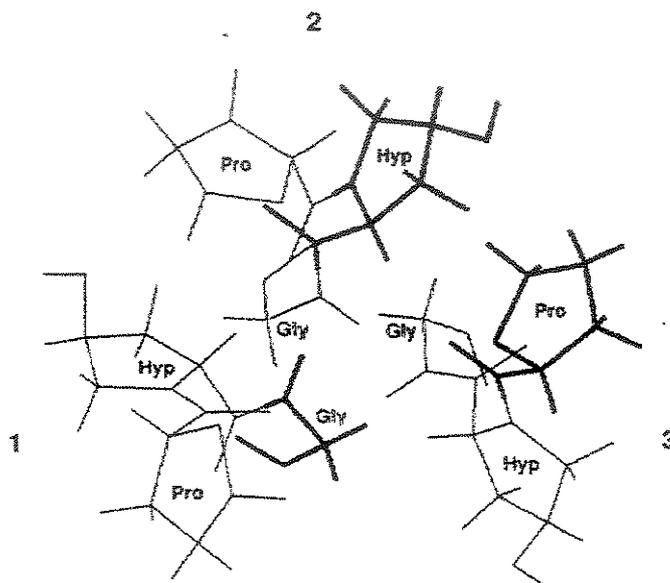
A união dos três filamentos é formada por ligações de hidrogênio perpendiculares ao eixo maior da fibra de colágeno. Os doadores são os grupos N-H da glicina e os aceptores são os grupos C=O da prolina¹⁹ (ver figura 8).

Figura 8 – Representação esquemática da estrutura de tripla hélice do colágeno ¹⁹



A característica fundamental da tripla hélice é a presença do aminoácido glicina na parte mais interna do triplete. Razões estéricas impossibilitam a presença do C_{β} , presente nos demais aminoácidos, nesta posição (ver figura 9).

Figura 9 - Organização das moléculas de colágeno em tripla hélice ²⁰.



Devido a molécula de colágeno ser muito complexa, costuma-se usar peptídeos sintéticos como modelo de estudo. A maioria dos autores utiliza a poliglicina II como modelo de estudo de proteínas que assumem conformação de tripla hélice. Dwivedi ²¹ atribuiu os grupos químicos desta molécula as suas bandas espectrais correspondentes. A frequência e composição destas bandas encontra-se exposta na tabela 1.

Tabela 1

Frequência e composição das bandas mais relevantes do espectro de poliglicina II ²¹

Frequência (cm ⁻¹)	Componentes das Bandas
3450 - 3250	Vibração de N-H ligado (s) (amida A)
2980 - 2936	CH ₂ (as)
2853 - 2803	CH ₂ (ss)
1670 - 1640	C=O (s) C-N (s) C α CN (d) (amida I)
1565 - 1533	N-H (b) C-N (s) C α C (s) (amida II)
1383 - 1374	CH ₂ (w) N-H (b) C α C (ss)
1350 - 1344	CH ₂ (w) CH ₂ (b) N-H (b) C α C (ss)
1310 - 1304	CH ₂ (tw) CH ₂ (w) N-H (b) CN (s)
1243 - 1237	C-N (s) CH ₂ (w) NC α (s) N-H (b) (amida III)

s – estiramento as-estiramento assimétrico ss-estiramento simétrico

b-deformação r-rock w-tesoura tw-torção

Basicamente, os grupos analisados nos espectros de colágeno e peptídeos sintéticos usados como modelo, correspondem aos grupos presentes em torno de uma ligação peptídica como os grupos carbonila (C=O), amino (N-H), metileno (C-H) e ligação C-C α .

O objetivo deste trabalho é analisar a possibilidade de utilização da técnica de FTIR no estudo das alterações da agregação molecular das fibras de colágeno, bem como determinar uma alteração destas bandas que possa ser utilizada como indicadora deste fenômeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Cortes histológicos de tendão calcâneo de bovinos adultos (2 anos) foram submetidos a dois tratamentos de imersão em xilol durante 15 min cada a fim de se retirar toda parafina. Os cortes foram secos em estufa a temperatura de 60°C por 48h e posteriormente reduzidos a um pó fino o suficiente para ser analisado pela técnica de FTIR.

Além do tendão, foi utilizado gelatina em pó da Lainer.

2.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram, posteriormente, divididas em três partes:

- 1- A primeira não sofreu tratamento algum, sendo utilizada como controle;
- 2- A segunda foi incubada em solução de papaína 0,1% (Sigma) 48h/10°C;
- 3- A terceira amostra foi imersa em solução aquosa de condroitin sulfato 0,1% (CS 4&6 Sigma) nas mesmas condições que a segunda.

2.3. DESIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras tratadas com papaína e condroitin sulfato foram submetidas a 5 centrifugações a 6000 rpm por 10 min. A primeira centrifugação foi realizada com a amostra imersa na solução de tratamento. As centrifugações posteriores

foram realizadas em graduações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e absoluto). Antes de serem analisadas, todas as amostras permaneceram em estufas a 60°C por uma noite e por 1h em dessecador.

2.4. PREPARO DA PASTILHA

As amostras foram diluídas em KBr na proporção de 1:100 (p/p), e submetidas a uma pressão de 6 ton por 2 min por uma prensa hidráulica da marca Carver Laboratory Press modelo C, número de série 34000-031.

2.5. ANÁLISE ESPECTRAL

Foi realizado um "background" de 256 scan no compartimento de análise do espectrômetro Perkin Elmer 1720-X pelo software IRDM com resolução de 2.0 antes de cada leitura. As pastilhas foram analisadas nas mesmas condições que o "background".

O espectro de cada amostra foi obtido pelo software IRDM através da subtração do espectro da amostra analisada pelo espectro do compartimento de análise sem amostra. O espectro resultante foi transferido para o software Graph Bulder , onde foram selecionadas as bandas presentes na resolução de 0,01. Das bandas presentes nesta resolução, foram analisadas as seguintes: N-H_(s) (amida A), C-H_(as), C-H_(ss), C=O_(s) (amida I), N-H_(b) (amida II), C-C α _(as),

C-C α (ss), C-H(b), C-N(s) (amida III). Bandas pouco informativas como N-C α (s) (amida IV), C-O(s), O-H(s), C-N(b) e C=O(b) foram posteriormente eliminadas.

2.6. AMOSTRAGEM

O espectro de cada amostra, de acordo com a norma adotada pelo Laboratório de Desenvolvimento de Processos Catalíticos/ Faculdade de Engenharia Química/ Universidade de Campinas, somente foi considerado válido após a obtenção consecutiva de três espectros idênticos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3 RESULTADOS

Os espectros (ver páginas 35-38) foram analisados de duas formas:

- 1º) Comparando-se as variações de intensidade de cada banda nos 4 espectros;
- 2º) Comparando-se as variações de intensidade de uma banda em relação a outras nos 4 espectros.

Pelo primeiro método, foi observado um aumento na intensidade de todas as bandas, em especial dos grupos carbonila, na seguinte sequência: tendão tratado com condroitin sulfato (0.085A), tendão sem tratamento (0.160A), tendão tratado com papaína (0.300A) e gelatina (0.560A). Os valores das bandas analisadas encontram-se expostos na tabela 2.

TABELA 2

INTENSIDADE ABSOLUTA DAS BANDAS ANALISADAS

BANDAS	T C S	T S T	T P	GELATINA
C=O_(s)	0.085	0.160	0.300	0.560
N-H_(s)	0.140	0.165	0.270	0.410
N-H_(b)	0.060	0.125	0.240	0.425
C-H_(as)	0.075	0.200	0.195	0.225
C-C_(as)	0.055	0.100	0.185	0.290
C-N_(s)	0.045	0.090	0.170	0.225
C-H_(b)	0.040	0.070	0.150	0.200
C-C_(ss)	0.055	0.080	0.178	0.250
C-H_(ss)	0.055	0.150	0.142	0.160

TCS – tendão tratado com condroitin sulfato

TP – tendão tratado com papaína

S – estiramento

as – estiramento assimétrico

TST – tendão sem tratamento

b – deformação

ss – estiramento simétrico

Pelo segundo método, observou-se um aumento na razão entre as intensidades de algumas bandas como $C=O_{(s)}/N-H_{(s)}$, $N-H_{(b)}/N-H_{(s)}$, $C=O_{(s)}/C-N_{(s)}$, $C-H_{(b)}/C-H_{(as)}$, $C-H_{(b)}/C-H_{(as)}$, $C-C\alpha_{(s)}/C-H_{(s)}$, $C-C\alpha_{(s)}/C-H_{(s)}$ na seguinte seqüência: tendão tratado com condroitin sulfato, tendão sem tratamento, tendão tratado com papaína e gelatina. Os dados estão expostos na tabela 3.

TABELA 3

RAZÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE ALGUMAS BANDAS

BANDAS ANALISADAS	TCS	TST	TP	GELATINA
$C=O_{(s)}/N-H_{(s)}$	0.607	0.970	1.111	1.366
$N-H_{(b)}/N-H_{(s)}$	0.429	0.758	0.889	1.037
$C=O_{(s)}/C-N_{(s)}$	1.889	1.778	1.765	2.489
$C-H_{(as)}/C-C_{(as)}$	0.733	0.500	0.949	1.289
$C-H_{(ss)}/C-C_{(ss)}$	1.000	0.533	1.253	1.563
$C-H_{(as)}/C-H_{(b)}$	0.533	0.350	0.769	0.889
$C-H_{(ss)}/C-H_{(b)}$	0.727	0.466	1.056	1.333

TCS – tendão tratado com condroitin sulfato

TP – tendão tratado com papaína

S – estiramento as – estiramento assimétrico

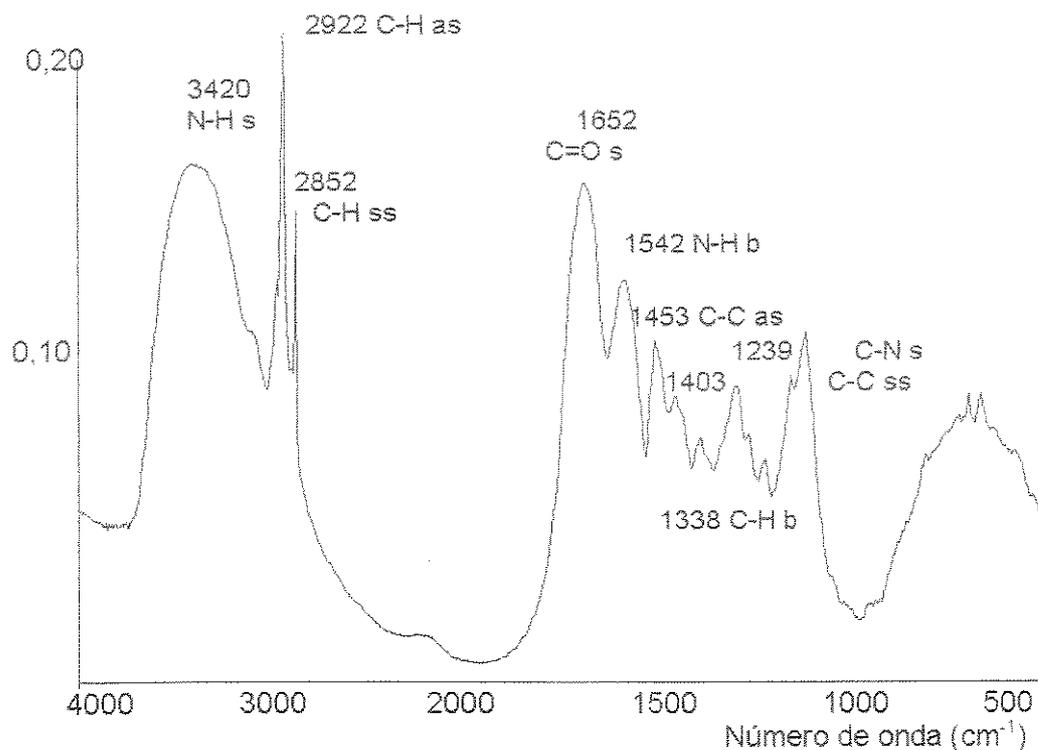
TST – tendão sem tratamento

b - deformação

ss – estiramento simétrico

ESPECTRO DE TENDÃO SEM TRATAMENTO

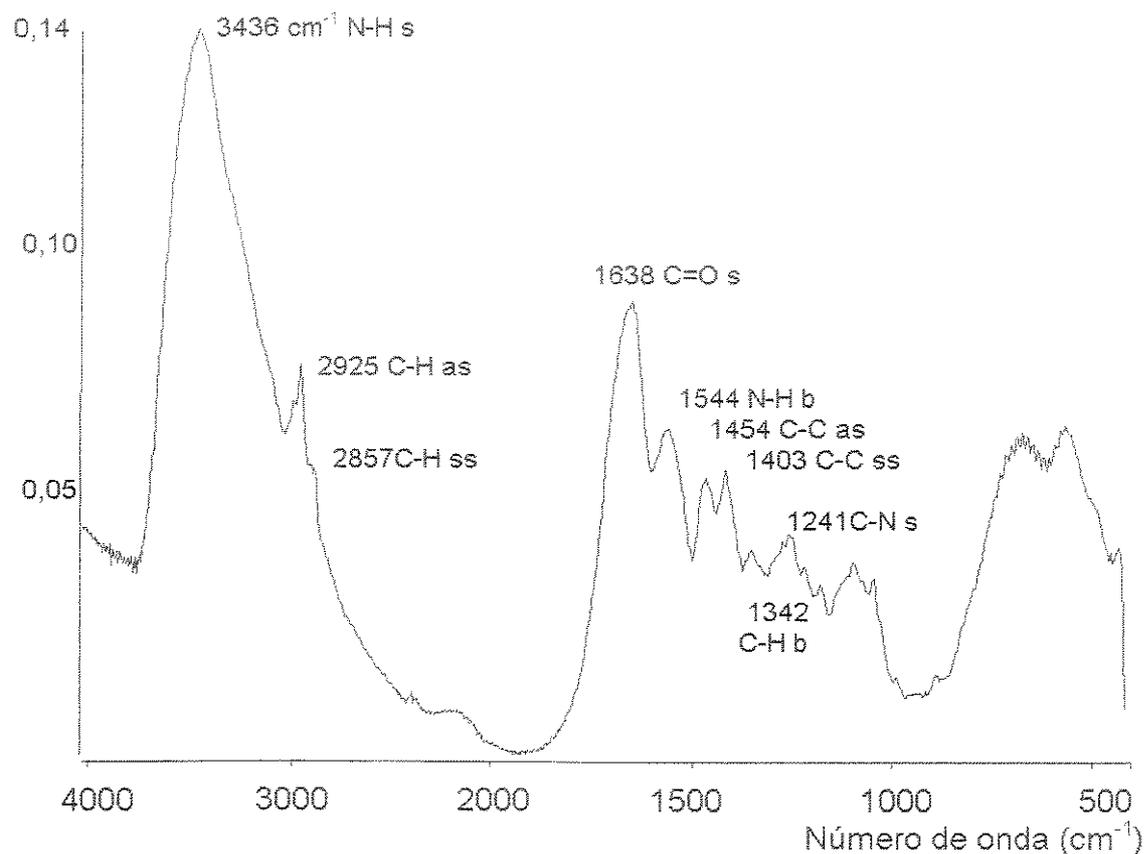
Absorbância (A)



- C=O s estiramento dos grupos carbonila (amida I)
- N-H s estiramento dos grupos amina (amida A)
- N-H b deformação dos grupos amina (amida II)
- C-N s estiramento dos grupos C-N (amida III)
- C-H as estiramento assimétrico dos grupos metileno
- C-H ss estiramento simétrico dos grupos metileno
- C-H b deformação dos grupos metileno
- C-C α as estiramento assimétrico da ligação carbono – carbono alfa
- C-C α ss estiramento simétrico da ligação carbono – carbono alfa

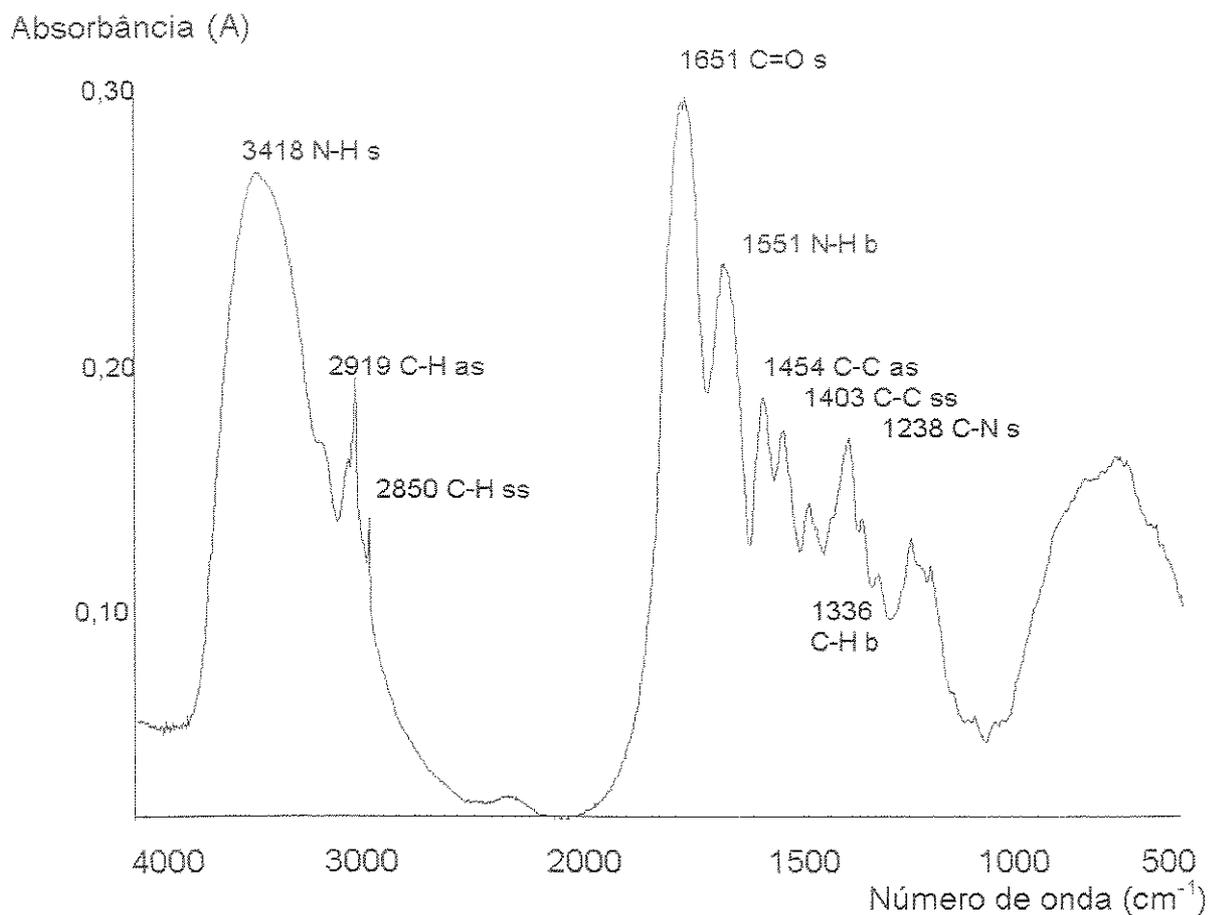
ESPECTRO DE TENDÃO TRATADO COM CONDROITIN SULFATO

Absorbância (A)



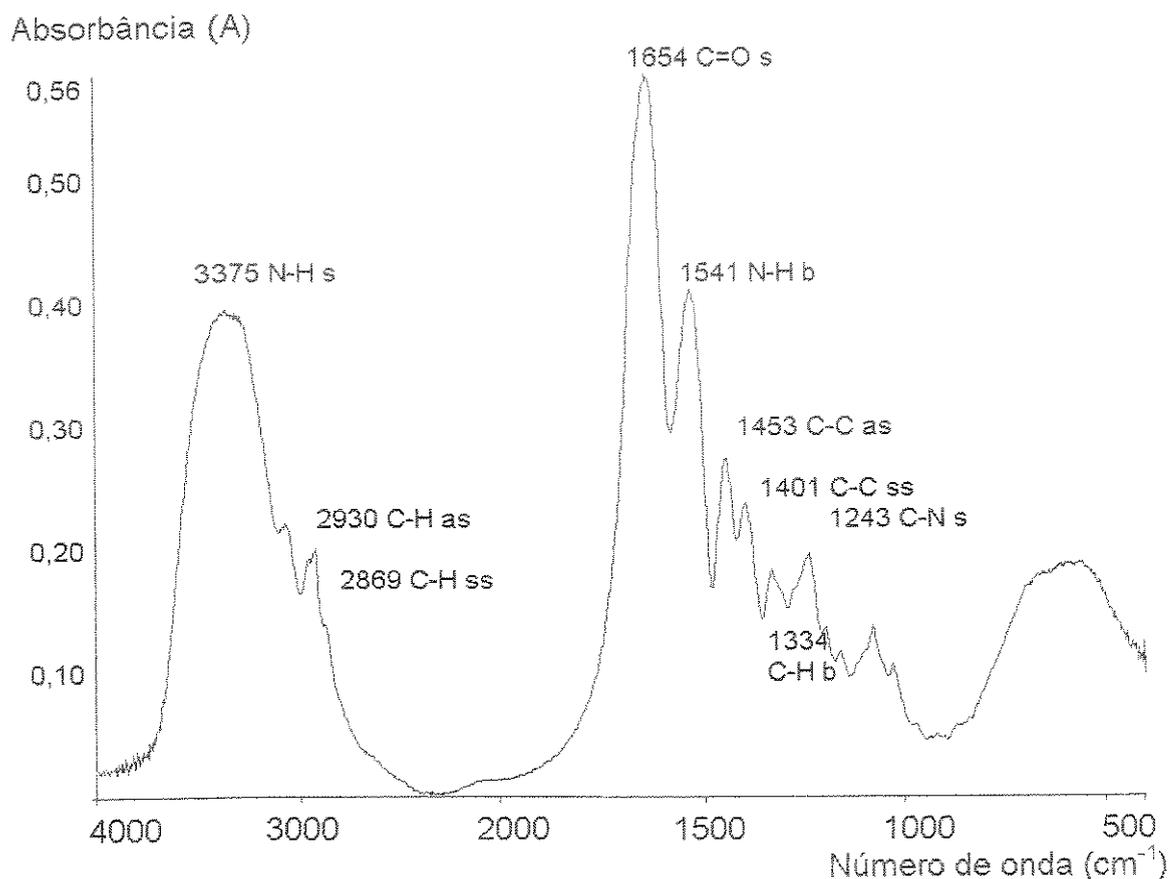
- C=O s estiramento dos grupos carbonila (amida I)
- N-H s estiramento dos grupos amina (amida A)
- N-H b deformação dos grupos amina (amida II)
- C-N s estiramento dos grupos C-N (amida III)
- C-H as estiramento assimétrico dos grupos metileno
- C-H ss estiramento simétrico dos grupos metileno
- C-H b deformação dos grupos metileno
- C-C α as estiramento assimétrico da ligação carbono – carbono alfa
- C-C α ss estiramento simétrico da ligação carbono – carbono alfa

ESPECTRO DE TENDÃO TRATADO COM PAPAÍNA



- C=O s estiramento dos grupos carbonila (amida I)
- N-H s estiramento dos grupos amina (amida A)
- N-H b deformação dos grupos amina (amida II)
- C-N s estiramento dos grupos C-N (amida III)
- C-H as estiramento assimétrico dos grupos metileno
- C-H ss estiramento simétrico dos grupos metileno
- C-H b deformação dos grupos metileno
- C-C α as estiramento assimétrico da ligação carbono – carbono alfa
- C-C α ss estiramento simétrico da ligação carbono – carbono alfa

ESPECTRO DE GELATINA



- C=O s estiramento dos grupos carbonila (amida I)
- N-H s estiramento dos grupos amina (amida A)
- N-H b deformação dos grupos amina (amida II)
- C-N s estiramento dos grupos C-N (amida III)
- C-H as estiramento assimétrico dos grupos metileno
- C-H ss estiramento simétrico dos grupos metileno
- C-H b deformação dos grupos metileno
- C-C α as estiramento assimétrico da ligação carbono – carbono alfa
- C-C α ss estiramento simétrico da ligação carbono – carbono alfa

4 DISCUSSÃO

O aumento observado na intensidade das bandas espectrais conforme mostrado na tabela 2 sugere que as alterações na agregação molecular das fibras de colágeno estejam intimamente relacionadas a força das ligações de hidrogênio de modo que uma diminuição na força destas ligações conduz a um estado de menor agregação molecular e conseqüentemente a uma maior intensidade das vibrações em geral e um aumento da intensidade da banda amida I, em especial. O fortalecimento destas ligações, ao contrário, induz aos efeitos opostos. Estes dados sugerem fortemente que a banda amida I (estiramento dos grupos C=O) seja um indicador adequado para se estudar agregação molecular de fibras de colágeno.

Os dados presentes na tabela 3 sugerem fortemente que as alterações espectrais podem ser entendidas como decorrentes da maior ou menor basicidade dos átomos de oxigênio dos grupos carbonila, de modo que as modificações provocadas neste átomo pelas alterações na força das ligações de hidrogênio influenciam outras partes da molécula que não apenas os grupos formadores da ligação de hidrogênio, repercutindo por todo o espectro. Para compreendermos como se dá este fenômeno, é preciso considerar que o colágeno é formado pela união de três cadeias polipeptídicas em tripla hélice. A característica fundamental desta estrutura é a presença do aminoácido glicina no seu interior, o que possibilita a formação de uma estrutura compacta⁸. A união dos filamentos é formada por ligações de hidrogênio perpendiculares ao eixo maior da fibra de

colágeno. Os doadores são os grupos N-H da glicina e os aceptores são os grupos C=O da prolina⁸.

Conforme explicado na introdução deste trabalho, a formação de ligações de hidrogênio limita a “extensão” das vibrações de estiramento, alterando, desta forma, o momento dipolar dos grupos envolvidos (C=O e N-H, neste caso). Devido ao caráter eletrostático destas ligações, os grupos envolvidos podem controlar, dentro de certos limites, a força desta interação mediante alterações na distância entre os dipolos, conforme sugerido pela fórmula abaixo.

$$F_{ele} = k \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

onde:

F_{ele} = força de atração eletrostática

K = constante dielétrica do meio

q = dipolo elétrico

r = distância entre os dipolos

A análise do espectro de tendão sem tratamento sugere que nos grupos aceptores de prótons, como a carbonila, a formação de ligações de hidrogênio limita a “extensão” das vibrações de estiramento dos grupos carbonila gerando, desta forma, um aumento da basicidade dos átomos de oxigênio destes grupos e uma atração mais intensa do átomo de hidrogênio do grupo amino²⁴. Como consequência, a intensidade das vibrações de estiramento dos grupos amino da (banda amida A) é maior que a vibração de estiramento dos grupos carbonila

(amida I) no espectro de tendão não tratado.

Por outro lado, ligações de hidrogênio provocam um aumento do momento dipolar dos grupos doadores de prótons, como a amina, uma vez que estas ligações tendem a se tornarem mais físseis devido a atração exercida pelo átomo de oxigênio sobre o átomo de hidrogênio. Portanto, aos átomos de nitrogênio (do grupo amina) interessa que a ligação torne-se mais fraca, favorecendo assim o deslocamento do par eletrônico em suas direções (dos átomos de nitrogênio). Para atingir este objetivo, os grupos amina se deformam, possibilitando assim o aumento de suas distâncias em relação aos grupos carbonila. O sucesso desta estratégia é comprometido, em parte, pela limitação das vibrações de deformação dos grupos amina devido ao caráter parcial de dupla ligação da ligação peptídica conforme mostrado na figura 10²³.

Figura 10²³ – Caráter parcial de dupla ligação da ligação peptídica



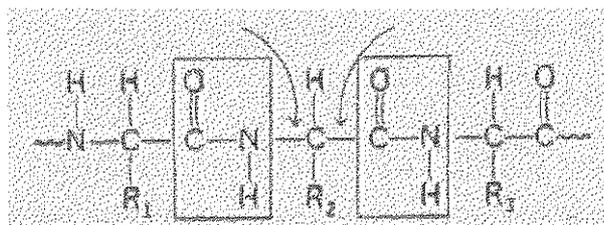
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

O caráter parcial de dupla ligação impede a livre rotação dos grupos amina em torno de seu eixo, limitando assim o espectro de vibrações de deformação destes grupos as vibrações de deformação no plano. Portanto, para minimizarem a atração exercida pelos grupos carbonila sobre seus átomos de

hidrogênio, os grupos amino vêem-se obrigados a aumentarem a intensidade de suas vibrações de deformação. Conseqüentemente, a intensidade da banda de deformação dos grupos amino (amida II) no espectro de tensão sem tratamento é significativa.

Ao contrário dos grupos amino, as vibrações de deformação dos grupos metileno (C-H) são facilitadas pela formação de uma ligação simples pura entre os átomos de carbono e hidrogênio. Ligações simples pura também unem os átomos de carbono alfa aos átomos de carbono da carbonila e aos átomos de nitrogênio dos grupos amino. Conseqüentemente, há uma grande liberdade de rotação (e portanto de deformação) em torno destas ligações de cada lado da unidade peptídica rígida (ver figura 11) ²³.

Figura 11 – Representação da liberdade de rotação da ligação C-H em torno da ligação peptídica.



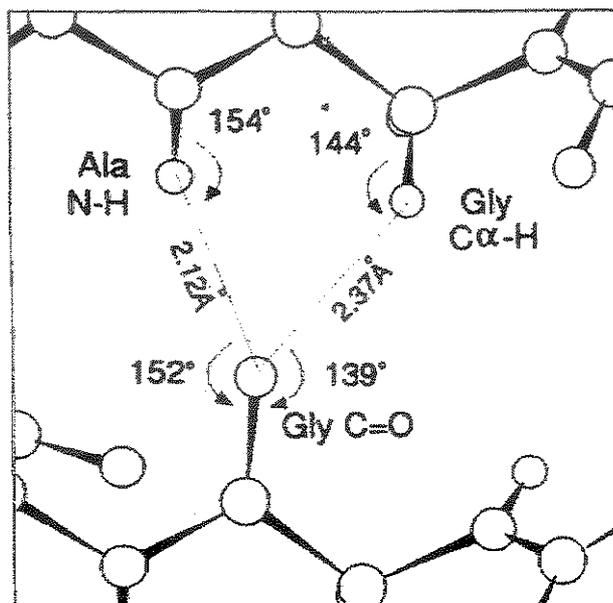
Esta maior possibilidade de deformação dos grupos metileno frente as alterações na força das ligações de hidrogênio possibilita a estes grupos otimizarem suas distâncias em relação as adjacências. Como conseqüência da maior gama de possibilidades de vibrações de deformação, a intensidade de cada

tipo destas vibrações isoladamente é pequena.

Grupos metileno (C-H) também podem formar ligações de hidrogênio com os grupos carbonila, aumentando assim a "extensão" de suas vibrações de estiramento. Ligações de hidrogênio entre os dois grupos (C-H ... O=C) carbonila e metileno são encontradas no espectro de FTIR abaixo de 400 cm^{-1} [22] portanto fora do alcance do espectrômetro usado neste trabalho.

A existência destas ligações foi questionada por Donohue em 1968. Contudo, recentes estudos de cristalografia (Bella) da tripla hélice do colágeno demonstram sua existência. Estes estudos indicaram que estas ligações não são determinantes da estrutura protéica e que elas só se formam quando fortes interações resultam em uma justaposição favorável entre doador-receptor, resultando em um pequeno acréscimo de energia das ligações de hidrogênio (ver figura 12) ²⁵.

Figura 12 – Representação esquemática de uma ligação de hidrogênio entre os grupos C-H e C=O
entre os grupos C-H e C=O

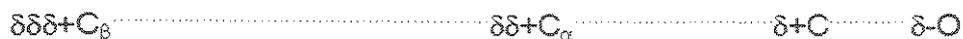


É possível que os tratamentos utilizados neste trabalho impessam a formação favorável destas justaposições, impedindo a formação destas ligações, o que explicaria a diminuição relativa da intensidade destas bandas quando comparado o espectro de tendão sem tratamento aos demais.

O efeito resultante das ligações de hidrogênio sobre as demais vibrações da região "backbone" (estiramento dos grupos C-C α e C-N) pode ser entendido como resultado do efeito indutivo dos grupos carbonila sobre as demais bandas espectrais. Chama-se efeito indutivo a propagação das alterações no momento dipolar de uma banda ao longo da cadeia². O efeito é maior nas ligações vizinhas

a região de origem, diminuindo progressivamente ². A figura 13 ilustra este efeito ao longo da cadeia de colágeno de modo esquemático.

Figura 13 ² – Representação esquemática do efeito indutivo ao longo da cadeia



Ao se tornar mais básico (devido ao enfraquecimento da ligação de hidrogênio) o átomo de oxigênio do grupo carbonila atrai mais intensamente os pares eletrônicos dos orbitais σ_{p-p} e π . Como consequência, o átomo de carbono do grupo carbonila procura suprir sua “deficiência eletrônica” atraindo mais intensamente o par eletrônico da ligação C-C_α (por esta razão, o átomo de C_α é representado por δδ+). O efeito persiste ao longo da cadeia de modo progressivamente mais brando devido a decrescente diferença de eletronegatividade das ligações C=O > C-C_α > C_α-C_β e ao fato da propagação da energia no sistema não ser conservativa.

Todavia, a magnitude das alterações da intensidade destas bandas não se altera de modo tão significativo quanto a das bandas amida A e amida I porque os grupos C-N, C-C_α, N-C_α situam-se ao longo do eixo da fibra, de modo que o estiramento destas bandas é limitado pelo PM (peso molecular) da cadeia peptídica.

Os resultados da comparação entre as intensidades de bandas distintas nos 4 espectros é discutido abaixo:

GRUPOS C=O (AMIDA I)

Chama-se amida I, a banda espectral que representa as vibrações de estiramento dos grupos carbonila (C=O), constituindo a banda mais importante do espectro [19,26,27].

Nos grupos carbonila, o orbital π está polarizado no sentido do átomo de oxigênio ocorrendo fraca interação entre este orbital e os grupos ligados a carbonila devido a menor eletronegatividade do átomo de carbono. Ao sofrer uma reação de substituição eletrofílica (como na formação de uma ligação peptídica), os substituintes interagem com os orbitais π , mantendo o átomo de oxigênio mais ou menos perpendicular ao plano da ligação, em posição trans em relação aos grupos amino, gerando um aumento da basicidade deste átomo²⁴.

Lazarev¹⁹ considera a banda de amida I um indicador apropriado para detectar importantes parâmetros estruturais como ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, estado de agregação e organização supramolecular das fibras de colágeno.

Os resultados deste trabalho confirmam esta hipótese ao verificar que há uma relação inversa entre a intensidade da banda amida I e o estado de agregação molecular (ver tabela 2), uma vez que o aumento da agregação molecular limita a "extensão" das vibrações de estiramento dos grupos carbonila.

Nossos resultados sugerem, também, que a relação entre as intensidades das bandas amida I/amida A diminui a medida que a agregação molecular aumenta (ver tabela 3), porque as ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e amino (C=O e N-H), situam-se perpendiculares ao longo eixo da fibra²⁰. Desta forma, um aumento na agregação molecular destas fibras gera uma diminuição do momento dipolar do grupo carbonila aumentando a basicidade (afinidade por prótons) do átomo de oxigênio tornando, conseqüentemente, a atração do átomo de hidrogênio dos grupos amino pelos átomos de oxigênio dos grupos carbonila mais intensa, aumentando, desta forma, a amplitude da banda amida A (vibração de estiramento dos grupos amino).

GRUPOS AMINO (AMIDA A e II)

As bandas espectrais que representam as vibrações de estiramento e deformação dos grupos amino (N-H) chamam-se, respectivamente, amida A e amida II.

A característica de acceptor de orbitais σ do átomo de hidrogênio possibilita a formação de ligações de hidrogênio pelos grupos amino (N-H)²⁸. Devido a natureza eletrostática destas ligações, sua força aumenta a medida que os átomos envolvidos se aproximam²⁹ (ou se agregam), conforme demonstrado pela fórmula ao lado:

$$F_{\text{ele}} = k \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

F = força eletrostática

K = constante dielétrica do meio

q = carga elétrica

r = distância nuclear

Os resultados deste trabalho mostram que a intensidade das vibrações de estiramento e deformação dos grupos amino (N-H) mantêm uma relação inversa com o estado de agregação molecular, provavelmente, porque o enfraquecimento das ligações de hidrogênio possibilita uma maior liberdade de movimento destes grupos, uma vez que a atração dos átomos de hidrogênio pelos átomos de oxigênio via ligações de hidrogênio torna-se menos intensa, possibilitando a aproximação do átomo de hidrogênio a cadeia protéica. Em consequência desta aproximação, o átomo de hidrogênio do grupo amino fica submetido a ação de 2 forças:

- Repulsão nuclear gerada pela diminuição da distância interatômica em relação aos átomos de nitrogênio e das cadeias laterais;
- Repulsão eletrostática causada pela maior proximidade dos átomos de hidrogênio das cadeias laterais (grupos metileno).

A repulsão nuclear pode ser considerada um processo dinâmico porque o aumento desta força gera um aumento da força de atração e vice-versa, de modo

que o átomo de hidrogênio passa a ocupar uma “faixa de espaço” cujos limites são regulados pelas forças de atração e repulsão.

Conforme sugerido por nossos resultados (intensidade da banda) a amplitude desta faixa aumenta a medida que a força das ligações de hidrogênio diminuem, uma vez que estas ligações “limitam” estes movimentos rítmicos a uma “faixa de espaço” menor.

Por sua vez, o aumento da força de repulsão eletrostática força os grupos amino a se deformarem mais intensamente como forma de otimizar sua energia de interação em relação aos grupos adjacentes. A energia é considerada ótima quando a atração é máxima e a repulsão é mínima, o que significa que os grupos não podem estar muito distantes, porque a energia seria muito fraca; nem muito próximos, porque a repulsão seria intensa.

GRUPOS C-H

Foi observado que a relação entre as vibrações de deformação e estiramento dos grupos C-H aumenta a medida que o estado de agregação molecular das fibras de colágeno diminui, por razões análogas a dos grupos amino (N-H). Todavia, ao contrário dos grupos amino, os grupos C-H possuem ampla liberdade de rotação em torno de seu eixo, o que permite a estes grupos otimizar rapidamente suas posições quando houver alterações na agregação molecular das fibras de colágeno.

O enfraquecimento das ligações de hidrogênio fornece mais “espaço” para os grupos químicos se distenderem gerando, provavelmente, um aumento das

forças de repulsão devido a aproximação de grupos adjacentes. Como consequência, os grupos metileno procuram se afastar. Em virtude deste movimento ser caótico, o afastamento de dois grupos metileno leva a aproximação a um terceiro.

As vibrações de deformação possibilitam a minimização das forças de repulsão uma vez que possibilitam aos grupos metileno restringirem seu "espaço" mediante rotações em torno do seu eixo e alterações no ângulo da ligação C-H. A consequência natural deste fato é um aumento generalizado na intensidade destas vibrações.

GRUPOS C-C α

Alterações na força das ligações de hidrogênio afetam indiretamente as bandas de estiramento dos grupos C-C α através do efeito indutivo.

A relação entre as intensidades das bandas de estiramento dos grupos C-C α /C-H aumenta a medida que o estado de agregação molecular diminui como consequência do efeito indutivo, de modo que um enfraquecimento das ligações de hidrogênio possibilita uma vibração de estiramento mais intensa por parte dos grupos carbonila. Conseqüentemente, o átomo de carbono deste grupo torna-se eletronicamente deficiente. Como foi dito anteriormente, o efeito indutivo diminui ao longo da cadeia de modo que ele é mais intenso na ligação C-C α do que na ligação C-H. Portanto, a relação entre a intensidade destas bandas aumenta a medida que a agregação molecular diminui.

Por estarem situados no “backbone” da proteína a intensidade dos grupos C-C α se altera pouco face aos tratamentos utilizados uma vez que a cadeia proteica oferece uma “barreira” ao estiramento destes grupos.

GRUPOS C-N

Denomina-se amida III, a banda espectral que representa as vibrações de estiramento dos grupos C-N .

Baseado no estudo de peptídeos sintéticos, Weaver³⁰ sugeriu que a banda amida III fosse usada como indicadora da conformação de peptídeos em solução aquosa, uma vez que sua frequência se altera com a modificação do peso molecular (PM) do aminoácido da posição X. Estes dados não podem ser transpostos para este trabalho, porque o peso molecular de uma estrutura como o tendão inviabiliza qualquer tentativa de análise neste sentido.

Ligações peptídicas possuem propriedades conformacionais peculiares. A estrutura trigonal plana do átomo de nitrogênio e o forte envolvimento do seu orbital 2p com o orbital π^* da carbonila forçam a ligação a adotar uma estrutura coplanar²⁴.

A banda amida III sofre influência indireta das alterações na força das ligações de hidrogênio de modo que o enfraquecimento destas ligações promove um aumento de $\mu_{C=O}$ e de μ_{N-H} gerando uma maior atração do pares eletrônicos dos orbitais π e σ_{p-p} e σ_{s-p} nos sentidos $\delta^+C \rightarrow \delta^-O$ e $\delta^+H \rightarrow \delta^-N$, respectivamente. O aumento nos valores de δ^+ para o átomo de carbono e de δ^- para o átomo de

nitrogênio permitem que o par eletrônico do orbital σ_{s-p} seja atraído com maior intensidade, gerando, conseqüentemente um aumento do momento dipolar da ligação C-N.

O fortalecimento das ligações de hidrogênio (devido ao aumento da agregação molecular) gera uma diminuição de μ_{N-H} e de $\mu_{C=O}$ e por extensão uma diminuição da densidade eletrônica no átomo de nitrogênio e um aumento da mesma no átomo de carbono. Como resultado, há uma diminuição do momento dipolar da ligação C-N e conseqüentemente da intensidade da banda amida III.

A utilização de outras técnicas como a NMR (ressonância magnética nuclear) e modelagem molecular, embora sejam amplamente utilizadas na elucidação de aspectos moleculares da estrutura das moléculas de colágeno [31-45], mostram-se inviáveis à natureza deste trabalho. A técnica de NMR detectaria uma quantidade excessiva de sinais (átomos de 1H ou ^{15}N) devido a grande quantidade destes átomos no tendão inviabilizando, desta forma, qualquer tentativa de análise. A técnica de modelagem molecular criaria uma matriz por demais complexa para ser analisada.

5 CONCLUSÕES

Com os dados obtidos no presente trabalho podemos concluir o seguinte:

1) A técnica de FTIR é capaz de detectar alterações na agregação molecular das fibras de colágeno presentes no tendão.

2) A banda amida I é o melhor indicador da alteração na agregação molecular nas fibras de colágeno.

3) A intensidade da banda amida I diminui com o aumento da agregação molecular das fibras de colágeno no tendão.

4) A relação entre as intensidades das bandas amida II e amida A, amida I e amida A, estiramento e deformação dos grupos C-H e estiramento dos grupos C-C_α e C-H aumenta a medida que as ligações de hidrogênio da molécula se fortalecem.

5) As alterações espectrais observadas são decorrentes de alterações na basicidade do átomo de oxigênio do grupo carbonila provenientes de alterações na força das ligações de hidrogênio, as quais são geradas por mudanças no estado de agregação molecular.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COLEMAN, P.B. Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis. CRC Press. Cap 1, 1993.
2. MARCH, J. Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms and structure. 2 ed. Mc. Graw-Hill Kogakusho, Ltda. Cap 1, 1977.
3. CAREY, F. A. Organic Chemistry. 3 ed. McGraw-Hill Company, INC. Cap 1, 1996.
4. RAVK, A. Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. Cap 3, 1994.
5. DLUHY, R. A. & MENDELSON, R. Emerging techniques in biophysical FT-IR. Analytical Chemistry. v.60 (4), p.269a, 1988.
6. O'LEARY, Y.; KANEUCHI, F.; IWAMOTO, T.; YOSHIURA, M. & IRIYAMA, K. Nondestructive analysis of biological materials by FT-IR-ATR. Method I: direct evidence for the existence of collagen helix structure in lens capsule. Application Spectroscopy, v.43 (1), p.138, 1989.

7. OZAKI, Y.; MIURA, T., SAKURI, K. & MATSUNAGA, T. Nondestructive analysis of water structure and content in animal tissues by FT-IR spectroscopy with light-fiber optics. Part I: human hair. Application Spectroscopy, v.46 (5), p.875, 1992.
8. BENEDETTI, E.; TEODORI, L.; TRINCA, M. L.; VERGAMINI, P.; SALVATI, F.; MAURO, F. & SPREMOLLA, G.. A new approach to the study of human solid tumor cells by means of FT-IR microspectroscopy. Application Spectroscopy, v.44 (8), p.1276, 1990.
9. WONG, P.T.T. & RIGAS, B.. Infrared spectra of microtome sections of human colon tissues. Application Spectroscopy, v.44 (10), p.1715, 1990.
10. RAVA, R. P.; BARAGA, J. J. & FELD, M. S. Near infrared Fourier transform raman spectroscopy of human artery. Spectrochimica Acta, v.47 A, p.509, 1991.
11. BARAGA, J. J.; FELD, M. S. & RAVA, R. P. Detection of atherosclerosis in human artery by mid-infrared attenuated total reflectance. Application Spectroscopy, v.45(4), p.709, 1991.
12. JACKSON, M. et al. Beware of Connective Tissue Proteins: Assignment and Implications of Collagen Absorptions in Infrared Spectra of Human Tissue. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1270, p. 1-6, 1995.

13. ELLIOTT, D. H. Structure and function of mammalian tendon. Biology Review. v.40, p.392-421, 1965.
14. VIDAL, B. C. Colágeno, uma Proteína Especial: Medicina e Biologia. Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins, p.449-71.
15. VIDAL, B. C. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. Protoplasma, v.59, p.472-9, 1964.
16. VIDAL, B. C. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. Cellular and Molecular Biology, v.26, p.415-21, 1980.
17. VIDAL, B. C. Ordem molecular y haces de colágeno. Trab. Inst. Cajal. v.75, p.19-27, 1984. INOUE, K; SAKAKIBARA, S & PROCKOP, D J. Effects of the Stereo-Configuration of the Hydroxyl Group in 4-Hydroxyproline on the Triple-Helical Structures Formed by Homogeneous Peptides Resembling Collagen. Biochimica et Biophysica Acta, v. 420, p. 133-41, 1976.
18. LAZAREV, Yu. A.; GRISHKOVSKY, B. A.; KHROMOVA, T. B.; LAZAREVA, A. V. & GRECHISHKO, V. S. Bound Water in the Collagen-Like Triple-Helical Structure. Biopolymers, v.32, p.189-195, 1992.

19. STRYER, L. Biología. 3 ed. Ed. Guanabara Koogan S.A. Cap. 11, 1992.
20. RAMACHARADAN, G. N. Stereochemistry of collagen. Int Journal Peptide Protein Research, v. 31, p.1-16, 1988.
21. DWIVEDI, A. M.; KRIMM, S. Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides and Proteins. XV. Crystalline Polyglycine II. Biopolymers, v. 21, p. 2377-97, 1982.
22. STRYER, L. Biología. 3 ed. Ed. Guanabara Koogan S.A. Cap. 2, 1992.
23. RAVK, A. Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. Cap 10, p. 160, 1994.
24. PADIYAR, G. S. Crystal and molecular structure of L-histidyl-L-serine trihydrate: occurrence of $C\alpha-H \cdots O=C$ hydrogen bond motif similar to the motif in collagen triple helix and sheets β . Journal Peptide Research, v.51, p.266-70, 1998.
25. LAZAREV, Yu. A.; GRISHKOVSKY, B. A.; KHROMOVA, T. B. Amide I Band of IR Spectrum and Structure of Collagen and Related Polypeptides. Biopolymers, v.24, p.1449-78, 1985.

26. PAYNE, K J; VEIS, A. Fourier Transform IR Spectroscopy of Collagen and Gellatin Solutions: Deconvolutions of the Amide I Band for Conformational Studies. Biopolymers, v. 2, p.1749-60, 1988
27. DOLZ, R & HEIDEMANN, E. Influence of different tripeptides on the stability of the collagen triple helix Analysis of the collagen sequence and identification of typical tripeptides. Biopolymers, v. 25, p.1069-80.
28. COMPANION, A. L. Chemical Bonding. McGraw-Hill Book Company. Cap. 4, 1964.
29. WEAVER, J. L.; WILLIAMS, R. W. Amide III Frequencies for Ala-X Peptides Depend on the X Amino Acid Size. Biopolymers, v. 30, p.593-7, 1990.
30. BECK, K & BRODSKY, B. Supercoiled Protein Motifs: The Collagen Triple-Helix and the (-Helical Coiled-Coil. Journal of Structural Biology, v.122, p.17-29, 1998.
31. BRODSKY, B & RAMSHAW, J A. The Collagen Triple-Helix Structure. Matrix Biology, v. 15, p. 545-54, 1997.
32. CHAN, V. C.; RAMSHAW, J A M; KIRKPATRICK, A & BECK, K. Positional Preferences of Ionizable Residues in Gly-X-Y Triplets of the Collagen Triple-helix. The Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 50, p. 31441-6, 1997.

33. FIELDS, G B & PROCKOP, D J. Perspectives on the synthesis and applications of triple-helical collagen model peptides. Biopolymers, v. 40, p. 345-57, 1996.
34. LI, M-H; FAN, P; BRODSKY, B. & BAUM, J. Two dimensional NMR assignments and conformation of Pro Hyp Gly and designed collagen triple helical peptide. Biochemistry, v. 32, p. 7377-87, 1993.
35. LIU, X; SIEGEL, D. L.; FAN, P., BRODSKY, B. & BAUM, J. Direct NMR measurement of the folding kinetics of a trimeric peptide. Biochemistry, v. 35, p. 4306-13, 1996.
36. _____. Nuclear Magnetic Resonance Shows Asymmetric Loss of Triple helix in Peptides Modeling a Collagen Mutation in Brittle Bone Disease. Biochemistry, v.37, p.15528-33, 1998.
37. LONG, C G; BRASWELL, E; ZHU, D.; APIGO, J; BAUM, J & BRODSKY, B. Characterization of Collagen-like Peptides Containing Interruptions in the Repeating Gly-X-Y Sequence. Biochemistry, v. 32, p. 11688-95, 1993.
38. MELACINI, G; FENG, Y & GOODMAN, M. Collagen-Based Structures Containing the Peptoid Residue N-Isobutyglycine (Nleu): Conformational Analysis of Gly-Nleu-Pro Sequences by ¹H-NMR and Molecular Modeling. Biochemistry, v.36, p.8725-32, 1997.

39. NAITO, A; TUZI, S; SAITÔ, H. A high-resolution ^{15}N solid-state NMR study of collagen and related polypeptides. The effect of hydration on formation of interchain hydrogen bonds as the primary source of stability of the collagen-type triple helix. European Journal Biochemistry, v.224, p.729-34, 1994.
40. NEMETHY, G & SCERAGA, H A. Free Energy of Hydration of Collagen Models and the Enthalpy of the Transition Between the Triple-Helical Coiled-Coil and Single-Stranded Conformations. Biopolymers, v.28, p.1573-84, 1989.
41. NEMETHY, G; Scheraga, HA. The Energy of Formation of Internal Loops in Triple-Helical Collagen Polypeptides. Biopolymers, v.35, p.607-19, 1995.
42. SHAH, N. K.; RAMSHAW, J. A. M.; KIRKPATRICK, A.; SHAH, C. & BRODSKY, B. A Host-Guest Set of Triple Helical Peptides: Stability of Gly-X-Y Triplets Containing Common Nonpolar Residues. Biochemistry, v.35, p.10262-8, 1996.
43. SMITH, CK. A Thermodynamic scale for α -sheet forming tendencies of the amino acids. Biochemistry, v. 33, p.5510-7, 1994.
44. VITAGLIANO, L; NEMETHY, G; ZAGARI, A. & SCHERAGA, H. A. Stabilization of the Triple-Helical Structure of Natural Collagen by Side-Chain Interactions. Biochemistry, v. 32, p.7354-9, 1993.