Universidade de São Paulo

Instituto de Física e Química de São Carlos

# "O papel da água de hidratação na estrutura e conformação de hemoproteínas visto pelas mudanças na simetria e estado de spin do centro ativo: um estudo por RPE"

**Ladislau Martin Neto**

Tese apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos, para obtenção do Título de Doutor em Ciências ( Física Aplicada )

[redacted]

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

Departamento de Física e Ciência dos Materiais

São Carlos - 1988

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE** _____
Ladislau Martin Neto _____ **APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM** 08 **DE** julho **DE** 1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento (orientador)

Prof. Dr. José Nelson Onuchic

Prof. Dr. George Bemski

Prof. Dr. Nilce Correia Meirelles

Prof. Dr. Maria Tereza Lamy Freund

Dedico

À Mitze e à minha família.

# *Agradecimentos*

Ao término desse trabalho gostaria de agradecer as pessoas que estiveram mais diretamente envolvidos em sua realização.

Ao *Prof. Otaciro Rangel Nascimento*, orientador desde o Mestrado, pelo apoio fundamental na realização do trabalho e na minha formação acadêmica, pela confiança e amizade sincera nestes seis anos de convivência.

Ao *Prof. Sérgio Mascarenhas* pela sugestão do trabalho, pelo inestimável apoio dentro da UAPDIA - EMBRAPA, pela confiança e amizade.

Ao *Prof. Marcel Tabak* pelo interesse e apoio relevante durante todo o trabalho e pela amizade demonstrada.

À *Profa. Rosemary Sanches* pela colaboração no início do trabalho, sugestões, apoio e pela amizade.

Ao *Prof. Oswaldo Baffa Filho* pelos incentivos, sugestões, colaboração, amizade e convivência bem humorada no Laboratório de Biofísica.

Ao *Prof. José Nelson Onuchic* pelas críticas e sugestões no final do trabalho e pela amizade.

Ao *Sanches*, *Isabel* e *Sueli* pela boa vontade em me ajudar, pelos incentivos, sugestões e pela amizade desses seis anos.

À *Wanda D. P. de Jesus* pela colaboração, medidas de eletroforese e também pela amizade.

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS
FÍSICA

À *Dra. Janice R. Perussi* pelas sugestões e discussões valiosas e pela amizade.

Às *Dras. Lúcia Panepucci* e *Ana Rita Nogueira* da UEPAE - EMBRAPA pelo auxílio na obtenção de sangue bovino e pela amizade.

À *Dra. Eliane Wajnberg* do CBPF - Rio de Janeiro, pelas medidas em temperaturas abaixo de $N_2$ líquido.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica pela convivência agradável e colaboração: *Ignez*, *Carlos*, *Marinônio*, *Silvério*, *Eneida*, *Ulysses*, *Cidão*, *Márcio*, *Adolfo*, *Maria do Carmo*, *Paulo* e *Antonio*.

A *todos os funcionários da UAPDIA - EMBRAPA* pela colaboração e excelente ambiente de trabalho e pela amizade.

Aos *Pesquisadores da UAPDIA* pelo apoio, incentivo e espírito de cooperação sempre demonstrado e pela amizade: *Colnago*, *Mauro*, *Paulo Cruvinel*, *Herman*, *Clóvis*, *Meire*, *Ladislau Rabello*, *Silvio*, *Wilson*, *Valim* e *Carlos*.

Ao *Valentim Monzane* pela confecção dos excelentes desenhos e pela amizade.

Ao *Marcelo L. Simões* pela colaboração no xerox e montagem das figuras e pela amizade.

Ao *Aldimar* e *Celso* pela ajuda na obtenção de nitrogênio líquido e pela amizade.

Ao *Valdir* e *Valdeci* do Setor de Computação pela colaboração imprescindível e pela amizade.

À *Maria Helena* e *Dr. Hidetaki* pela colaboração e auxílio nas medidas de absorção ótica e pela amizade.

Ao *Italo* e *Eduardo* pelo trabalho de encadernação.

Aos *Funcionários do DFCM* pelos inúmeros serviços prestados.

À *FAPESP*, *CNPq* e à *EMBRAPA* pelo apoio financeiro.

À *Nêuri L. M. Antunes* pelo excelente trabalho de datilografia.

À *Mitze* pelo apoio, compreensão e dedicação destes anos todos.

À *Minha Família* pelo estímulo, apoio e equilíbrio transmitido durante toda minha vida.

# Indice

LISTA DE FIGURAS ..... i

LISTA DE TABELAS ..... ix

RESUMO ..... x

ABSTRACT ..... xiii

INTRODUÇÃO ..... 1

CAPITULO I. HEMOGLOBINA E MIOGLOBINA ..... 5

1.1. Introdução ..... 5

1.2. Propriedades fisiológicas ..... 8

1.3. Mioglobina ..... 10

1.4. Hemoglobina ..... 12

1.5. Meta Hb e Hidroxi Hb ..... 15

1.6. Hemicromo ..... 15

1.7. Nitrosil-Mb ..... 18

CAPITULO II. HIDRATAÇÃO DE PROTEINAS GLOBULARES ..... 20

2.1. Interações específicas água-proteína ..... 20

2.2. Estágios no Processo de Hidratação ..... 23

2.3. O papel da água na estrutura da Mb e Hb ..... 26

2.3.1. Aspectos estáticos ..... 26

2.3.2. Aspectos dinâmicos ..... 30

CAPITULO III. TEORIA DE RESSONANCIA PARAMAGNETICA ELETRONICA - ( RPE ) ..... 38

3.1. Introdução ..... 38

3.2. Hamiltoniano de Spin ..... 39

3.3. Ion Ferro em Hemoproteínas ..... 41

3.3.1. Introdução ..... 41

3.3.2. Hamiltoniano de Spin e Níveis de Energia para o íon Ferro (III) ..... 45

3.3.2.1. $Fe^{3+}$ - S = 5/2 ..... 45

3.3.2.1.1. Efeito da temperatura no espectro de RPE ..... 52

3.3.2.2. $Fe^{3+}$ - S = 1/2 ..... 54

3.3. Efeito "g-strain" ..... 60

3.4. Nitrosil hemiproteínas ..... 61

3.5. Efeitos da Probabilidade de Transição e Temperatura nas Absorções de RPE ..... 66

CAPITULO IV. MATERIAIS E METODOS ..... 69

4.1. Preparação de meta Mb ..... 69

4.2. Variação da hidratação das amostras liofilizadas ..... 70

4.3. Preparação de Nitrosil-Mb ..... 71

4.4. Adição de "spin-trap" a meta Mioglobina ..... 72

4.5. Medidas de RPE ..... 73

4.6. Medidas de Absorção Eletrônica ..... 73

4.7. Medidas de Temperatura ..... 74

4.8. Cálculo da Area das Linhas de RPE ..... 74

CAPITULO V. RESULTADOS ..... 76

5.1. Meta Mioglobina ..... 76

5.1.1. Medidas a T = -160°C ..... 76

5.1.2. Medidas com "spin-trap" ..... 93

5.1.3. Medidas a temperaturas abaixo de $N_2$ líquido ..... 93

5.2. Meta Hemoglobina ..... 95

5.3. Cálculos a, b, c, $V/\lambda\delta/\lambda$, $V/\varepsilon$ para os hemicromos ..... 111

5.4. Nitrosil - Mb ..... 113

5.5. Testes Nitrosil - Hb ..... 119

**CAPITULO VI.** DISCUSSÃO ..... 121

6.1. Meta Mioglobina ..... 121

6.2. Meta Hemoglobina ..... 130

6.3. Nitrosil - Mb ..... 140

6.4. Testes Nitrosil - Hb ..... 144

**CAPITULO VII.** CONCLUSÕES ..... 145

7.1. Meta Mioglobina ..... 145

7.2. Meta Hemoglobina ..... 146

7.3. Nitrosil - Mb ..... 148

7.4. Sugestões para continuidade dos estudos ..... 149

APENDICE ..... 151

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS ..... 152

# *Lista de Figuras*

**Figura 1.** Grupo heme ( Dickerson & Geis, 1983 ). Através dos grupos carboxilatos, das posições 6 e 7, o grupo heme se liga a porção proteica da Hb e Mb.

**Figura 2.** Estrutura do grupo heme, mostrando também as histidinas proximal F8 e distal E7; a esfera hachurada representa a posição do 6º ligante.

**Figura 3.** Curvas de oxigenação para a Mb e Hb em pH = 7,6 , 7,4 e 7,2 ( Dickerson, R.E. & Geis, I. , 1983 ).

**Figura 4.** Molécula de mioglobina, mostrando os carbonos α e as oito extensões de hélices α ( A α H ) ( Lehninger, 1975 ).

**Figura 5.** Molécula de oxi-hemoglobina ( Cantor & Schimmel, 1980, Vol. I ).

**Figura 6.** Molécula de desoxi-hemoglobina ( Cantor & Schimmel, 1980, Vol.I ).

**Figura 7.** Um esquema de hemicromos reversível e irreversível : em dois dos três hemicromos, a 5ª posição de coordenação do ferro do heme está ligado a histidina proximal ( F8 ) e na sexta coordenação a histidina distal ( E7 ).

**Figura 8.** Vista esquemática da organização estrutural da água em torno de uma proteína globular.

**Figura 9.** Propriedade do sistema lisozima - água como uma função do conteúdo de água. O valor da barra vertical na figura é dado separadamente para cada curva, na respectiva unidade de medida.

**Figura 10.** Espectros de RPE da meta Mb, de uma mesma amostra, nas seguintes condições ( Yonetani & Scheleyer , 1967 ):

**a)** liofilizada

**b)** parcialmente hidratada

**Figura 11.** Dependência da temperatura da velocidade de relaxação dielétrica da água na metamioglobina ( círculos cheios, escala da esquerda ) e da velocidade de transição conformacional dos átomos de ferro ( círculos vazios, escala da direita ) ( Singh et al., 1981 ).

**Figura 12.** Calor específico da água em cristais de mioglobina (-Δ-) como uma função da temperatura. Os dados foram calculados da diferença Δ dH/dT entre duas medidas. O primeiro experimento foi com cristais intactos, e o segundo depois de secar o mesmo cristal a 80°C sob fluxo de nitrogênio. O calor específico do gelo (—) também é dado.

**Figura 13. a)** Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético

**b)** A forma de linha da absorção de energia da microonda

**c)** Derivada da linha de absorção.

**Figura 14. (a)** Ocupação possíveis dos orbitais d pelos elétrons do íon $Fe^{2+}$ e $Fe^{3+}$

**(b)** Efeito do campo cristalino Δ no estado de spin para o íon $Fe^{3+}$ .

**Figura 15.** Dependência angular das funções de onda 3d.

**Figura 16.** Efeito do campo cristalino nos níveis de energia dos orbitais d:

**a)** íon livre ( simetria esférica )

**b)** vizinhança octaédrica

**c)** octaedro com distorção tetragonal.



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

**Figura 17**. Níveis de energia de um íon com S = 5/2

**a)** íon livre em um campo magnético externo

**b)** íon em um campo cristalino axial com Ho// Z

**c)** íon em um campo cristalino axial com Ho Z.

**Figura 18**. Espectro de RPE típico da meta Mb ( amostra policristalina ou solução congelada ):

**a)** linha contínua é a curva teórica e a pontilhada é o sinal observado experimentalmente mostrando o alargamento de linha;

**b)** a derivada da linha de absorção.

**Figura 19**. Representação vetorial da orientação do eixo de quantização do heme ( Feher, 1970 ).

**Figura 20**. Valores de g efetivo em função de $\lambda$ - E/D ( Wickman et al., 1965 ).

**Figura 21**. Distribuição da população de spin nos três dubletos de Kramers para ferrimioglobina-flúor ( Peisach et al., 1971 ).

**Figura 22**. População fracional do menor dubleto de Kramers para três proteínas com S = 5/2, com os valores de D = 10cm$^{-1}$ ( Ferri Mb); 5,05 cm$^{-1}$ ( Ferri Mb- flúor ) e 0,55 cm$^{-1}$ ( $Mn^{2+}$ - Mioglobina ).

**Figura 23**. O espectro de RPE típico de ferrihemeproteínas com spin baixo ( 1/2 ):

**(a)** 1ª derivada do espectro de absorção

**(b)** espectro de absorção. A linha pontilhada é o espectro teórico, supondo componente de largura de linha zero ( Poole, 1983 ).

**Figura 24**. Orbitais $3d^5$ em diferentes condições de campo cristalino.

**Figura 25**. Espectro de RPE típico do grupo NO ligado ao ferro ( pentacoordenado ) em hemoproteínas.

**Figura 26**. Modelo usado para calcular a função de onda eletrônica do sistema nitrosil hemoproteína.

**Figura 27**. Estrutura eletrônica mais satisfatória em termos dos parâmetros de RPE.

**Figura 28**. Espectro típico de RPE mostrando os trapézios de largura unitária.

**Figura 29**. Espectros de RPE da meta Mb de baleia em diferentes graus de hidratação.

**Figura 30**. Espectros de RPE da meta Mb equina em diferentes graus de hidratação.

**Figura 31**. Espectros de RPE da meta Mb em diferentes graus de hidratação, na região de campo baixo.

**Figura 32**. Gráfico da variação de $\Delta H_I$ em função do grau de hidratação, para a meta Mb de baleia.

**Figura 33**. Gráfico da variação de $\Delta H_I$ em função do grau de hidratação, para a meta Mb equina.

**Figura 34**. Gráfico da área de sinal com g ~ 6 em função do grau de hidratação, para a meta Mb de baleia.

**Figura 35**. Gráfico da área dos sinais com g ~ 2 em função da hidratação, para a meta Mb de baleia.

**Figura 36**. Espectros de absorção de RPE da meta Mb de baleia:

a) 0,03 g $H_2O$/g Mb

b) 0,24 g $H_2O$/g Mb.

**Figura 37**. Gráfico da área total das absorções de RPE em função do grau de hidratação para a meta Mb de baleia.

**Figura 38**. Variação do sinal com g = 4,3 em função do grau de hidratação para a meta Mb de baleia obtida pela aproximação I . $\Delta H^2$.

**Figura 39**. Espectros de RPE de amostras secas em uma estufa a T = 105°C por 24 horas:

a) meta Mb equina

b) meta Hb bovina

**Figura 40**. Gráfico da Intensidade do sinal do radical ( g = 2,01 ) em função da hidratação, na meta Mb de baleia.

**Figura 41**. Espectros de RPE da meta Mb equina liofilizada obtida a partir de soluções com os seguintes pHs:

a) pH = 9,8

b) pH = 7,3

**Figura 42**. Espectros de RPE:

a) solução de meta Mb

b) mesma solução de a) depois da adição de azida sódica.

**Figura 43**. Espectros de absorção de RPE da meta Mb de baleia, obtido da tela do osciloscópio do espectrômetro:

a) antes correção linha base

b) depois correção linha base.

**Figura 44**. Espectros de RPE da meta Mb equina com "spin-trap" mostrando:

**a)** espectro do "spin-trap" na meta Mb equina liofilizada, medido a R = -160°C

**b)** espectro da mesma amostra que a) dissolvido em água e medido a T = 25°C.

**Figura 45**. Espectro de RPE da meta Mb de baleia com 0,06 g $H_2O$/g Mb medido a T = 8 K.

**Figura 46**. Gráfico da largura de linha ( $\Delta H_1$ ) para amostras em diferentes graus de hidratação em função da temperatura da medida, para a meta Mb de baleia.

**Figura 47**. Espectros de RPE da meta Hb humana em diferentes graus de hidratação.

**Figura 48**. Espectros de RPE da meta Hb bovina em diferentes graus de hidratação.

**Figura 49**. Espectros de RPE da meta Hb humana

**a)** amostra liofilizada ( normal )

**b)** amostra liofilizada a partir de uma solução na qual adicionou-se N-etil-maleimida ( NEM )

**Figura 50**. Espectros de RPE:

**a)** meta Hb humana liofilizada ( Sigma )

**b)** meta Hb equina ( Sigma )

**c)** meta Hb bovina ( preparada no Laboratório de Biofísica ).

**Figura 51**. Gráfico da variação de $\Delta H_1$ em função do grau de hidratação para a meta Hb humana.

**Figura 52**. Variação da área do sinal com g ~ 6 em função do grau de hidratação para a meta Hb humana.

**Figura 53**. Variação da área do sinal com g ~ 6 em função da hidratação para a meta Hb bovina. Obtida pela aproximação $I . \Delta H^2$.

**Figura 54**. Variação da área das linhas com g ~ 2 (hemicromos H e P) em função da hidratação para a meta Hb humana.

**Figura 55**. Variação da área total ( g ~ 6 + hemicromos ) em função do grau de hidratação para a meta Hb humana.

**Figura 56**. Variação da área do sinal com g = 4,3 em função da hidratação para a meta Hb humana. Obtida pela aproximação $I. \Delta H^2$.

**Figura 57**. Variação da intensidade do sinal do radical livre (g = 2,01) em função da hidratação para a meta Hb bovina.

**Figura 58**. Espectros de RPE da meta Mb de baleia em diferentes graus de hidratação:

**a)** sem adição de gás NO.

**b)** depois da adição de NO

**Figura 59**. Espectros de RPE:

**a)** amostra de meta Mb com 0,30 g $H_2O$/g Mb na qual adicionou-se NO e depois dissolveu-se em água ( coloração verde ), medido a T = -160°C, P = 10 mW, Ampl. Modulação = 8 Gauss.

**b)** mesma amostra de a) aós adição de nova quantidade de NO na amostra em solução.

**Figura 60**. Espectros de RPE mostrando o sinal com g ~ 6, antes ( a e c ) e depois ( b e d ) da adição de gás NO na meta Mb de baleia em dois graus de hidratação diferentes:

a) e b) seca

c) e d) 0,30 g $H_2O$/g Mb.

**Figura 61**. Gráfico da variação da diferença da largura de linha do sinal com g ~ 6 antes e depois da adição de gás NO na meta Mb de baleia em função do grau de hidratação.

**Figura 62**. Espectro de RPE:

**a)** solução de meta Mb de baleia - C = 1 mM

**b)** mesma amostra de a após adição de gás NO em excesso.

**Figura 63**. Espectros de RPE medidos a T = -160°C, P = 10 mW, Ampl. Mod. = 8G:

**a)** meta Hb bovina liofilizada ( Sigma ) + NO

**b)** meta Hb humana liofilizada + NO

**c)** ( meta Hb humana + NEM ) liofilizada + NO

**Figura 64**. Região próximo ao heme na cadeia β da oxi Hb mostrando a hélice F, com o resíduo histidina proximal ( posição 92 ) coordenado ao ferro. O aminoácido da posição 93 é a cisteína ( $\beta^{93}$ ).

**Figura 65**. Titulação com PCMB ( método de Boyer, 1954 ) para a meta Hb bovina ( Sigma ) e meta Hb humana ( biof. ).

**Figura 66**. Espectros de RPE de solução de meta Hb ( 1 mM ) à qual adicionou-se spin-label ( 5 mM ), derivado da maleimida:

**a)** meta Hb bovina ( Sigma )

**b)** meta Hb humana ( biof. )

# *Lista de Tabelas*

**Tabela I.** Alguns ligantes que podem ocupar a 6ª coordenaçãodo ferro no heme e o efeito sobre a valência e estado de spin do íon ferro ( Antonini, E. & Brunori, M., 1971 )

**Tabela II.** Quantidade de água "ligada" em soluções aquosas de proteína

**Tabela III.** Porcentagem de conversão de derivados, da meta Hb bovina para hemicromo H ( bi-histidina ) em diferentes preparações ( Alter, 1983 ).

**Tabela IV.** Valores da Separação de Campo Zero ( D ) para alguns derivados da Mb e Hb ( Yonetani et al., 1970 ).

**Tabela V.** Os três sistemas propostos para estudar as diferentes formas estruturais de nitrosilhemoproteínas.

# *Resumo*

Neste trabalho foi estudado a influência da água na estabilização da estrutura e conformação da mioglobina ( Mb ) e hemoglobina ( Hb ) através de mudanças no centro ativo ( grupo heme ), detectadas por Ressonância Paramagnética Eletrônica ( RPE ).

Utilizou-se os derivados meta Mb e nitrosil-Mb de baleia, meta Mb equina, meta Hb humana e meta Hb bovina. Amostras com diferentes graus de hidratação ( 0 a 0,50 g $H_2O$/g proteína ) foram submetidas as medidas de RPE, à T = -160ºC, acompanhando o sinal do íon ferro (III) nas meta Mb ( e Hb ) e do grupo NO na nitrosil-Mb. A fração populacional dos complexos formados foram obtidos a partir da integral dupla do espectro de RPE.

Na desidratação da meta Mb 65% das moléculas perderam a água da sexta coordenação do ferro (III) dando origem a outros complexos. Um desses complexos foi o hemicromo H ( bi-histidina ) onde um átomo de nitrogênio da histidina distal E7 se coordena ao ferro, com a hélice E se movimentando em direção ao heme. Adicionalmente a formação do hemicromo observou-se uma diminuição de 40% de moléculas detectáveis por RPE, na desidratação, e sugeriu-se a formação de moléculas com ferro reduzido [Fe (II)] como explicação para essa redução. Foi observado também um alargamento da linha com g ~ 6 para as amostras com graus de hidratação menores que 0,20 g $H_2O$/g Mb devido a desvios da simetria axial em torno do íon ferro (III). Esses desvios de simetria foi proposto originar-se de distorções conformacionais nas amostras com baixa hidratação. Em níveis de hidratação acima de 0,20 g $H_2O$/g Mb observou-se um

aumento considerável de centros detectáveis por RPE com a recuperação de moléculas com a forma meta.

Na meta Hb somente 5% das moléculas permaneceram com a água da sexta coordenação do ferro após a desidratação. As outras 95% das moléculas deram origem a dois tipos de hemicromos ( 55% ) e moléculas com $Fe^{2+}$ ( 40% ). Foram formados o hemicromo H e principalmente o hemicromo P ( o 5º ligante do ferro deve ser o átomo de enxofre da cisteína da cadeia β posição 93 ( $\beta^{93}$ ), vizinho da histidina proximal $\beta^{92}$ que é deslocada, e o 6º ligante é proposto ser o nitrogênio da histidina distal E7 ). Em um nível de hidratação em torno de 0,40 g $H_2O$/g Hb há um aumento considerável de moléculas que voltam a ter a água na 6ª coordenação do ferro com o concomitante decréscimo da quantidade de hemicromos e de moléculas com ferro (II).

Na adição do gás NO nas amostras de meta Mb de baleia com diferentes graus de hidratação houve a formação significante do complexo $Fe^{2+}$ - NO somente abaixo de 0,25 g $H_2O$/g Mb. Em valores superiores de hidratação ( até 0,50 g $H_2O$/g Mb ) as amostras tornaram-se praticamente diamagnética, após a adição do NO, com a formação do complexo $Fe^{2+}$ - $NO^+$. Os resultados foram interpretados supondo que o NO reage diretamente com íons $Fe^{2+}$ disponíveis abaixo de 0,25 g $H_2O$/g Hb formando o complexo $Fe^{2+}$ - NO - paramagnético. Em hidratações superiores como praticamente não há mais íons $Fe^{2+}$ disponíveis o NO reduz o $Fe^{3+}$ parando no intermediário $Fe^{2+}$ - $NO^+$ - diamagnético.

O espectro tripleto observado para o NO em baixa hidratação na Mb é associado a um complexo onde o ferro (II) está

pentacoordenado. Isso indica que a histidina proximal F8 se afastou do heme tornando possível a entrada de um novo grupo em seu lugar.

# *Abstract*

In this work the role of water was studied in the stabilization of structure and conformation of myoglobin ( Mb ) and hemoglobin ( Hb ) by changes in the active center ( heme group ), detected by Electron Paramagnetic Resonance ( EPR ).

Whale met Mb and nitrosyl-Mb, equine met Mb, human and bovine met Hb were used. Samples with differents hydration degrees ( 0 to 0,50 g $H_2O$/g protein ) were measured by EPR, T = -160°C, analysing the iron (III) signal in the met Mb ( and Hb ) and NO signal in the nitrosyl-Mb. The populational fractions of complexes were obtained by double integration of EPR spectrum.

In the dehydration of met Mb 65% of molecules lost the water molecule coordinated to the iron (II) giving origin to other complexes. One of these complexes was the hemichrome H (bis-histidin) where the nitrogen atom of the E7 distal histidin binds to the iron (III). For this to occur the E helix must be close to the heme group. A percentual of 40% of the molecules were not detected by EPR in the dehydration and we suggest the reduction of iron (III) to iron (II) in these molecules. We also observed an increase of line width of g ~ 6 signal in the samples with hydration degree below 0,20 g $H_2O$/g Mb, due to changes in the axial symmetry around at iron (III) ion. These symmetry changes were suggested to occur due to conformational distortions in the samples at low hydration. For hydrations levels above 0,20 g $H_2O$/g Mb a considerable increase was observed in the groups detectable EPR with recuperation of molecules in the met form.

In met Hb only 5% of molecules remained with the water molecule coordinated to the iron after dehydration. The other 95% of molecules gave origin to two types of hemicromes ( 55% ) and molecules with iron (II) ( 40% ). The hemichromes observed were the bi-histidin and hemichrome P ( the proximal histidin [92] was deslocated with the coordination of sulphur atom of cystein [93] ). For hydration levels around 0,40 g $H_2O$/g Hb there is a considerable increase of molecules that return to met form. There is for the same hydration level a decrease of quantities of hemichromes and molecules with iron (II).

In the NO gas addition to whale met Mb sample with differents hydration degrees we observed significant formation of Fe (II) - NO complex only below 0,25 g $H_2O$/g Mb. For higher hydration levels ( until 0,50 g $H_2O$/g Mb ) after the NO addition, the samples were pratically diamagnetic, with the formation of Fe (II) - $NO^+$ complex. The results were interpreted supposing that NO binds directly to Fe (II) ion that is present below 0,25 g $H_2O$/g Hb with the formation of a paramagnetic complex Fe (II) - NO. For higher hydrations there is no iron (II) available and the NO reduces the iron (III) with the formation of intermediate diamagnetic complex Fe (II) - $NO^+$.

The triplet spectrum displayed by NO at low hydration in Mb is associated with a complex where the iron (II) is pentacoordinated. This result indicates that F8 proximal histidin moves away from the heme group possibilitating the coordination of a new group in this place.

# *Introdução*

A água é o componente mais abundante da superfície da Terra e também o principal constituinte dos organismos vivos. Somente os oceanos contém $1,5 \times 10^{24}$ gramas enquanto outras $0,8 \times 10^{24}$ gramas estão presas na crosta terrestre, na forma de água de hidratação ( Eisenberg & Kauzmann, 1969 ).

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

O ser humano adulto contém de 65 a 70% de água. Os tecidos nervosos são constituídos por 84% de água, enquanto os adiposos tem somente 30%. Um adulto consome, entre água líquida e a retirada dos alimentos, mais de 900 litros por ano. O ciclo de água nas plantas verdes e organismos marinhos que fazem fotossíntese é $6,5 \times 10^{11}$ toneladas/ano ( Pethig, 1979 ).

Como mostram esses dados há um conhecimento detalhado da distribuição e velocidade do consumo da água em sistemas biológicos. Contudo o conhecimento do papel da água no processo da vida, a nível molecular, é muito reduzido.

Uma das razões para esse pequeno conhecimento é que a maior parte dos biologistas tinham, até recentemente, a água somente como um meio de suspensão para as moléculas ativas ou um mero preenchimento de espaço nos organismos vivos.

As outras áreas da ciência também ignoraram a água e o interesse ativo e significante sobre seu estudo com uma molécula "especial" começou somente no início dos anos 60 ( Pethig, 1979 ).

Atualmente sabe-se que a nível molecular a água interege entre si, formando água líquida ou vários tipos de gelos, e com outras moléculas. Estas podem ser desde pequenos íons ( $Na^+$ , $K^+$ , $Cl^-$ e outros ) até macromoléculas.

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

a) **interação hidrofílica** - através de pontes de hidrogênio ou solvatação das cargas das moléculas;

b) **interação hidrofóbica** - a água, sendo repelida pelos resíduos apolares da molécula, é obrigada a se auto-organizar formando por exemplo dodecaedros pentagonais e estruturas altamente organizadas tipo clatratos.

O aspecto globular de proteínas pode ser explicado como devido a interação com a água. Para que a proteína seja solúvel, os aminoácidos hidrofílicos devem ficar na parte externa para solvatação e os hidrofóbicos se voltam para o interior da molécula.

Na tentativa de acompanhar as propriedades da água no processo de hidratação de proteínas, inúmeros estudos tem sido feitos. Alguns deles são medidas de calor específico, NMR, relaxação dielétrica, isotermas de adsorção, infravermelho e raio-X de alta resolução.

A partir desses estudos foi possível estabelecer a existência de uma camada de água de hidratação para as proteínas. Essa camada está associada as moléculas de água que tem uma interação "direta" com a proteína e que por isso tem algumas de suas

propriedades alteradas, em comparação com a água "livre", sendo assim possível identificá-las. A água de hidratação é proposta ser de fundamental importância para o estabelecimento da conformação nativa e estado funcional das proteínas.

No caso das hemoproteínas ( Hb e Mb ) um outro enfoque no estudo da hidratação pode ser dado: acompanhar possíveis mudanças na região do centro ativo da proteína moduladas pela variação do grau de hidratação. Isso porque essas proteínas tem cor, absorvem no visível e ultra violeta, e possuem um átomo de ferro, no centro ativo, podendo também ser acompanhado por medidas de susceptibilidade magnética e por RPE, quando o ferro é colocado num estado paramagnético. Há ainda a possibilidade de medidas Mössbauer , que depende do "enriquecimento" da proteína com $^{57}Fe$ ( no lugar do $^{56}Fe$ ).

Dentro desse enfoque Zeynek, 1926 e Haurowitz, 1951 reportaram que na desidratação de ferrohemoglobina havia a formação de hemocromos ( na 6ª posição de coordenação do ferro, normalmente ocupada pelo oxigênio, entrava um átomo de nitrogênio da própria proteína ). Keilin & Hartree, 1952 fizeram observação semelhante na metahemoglobina ( observando a formação de hemicromos, com a saída da água na 6ª coordenação e e entrada de um nitrogênio da própria proteína, e o ferro (III) passando a ter S = 1/2 ).

Haberditzl et al., 1961 demonstraram que a susceptibilidade magnética da metahemoglobina ( meta Hb ) decresce consideravelmente na desidratação. Por sua vez Caughey et al., 1966, a partir de medidas Mössbauer propuseram que metamioglobina ( meta Mb ) liofilizada era um composto de baixo spin ( 1/2 ).

Yonetani & Schleyer, 1967 considerando que a técnica de RPE dá informação mais precisa sobre o estado eletrônico ( valência e spin ) do ferro que susceptibilidade magnética e espectro de absorção eletrônica, estudaram a influência do estado físico nas propriedades eletromagnéticas do centro ativo de meta Mb. As principais observações na proteína liofilizada foram a coexistência de moléculas com alto e baixo spin ( e não puramente baixo spin como proposto po Caughey ) e a redução acentuada do paramagnetismo da amostra em comparação com a proteína em solução. Contudo, não fizeram medidas com controle de hidratação e não explicaram satisfatoriamente os resultados obtidos.

O presente trabalho foi proposto para ser uma investigação criteriosa do processo de hidratação da Hb e Mb, explorando as informações obtidas pela técnica de RPE. Utilizou-se os derivados meta Mb, nitrosil Mb e meta Hb de diferentes espécies e as medidas foram feitas em amostras com diferentes graus de hidratação.

As características da Hb e Mb, seus papéis fisiológicos, e os diferentes derivados observados são apresentados no Capítulo I. No Capítulo II mostra-se uma breve revisão de estudos de hidratação em proteínas globulares. A teoria de RPE mostrando o hamiltoniano de spin dos sistemas estudados e a origem dos espectros estão no Capítulo III. No Capítulo IV descreve-se os materiais e métodos utilizados e o Capítulo V apresenta os resultados obtidos. A Discussão e as Conclusões são apresentadas no Capítulo VI e VII, respectivamente.

# *Capítulo I*

# *Hemoglobina e Mioglobina*

## 1.1. Introdução

Dentre as mais abundantes proteínas de vertebrados, estão a hemoglobina ( Hb ) e a mioglobina ( Mb ). Na corrente sangüínea existe em torno de cinco bilhões de células vermelhas ( eritrócitos ) por mililitro ( ml ), e cada uma é empacotada com 280 milhões de moléculas de hemoglobina, de peso molecular 64.500 dáltons ( hemoglobina humana) e com quatro grupos heme por molécula ( Dickerson, R.E. & Geis, I , 1983 ).

A mioglobina ( Mb ), proteína do músculo, é semelhante à Hb mas tem somente um grupo heme e uma cadeia polipeptídica semelhante às da Hb. Seu peso molecular é 17.815 dáltons ( mioglobina de cachalote ).

O centro ativo dessas moléculas é o grupo heme : um átomo de ferro circundado por um anel porfirínico* ( Figura 1 ). Esse anel é insaturado em relação ao benzeno e tem muitos elétrons $\pi$ deslocalizados. Somente uma das possíveis estruturas ressonantes é

---

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

mostrado na Figura 1 e o "esqueleto" tem exatamente uma simetria de ordem 4, com as ligações **a** e **a'**, **b** e **b'**, **c** e **c'**, **d** e **d'** equivalentes.

O grupo heme se coordena a Hb e Mb através de ligações iônicas com os grupos carboxilatos nas posições 6 e 7 ( Figura 1 ) e por um nitrogênio do grupo imidazol do resíduo histidina F8 , na 5ª coordenação do ferro ( Figura 2 ). O sítio da 6ª coordenação é ocupado por uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ), no caso fisiológico normal. Incidentalmente a alta toxicidade do monóxido de carbono ( CO ) e cianeto ( $CN^-$ ) é devido ao fato que eles ligam irreversivelmente no sítio da 6ª coordenação. Na Tabela I são apresentados alguns ligantes que podem ocupar esse sítio e os efeitos sobre o estado de spin e valência do íon ferro.

**Tabela I.** Alguns ligantes que podem ocupar a 6ª coordenação do ferro no heme e o efeito sobre a valência e estado de spin do íon ferro ( Antonini, E. & Brunori, M., 1971 )

| Ligante | Valência | Spin (s) |
|---|---|---|
| $O_2$ | $2^+$ | 0 |
| nenhum (desoxi) | $2^+$ | 2 |
| NO | $2^+$ | 0 |
| CO | $2^+$ | 0 |
| $H_2O$ | $3^+$ | 5/2 |
| $(OH)^-$ | $3^+$ | 1/2 |
| $F^-$ | $3^+$ | 5/2 |
| $(CN)^-$ | $3^+$ | 1/2 |
| $N_3^-$ | $3^+$ | 1/2 |

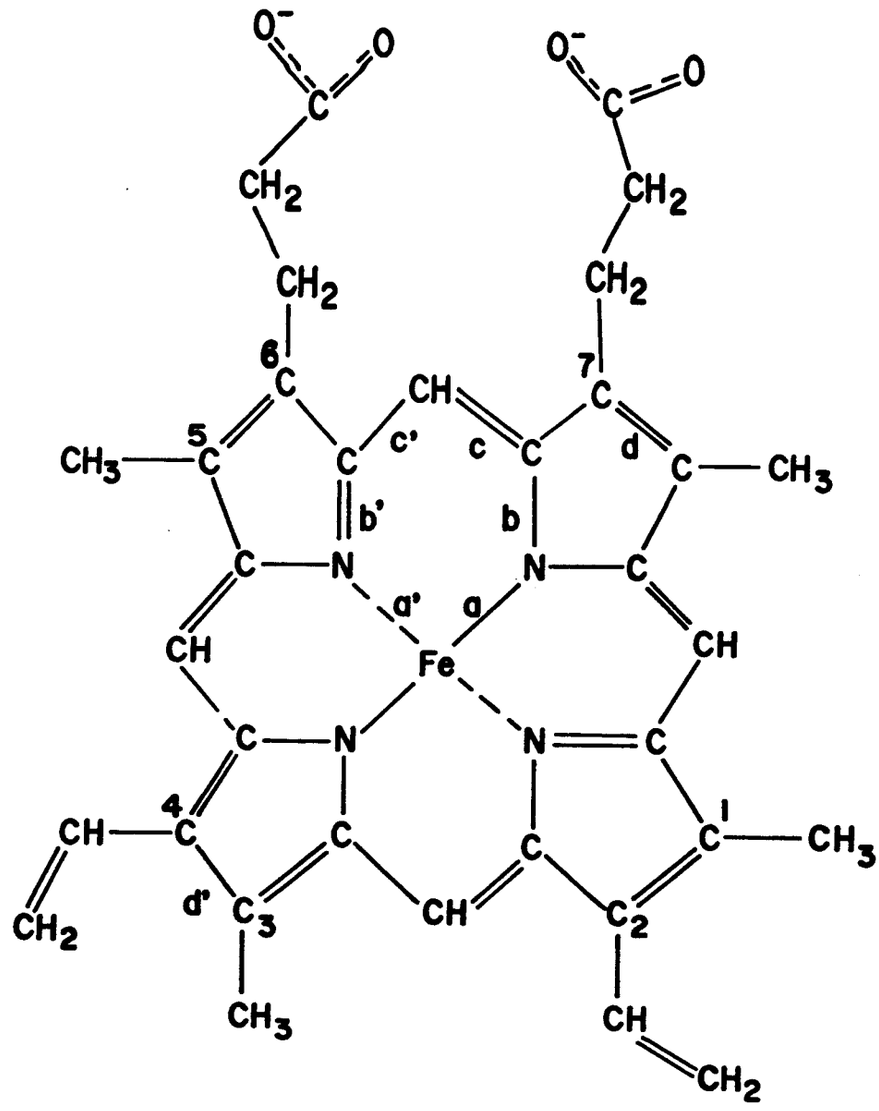



**Figura 1**. Grupo heme ( Dickerson & Geis, 1983 ). Através dos grupos carboxilatos, das posições 6 e 7, o grupo heme se liga a porção proteica da Hb e Mb.

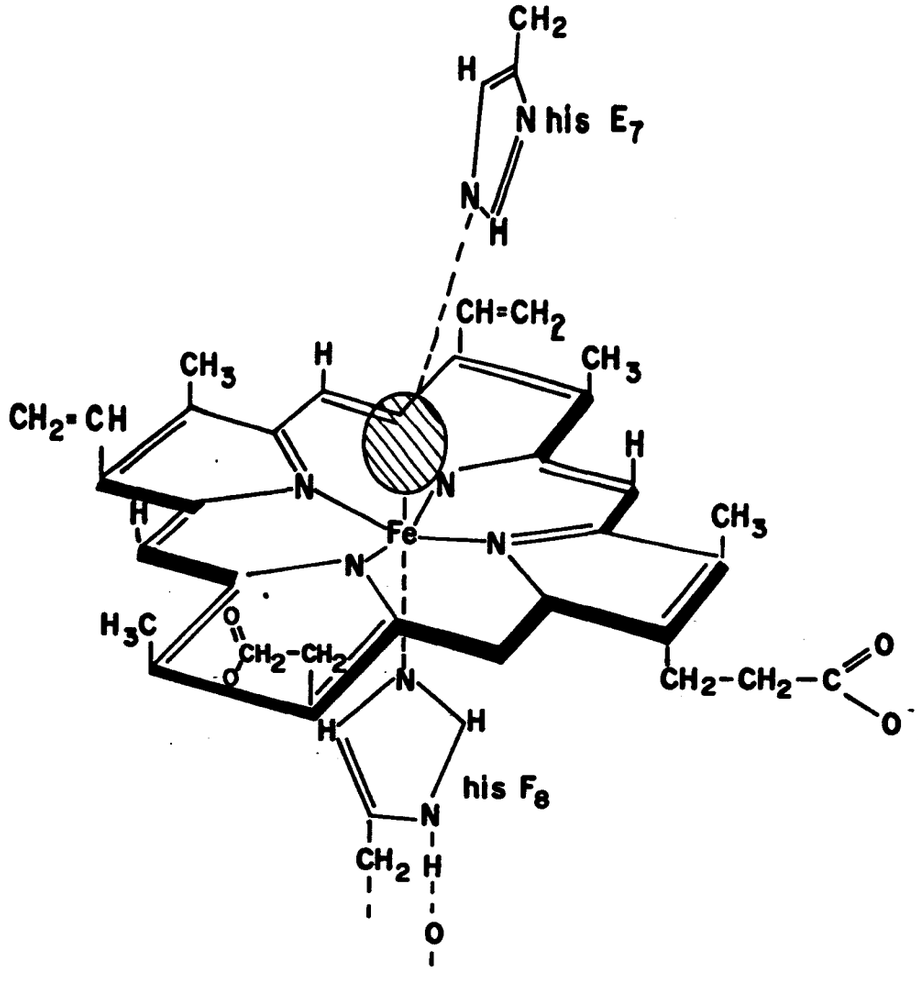



**Figura 2.** Estrutura do grupo heme, mostrando também as histidinas proximal F8 e distal E7; a esfera hachurada representa a posição do 6º ligante.

## 1.2. Propriedades Fisiológicas

O papel da Hb é ligar o oxigênio ( $O_2$ ), no ferro da heme, nos pulmões e entregá-lo nos tecidos para a ação metabólica. Nos tecidos musculares, que contém mioglobina, o oxigênio é armazenado

no seu grupo heme até ser requerido para a oxidação metabólica. Uma segunda tarefa da hemoglobina é ligar o dióxido de carbono ( $CO_2$ ), produto da oxidação, e trazê-lo de volta aos pulmões a fim de ser liberado e prevenir a formação de ácidos nos músculos. Vale a pena citar que $CO_2$ não é transportado ligado ao ferro dos grupos heme mas sim ao nitrogênio das aminas terminais e principalmente como íon bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) em solução ( Dickerson, R. & Geis, I., 1983 ).

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

Na Figura 3 são mostradas curvas de oxigenação da Hb e Mb.

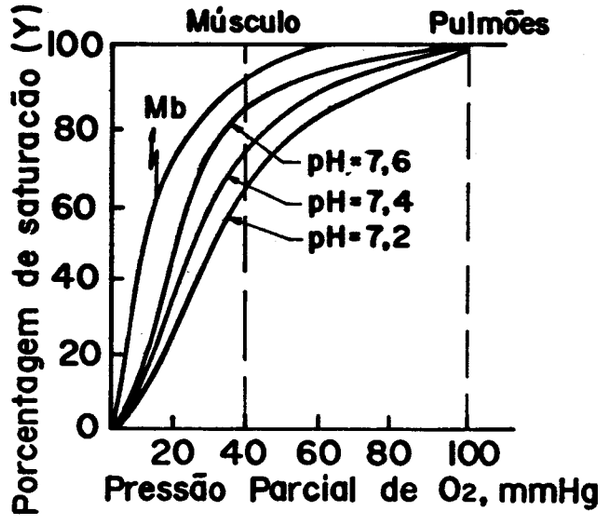



**Figura 3.** Curvas de oxigenação para a Mb e Hb em pH = 7,6 , 7,4 e 7,2 ( Dickerson, R.E. & Geis, I., 1983 ).

A saturação Y é definida pela fração de ocupação dos sítios de ligação do $O_2$. Os valores variam de 0-100 ( todos os sítios vazios até todos os sítios cheios ). A forma da curva de oxigenação da Hb é sigmoidal, mostrando que a ligação é cooperativa. Para a Mb a curva é hiperbólica.

A perda de afinidade pelo oxigênio a medida que o pH diminui ( efeito Bohr ) influencia a transferência do oxigênio nos tecidos.

O ferro na atividade fisiológica de hemoproteínas, como $Fe^{2+}$, pode fazer pequenos movimentos saindo ou entrando no plano da porfirina, durante o processo de oxigenação-desoxigenação. Esse movimento é transladado para a cadeia proteica, possivelmente com grande amplificação, através da histidina rigidamente ligada e isso é acompanhado por mudanças conformacionais na estrutura terciária da proteína. Na Hb ( tetrâmero ) há também mudanças na estrutura quaternária que são essenciais para a cooperatividade no processo de oxigenação ( Dickerson, R. E. & Geis, I., 1983 ).

## 1.3. Mioglobina

A mioglobina ( Mb ) é constituída de um grupo heme e de uma cadeia polipeptídica de 153 aminoácidos ( Peso molecular 17.815 dáltons - mioglobina de cachalote ), arranjados em oito extensões de hélices α que formam uma fenda para o grupo heme ( Figura 4 ). Todas as hélices são dextrogiras e variam em comprimento de 7 a 26 resíduos. Ao todo, 121 dos 153 resíduos estão em região helicoidal. A molécula é um esferóide achado nos polos, aproxidamente 44 x 44 x 25 Å

( Mb cachalote ). É extremamente compacta sendo que existe pouco espaço vazio em seu interior. A Mb é semelhante em constituição e estrutura à subunidade β da Hb.

As fontes mais ricas de mioglobina são os músculos de mamíferos aquáticos tais como focas, baleias e porcos marinhos que devem estocar $O_2$ por períodos relativamente longos. Foi do cachalote que John Kendrew, em 1962 obteve a Mb para a determinação da primeira estrutura de raios-X de proteína ( Dickerson, R.E. & Geis, I., 1983 ).

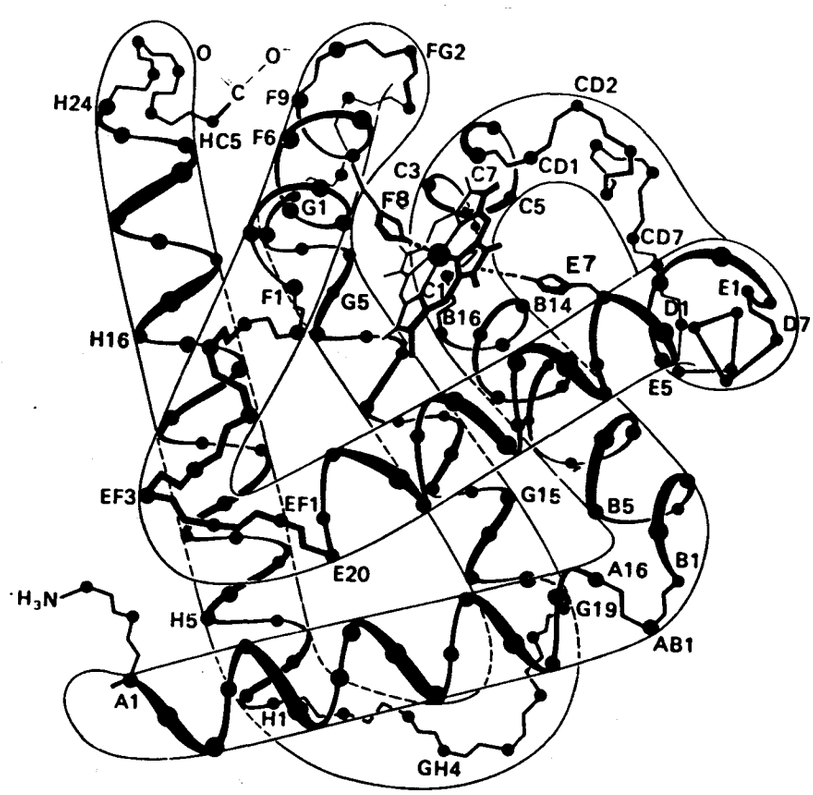



**Figura 4.** Molécula de mioglobina, mostrando os carbonos α e as oito extensões de hélices α ( A a H ) ( Lehninger, 1975 ).

As cadeias laterais dos vinte aminoácidos tem uma grande variedade de propriedades. Alguns são muito polares e outros são hidrofóbicos, influenciando assim as regiões da cadeia em que ocorrem para formar dobras assumindo aspecto de uma proteína globular. Os grupos laterais não polares dispõem-se no interior da molécula. Os resíduos que possuem tanto uma parte apolar quanto outro polar são orientados de modo que suas porções não polares dirijam-se para dentro. Os únicos resíduos polares dentro da Mb ( e da Hb ) são duas histidinas ( oito na Hb ), que têm funções importantes no centro ativo. O exterior da molécula contém tanto resíduos polares quanto não polares. Essa disposição deve, certamente, ter uma forte influência na solubilidade da Mb ( e Hb ). O grupo heme está localizado em uma fenda da molécula, um local apolar, que protege o estado ferroso do heme, da oxidação.

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

## 1.4. Hemoglobina ( Hb )

E constituída por quatro grupos hemes e quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas de 141 resíduos ( cadeias $\alpha$ ) e duas com 146 ( cadeias $\beta$ ), num total de 574 aminoácidos ( Peso molecular - 64.500 dáltons - Hb humana ).

É uma molécula aproximadamente esférica, com uma cavidade central, e dimensões 64 x 50 x 50 Å ( oxi Hb de cavalo ). Os grupos heme de cadeias $\alpha_2$ e $\beta_1$ são particularmente próximos, como são aqueles de $\alpha_1$ e $\beta_2$ ( Figura 5 ).

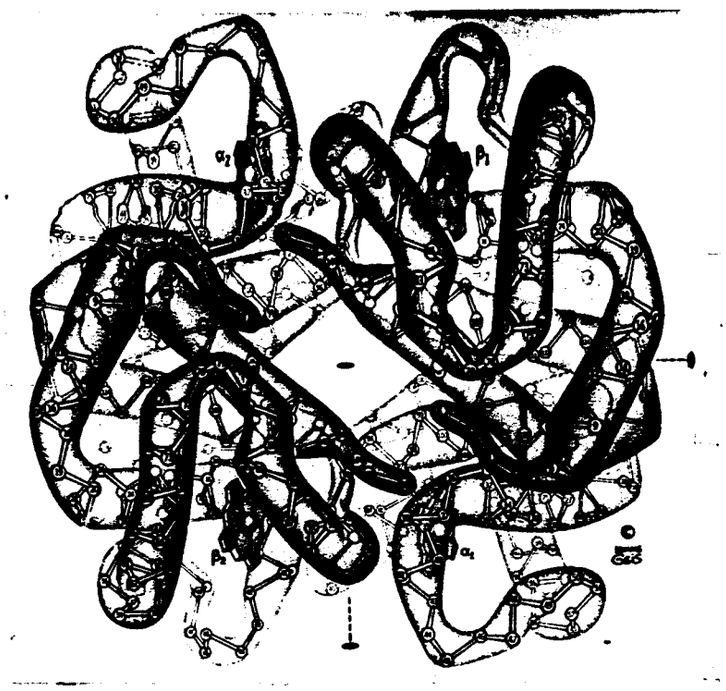


**Figura 5. Molécula de oxi-hemoglobina ( Cantor & Schimmel, 1980, Vol. I ).**

O empacotamento de cadeias na molécula de Hb é tal que o contato entre cadeias laterais existe entre subunidades diferentes ( $\alpha$ e $\beta$ ), mas há pequeno contato entre as iguais. Segundo Perutz os pontos de contato entre as cadeias diferentes são hidrofóbicos, enquanto entre as cadeias semelhantes são polares.

Os contatos $\alpha$ e $\beta$ são de dois tipos. Os $\alpha_1 \beta_1$ ou $\alpha_2 \beta_2$ são chamados contatos de empacotamento por representarem o empacotamento das subunidades que não mudam quando a molécula

Hb vai da configuração desoxi para oxi. Os contatos $\alpha_1 \beta_2$ e $\alpha_2 \beta_1$ são chamados contatos de deslisamento, uma vez que sofrem as principais mudanças quando há alteração no estado de ligação do ferro do heme. Ligações de hidrogênio e pontes salinas também são importantes para manter as subunidades juntas (Dickerson & Geis, 1983).

A distância entre os dois íons de ferro mais próximo é 25 Å. Cada um deles se acha parcialmente envolto em uma "bolsa" de resíduos apolares. Existe uma cavidade central dentro da molécula de Hb, forrada por resíduos polares. 2-3-difosfoglicerato ( DPG ), um produto do metabolismo da glicose, ocupa essa cavidade central quando a molécula está no estado desoxigenado, estabilizando essa forma ( Figura 6 ).

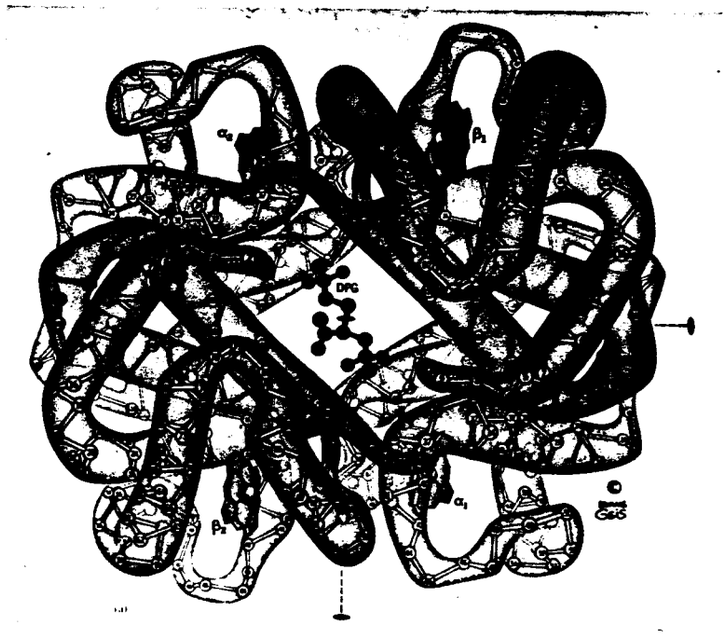



**Figura 6.** Molécula de desoxi-hemoglobina ( Cantor & Schimmel, 1980, Vol.I ).

## 1.5. Meta Hb ( ou Mb ) e Hidroxi Hb ( ou Mb )

Como mostrado na Tabela I outros ligantes que o $O_2$ podem coordenar-se ao ferro do heme alterando, eventualmente, a valência e o estado de spin do ferro. No caso do ligante ser uma molécula de água o derivado é chamado meta Hb ( ou meta Mb ) e a valência do ferro é alterada para $3^+$ e o estado de spin para 5/2. A molécula de água ocupando a 6ª coordenação do ferro, forma ponte de hidrogênio com a histidina distal $E_7$ da globina ( Figura 2 ).

Dependendo do pH da solução ocorre a coordenação do íon $OH^-$, em vez de $H_2O$. Nesse caso há uma transição de alto spin ( 5/2 ) para baixo spin ( 1/2 ). Essa mudança é acompanhada de variações espectrais, tanto de RPE como de absorção eletrônica. Costuma-se referir a esse derivado como hidroxi Hb ( ou Mb ).

## 1.6. Hemicromo

Um dos mecanismos que levam à rápida destruição das células vermelhas do sangue é a conversão da molécula de hemoglobina solúvel para formas não solúvel, que quando precipitadas são conhecidas como "corpos de Heinz" ( Heinz, R., 1890 ). Não é surpresa que "corpos de Heinz" sejam formados seguindo uma rápida conversão de uma molécula de Hb defeituosa para o estado férrico devido a uma anormalidade na estrutura primária ou na talassemia ( ausência de cadeias $\alpha$ ou $\beta$ ). Contudo, é mais fácil explicar a desnaturação de Hb em eritrócitos normais seguindo apenas interações de óxido-redução. Isso se torna possível se for assumido que além da

oxidação do ferro do heme, maiores alterações também ocorram na estrutura do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, da Hb.

Tem sido mostrado que oxidação "in vitro" de subunidades isoladas $\alpha$, $\beta$ ou $\gamma$ de Hb e de Hb anormais e instáveis resultam na formação de hemicromos ( ferrihemocromos ) como um produto intermediário da desnaturação ( Rachmilewitz et al., 1971 ). A formação de hemicromos está associada com um aumento na tendência para precipitação de subunidades de Hb ou de variantes de Hb instáveis.

A formação de corpo de Heinz é proposto ocorrer subsequentemente a uma mudança na estrutura terciária das subunidades da Hb onde há a formação de hemicromos, onde ambas 5ª e 6ª posição de coordenação do ferro do heme são ligados a ligantes endógenos da molécula de Hb [ Blumberg, W. E. & Peisach , J. ( 1971 ) ].

A partir de estudos de compostos conhecidos de Hb férrica ( Blumberg et al., 1972 ) e de vários compostos modelos ( Peisach et al. , 1973 ) foram descritos alguns hemicromos reversíveis e irreversíveis conforme mostrado na Figura 7.

O hemicromo bi-histidina H ( g = 2,81 , 2,27 , 1,67 ) é um composto considerado reversível e deriva dos anéis imidazólico ( F8 ) e distal ( E7 ) e difere do hemicromo bi-histidina irreversível B ( g = 2,99 ; 2,28 e 1,45 ) pois este é protonado na posição N1 do anel imidazólico. O outro hemicromo irreversível P ( g = 2,45 , 2,28 e 1,94 ) é semelhante a vários compostos baixo spin nos quais um ligante é um mercapeptídeo, possivelmente de uma cisteína, e outro uma base nitrogenada e é idêntico ao hemicromo encontrado no citocromo P-450 ( g = 2,41, 2,25 , 1,93 ).

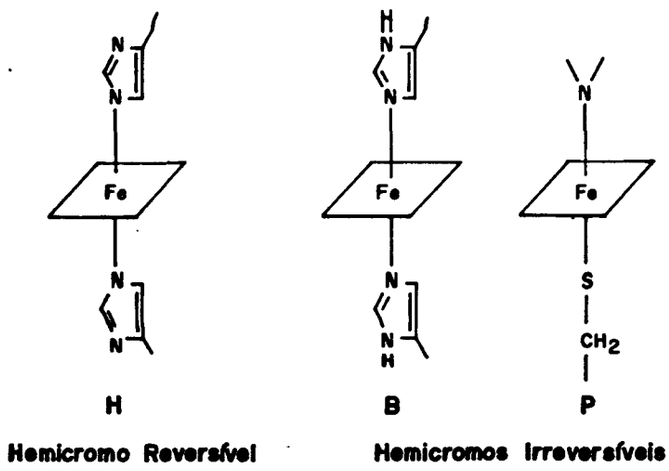



**Figura 7.** Um esquema de hemicromos reversível e irreversível: em dois dos três hemicromos, a 5ª posição de coordenação do ferro do heme está ligado a histidina proximal ( F8 ) e na sexta coordenação a histidina distal ( E7 ). Os hemicromos irreversíveis ( B e P ) tem respectivamente, as histidinas protonadas ou um mercapeptídeo e uma base nitrogenada como ligante ao ferro ( Rachmilewitz, 1974 ).

Nas cadeias β da Hb, uma cisteína ocupa a posição 93, vizinha a histidina "proximal" ( posição 92, que se coordena ao ferro ). Portanto, uma possibilidade para explicar a origem do hemicromo P é a ligação do átomo de enxofre dessa cisteína ( β93 ) ao ferro com a histidina "proximal" que ocupa a 5ª coordenação do ferro sendo deslocada e na 6ª coordenação entra uma base nitrogenada ( Rachmilewitz, 1974 ).

Para isso ocorrer a hélice F teria que girar sobre seu eixo para ligar o átomo de enxofre ao ferro. Tal rotação faria com que alguns grupos hidrofóbicos, originalmente dentro da molécula, ficassem expostos ao solvente enquanto os grupos hidrofílicos se voltariam para dentro ( Peisach et al., 1972 ).

No caso de hemicromos reversíveis a mudança estrutural é sucedida somente por poucas quebras de pontes de hidrogênio. Contudo, para os hemicromos irreversíveis há necessidade da quebra de muitas ligações de hidrogênio. Segundo Rachmilewitz et al., 1971, a formação de hemicromo irreversível a partir de hemicromo reversível é uma reação dependente do tempo, como observou seguindo a desnaturação da Hb normal com salicilato ou em desnaturação espontânea de cadeias isoladas oxidadas α e β.

## 1.7. Nitrosil-Mb ( ou Hb )

Os estudos de RPE em hemoproteínas são feitos, geralmente, utilizando o íon ferro na forma $3^+$. As formas oxi e desoxi da Hb ( ou Mb ), onde o ferro está na forma $2^+$, não exibem sinal de RPE.

Uma alternativa que tem sido muito usada é a utilização dos derivados nitrosil. Nesse caso o sinal de RPE observado é do próprio grupo NO ligado ao $Fe^{2+}$, mimetizando a molécula de $O_2$.

Keilin & Hartree, 1937, realizando experimentos ópticos com oxi e meta Hb, mostraram que o óxido nítrico ( NO ) combina-se com as duas formas da Hb. Com a oxi Hb, o composto formado é



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS
FÍSICA

estável, sendo difícil obter novamente a Hb livre de NO. Com a meta Hb, entretanto, o composto formado não é estável, sendo que o $Fe^{3+}$ é reduzido a $Fe^{2+}$ e o composto resultante é idêntico ao obtido com a oxi Hb ( Chien, 1969 ).

O mecanismo proposto para a reação da meta-Hb ( ou meta Mb ) com NO é o seguinte ( Ehrenberg & Szczepkowsky, 1960 ; Chien, 1969a ):

$$(\text{heme } Fe^{3+}) + NO \rightleftharpoons (\text{heme } Fe\,NO)^{3+} \qquad \textbf{(a)}$$

$$(\text{heme } Fe\,NO)^{3+} \rightleftharpoons (\text{heme } Fe^{2+}) + NO^{+} \qquad \textbf{(b)}$$

$$(\text{heme } Fe^{2+}) + NO^{+} + 2\,OH^{-} \rightleftharpoons (\text{heme } Fe\,NO_2)^{+} + H_2O \qquad \textbf{(c)}$$

$$(\text{heme } Fe\,NO_2)^{+} + NO \rightleftharpoons (\text{heme } Fe\,\underset{\substack{\Downarrow \\ \text{paramagnético - sinal RPE}}}{NO})^{2+} + NO^{2-} \qquad \textbf{(d)}$$

Observa-se que, no mecanismo proposto, para cada heme ( $Fe^{3+}$ ) são necessárias duas moléculas de NO para que a reação ocorra totalmente, isto é, para que ocorra a redução do ferro e a formação do nitrosil-ferroso-heme. Há também dependência do pH pois o passo c da reação requer a presença de $OH^{-}$.

A possibilidade de observação de espectros de RPE a temperatura ambiente, também mostra que ambos produtos finais da reação ( NO com $Fe^{3+}$ e $Fe^{2+}$ ) são nitrosil-ferroso-Hb de spin baixo ( $S = 1/2$ ). Se o estado de spin fosse alto ( $S = 3/2$ ) o tempo de relaxação deveria ser curto, sendo difícil a observação de sinal de RPE, exceto a temperaturas muito baixas.

# *Capítulo II*

# *Hidratação de Proteínas Globulares*

## 2.1. Interações específicas água-proteína

Na Figura 8 é mostrado uma vista esquemática de um modelo que descreve a organização estrutural da água em torno de uma proteína globular. Existem três tipos de moléculas de água organizadas localmente em adição as moléculas de água "livre". Esses tipos de água são distinguíveis através de dados termodinâmicos e ou cinéticos e ou espectroscópicos ( Hopfinger, 1977 ).

Existem poucas moléculas de água presas fortemente em locais específicos, tais como sítios ativos, ligadas a íons metálicos, ou no interior das proteínas. Estudos de raios-X e nêutrons de alta resolução têm identificado a localização de algumas dessas moléculas de água. Na quimiotripisina dezesseis moléculas de água foram identificadas no interior da proteína ( Birktoft & Blow , 1972 ) e na anidrase carbônica C nove moléculas de água foram encontradas na cavidade do sítio ativo ( Lijas et al., 1972 ).

Nenhuma molécula de água fixada internamente é encontrada na Mb ou nas subunidades da Hb. No entanto na Hb, água ligada internamente é encontrada entre as suas subunidades e formam uma parte essencial do conjunto de ligações de hidrogênio que ajudam a manter o tetrâmero junto ( Perutz, 1978 ).

A segunda classe de água pode ser chamada de água "ligada". Esta pode ser distinguida da água "fortemente ligada" porque:

1) existe muito mais água "ligada" que "fortemente ligada" e 2) água "ligada" não é tão altamente organizada em relação a proteína, como a "fortemente ligada".

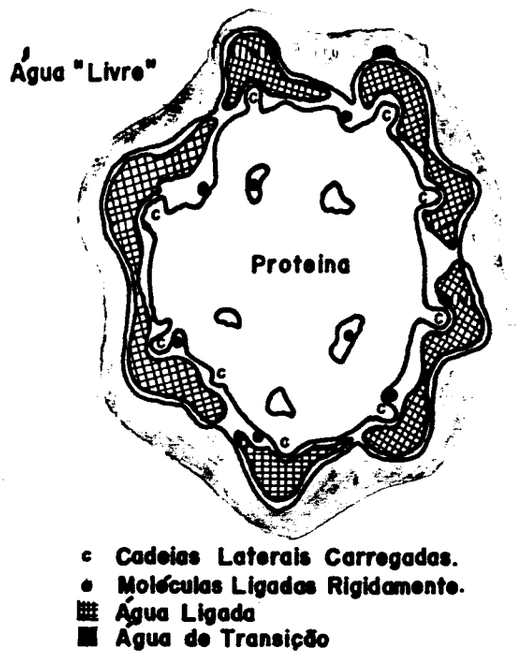



**Figura 8. Vista esquemática da organização estrutural da água em torno de uma proteina globular.**

Experimentos calorimétricos ( Bull & Breese, 1968 a, b; Mrevlishvili & Privalov, 1969 ) caracterizaram a água "ligada" como água não congelável. Isto é, existe uma quantidade moderada de água ( Tabela II ) em soluções de proteína que tem um calor de fusão muito baixo e um correspondente baixo ponto de congelamento. Soluções contendo esse tipo de água possui uma capacidade de calor configuracional aumentada que pode ser explicada pela interação água - proteína.

Os resultados de dispersão dielétrica, em alta frequência de soluções de proteínas indicam duas regiões de dispersão, $10^8$ e $10^{10}$ Hz; a primeira em $10^8$ Hz é de pequena amplitude. Existe concordância que a dispersão na frequência mais elevada é devido a rotação molecular da água "livre", enquanto a dispersão de pequena amplitude surge de contribuições rotacionais de água "ligada" mais possíveis efeitos de movimentos das cadeias laterais dos aminoácidos ( Grant et al., 1968; Takashima, 1969 ).

Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear ( RMN ou NMR do inglês Nuclear Magnetic Resonance ) sugerem que as moléculas de água ligada formam, aproximadamente, uma monocamada sobre a proteína e possui tempos de rotação perto de $10^{-9}$ segundos a temperatura ambiente ( Koenig & Schillinger, 1969; Walter & Hope, 1971; Cooke & Kuntz, 1973).

A quantidade de água ligada pode ser determinada da integração do sinal de absorção de NMR. Os resultados de tais integrações são dados na Tabela II. Da razoável concordância entre os dados de água não congelável obtido de medidas calorimétricas e de água ligada encontrado por NMR, é possível que ambas técnicas meçam a mesma entidade de água ( Hopfinger, 1977 ).

De 0,25 a 0,40 g $H_2O$/g proteína as partes não cobertas da proteína, tornam-se hidratadas. Essa é uma camada de transição entre a água "livre" e a água "ligada" da proteína.

**Tabela II.** Quantidade de água "ligada" em soluções aquosas de proteína

| Proteína | Quantidade de água não congelável em g $H_2O$/g proteína Calorimetria | Agua "ligada" em g $H_2O$/g proteína NMR |
|---|---|---|
| Hemoglobina | | |
| Nativa | 0,32 [a] | 0,42 [b] |
| Desnaturada | 0,34 [a] | — |
| Mioglobina (nativa) | — | 0,24 [b] |
| Lisozima (nativa) | 0,3 [c] | 0,34 [b] |
| BSA (nativa) | 0,34 [b] | 0,40 [b] |
| Ovalbumina (nativa) | — | 0,33 [b] |

a - Mrevlishvili & Privalov, 1969
b - Kuntz, 1971 a, b
c - Bull & Breese, 1968 a, b

## 2.2. Estágios no Processo de Hidratação

A hidratação consiste de três estágios bem definidos que refletem as várias propriedades do sistema.

Entre 0 e 0,07 g $H_2O$/g proteína o processo de hidratação é dominado pela interação da água com os grupos ionizáveis. Na Figura 9 mostra-se que para a lisozima em 0,07 g/g existe uma transição no espectro de infravermelho ( Carreri et al, 1979 ). e capacidade de calor ( Yang & Rupley, 1979 ) refletindo uma mudança no arranjo da água na superfície da proteína. Esse valor é muito próximo do valor 0,06 g/g,

obtido para a hemoglobina a partir de isotermas de adsorção ( Cardew & Eley, 1958; Brausse et al., 1968 ), associado a 1ª monocamada de BET ( Brunauer & Emmet & Teller, 1938 ).

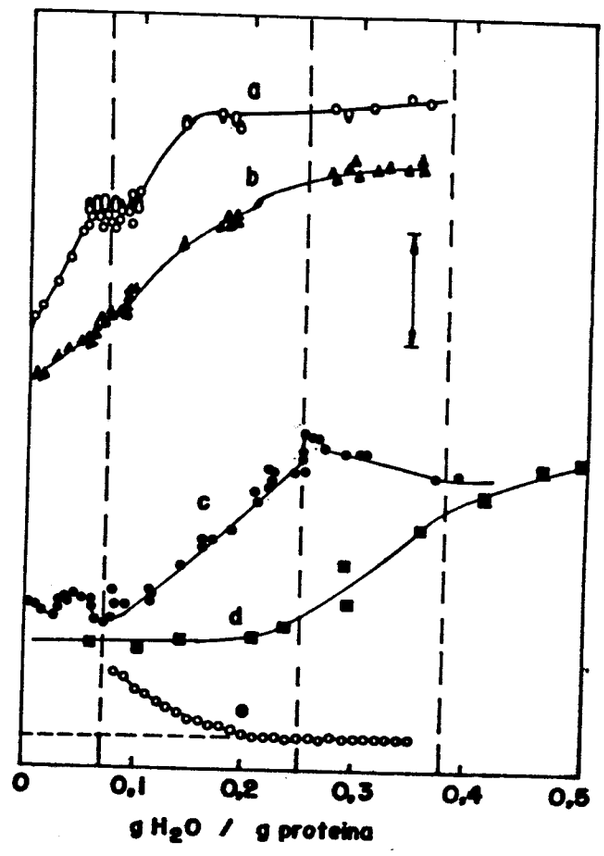



**Figura 9.** Propriedade do sistema lisozima - água como uma função do conteúdo de água. O valor da barra vertical na figura é dado separadamente para cada curva, na respectiva unidade de medida. Curvas: **a)** Absorbância no máximo da banda do carboxilato ( 1580 $cm^{-1}$ ) medido a 38°C; unidade 0,35 A; **b)** Variação na banda Amida I', medido em 38°C como a diferença entre os extremos negativo ( 1690 $cm^{-1}$ ) e positivo ( 1645 $cm^{-1}$ ) em torno do ponto isobéstico do espectro diferencial; unidade 0,17 A; **c)** Capacidade de calor aparente da lisozima, em 25°C; unidade 0,2 J/K.g. Esta função é uma medida do excesso da capacidade de calor do sistema por g da proteina; **d)** Atividade enzimática, medido em 25°C; unidade $5 \times 10^{-6}$ $s^{-1}$; **e)** susceptibilidade diamagnética, medido em 25°C e expresso como susceptibilidade diferencial por g de água adsorvida; unidade $0,55 \times 10^{-6}$ e.m.u/g. O limite para alta hidratação é igual ao valor da água liquida ( $0,721 \times 10^{-6}$ e.m.u./g ) ( Carreri et al, 1980 ).

Na faixa de 0,07 a 0,25 g/g os grupos de moléculas de água se formam, sobre os grupos ionizáveis e polares, e crescem cobrindo a maior parte da proteína.

De 0,25 a 0,40 g/g as partes não cobertas tornam-se hidratadas. Aparentemente a água condensa-se sobre elementos da superfície com uma interação menos intensa, possivelmente sobre átomos apolares não adjacentes a grupos ionizáveis ou polares. Essa é uma camada de hidratação que atua como um estado de transição entre água "livre" e a água "ligada".

Para a lisozima várias propriedades tem comportamentos distintos em uma hidratação de 0,20 g $H_2O$/g proteína como: atividade enzimática, capacidade de calor, susceptibilidade diamagnética e variação na banda amida ( 1660 $cm^{-1}$ ) conforme mostrado na Figura 9.

Para várias outras proteínas uma dependência característica do aumento da "constante" dielétrica com o grau de hidratação foi observado. Enquanto Rosen, 1963 encontrou para a albumina do soro bovino e mioglobina de baleia valores de 0,246 g/g e 0,235 g/g, respectivamente, para o aumento ocorrer, Brausse et al., 1968 encontrou 0,165 g/g para hemoglobina de cavalo. Por sua vez Maricic et al., 1964 observaram a hidratação crítica de 0,18 g/g para observar condutividade protônica na Hb. Assim, observa-se que várias propriedades relacionadas com o sistema água - proteína exibem descontinuidade em torno da hidratação de 20%, indicando ser um ponto importante no processo de hidratação.

Ainda para a lisozima observa-se que a atividade enzimática sofre nova mudança em 0,38 g/g. Isso indica que embora as multi-camadas de água não são importantes para comportamentos



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

mediados no tempo, são para algumas propriedades dinâmicas ( Rupley et al., 1980 ).

## 2.3. O papel da água na estrutura da Mb e Hb

### 2.3.1. Aspectos estáticos

A mioglobina e a hemoglobina como proteínas globulares dependem das interações específicas com a água para estabilização dessa forma.

Do ponto de vista da estrutura secundária Bohm & Abaturov, 1977 interpretaram resultados de dicroísmo circular da meta Hb, amostra em filmes, em hidratação inferior a 70% de umidade relativa ( ~ 0,20 g/g ) com a diminuição de 25 a 30% no conteúdo de hélice-α. Nesse mesmo trabalho citam resultados preliminares para a meta Mb no qual o decréscimo no conteúdo de hélice-α ocorre somente em hidratação abaixo de 40% de umidade relativa ( ~ 0,10 g/g ) ou seja, em um valor significantemente menor que para a meta Hb.

Jacobson & Krueger, 1975 também sugerem redução no conteúdo de hélice-α para a Mb liofilizada, a partir de medidas de espectroscopia infravermelho.

Grande parte dos trabalhos existentes tem acompanhado as propriedades da água ou do agregado molecular como um todo no processo de hidratação das hemoproteínas ( infravermelho, isotermas de adsorção, dispersão dielétrica, NMR, dicroísmo circular e outras ). Contudo uma alternativa de muito interesse é o acompanhamento de alterações no centro ativo ( heme ) em função do grau de hidratação.

Isso porque o ferro do heme apresenta possibilidade de medidas de absorção óptica, susceptibilidade magnética, espectroscopia Mossbauer, RPE, etc. que podem refletir alterações com a hidratação.

Dentro desse enfoque Zeynek, 1926 e Haurowitz, 1951 reportaram que a desidratação de ferrohemoglobina era acompanhado por mudanças reversíveis no espectro de absorção de luz visível com a formação de hemocromos ( a 6ª posição de coordenação de ferro (II) ocupada por um átomo de nitrogênio da própria proteína ). Em seguida Keilin & Hartree, 1952 fizeram observação semelhante para a ferrihemoglobina, neste caso obtiveram hemicromos. Essas mudanças ópticas não foram aparentemente observadas na desidratação de oxiferrohemoglobina e ferrihemoglobina - flúor ( $F^-$ ), - azida ( $N_3^-$ ) e cianeto ( $CN^-$ ). Esses trabalhos foram feitos a partir de amostras na forma de filme.

Haberditzl et al., 1961 demonstraram que a susceptibilidade magnética da ferrihemoglobina decresce consideravelmente na desidratação. Do paramagnetismo residual do grupo heme estimaram que o momento magnético efetivo do íon Fe (III) era 2,91 magnétons de Bohr. A partir de medidas espectroscópicas Mossbauer em ferrimioglobina Caughey et al., 1966 propuseram que a ferri-Mb na forma liofilizada é um composto baixo spin.

Yonetani & Schleyer, 1967 considerando que parâmetros de RPE dão informações menos ambíguas a respeito do estado eletrônico do ferro que susceptibiliade magnética e espectro de absorção óptica, estudaram a influência do estado físico de hemoproteínas sobre as propriedades eletromagnéticas do seu grupo prostético. Dentre as principais observações desse trabalho estão que:

- a largura de linha das absorções de RPE para ferrimioglobina decresce na seguinte ordem: solução concentrada < suspensão policristalina úmida < amostra liofilizada < policristal seco. Esse alargamento causado pela desidratação pode ser revertido pela re-hidratação e dissolução da amostra seca. A razão deste alargamento foi proposta ser devido ao aumento de interações magnéticas entre grupos heme vizinhos como resultado de empacotamento mais próximo da moléculas na desidratação.

- a intensidade da absorção de RPE da linha devido a S = 5/2 na ferrimioglobina decresce por um fator 10 a 20 na desidratação.

- a intensidade integrada da absorção de RPE da amostra policristalina seca de Mb, incluindo as absorções de baixo spin ( 1/2 ), era somente de 10 a 15% da Mb hidratada.

A partir dos resultados obtidos concluiu que a meta Mb desidratada é uma mistura de compostos alto e baixo spin ( a molécula da $H_2O$ da 6ª coordenação é trocada nesse composto por um grupo nitrogenado da proteína ) e não puramente baixo spin como assumido por Caughey a partir de dados espectroscópicos Mossbauer. Ainda mais que a redução acentuada da absorção de RPE , conforme mostrado na Figura 10, sugere que a transição de spin induzida pela desidratação não deve ser uma transformação de um passo somente ou seja de alto spin para baixo spin, mas pode envolver passos intermediários. As propriedades desses passos intermediários, segundo Yonetani &

Schleyer, não estavam definidos mas pareciam ser altamente dependentes do grau de hidratação.

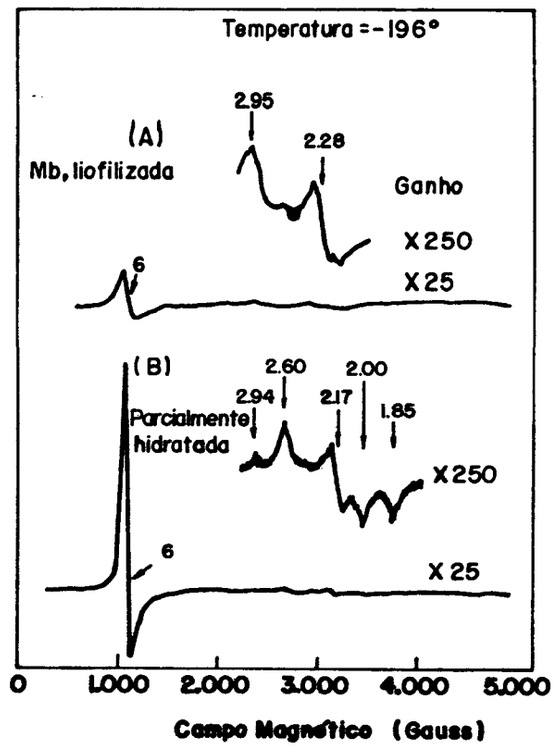



**Figura 10.** Espectros de RPE da meta Mb, de uma mesma amostra, nas seguintes condições:
**a)** liofilizada
**b)** parcialmente hidratada

Mais recentemente Alter, 1983 utilizando espectroscopia fotoacústica observou as perturbações espectrais associadas com mudança de estado físico da Hb. Estudou os derivados ( $H_2O$ ), flúor ( $F^-$ ), azida ( $N_3^-$ ) e cianeto ( $CN^-$ ) quanto aos efeitos da liofilização, cristalização e precipitação com sulfato de amônio. A principal

observação feita foi os diferentes níveis de formação do hemicromo H ( bi-histidina ) entre os diferentes derivados e processos de preparação.

A Tabela III mostra tal resultado, indicando uma maior formação para o derivado meta no processo de liofilização e o menor para o cianeto. O valor maior observado no processo de liofilização que na precipitação reflete uma maior eficiência na remoção de água da proteína. A maior estabilidade para o derivado cianeto é esperado pela sua ligação ser a mais forte, dentre os ligantes utilizados com o ferro.

**Tabela III.** Porcentagem de conversão de derivados, da meta Hb bovina para hemicromo H ( bi-histidina ) em diferentes preparações ( Alter, 1983 ).

| **Derivado Hb bovina** | **Preparação** | | |
|---|---|---|---|
| | **Liofilizada** | **Precipitada** | **Cristalizada** |
| $H_2O$ ( meta ) | 82 ± 3 | 29 ± 7 | — |
| $F^-$ | 69 ± 2 | 6 ± 4 | — |
| $N_3^-$ | 52 ± 2 | < 2 | < 2 |
| $CN^-$ | < 2 | < 2 | < 2 |

### 2.3.2. Aspectos Dinâmicos

As funções fisiológicas de proteínas não podem ser entendidas somente de sua estrutura estática uma vez que aspectos dinâmicos são de grande importância ( Singh et al., 1981 ).

Estudos de raio-X ( Frauenfelder et al., 1979 ) e Mossbauer ( Keller & Debrunner , 1980; Parak et al., 1981 ) com cristais e soluções congeladas de mioglobina revelaram que os átomos na proteína sofrem deslocamentos acentuados. Por exemplo, o deslocamento médio do átomo de ferro na mioglobina é tão grande como 0,24 Å, a temperatura ambiente. Tais valores anômalos podem ser descritos a flutuações entre subestados conformacionais da molécula da proteína ( Frauenfelder et al., 1979 ).

Esses subestados surgem de um grande número de configurações estruturais ligeiramente diferentes que a proteína pode adotar. Em experimentos Mössbauer obteve-se que o tempo característico desses movimentos de larga amplitude é da ordem de $10^{-7}$ s a temperatura ambiente ( Parak et al., 1981 ). No congelamento, contudo, essas flutuações caem e abaixo de 200 K, são muito lentas para serem vistas por Mössbauer.

Experimentos Mössbauer em proteínas ( Parak & Formenck, 1971 e Frolov et al., 1975 ) e espalhamento Rayleigh com mioglobina policristalina ( Krupjanski et al., 1980 ) com conteúdo de água controlada mostraram que os grandes deslocamentos do átomo de ferro desaparecem se a quantidade de água adsorvida da proteína é reduzida. A dependência da temperatura de medidas de relaxação dielétrica de água adsorvida em cristais de metamioglobina ( Singh et al., 1981 ) estão fortemente correlacionadas com a dependência da temperatura do deslocamento do átomo de ferro medido por Mössbauer. Na Figura 11 mostra-se esses resultados.

Para explicar esse fenômeno Singh et al., 1981 propuseram dois mecanismos: 1) o movimento da proteína sofre um amortecimento

mecânico pela água adsorvida; 2) existe um acoplamento dinâmico elétrico entre os dipolos elétricos flutuantes da água adsorvida e os grupos polares da proteína.

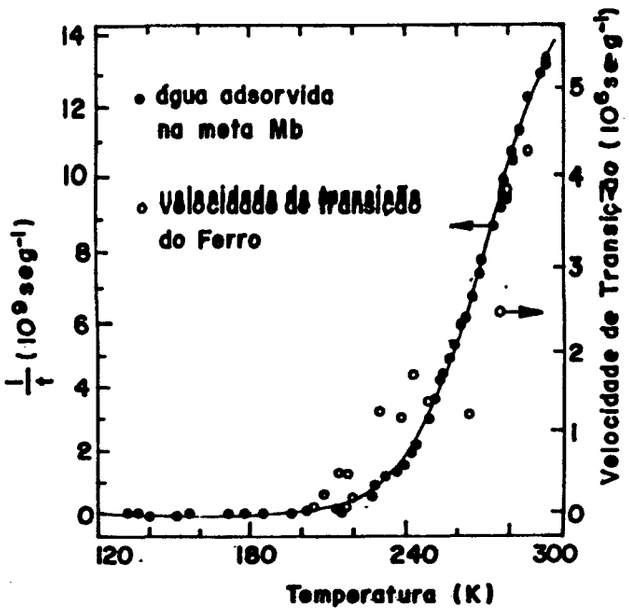



**Figura 11.** Dependência com a temperatura da velocidade de relaxação dielétrica da água na metamioglobina ( circulos cheios, escala da esquerda ) e da velocidade de transição conformacional dos átomos de ferro ( circulos vazios, escala da direita ) ( Singh et al., 1981 ).

A temperatura ambiente as moléculas de água podem se reorientar com uma velocidade rápida. Dessa forma, dificilmente exercem qualquer força de atrito no movimento da proteína, que consequentemente pode flutuar entre os subestados conformacionais com uma velocidade também muito rápida. Com o decréscimo da temperatura a velocidade de reorientação das moléculas de água decresce levando a um forte amortecimento no movimento da proteína

resultando em uma diminuição da velocidade de flutuação entre os subestados.

Por outro lado como investigado por Friend & Gurd, 1979 as interações eletrostáticas entre os aminoácidos carregados na superfície da proteína tem uma contribuição importante para a energia de estabilização da estrutura terciária da mioglobina. Consequentemente qualquer distúrbio das cargas ou propriedades dielétricas do meio molecular é provável ter uma forte influência na estrutura e dinâmica da proteína.

Geralmente a barreira de potencial entre subestados conformacionais da proteína é alto em comparação com a energia térmica, e consequentemente as transições entre subestados são raras. A reorientação dos momentos de dipolo elétrico das moléculas de água levam a flutuações locais do campo elétrico, o qual interage com os grupos carregados da superfície da proteína movimentando-os. Assim a barreira de potencial entre os subestados conformacionais da proteína é modulado pelas flutuações dos momentos de dipolo da água adsorvida.

A amplitude média dessas modulações de potenciais é pequena e ocorrem em uma taxa média dada pela velocidade de relaxação dielétrica. Ocasionalmente, contudo, devido a correlação estatística entre os dipolos flutuantes, essa modulação de potencial pode alcançar grande amplitude.

A probabilidade requerida para tais flutuações serem suficientemente grandes para explicar a velocidade relativamente lenta de flutuação da proteína, em comparação com a velocidade de relaxação rápida na água adsorvida, é em torno de uma parte em mil.

Uma vez que a velocidade de flutuação do dipolo da água adsorvida cresce com o aumento de temperatura, a velocidade de transição conformacional nas proteínas é esperada aumentar proporcionalmente, como se observa experimentalmente.

O efeito acoplamento elétrico pode também ser visto como uma blindagem ao movimento dos grupos carregados na superfície da proteína pela alta constante dielétrica da água adsorvida. Esta blindagem é efetiva somente para aquelas flutuações conformacionais da proteína que são mais lentas que a velocidade de relaxação dielétrica da água adsorvida. Consequentemente a velocidade de flutuação conformacional diminui com o decréscimo da velocidade de relaxação dielétrica da água adsorvida, no abaixamento da temperatura ( Singh et al., 1981 ).

Doster et al., 1986 a partir de medidas de calorimetria e espectroscopia infravermelho estudaram a água de hidratação em soluções e cristais de mioglobina em temperaturas abaixo de 0°C. As principais observações e conclusões foram:

- a água de hidratação permanece amorfa em baixas temperaturas,

- há uma transição tipo "vidro alargada" entre 180 e 270 K que depende do grau de hidratação da proteína ( Figura 12 );

- O espectro infravermelho e o calor específico da água em cristais de Mb foram determinados pela primeira vez entre 180 e 290 K.

• As dependências semelhantes com a temperatura sugerem correlação entre flutuações estruturais e movimento térmico da água do cristal ( Figura 11 );

• Um modelo de rede de ligações de hidrogênio é proposto para explicar esses aspectos. Segundo o modelo a cinética da quebra e formação de ligações de hidrogênio intramolecular e aquelas resultantes das interações solvente - proteína são contribuições essenciais para a dinâmica das proteínas. O sistema água - proteína é uma rede de ligações de hidrogênio e tal rede não tem simetria translacional. Ela pode ser separada em grupos com acoplamento interno diferentes. A dinâmica desses grupos envolve a formação e quebra de ligações de hidrogênio, que é um fenômeno predominantemente cooperativo, providenciando um mecanismo entre flutuações da água e movimento conformacional da proteína. O tamanho desses grupos diminui com o decréscimo da hidratação, influenciando na sua estabilidade, que é diminuída.

• A mioglobina desidratada pode ser aquecida até 80°C sem desnaturação. Isso, segundo Doster et al., sugere que a ligação de hdirogênio pode ser quebrada somente às custas da formação de uma nova ligação. O processo é pouco efetivo se somente poucos doadores e aceptores estão presentes.

• Trabalhos de cinética de ligação de ligantes em hemeproteínas ( Austin et al., 1975 , Doster et al., 1982 ) mostraram um comportamento não exponencial que foi explicado como devido a existência de uma distribuição de subestados conformacionais. Concluiram desses experimentos que cada proteína é congelada em subestado particular abaixo de 200 K. Essa distribuição pode refletir a

multiplicidade de estados da água na superfície da proteína. A mudança para o vermelho da banda do gelo "amorfo" ( água ligada ) por 15 a 20 $cm^{-1}$, relativo ao gelo de "volume" ( água livre ) implica um aumento da energia de ligação média de 3,6 kJ/mol. Essa mudança corresponde a um encurtamento da distância O ... O de 0,05 Å ( Joesten, 1974 ). A distribuição de ligações de hidrogênio, pode assim, ser inacessível a cristalografia de raio-X.

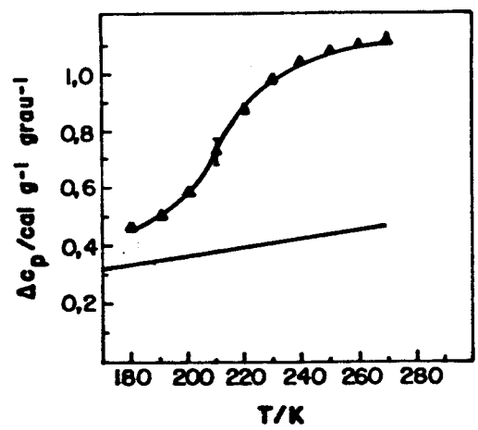



**Figura 12.** Calor específico da água em cristais de mioglobina (-Δ-) como uma função da temperatura. Os dados foram calculados da diferença Δ dH/dT entre duas medidas. O primeiro experimento foi com cristais intactos, e o segundo depois de secar o mesmo cristal a 80°C sob fluxo de nitrogênio. O calor específico do gelo ( — ) também é dado ( Doster et al., 1986 ).

Bogatyrenko & Likhtenshtein, 1985 observaram o efeito da hidratação nas propriedades dinâmico-molecular da albumina de soro humano, a partir de parâmetros de espectro de fosforescência e de RPE de "spin label" covalentemente ligado. Concluiram que na região de baixa temperatura ( 90-260 K ) a hidratação de albumina de soro

humano leva a intensificação apreciável dos movimentos molecular de baixa frequência ( $\gamma < 10^3$ $seg^{-1}$ ) e influencia fracamente os movimentos de alta frequência das regiões hidrofóbicas e acessíveis ao solvente.

# *Capítulo III*

# *Teoria de Ressonância Paramagnética Eletrônica ( RPE )*

## 3.1. Introdução

A Ressonância Paramagnética Eletrônica ( RPE ) é o fenômeno de absorção de energia dos elétrons não emparelhados de um átomo, molécula ou íon quando estes se encontram sujeitos a aplicação de um campo magnético ( Poole, C. P. , 1983; Pake, G. E. & Estle, T. L. , 1973 ). Assim a condição necessária para a utilização de RPE é a existência de elétrons desemparelhados no sistema em estudo. Nesse aspecto alguns dos íons dos metais de transição ( $Fe^{3+}$, $Cu^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Mo^{3+}$ e outros ), e radicais livres são adequados.

Em certos casos, como por exemplo para algumas macromoléculas ( proteínas, fosfolipídios, etc), que não apresentam absorção intrínsica de RPE , é possível a introdução de moléculas chamadas "spin-label", que são radicais livres estáveis. O "spin-label" ligado a macromolécula pode refletir no seu espectro de RPE alterações relacionadas com o sistema de interesse. O mais utilizado dos spin - label são derivados do radical nitróxido ( N-O ) ( Knowles et al., 1976 ).

## 3.2. Hamiltoniano de Spin

O momento magnético $\vec{\mu}$ de um elétron desemparelhado pode ser expresso em termos de seu spin ($\vec{s}$) como:

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

onde $\beta$ é o magnéton de Bohr e g é o fator giromagnético para o elétron.

Na presença de um campo magnético $\vec{H}$ a interação desse elétron com o campo magnético será dado pelo hamiltoniano:

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu}.\vec{H} \quad \text{ou} \qquad (2)$$

$$\mathcal{H} = g\,\beta\,\vec{s}.\vec{H} \qquad (3)$$

Este hamiltoniano descreve o efeito Zeeman e sua solução fornece as possíveis energias para o sistema.

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

$$\mathcal{H} = g\,\beta\,Ho.S_Z \qquad (4)$$

$$E(m_s) = g\,\beta\,Ho.m_s \qquad (5)$$

onde $m_s$ são as possíveis projeções do spin ao longo do eixo de quantização Z. No caso de um elétron as projeções possíveis são $M_I = \pm 1/2$ e as energias serão:



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS-USP
FÍSICA

$$E\left(+\frac{1}{2}\right) = +\frac{1}{2}\, g\, \beta\, Ho \qquad (6)$$

$$E\left(-\frac{1}{2}\right) = -\frac{1}{2}\, g\, \beta\, Ho \qquad (7)$$

A transição entre os dois níveis se dará quando uma energia $\Delta E = g\, \beta\, Ho$ for fornecida ao sistema. Essa energia faz com que o momento magnético transicione de uma posição paralela ao campo magnético Ho para uma posição antipararela a este. A energia $\Delta E$ normalmente é fornecida ao sistema através da exposição a um campo de microondas de frequência fixa perpendicular ao campo Ho que é adiabaticamente variado até que ocorra a transição. Quando ocorre a transição o sistema absorve energia do campo de microonda e essa absorção ou geralmente a sua derivada pode ser detectada por um sistema eletrônico apropriado que faz parte dos espectrômetros de RPE. A Figura 13 ilustra essas informações.

As considerações feitas, até agora, são válidas no caso do elétron livre para o qual o fator g vale 2,0023. No entanto, estuda-se casos mais complexos, onde os elétrons desemparelhados não se encontram livres, mas sujeito a interações no átomo ou íon e com os ligantes. Algumas dessas interações são: interação spin-órbita, interação fina e interação hiperfina.

Na verdade essas interações "enriquecem" o espectro de RPE fornecendo informações importantes sobre o sistema contendo o elétron desemparelhado.

A seguir serão descritos os sistemas estudados nesse trabalho mostrando os correspondentes hamiltoniano de spin e a origem do espectro de RPE.

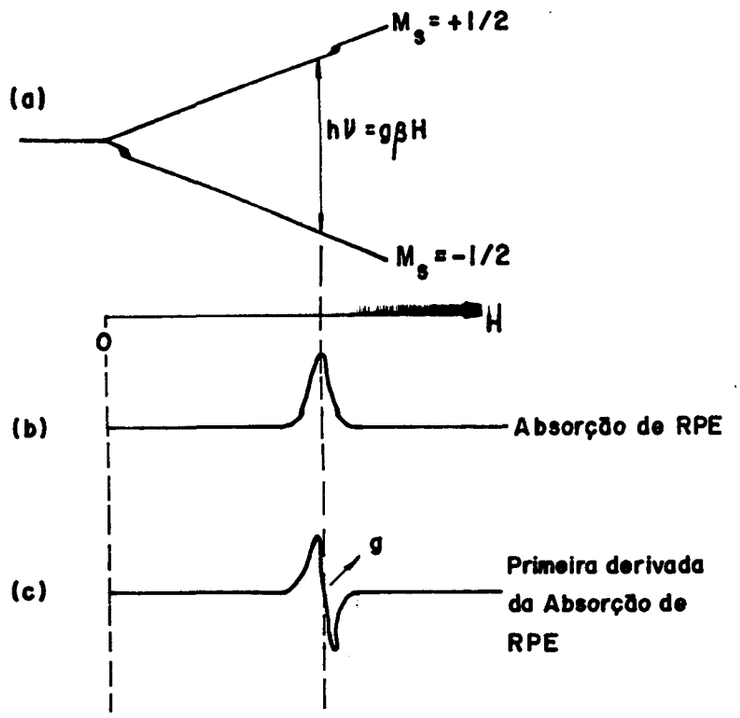



**Figura 13. a)** Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético
**b)** A forma de linha da absorção de energia da microonda
**c)** Derivada da linha de absorção.

## 3.3. Ion Ferro em Hemoproteínas

### 3.3.1. Introdução

Um átomo de ferro tem 26 elétrons, sendo que 18 estão em camadas fechadas e 8 na configuração orbital $3d^6\ 4s^2$. Nas hemoproteínas, pode aparecer no estado trivalente ( $Fe^{3+}$, férrico ) ou divalente ( $Fe^{2+}$ , ferroso ). No primeiro caso a configuração orbital é $3d^5$ e no último $3d^6$.

A camada 3d consiste de 5 orbitais que podem acomodar no máximo 10 elétrons levando-se em conta seus spins paralelos e antiparalelos, como é requerido pelo princípio de Exclusão de Pauli. Quando há menos de 10 elétrons, vários arranjos são possíveis, como mostrado na Figura 14a. A regra de Hund favorece o estado de spin mais alto como o de menor energia, de forma que os estados fundamentais para $3d^5$ e $3d^6$ são respectivamente $^6S$ e $^5D$.

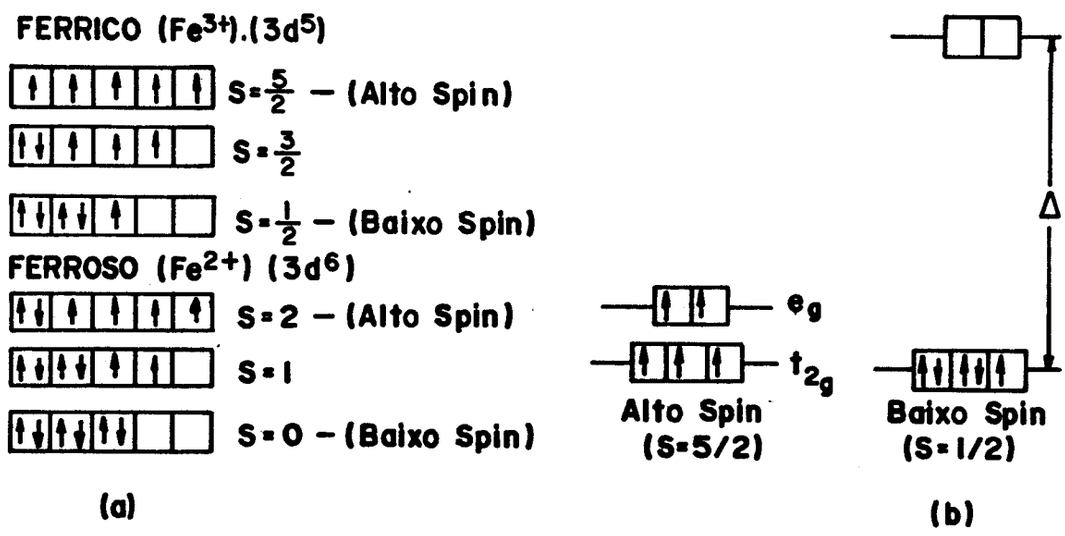



**Figura 14.** **(a)** Ocupação possíveis dos orbitais d pelos elétrons do íon $Fe^{2+}$ e $Fe^{3+}$.
**(b)** Efeito do campo cristalino Δ no estado de spin para o íon $Fe^{3+}$.

A dependência angular das cinco funções de onda ( orbitais ) 3d ortogonais são mostrados na Figura 15.

Os orbitais $d_{xy}$, $d_{xz}$, $d_{yz}$ são denominados $t_{2g}$ e os $d_{z^2}$ e $d_{x^2-y^2}$ são chamados $e_g$. No íon livre a energia dos cinco orbitais é a mesma, ou seja, o estado fundamental é pentadegenerado *. No campo cristalino ( Feher, 1969 ) o efeito da circunvizinhança não é o mesmo sobre todos os orbitais d e, sendo assim, a degenerescência é levantada, de modo que o desdobramento dos níveis de energia degenerados deverá ser sensível à simetria da vizinhança.

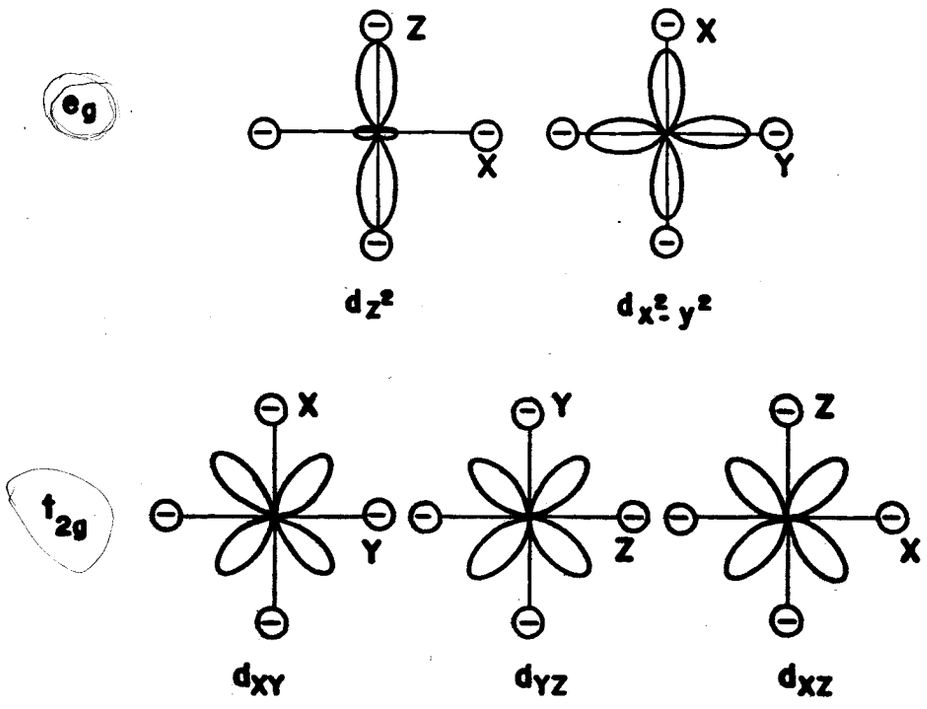



**Figura 15**. Dependência angular das funções de onda 3d.

---

* Na aproximação da teoria de campo cristalino os ligantes são substituidos por cargas puntuais negativas, que vão dar origem a um campo elétrico que atua sobre o ion paramagnético.

Numa primeira aproximação ao estudo do grupo heme das hemoproteínas o íon ferro está octaedricamente coordenado a 6 ligantes carregados negativamente. Os orbitais **d**, no centro desse octaedro, serão desdobrados. Os três orbitais $t_{2g}$ ( $d_{xy}$ , $d_{xz}$ , $d_{yz}$ ) evitam os vértices negativos do octaedro, enquanto os orbitais $e_g$ ( $d_{x^2-y^2}$ e $d_{z^2}$ ) apontam diretamente para as cargas negativas ( Figura 16 ). Nesse caso, a energia de repulsão Coulombiana é grande e esses orbitais ( $e_g$ ) estarão com uma energia maior. A diferença de energia entre os orbitais $t_{2g}$ e $e_g$ é chamada de parâmetro de campo cristalino $\Delta$. Esse valor depende do composto; em grupos heme é da ordem de $10^4\ cm^{-1}$ ( Feher, G., 1970 ).

Dependendo da intensidade do desdobramento do campo cristalino $\Delta$, que levanta a degenerescência dos orbitais, pode-se ter uma configuração baixo spin ou alto spin. Assim ligantes fortes $\Delta$ intenso, como o cianeto ( $CN^-$ ) fornece uma configuração de baixo spin ( S = 1/2 para o $Fe^{3+}$ ) e ligantes fracos como a água e o flúor, fornecem uma configuração de alto spin ( S = 5/2 ). Na Figura 14a-b mostra-se as ocupações possíveis dos orbitais **d** pelos elétrons dos íons ferro ( II ) e ferro ( III ) e o efeito do campo cristalino $\Delta$ no estado de spin para o ferro ( III ).

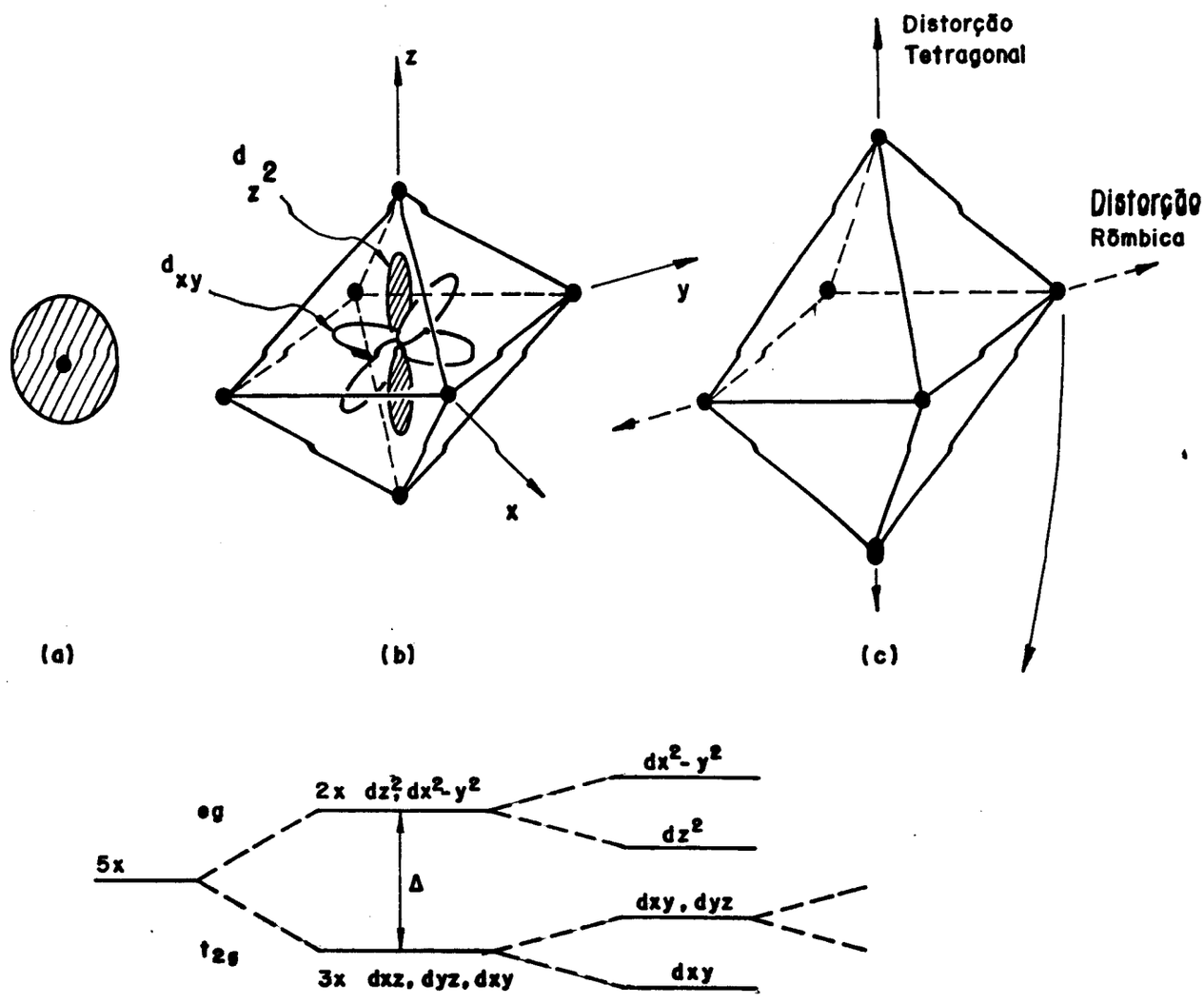



**Figura 16.** Efeito do campo cristalino nos níveis de energia dos orbitais d:
**a)** íon livre ( simetria esférica )
**b)** vizinhança octaédrica
**c)** octaedro com distorção tetragonal.

## 3.3.2. Hamiltoniano de Spin e Níveis de Energia para o íon Ferro (III)

### 3.3.2.1. $Fe^{3+}$ - S = 5/2

Para o íon ferro ( III ), estado de spin S = 5/2, em hemoproteínas o hamiltoniano é dado por:

$$\mathcal{H} = \beta \left( g_x S_x H_x + g_y S_y H_y + g_z S_z H_z \right) + \tag{8}$$

$$+ D \left[ S_z^2 - \frac{1}{3} S (S+1) \right] + E \left( S_x^2 - S_y^2 \right)$$

o primeiro termo é o devido ao efeito Zeeman e os termos contendo **D** e **E** são devido a interação fina ou de campo magnético zero e estão associadas ao campo eletrostático ao redor do íon. **D** e **E** são associados a desdobramentos axial e rômbico respectivamente ( Feher, 1970 ).

O hamiltoniano de spin (8) pode ser escrito, de outra maneira, em termos de um fato g efetivo ( $g_{ef}$ ), onde está contido as contribuições de **D** e **E** também, com a seguinte forma:

$$\mathcal{H} = g_{ef} \beta \vec{s} . \vec{H} \tag{9}$$

Os valores de $g_{ef}$ serão aqueles medidos diretamente no espectro de RPE.

O íon ferro ( III ) livre apresenta como termo fundamental $^6S_{5/2}$ e quando submetido a um campo magnético desdobra os três dubletos de Kramers ( ± 5/2 , ± 3/2 , ± 1/2 ) como apresentado na Figura 17a. No heme quando está sujeito a um campo cristalino axial ( E = 0 ) fraco, criado pelos ligantes, os três dubletos desdobram-se em três níveis com diferentes energias em campo magnético zero. As Figuras 17b e 17c mostram os casos de aplicação de um campo magnético paralelo e perpendicular, respectivamente ao eixo Z do sistema. Os diferentes desdobramentos podem ser entendidos considerando que o eixo de quantização ( Z ) para o sistema não

depende do campo magnético externo mas sim do campo cristalino criado pelos ligantes, ou seja $D \gg g\beta H$ ( Feher, 1970 ).

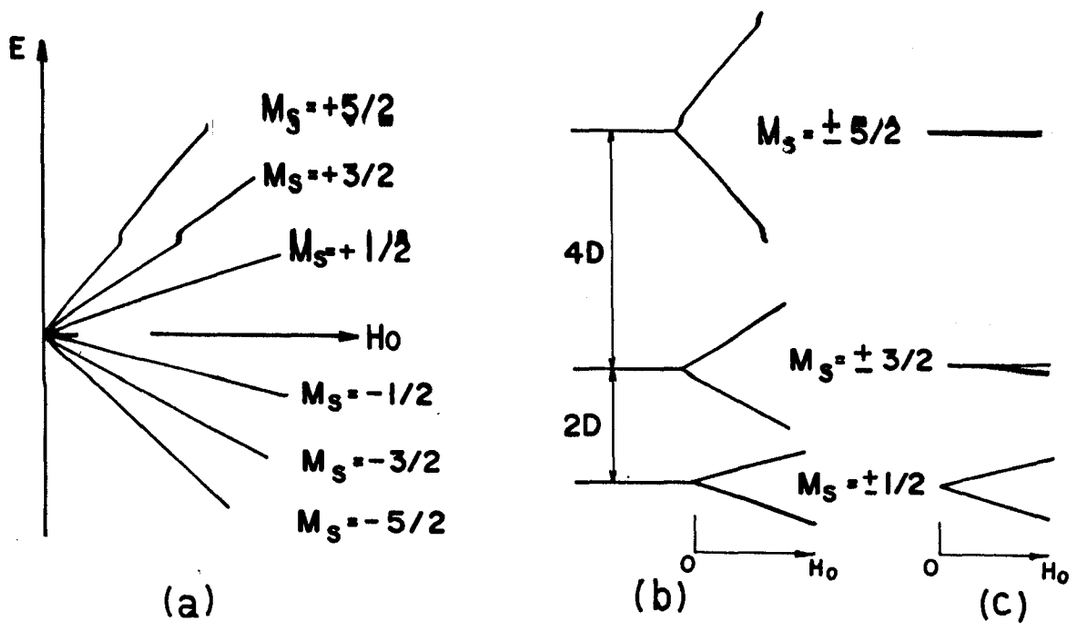



**Figura 17.** Níveis de energia de um íon com S = 5/2

**a)** íon livre em um campo magnético externo

**b)** íon em um campo cristalino axial com Ho// Z

**c)** íon em um campo cristalino axial com Ho⊥Z.

O espectro típico de RPE para o íon ferro ( III ), em uma solução congelada de meta Mb, sujeito a um campo cristalino axial fraco ( S = 5/2 ), é mostrado na Figura 18b, onde observa-se duas absorções, uma em campo baixo, g ~ 6, e outra em campo alto g ~ 2. Na Figura 18a mostra-se o espectro de absorção correspondente.

O espectro é interpretado considerando que a transição está ocorrendo entre o dubleto de Kramers de menor energia

( $m_s = \pm 1/2$ ). Como mostra a Figura 19 o ângulo formado entre as direções de $m_s = \pm 1/2$ e o eixo Z é o mesmo para H // Z e H⊥ Z. A projeção de S na direção perpendicular a Z é muito maior que ao longo de Z e isso leva a uma energia de Zeeman maior para a direção perpendicular.

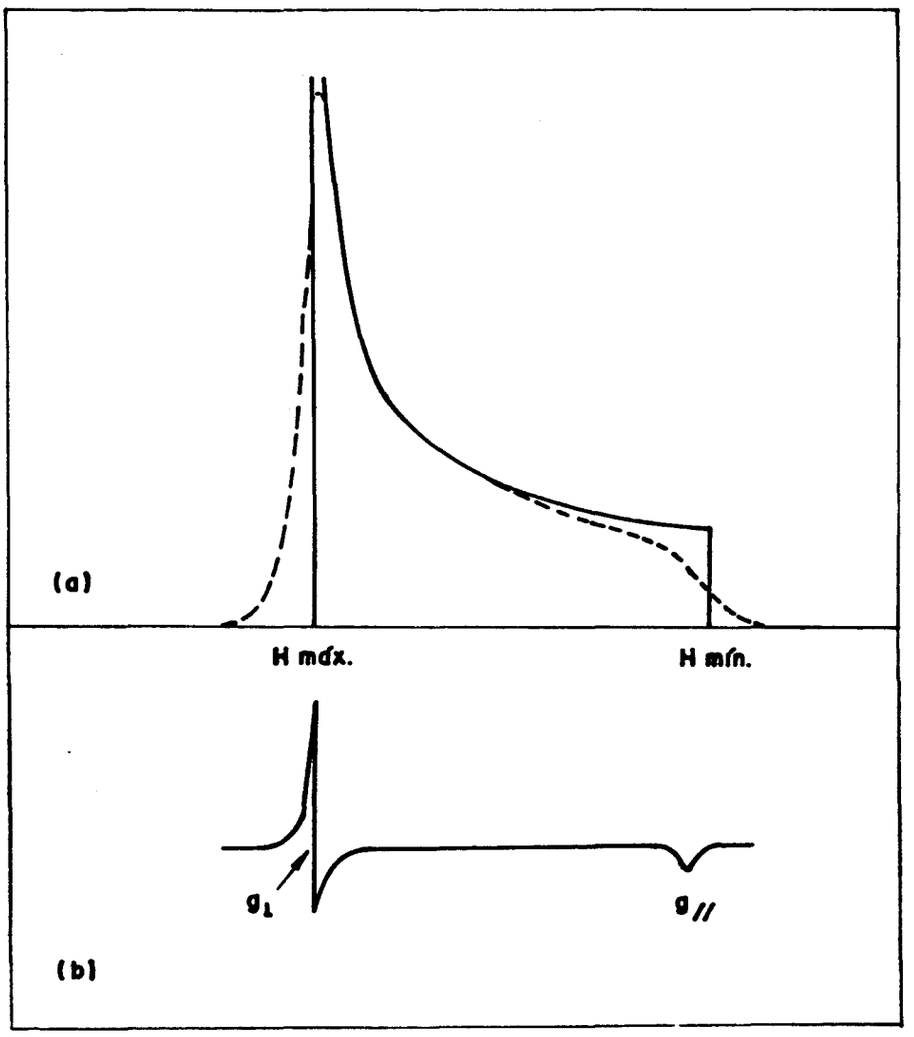



**Figura 18.** Espectro de RPE típico da meta Mb ( amostra policristalina ou solução congelada ):

**a)** linha contínua é a curva teórica e a pontilhada é o sinal observado experimentalmente mostrando o alargamento de linha;

**b)** a derivada da linha de absorção.



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

Esta energia maior é formalmente explicitado através do valor de $g_{\perp}$ maior que para $g_{//}$. Essa também é uma das razões pela intensidade muito maior para o sinal com $g_{\perp}$. A outra é simplesmente o fato que as direções x e y são equivalentes e suas contribuições se somam no espectro.

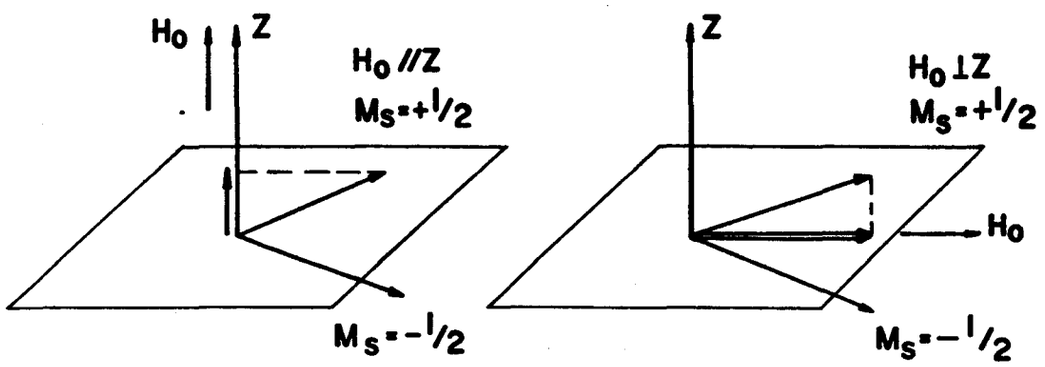



**Figura 19. Representação vetorial da orientação do eixo de quantização do heme ( Feher, 1970 ).**

Na Tabela IV mostra-se os valores de **D** para algumas hemoproteínas. Com esses valores e considerando a faixa de frequência de operação dos espectrômetros convencionais de RPE ( Banda X - 0,33 $cm^{-1}$ ) a única transição possível é realmente para o dubleto de Kramers de menor energia $M_S = \pm 1/2$ ( $\Delta m_I = \pm 1$ ).

Nas considerações feitas até agora, **E** da equação 8 foi desprezado. Esse termo origina-se devido a uma distorção rômbica do campo cristalino que circunda o íon. Isso leva a uma quebra de

simetria no plano do heme fazendo com que as direções x e y não sejam mais magneticamente equivalentes.

**Tabela IV.** Valores da Separação de Campo Zero ( D ) para alguns derivados da Mb e Hb ( Yonetani et al., 1970 ).

| Proteína | D ( $cm^{-1}$ ) | Método |
|---|---|---|
| Meta Mb | 10,0 | RPE, Mössbauer |
| Ferrimioglobina - Flúor | 6,5 | Susceptometria |
| Ferrimioglobina - Flúor | 6,3 | Mössbauer |
| Ferri Hemoglobina - Flúor | 5,0 | RPE |
| Ferri Hemoglobina - Flúor | 7,0 | Mössbauer |
| Mioglobina - $Mn^{2+}$ | 0,55 | RPE |

Convenientemente, define-se o parâmetro $\lambda = E/D$ e a variação dos valores fisicamente distintos é restrito a $\lambda < 1/3$. Na Figura 20 é mostrado a variação do fator g efetivo em função do parâmetro $\lambda$ para os três dubletos de Kramers, proposto por Wickman et al., 1965.

Observa-se na Figura 20 que

**a)** para $E = 0$, $\lambda = 0$, a simetria é axial e para o dubleto de menor energia tem-se as transições em $g_{ef} = 2$ ($g_z = g$ ) e $g_{ef} = 6$ ( $g_x$ e $g_y = g$ ), como mostrado na Figura 15;

**b)** para E grande ou seja, $\lambda = 1/3$ tem-se para o dubleto do meio ( $\pm 3/2$ ) uma única transição em $g_{ef} = 4,3$ ( $g_x$ ,

$g_y$ e $g_z$ ) ( valores maiores de $\lambda$ há somente inversão no valor de D );

c) para valores intermediários de $\lambda$ ( 0 - 1/3 ) uma série de transições pode ser observada.

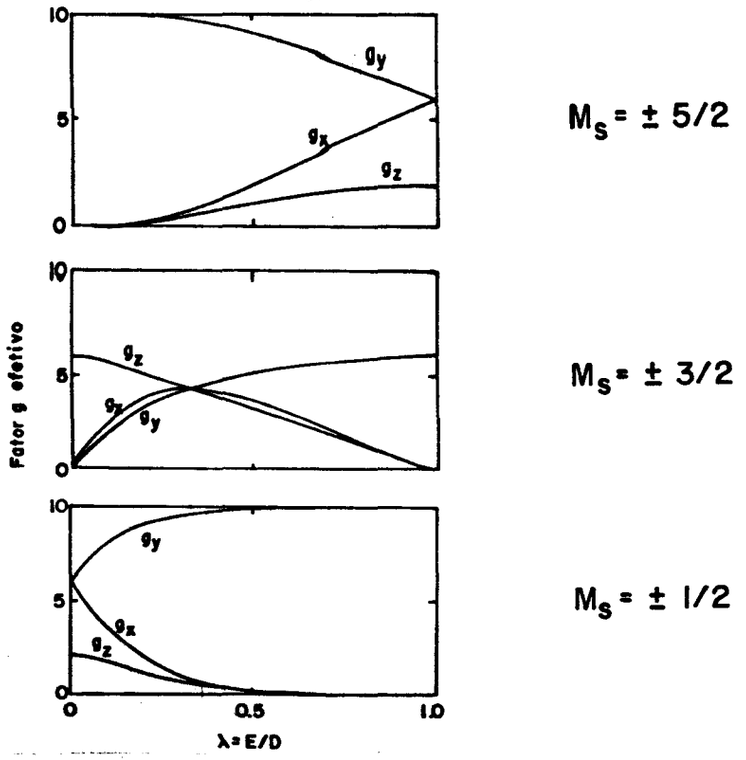



**Figura 20.** Valores de g efetivo em função de $\lambda = E/D$ ( Wickman et al., 1965 ).

Os fatores $g_x$ e $g_y$ são dados pelas seguintes relações ( Watari, 1967 ):

$$g_x = 6 - 24 \frac{E}{D} \qquad (10)$$

$$g_y = 6 + 24 \frac{E}{D} \qquad (11)$$

Dos fatores g no plano ( x , y ) ( plano do heme ), a relação E/D pode ser calculada dando:

$$\frac{E}{D} = \frac{|g_x - g_y|}{48} \qquad (12)$$

Assim como $E/D < 0{,}33$, o grau de distorção rômbica, ou rombicidade, do sistema pode ser definido como ( Peisach et al., 1971 ):

$$\% \text{ Rombicidade} = \frac{|g_x - g_y|}{16} \cdot 100\% \qquad (13)$$

### 3.2.2.1.1. Efeito da temperatura no espectro de RPE

A fração populacional de spins em cada dubleto de Kramers em campo magnético zero são mostrados na Figura 21 como uma função da temperatura para o derivado ferrimioglobina-flúor, assumindo simetria tetragonal ( axial ) ( Peisach et al., 1971 ). Somente em temperaturas muito baixa ( perto de 1 K ) a população de spin está totalmente no dubleto de Kramers de menor energia. Em temperaturas muito altas ( acima de 150 K ) cada população assintoticamente aproxima-se de 1/3.

Uma vez que as propriedades magnéticas dos dois dubletos de Kramers superiores do ferro ( III ) com alto spin não influenciam a absorção de RPE, quando estudado em Banda X ( 9 GHz ), pode-se considerar o estado de menor energia como um sistema de spin efetivo 1/2. Deve-se contudo haver cuidados pois em temperaturas comparáveis a separação do campo ligante entre os dubletos de Kramers, existirá uma dependência da distribuição da população, baseada na distribuição de Boltzmann. Portanto nem todas moléculas com alto spin darão origem a absorção de RPE.

Um conhecimento do valor de **D** permite determinar com precisão a fração da população no dubleto de Kramer de menor energia. Em ferrihemoproteínas nas quais **D** não é conhecido a

interpretação quantitativa absoluta por RPE só é possível em temperaturas muito baixa.

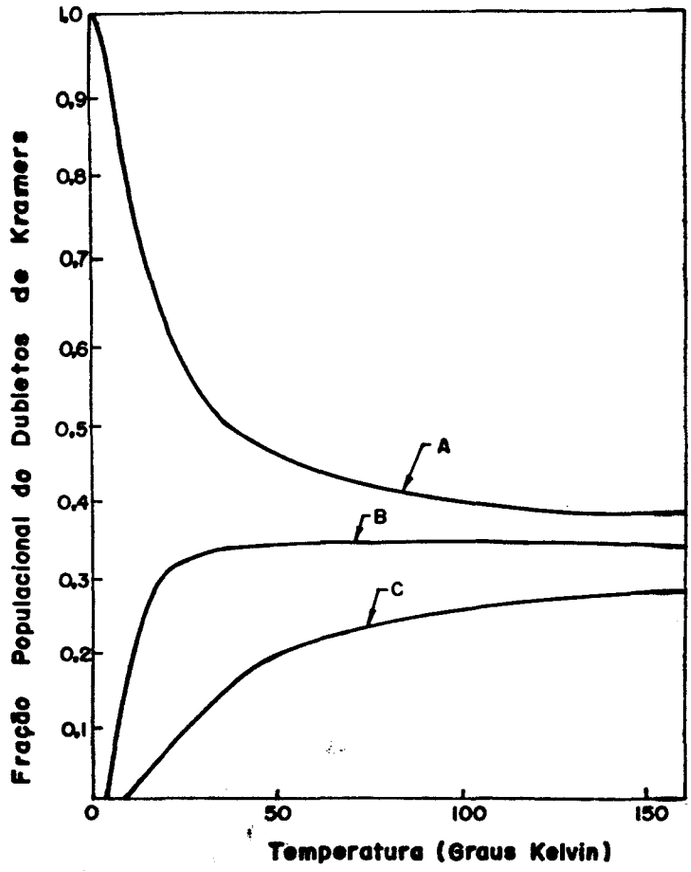



**Figura 21.** Distribuição da população de spin nos três dubletos de Kramers para ferrimioglobina-flúor ( Peisach et al., 1971 ).

A população do menor dubleto de Kramer em qualquer temperatura é dependente da magnitude de separação de campo zero, conforme mostrado para alguns casos na Figura 22.

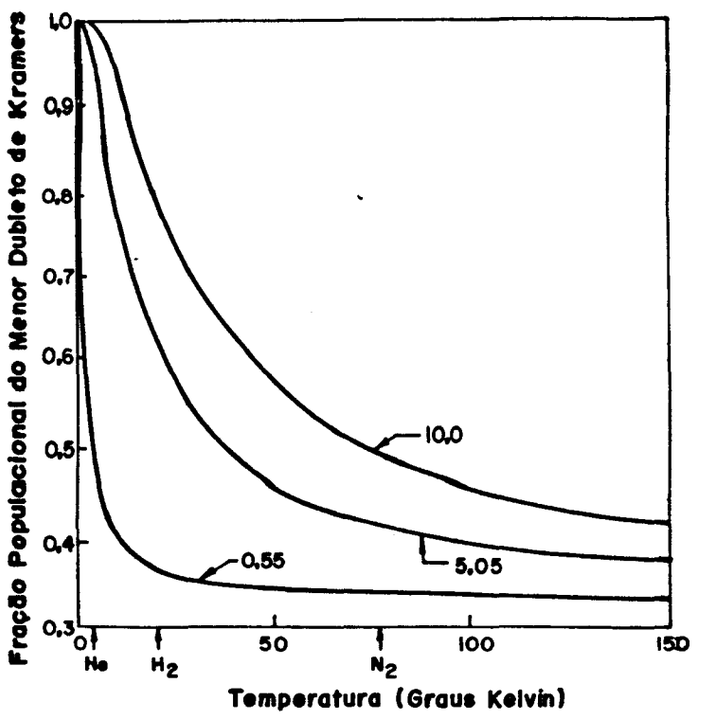



**Figura 22.** População fracional do menor dubleto de Kramers para três proteínas com S = 5/2, com os valores de D=10cm$^{-1}$( Ferri Mb); 5,05 cm$^{-1}$ ( Ferri Mb - flúor ) e 0,55 cm$^{-1}$ ( $Mn^{2+}$ - Mioglobina ) ( Peisach et al., 1971 ).

### 3.3.2.2. $Fe^{3+}$ - S = 1/2

Uma situação diferente ocorre para o íon ferro ( III ), quando ele se encontra sujeito a um campo cristalino intenso porque, nesse caso, o estado de spin é 1/2. Não há separação de campo magnético zero e o hamiltoniano de spin é dado por

$$\mathcal{H} = \beta \vec{s} . \bar{g} . \vec{H} \qquad (14)$$

O valor médio de g novamente é próximo do 2.

Na Figura 23 mostra-se o espectro de RPE típico de ferrihemoproteínas de spin baixo.

Os desvios acentuados dos fatores g do valor 2,0023, do elétron livre, são devido a contribuição relevante do momento angular orbital ( Pake & Estle, 1973) para o momento magnético total. Observa-se também que a simetria em torno do íon Fe ( III ) é rômbica ( três valores distintos de g ).

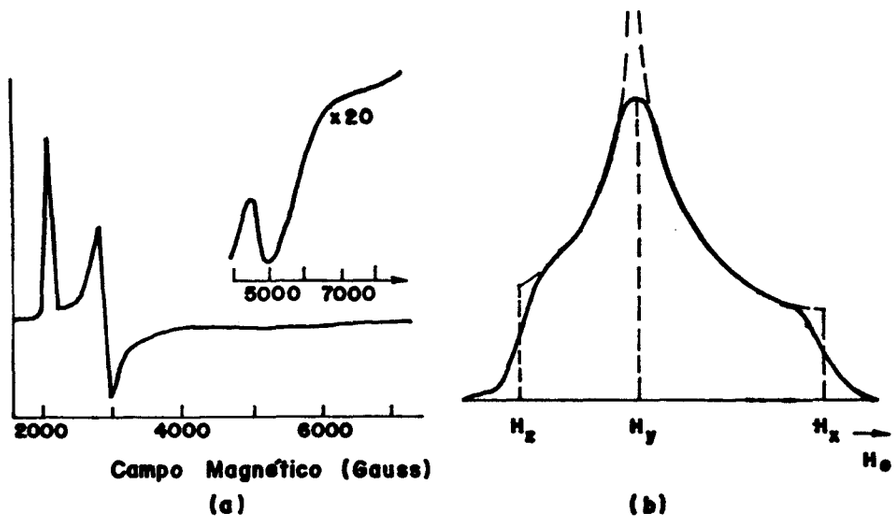



**Figura 23.** O espectro de RPE típico de ferrihemeproteínas com spin baixo ( 1/2 ):
**(a)** 1ª derivada do espectro de absorção
**(b)** espectro de absorção. A linha pontilhada é o espectro teórico, supondo componente de largura de linha zero ( Poole, 1983 ).

Uma boa aproximação para explicar o espectro é dada por Weissbluth ( 1967 ). O modelo assume que os três orbitais $t_{2g}$ ( $d_{xy}$, $d_{xz}$, $d_{yz}$ ) estão isolados dos orbitais $e_g$ ( $d_{z^2}$, $d_{x^2-y^2}$ ) e que os cinco elétrons de valência estão localizados nesses orbitais $t_{2g}$, de forma que a configuração eletrônica a um elétron é $( d_{xy} )^2 ( d_{xz} )^2 ( d_{yz} )$, que

pode ser, alternativamente, representada como ( $d_{yz}$ ) ou seja, um "buraco" positivo em $d_{yz}$. Além disso é postulado que esses orbitais estão sujeitos a campos ligantes assimétricos; em simetria $D_{2h}$ ( rômbica ) a parte não esférica dos campos ligantes pode ser decomposta numa componente axial δ ( proporcional ao campo ligante forte ao longo do eixo z ) e uma componente rômbica, menor, V ( proporcional à diferença no campo ligante forte, ao longo de x e y ). O efeito de δ, geralmente interpretado como um alongamento ou uma compressão no eixo z ( perpendicular ao plano do grupo heme ), é separar $d_{xy}$ de $d_{xz}$ e $d_{yz}$; com δ positivo, $d_{xy}$ é estabilizado em relação aos outros orbitais ( Figura 24 ).

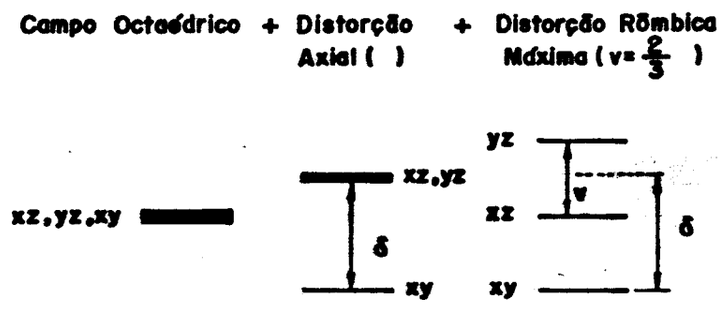



**Figura 24.** Orbitais $3d^5$ em diferentes condições de campo cristalino.

A componente V é uma distorção no plano, resultante da não equivalência de $d_{xz}$ e $d_{yz}$, e nunca é maior que 2/3 δ pois, quando a separação entre os orbitais é igual, um tem rombicidade

máxima. Além disso, qualquer aumento de V, leva a uma mudança qualitativa no padrão gráfico, e os eixos xy podem ser re-definidos para manter o eixo z como aquele que está associado com a maior distorção, com

$$\frac{V}{\delta} = \frac{2}{3} \tag{15}$$

o sistema é dito 100% rômbico.

Se o elétron estiver confinado unicamente a $d_{yz}$, poderia não haver contribuição orbital ao momento magnético e somente um valor-g seria observado. Entretanto, há três valores de g distintos, o que estabelece que o orbital que contém o spin desemparelhado não está exclusivamente em $d_{yz}$, como está explícito na Figura 23, mas numa combinação linear de $d_{yz}$ com $d_{xz}$ e $d_{yz}$. Essa mistura de orbitais é introduzida pela interação spin-órbita, pois os três orbitais estão relacionados uns com os outros, por rotações das coordenadas x, y e z.

O próximo passo é expressar as funções de onda como uma combinação linear dos três estados disponíveis:

$$\begin{aligned} |\psi^+\rangle &= a|\xi^+\rangle + ib|\eta^-\rangle + c|\zeta^+\rangle \\ |\psi^-\rangle &= a|\xi^-\rangle + ib|\eta^+\rangle + c|\zeta^-\rangle \end{aligned} \tag{16}$$

em que $d_{yz}$, $d_{xy}$ e $d_{xz}$ são representados por $\xi$, $\eta$ e $\zeta$; a, b e c são reais, os sinais + e - representam o spin eletrônico. A formulação da combinação exata do orbital na equação 16 não é óbvia; é ditada pelo fato de que os estados são misturados por interações spin-órbita e é obtida a partir de considerações de simetria, como descrito por Weissbluth, 1967. Adicionalmente, as relações entre os coeficientes nas



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

duas equações (acima) são governadas pela regra de Kramer $|\psi^-\rangle = i\,|\psi^+\rangle$.

Taylor (1977) propôs uma representação alternativa para o estado fundamental, levando a uma simplificação nas fórmulas subsequentes.

$$|\psi^+\rangle = a\,|\xi^+\rangle - ib\,|\eta^-\rangle - c\,|\zeta^+\rangle$$

$$|\psi^-\rangle = -a\,|\xi^-\rangle - ib\,|\eta^+\rangle - c\,|\zeta^-\rangle \qquad (17)$$

Na presença do campo magnético o termo do operador Hamiltoniano do qual g é calculado é $\beta\vec{H}\left(\hat{L}_j + 2\hat{S}_j\right)$, $j = x, y$ ou $z$ e a separação de energia ao longo do eixo j é $\Delta E_j = g_j\,\beta\,\vec{H}$. As expressões resultantes para os valores de g principal em termos dos coeficientes da função de onda são:

$$g_z = 2\left[(a+b)^2 - c^2\right]$$

$$g_y = 2\left[(a+c)^2 - b^2\right] \qquad (18)$$

$$g_x = 2\left[a^2 - (b+c)^2\right]$$

Essas equações são uma consequência nos sinais de a, b e c usados na equação 17 e, mais particularmente da escolha que o produto $g_x\,g_y\,g_z$ seja positivo quando $a = 1$.

As relações 18 levam à obtenção das expressões para as quantidades a, b, c, V e $\delta$.

$$a = \frac{(g_z + g_y)}{\left[8\,(g_z + g_y - g_x)\right]^{1/2}}$$

$$b = \frac{(g_z - g_x)}{\left[8\,(g_z + g_y - g_x)\right]^{1/2}} \qquad (19)$$

$$c = \frac{(g_y - g_x)}{\left[8\,(g_z + g_y - g_x)\right]^{1/2}}$$

e

$$\frac{V}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_y}{g_z - g_x}$$

$$\frac{\delta}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_z}{g_y - g_x} - \frac{1}{2}\,\frac{V}{\lambda} \qquad (20)$$

V e $\delta$ são dados em unidades da constante de acoplamento spin-órbita $\lambda$. Assim, tem-se que:

$$g_z + g_y - g_x = 2\,(a + b + c)^2 \qquad (21)$$

Utilizando a condição de normalização $a^2 + b^2 + c^2 = 1$, obtém-se:

$$g_x^2 + g_y^2 - g_z^2 - g_x g_z - g_x g_y + g_y g_z + 4 g_x - 4 g_y - 4 g_z = 0 \quad (22)$$

Essa expressão permite calcular qualquer valor de g conhecendo-se os outros dois, o que é de particular interesse para os gupos heme porque o menor valor de g ( em campo mais alto ) é muitas vezes alargado e somente detectável em temperaturas muito baixa ( perto de He líquido ) e/ou em soluções muito concentradas.

## 3.3. Efeito "g-strain"

Os espectros RPE de metaloproteínas são geralmente obtidos de soluções congeladas. Eles são caracterizados por um grande alargamento não homogêneo que é sobreposto ao efeito da amostra policristalina. Este alargamento é atribuído a uma distribuição randômica de conformações da proteína resultando em uma distribuição dos parâmetros do hamiltoniano de spin. É amplamente aceito que as flutuações de conformação são relacionadas a distribuição de estresses exercidos pela circunvizinhança sobre o sítio ativo e a distribuição de valores de g resultantes tem sido chamado alargamento "g-strain" ( Hearshen et al., 1982 ).

A magnitude deste alargamento pode depender do solvente. No entanto, esse fenômeno é típico do meio proteico. Quando um modelo teórico para descrever as propriedades magnéticas do centro ativo é disponível , uma simulação numérica significativa do espectro de RPE, baseado nesse modelo deve incluir o efeito de alargamento de "g-strain". Por outro lado, a quantização desse efeito é por si mesmo de interesse, porque está relacionado à flexibilidade da

circunvizinhança do sítio ativo, uma propriedade que pode ser de significado funcional ( More et al., 1987 ).

## 3.4. Nitrosil hemoproteínas

O óxido nítrico ( NO ), como a molécula de oxigênio ( $O_2$ ), liga-se ao ferro do heme ocupando a 6ª posição de coordenação, ficando o ferro octaedricamente coordenado. Os compostos heme ferrosos ( $Fe^{2+}$ ) com NO são paramagnéticos e, ao contrário do caso em que os ligantes são $O_2$ ou $CO_2$, é possível realizar estudos através de RPE acompanhando o sinal do próprio NO.

O hamiltoniano de spin para compostos NO - $Fe^{2+}$ é dado por:

$$\mathcal{H} = \beta \vec{S} \bar{g} \vec{H} + \vec{S} . \vec{A} \vec{I} \qquad (23)$$

além do termo Zeeman ele contém o termo de interação hiperfina, que surge da interação entre o spin eletrônico desemparelhado e o spin nuclear ( I ) do átomo de nitrogênio ( I = 1 ) do NO. O parâmetro A reflete a extensão dessa interação e muitas vezes é expresso em unidades de campo magnético ( Gauss, por exemplo ). Isso porque pode ser obtido diretamente do espectro de RPE, como mostrado na Figura 25.

A absorção de RPE de derivados NO de $Fe^{2+}$ hemoproteínas mostra variações de acordo com o tipo de proteína [ Kon , 1968 e 1969 ) e de possíveis perturbações na sua estrutura nativa ( Kon, 1968 ). Assim NO, visto com uma molécula "label", tem sido usado como um "probe" para acompanhar eventos na região do heme, com o ferro na forma $2^+$ ou seja, na forma da proteína nativa.

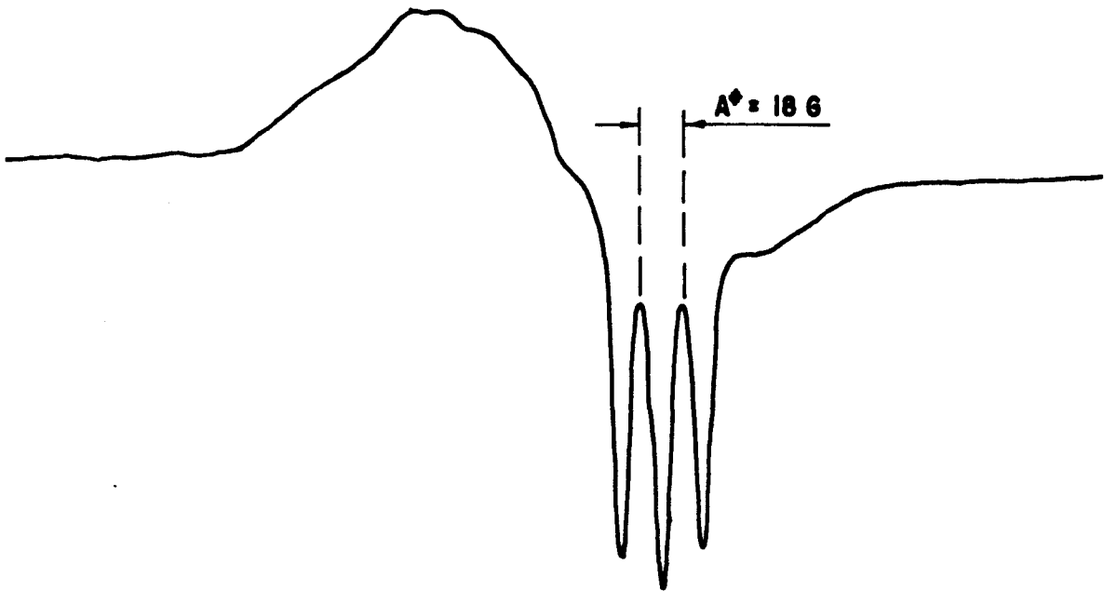



**Figura 25.** Espectro de RPE típico do grupo NO ligado ao ferro ( pentacoordenado ) em hemoproteínas.

Morse & Chan, 1980 estudaram a dependência com a temperatura do espectro de RPE da nitrosil-mioglobina ( Mb NO ) em solução congelada. Duas espécies foram observadas, uma com tensor g rômbico ( 2,080 , 1,988 , 1,979 ) chamadas tipo I e uma com tensor g axial ( 2,041 , 1,983 ) chamado tipo II. Os mesmos estudos usando cristais foram feitos por Hori et al. , 1981 , que observaram em baixa temperatura, um tensor g rômbico ( 2,076 , 2,002 , 1,979 ) e o tensor hiperfino A ( 14N ) ( 15 , 17 , 19 Gauss ) para o tipo I. O tipo II não pode ser totalmente descrito.

Para clarificar os parâmetros de RPE e simetria dos diferentes espectros, modelos teóricos tem sido propostos, e comparação com modelos de heme tem sido feitos ( Trittlevitz et al. , 1975 ; Doetschman et al. , 1980 ; Mun et al., 1979 ). Esses esforços permitiram explicar por exemplo, a origem do sinal tripleto apresentado pelo

derivado N-O na forma desoxi como um estado de pentacoordenação para a simetria do ferro ( Mun et al., 1979 ). Esse fato foi usado para seguir a variação conformacional na transição R-T ( oxi , desoxi ) ( Louro et al., 1979 ).

Com relação à estrutura eletrônica , geralmente os estudos de RPE estabelecem que os elétrons desemparelhados estão fortemente ligados ao átomo metálico, com uma deslocalização relativamente menor com relação à porfirina e à histidina. Entretanto, para os derivados NO e $O_2$ existem várias estruturas alternativas , algumas das quais consideram uma ampla deslocalização em direção aos ligantes.

Existem vários modelos propostos [ Modelo $\pi^*$ ( NO ) - Trittelvitz et al., 1975 ; Modelo $\pi^*$ ( $d_{yz}$ ) - Dickinson & Symons , 1983 ; modelo de Doetschman - Doetschman et al., 1980 ], contudo há certos aspectos dos resultados que fortalecem a proposição de que o modelo $\sigma^*$ ( Mun et al., 1979 ) seja o mais correto. A razão para esta proliferação de modelos é o fato que os resultados de RPE são complexos, especialmente quando as direções dos vários componentes tensoriais são levados em conta.

No modelo $\sigma^*$ , Mun e colaboradores estudaram as distribuições eletrônicas em oito diferentes formas estruturais com o intuito de explicar as mudanças na interação hiperfina do $^{14}N$ , observadas com a transição da estrutura R à T da nitrosilhemoglobina. Essa transição é provocada pelo inositolhexafosfato ( IHP ) ou pela variação do pH.

Quatro das oito formas estudadas ( Tabela V ) consideram o N prox , do imidazol proximal, protonado e desprotonado, com as estruturas do grupo Fe-N-O , linear e em dobra ( Figura 26 ). Duas

outras formas possuem a estrutura Fe-N-O linear e a distância Fe - Imidazol aumentada em 0,5 e 1,0 Å.

Os outros dois sistemas são pentacoordenados, com a ligação Fe-N-O em dobra e linear.

**Tabela V.** Os três sistemas propostos para estudar as diferentes formas estruturais de nitrosilhemoproteínas.

| Fe - N - O | Diferença | |
|---|---|---|
| linear | N prox : protonado | 1º sistema |
| dobra | desprotonado | |
| linear | desprotonado | |
| dobra | protonado | |
| linear | Fe - Im + 0,5 Å | 2º sistema |
| linear | Fe - Im + 1,0 Å | |
| linear | pentacoordenado | 3º sistema |
| dobra | pentacoordenado | |

Os estudos mostraram que os arranjos dos níveis de energia não diferem significativamente de uma estrutura para outra e que o elétron desemparelhado sempre ocupa um orbital anti-ligante $d_{z^2}$, com pequena deslocalização para o orbital N ( $\sigma$ ) do $N_\varepsilon$ e uma grande deslocalização para o orbital NO ( $\sigma$ , $\pi$ ) ( Figura 27 ).

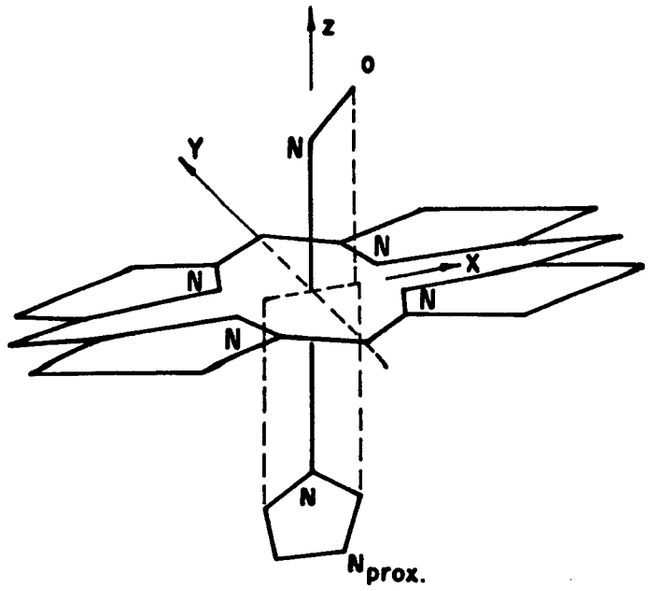



**Figura 26.** Modelo usado para calcular a função de onda eletrônica do sistema nitrosil hemoproteína.

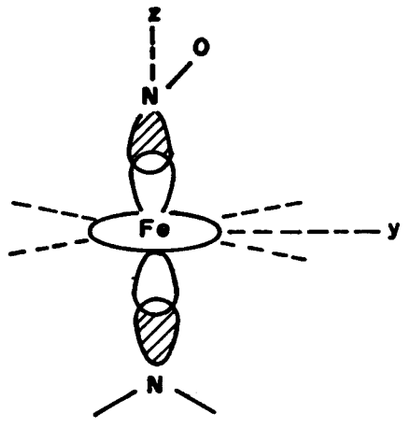



**Figura 27.** Estrutura eletrônica mais satisfatória em termos dos parâmetros de RPE.

O primeiro sistema, da Tabela V, poderia explicar a existência de um padrão hiperfino com nove linhas decorrentes da interação hiperfina do 14N do grupo NO e o átomo $N_\varepsilon$ do imidazol proximal.

Para o segundo sistema, um aumento do comprimento da ligação Fe-Imidazol produz uma sensível diminuição na interação hiperfina do $14N_\varepsilon$, indicando que um aumento maior que 1,0 Å poderia gerar um padrão hiperfino com três linhas, semelhante ao encontrado para o sistema pentacoordenado, ou seja, o terceiro sistema ( Tabela V ).

### 3.3.5. Efeitos da Probabilidade de Transição e Temperatura nas Absorções de RPE

A comparação das áreas das curvas de absorções de RPE entre sistemas diferentes só é possível quando se conhece a probabilidade de transição de cada um deles.

De acordo com Aasa & Vanngard, 1975 a probabilidade de transição é obtida da relação:

$$g_p^{av} = \frac{2}{3}\left[\frac{\left(g_x^2 + g_y^2 + g_z^2\right)}{3}\right]^{1/2} + \frac{1}{3}\left[\frac{\left(g_x + g_y + g_z\right)}{3}\right]$$

Assim, tem-se:

| | $g_x$ | $g_y$ | $g_z$ | $g_p^{av}$ |
|---|---|---|---|---|
| meta Mb ( ou Hb ) | 5,91 | 5,91 | 2,0 | 4,84 |
| hemicromo H | 1,64 | 2,27 | 2,85 | 2,28 |
| hemicromo P | 1,91 | 2,27 | 2,45 | 2,22 |
| Azida - Mb | 1,73 | 2,21 | 2,79 | 2,27 |
| Nitrosil - Mb | 2,01 | 2,1 | 2,09 | 2,04 |

Portanto a área da absorção da meta Mb ( ou Hb ) deve ser dividida por $g_p^{av}$ = 4,84, a do hemicromo H por 2,28 e assim por diante, para se obter o número de spins da amostra.

Contudo, no caso da meta Mb ( ou Hb ) a temperatura da amostra influencia na distribuição da população dos três dubletos de Kramers alterando a intensidade do sinal, que se origina ( nesse caso ) somente do dubleto de menor energia ( $M_S = \pm 1/2$ ) ( ver 3.2.1.2 ). Na Figura 22 mostra-se tal dependência e obtém-se que para a temperatura de 113 K ( -160°C ) ( temperatura das medidas de RPE desse trabalho ) somente 45% da população de spin está no dubleto de menor energia. Dessa forma a área da curva de absorção da meta Mb ( ou Hb ), deve ser multiplicada por um fator 2,2 ( 100/45 ).

Portanto o fator final a ser levado em conta no cálculo da área da meta Mb ( ou Hb ) é :

$$\text{Area final} = \text{Area exp.}\left[\frac{1}{g_p^{av}} . 2{,}2\right] = \text{Area exp.}\left[\frac{2{,}2}{4{,}84}\right] = \frac{\text{Area exp.}}{2{,}2}$$

ou seja, o valor numérico obtido da integração da curva experimental de RPE deverá ser dividido por 2,2.

Ao final das considerações feitas, conclui-se que nas condições das medidas de RPE ( T = -160°C ) pode-se comparar diretamente os valores das áreas obtidas dos diferentes sistemas estudados.

# *Capítulo IV*

# *Materiais e Métodos*

## 4.1. Preparação de Meta Hb

Um volume de 20 ml de sangue humano foi inicialmente centrifugado a 3500 rpm por dez minutos à T = 4°C. Essa operação separa as hemácias, que se sedimentam, do plasma e estroma.

As hemácias sedimentadas foram lavadas três vezes com uma solução de cloreto de sódio ( 0,9% ), tamponada pH = 7,4 , eliminando os glóbulos brancos e gorduras.

Em seguida as hemácias foram redissolvidas em uma solução salina a um hematócrito de 50%, isto é volume/volume. Essa suspensão foi centrifugada a 15000 rpm por trinta minutos, obtendo-se a Hb como sobrenadante e as membranas precipitadas.

As operações descritas foram feitas utilizando a centrifugadora Sorval RC-5B.

A concentração da amostra ( 2,5 mM ) foi obtida a partir de medida de absorção eletrônica, que de acordo com a lei de Beer-Lambert ( Cantor & Schimmel , 1980, Vl. II ):

$$A = C . \xi . l$$

onde

A - absorbância ( nesse caso em 540 nm )

C - concentração ( a ser determinada )

$\xi$ - coeficiente de extinção

l - caminho óptico

O valor do coeficiente de extinção a 540 nm é 55,2 l/mol.cm e foi obtido da literatura ( Antonini & Brunori, 1971 ). O caminho óptico de 1 cm corresponde a espessura da cubeta contendo a solução.

A oxidação de oxi Hb para meta Hb foi obtida adicionando-se ferricianeto de potássio [ $K_3$ Fe $(CN)_6$ ] em quantidade molar superior ( sete vezes ) a solução de oxi Hb . Imediatamente após a adição houve uma mudança de coloração da solução, de vermelho ( oxi Hb ) para marrom ( meta Hb ). Em seguida, a solução de meta Hb foi passada em coluna de sephadex para retirar o excesso de ferricianeto.

A liofilização da amostra foi feito em um liofilizador construído no laboratório de Biofísica. O tempo de liofilização para cada 10 ml de solução foi de aproximadamente seis horas.

Utilizando o procedimento descrito preparou-se também meta Hb bovina, para medidas comparativas.

## 4.2. Variação da hidratação das amostras liofilizadas

Utilizou-se metamioglobinas equina e de baleia e meta Hb bovina liofilizadas obtidas da Sigma Co., além da meta Hb humana preparada conforme descrito no item anterior.

Amostras com 15 a 20 mg das proteínas eram depositadas em recipientes de papel alumínio. Em seguida, eram colocadas em um dessecador, contendo pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ), no qual era feito

vácuo. Com este procedimento retirava-se, em média, 10% de água em peso das amostras liofilizadas.

Os diferentes graus de hidratação foram obtidos expondo as proteínas a conhecidas pressão de vapor obtidas de diferentes soluções salinas saturadas ( Schneider & Schneider, 1972 ). O tempo de quatro dias mostrou-se adequado para obtenção do estado de equilíbrio.

Ao final dos quatro dias determinava-se por método gravimétrico ( Balança Kerr, sensibilidade de décimo de miligrama ) a massa de água absorvida pela proteína.

Depois as amostras eram introduzidas em tubos de quartzo para serem submetidas as medidas de RPE.

A eficiência da secagem do procedimento descrito anteriormente foi comparado com o método tradicional ( Brausse et al., 1968 ) de secar em estufa a T = 105°C por 24 horas. Os resultados obtiveram ótima concordância.

O procedimento tradicional não poderia ser utilizado pois a temperatura de 105°C ocorre a desnaturação da proteína, tornando-se insolúvel em água, conforme verificado.

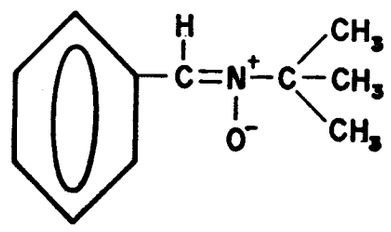
## 4.3. Preparação de Nitrosil-Mb

A preparação do gás NO foi feito através da reação do ácido nítrico 30% com cobre metálico. O gás é borbulhado em uma solução de água para eliminar o gás $NO_2$, geralmente formado também, e então armazenado em um recipiente de vidro.

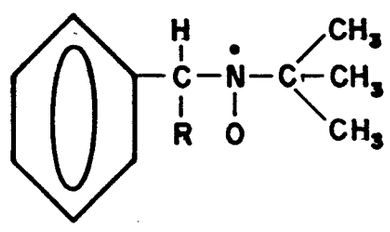
O NO foi introduzido diretamente nos tubos de quartzo contendo as amostras de meta Mb liofilizada com o grau de hidratação desejado. Antes da adição do gá NO retirou-se o ar existente no tubo de quartzo. O tempo de reação esperado foi de quatro horas.

## 4.4. Adição de "spin-trap" a metamioglobina

Utilizou-se o "spin-trap" N-terc-butil alfa fenil nitrona, obtido da Aldrich Chemical Co. Esse composto tem peso molecular 177,25 g e a seguinte fórmula estrutural:




Quando o "spin-trap" capta um radical livre ele se torna um radical livre estável ( Janzen, 1980 ). O elétron desemparelhado fica sobre o grupo NO e pode ser detectado por RPE. A estrutura torna-se:




onde R é o radical capturado e • representa o elétron desemparelhado.

A adição de spin-trap foi feita a uma solução de meta Mb equina 1,35 mM e dissolveu-se muito lentamente sendo que ao final

de doze horas toda reação havia se completado. Em seguida a amostra foi liofilizada.

## 4.5. Medidas de RPE

As medidas foram realizadas utilizando um espectrômetro Varian E-109, "Century Line", equipado com uma cavidade Varian "multi-purpose". O sistema opera em Banda X ( 9 GHz ) com 100 kHz de frequência de modulação. Para as medidas a temperatura de -160°C utilizou-se o controlador de temperatura E-257 da Varian.

A potência de microonda utilizada geralmente foi de 10 mW. A amplitude de modulação foi 8 Gauss para medir o sinal do íon $Fe^{3+}$, 2 gauss para um radical livre presente nas hemoproteínas liofilizadas e 2,5 Gauss para o sinal do NO.

Efetuou-se medidas a temperatura abaixo de $N_2$ líquido ( até 8 K ) utilizando o equipamento Varian E-9 com sistema Helitran da Air Products do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas ( CBPF ), Rio de Janeiro.

## 4.6. Medidas de Absorção Eletrônica

Utilizou-se os espectrofotômetros Shimadzu UV-180 e Beckman DK-2 para as medidas de absorção eletrônica das proteínas. Essas medidas foram feitas, geralmente, para obtenção da concentração das amostras, conforme descrito no item 1 desse capítulo.



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

## 4.7. Medidas de Temperatura

A temperatura foi medida com um termopar cobre-constantan, colocado próximo a amostra, e que está conectado a um termômetro digital Fluke 2100 A.

## 4.8. Cálculo da Área das Linhas de RPE

Uma vez que o espectro de RPE normalmente é a primeira derivada da curva de absorção há necessidade de ser feita uma integral dupla deste para se obter a área da curva de absorção. Essa área será proporcional ao número de spins da amostra.

Os espectros de RPE primeiramente são digitalizados utilizando um equipamento automático acoplado ao computador PDP 11, que é composto de sensor/emissor de luz infravermelho que detecta a linha das curvas de RPE. Isso possibilita a construção de uma tabela x/y dos pontos digitalizados. As leituras são feitas a cada 0,9 mm aproximadamente e para os 400 mm de comprimento do espectro obtém-se em torno de 440 pontos.

A partir da elaboração de um programa para computador em linguagem FORTRAN ( apêndice I ) o valor numérico da integral dupla do espectro de RPE pode ser obtida. Foi incluído nesse programa a possibilidade da correção da linha de base do espectro, quando necessário.

O programa foi elaborado para calcular a área utilizando a fórmula trapezoidal. Na Figura 28 mostra-se uma curva típica de RPE com os trapézios de largura unitária indicados.

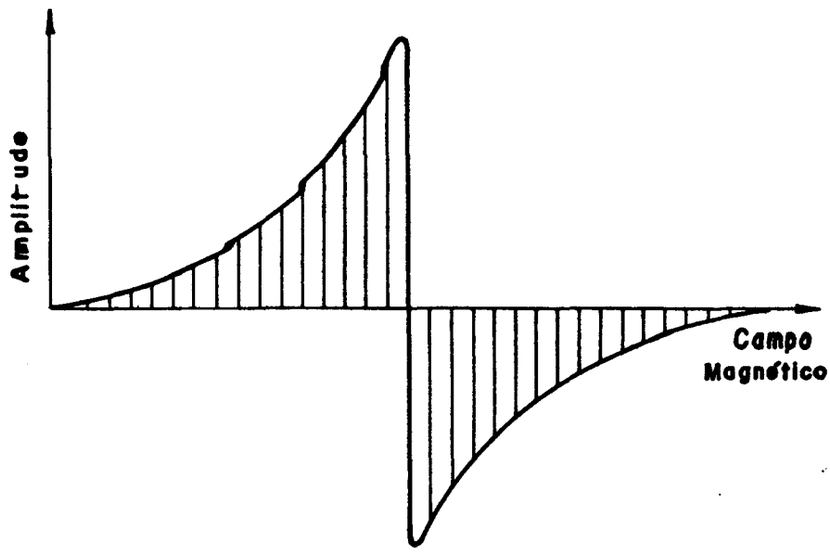



**Figura 28.** Espectro típico de RPE mostrando os trapézios de largura unitária.

Na fase final das medidas, com os derivados nitrosil-Mb, azida - Mb e em alguns testes para meta Mb utilizou-se o sistema de aquisição, digitalização e análise de dados desenvolvido por Thomaz, 1987 e que foi acoplado diretamente ao espectrômetro de RPE possibilitando, dentre outras tarefas, os cálculos da integral dupla do espectro de RPE.

# *Capítulo V*

# *Resultados*

## 5.1. Metamioglobina

Efetuou-se medidas utilizando meta Mb equina e de baleia, obtidas da Sigma Co.

### 5.1.1. Medidas a T = -160°C

Os espectros de RPE de algumas das amostras, medidos a T = -160°C, em diferentes graus de hidratação são mostradas nas Figuras 29 e 30.

A origem das linhas são, em campo baixo: - ( g ~ 6 ), devido ao íon ferro (III), estado de spin 5/2 em um sítio com simetria axial, componente perpendicular ( Bennet, et al.,1955); - ( g = 4,3), devido ao íon ferro (III), estado de spin 5/2, porém em um sítio com simetria rômbica, razão E/D = 0,33 ( Kotani & Morimoto, 1967). Em campo alto: - ( g ~ 2 ) [ $g_1$ = 2,8 ; $g_2$ = 2,3 ; $g_3$ = 1,6 - não resolvido) ] devido ao íon ferro (III), estado de spin 1/2, em um sítio com simetria rômbica [ este complexo é chamado hemicromo H ( Rachmilewitz, 1974 ) onde o sexto ligante é atribuído ser o átomo de nitrogênio da histidina distal E7 ] ; - ( g = 2,01 ) ( linha fina do espectro - ΔH = 10 Gauss ) devido a um radical livre criado no processo de desidratação.

As principais observações foram:

a) a largura de linha em g ~ 6 decresceu monotonicamente com o aumento do grau de hidratação até um valor de 0,20 g $H_2O$/ g Mb

( 20% em peso ) [ $\Delta H_{seca}$ = 170 Gauss ( equina ), 150 Gauss ( baleia ) ; $\Delta H_{20\%}$ - 90 Gauss ( ambas ) e praticamente não mostra variação para valores de hidratação superiores [ $\Delta H_{solução}$ = 85 - 90 Gauss ]. Na Figura 31 são mostrados os espectros na região em g ~ 6 para diferentes graus de hidratação. Nos gráficos das Figuras 32 e 33 mostram-se as variações de $\Delta H$ observadas;

**b)** A área da linha com g ~ 6 ( proporcional ao número de spins ), obtida a partir da integral dupla do espectro de RPE, é mostrada na Figura 34. Essa mostrou-se praticamente constante em valores de hidratação inferiores a 20% em peso, e aumenta consideravelmente em valores superiores a tal hidratação. O resultado para meta Mb equina é semelhante;

**c)** As linhas com g ~ 2 , devido ao hemicromo H foram observadas nas amostras com hidratação entre 0 e 50%. Na Figura 35 é apresentado o cálculo para a meta Mb de baleia. Apesar da flutuação razoável a curva indica o decréscimo da área com o aumento do grau de hidratação. Na Figura 36 mostra-se o espectro de absorção ( obtido da tela do osciloscópio do espectrômetro de RPE e gerado pelo sistema desenvolvido por Thomaz , 1987 ) para duas amostras em diferentes graus de hidratação. E evidente uma quantidade maior de hemicromo na amostra mais desidratada;

**d)** A área total das linhas de absorções ( g ~ 6 e hemicromo) mostraram o comportamento ditado pela linha com g ~ 6 ( as flutuações em baixa hidratação são devido ao hemicromo ). Essa curva mostrada na Figura 37 para meta Mb de baleia, e indica um aumento real considerável do número de centros paramagnéticos detectados por RPE acima de 20% de hidratação;

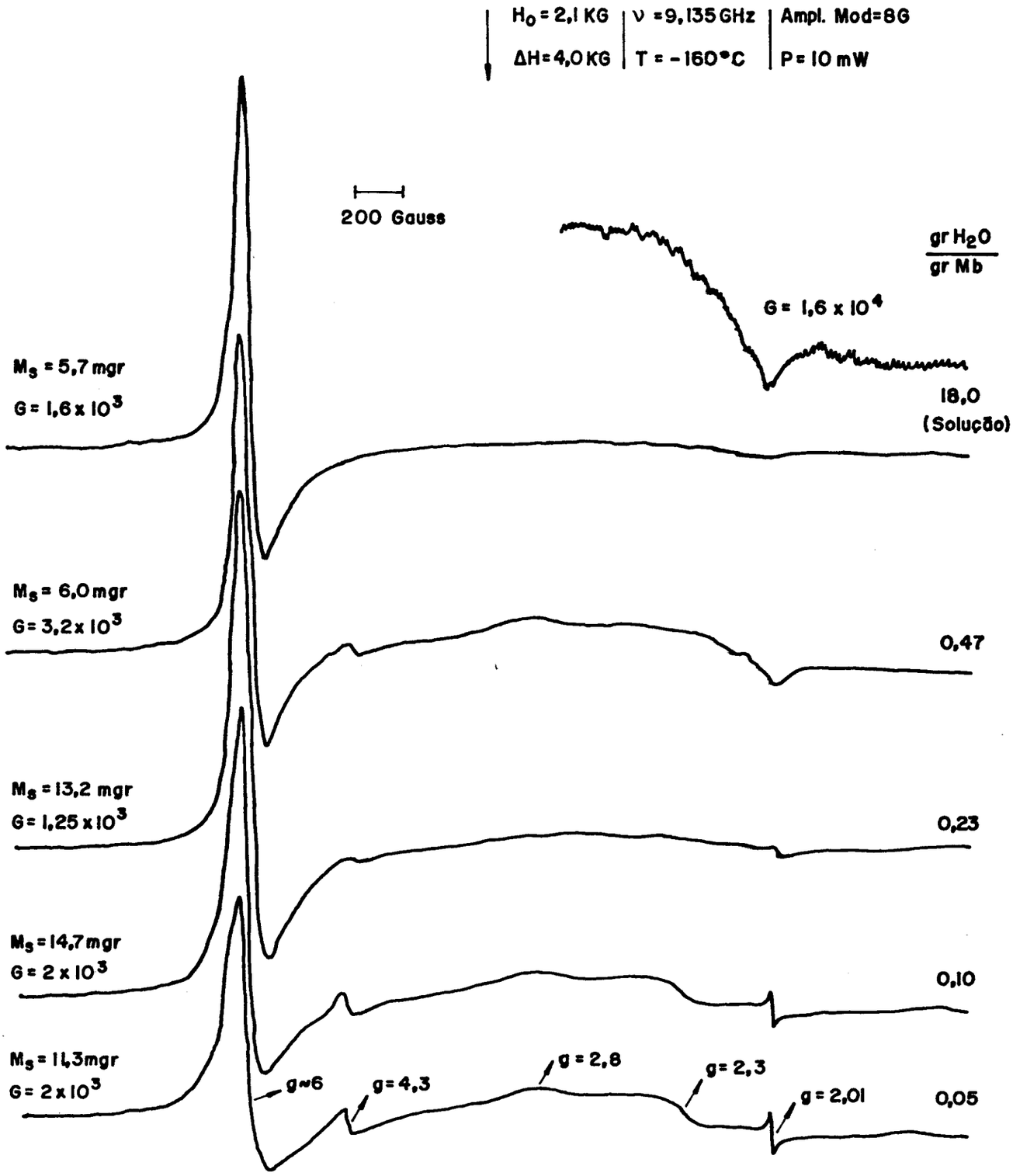



**Figura 29**. Espectros de RPE ( T = -160°C ), da meta Mb de baleia em diferentes graus de hidratação.

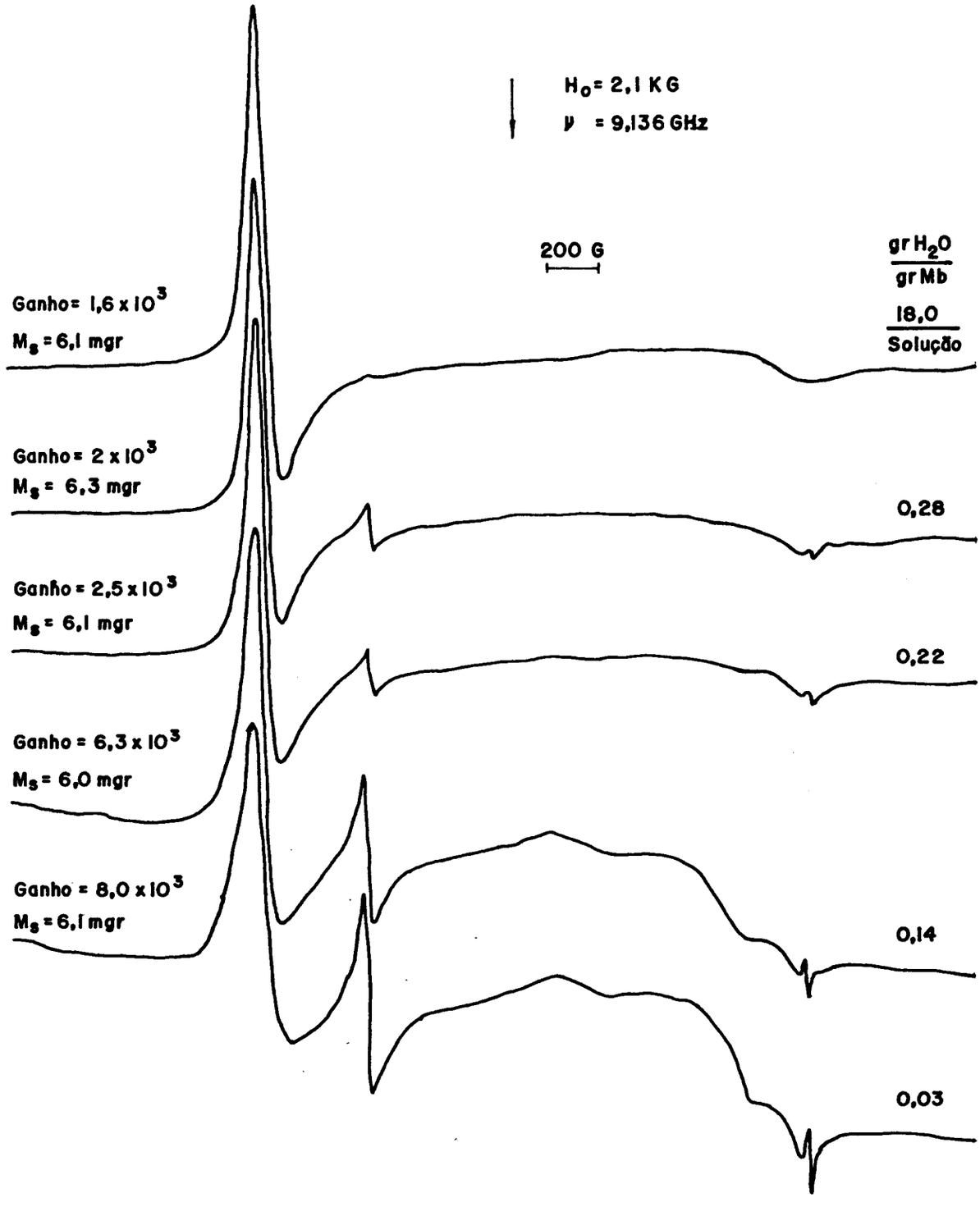



**Figura 30.** Espectros de RPE ( T = -160°C ), da meta Mb equina em diferentes graus de hidratação.

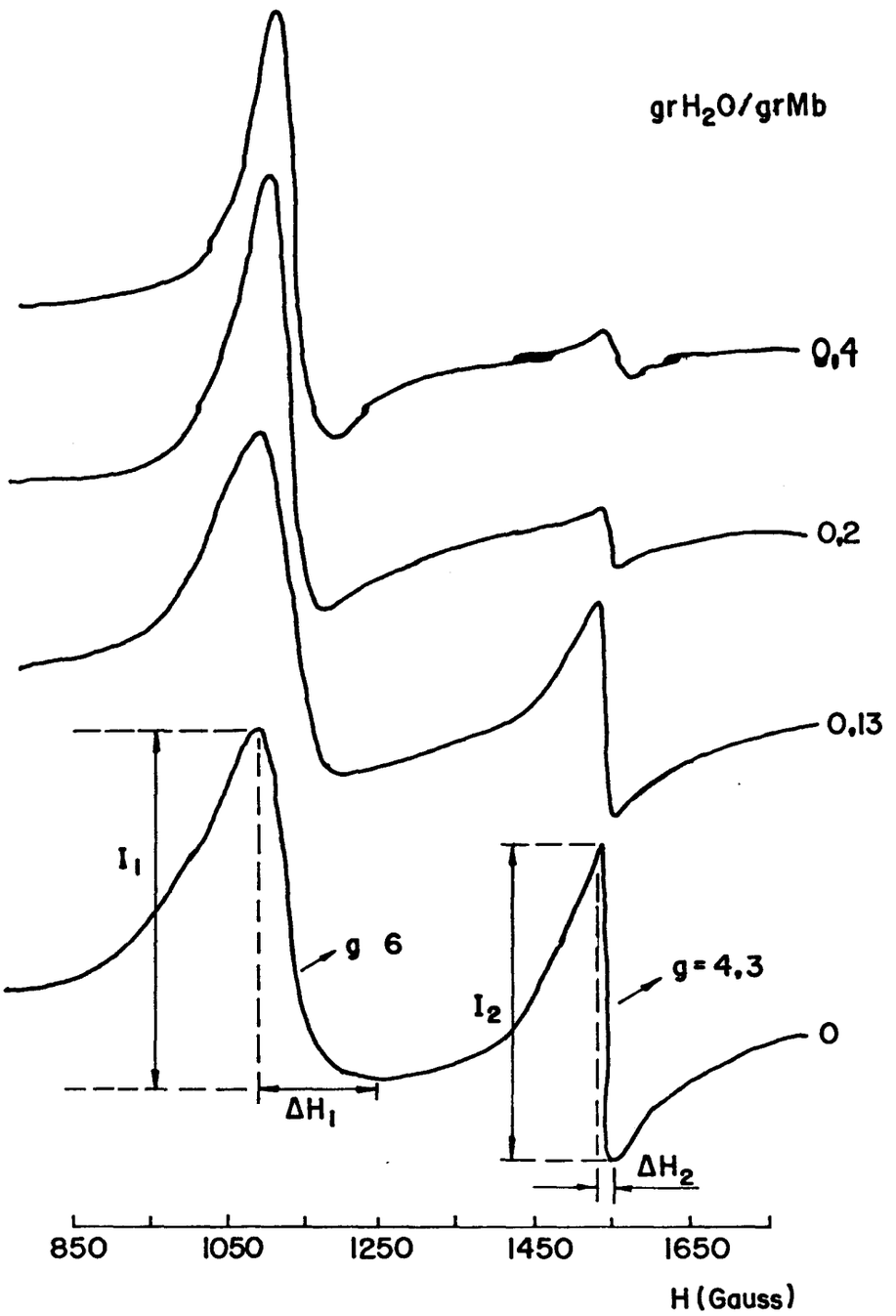



**Figura 31**. Espectros de RPE ( T = -160°C ), da meta Mb em diferentes graus de hidratação, na região de campo baixo.

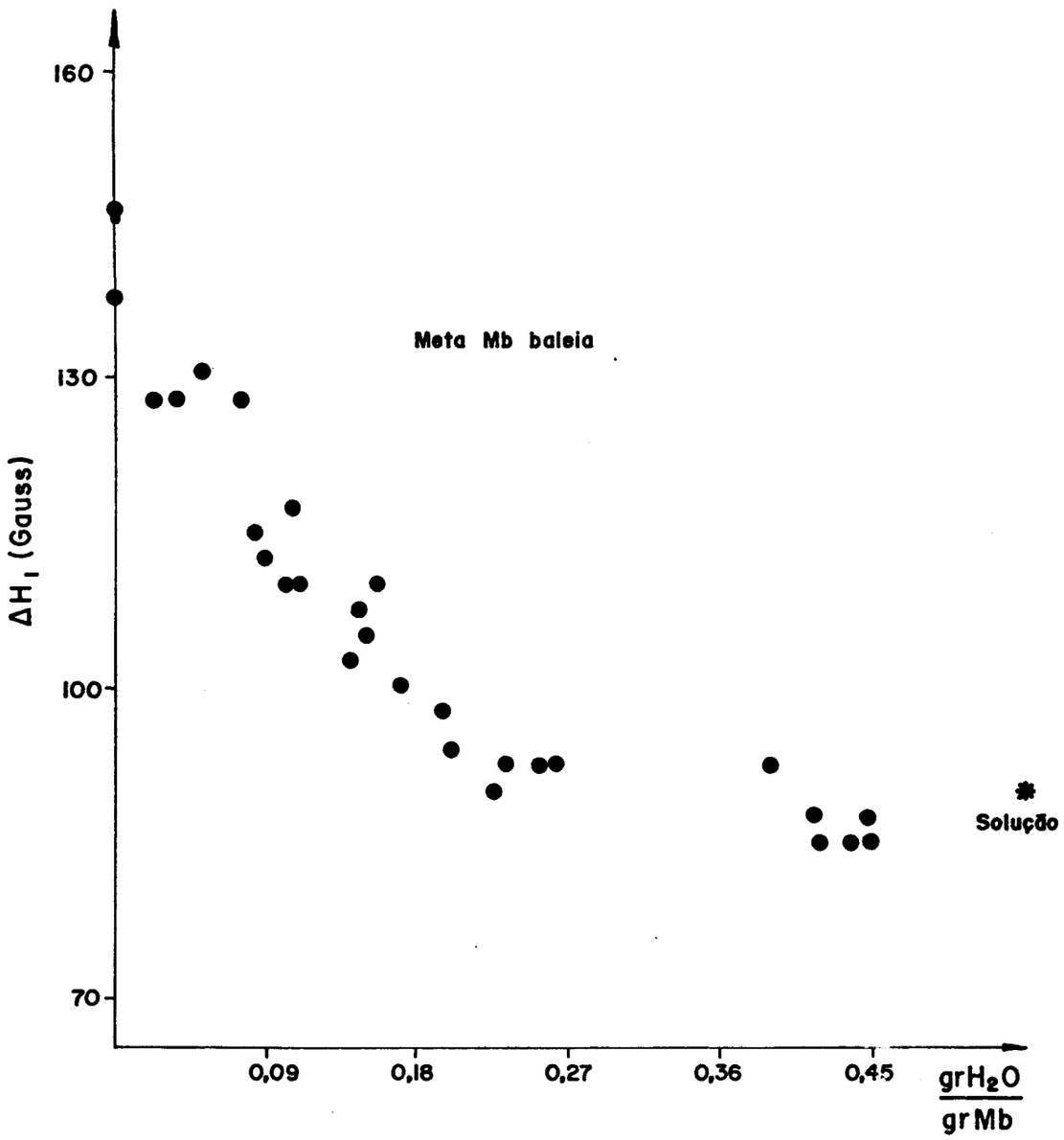



**Figura 32**. Gráfico da variação de $\Delta H_1$ em função do grau de hidratação, para a meta Mb de baleia.

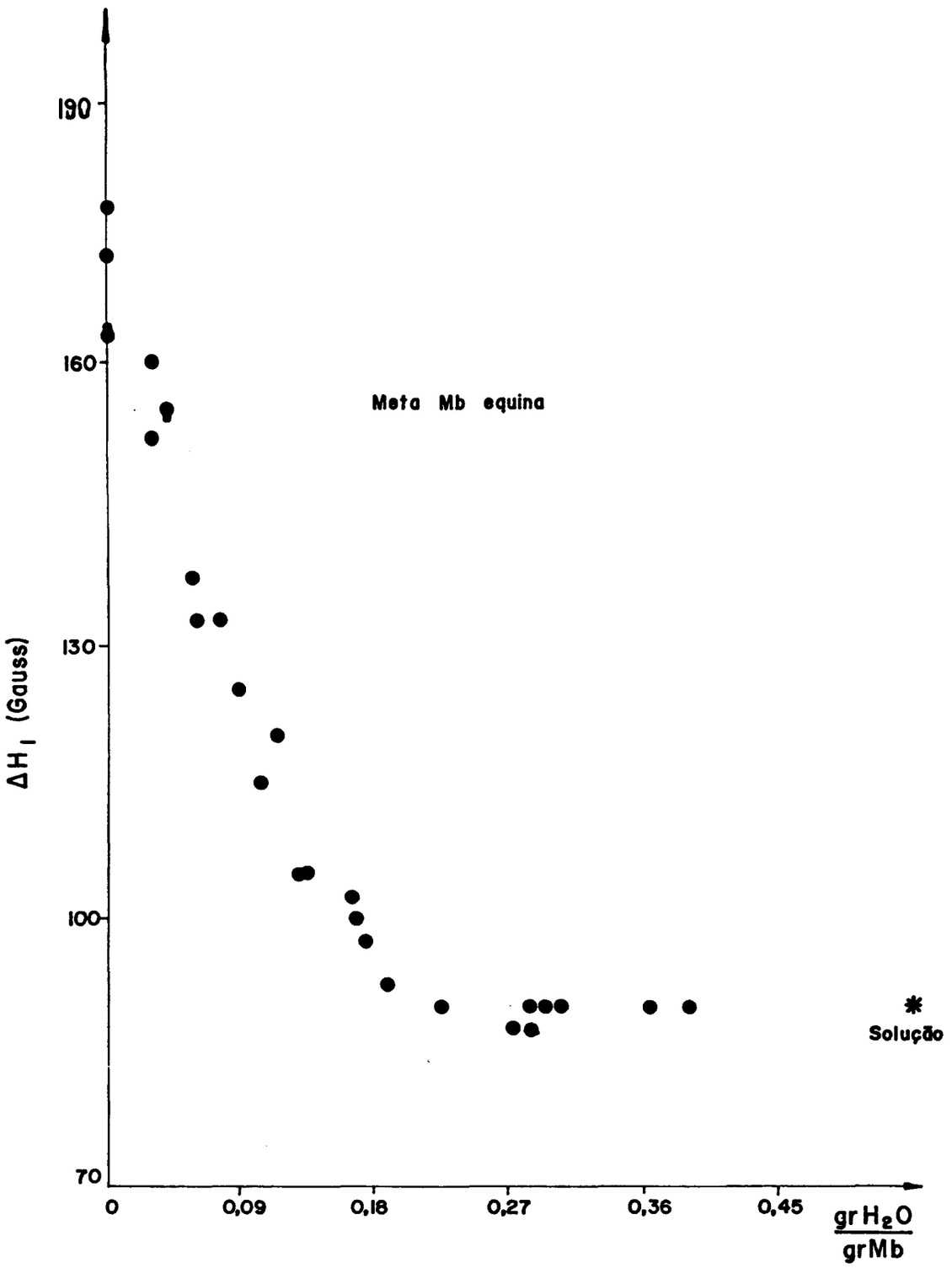



**Figura 33**. Gráfico da variação de $\Delta H_1$ em função do grau de hidratação, para a meta Mb equina.

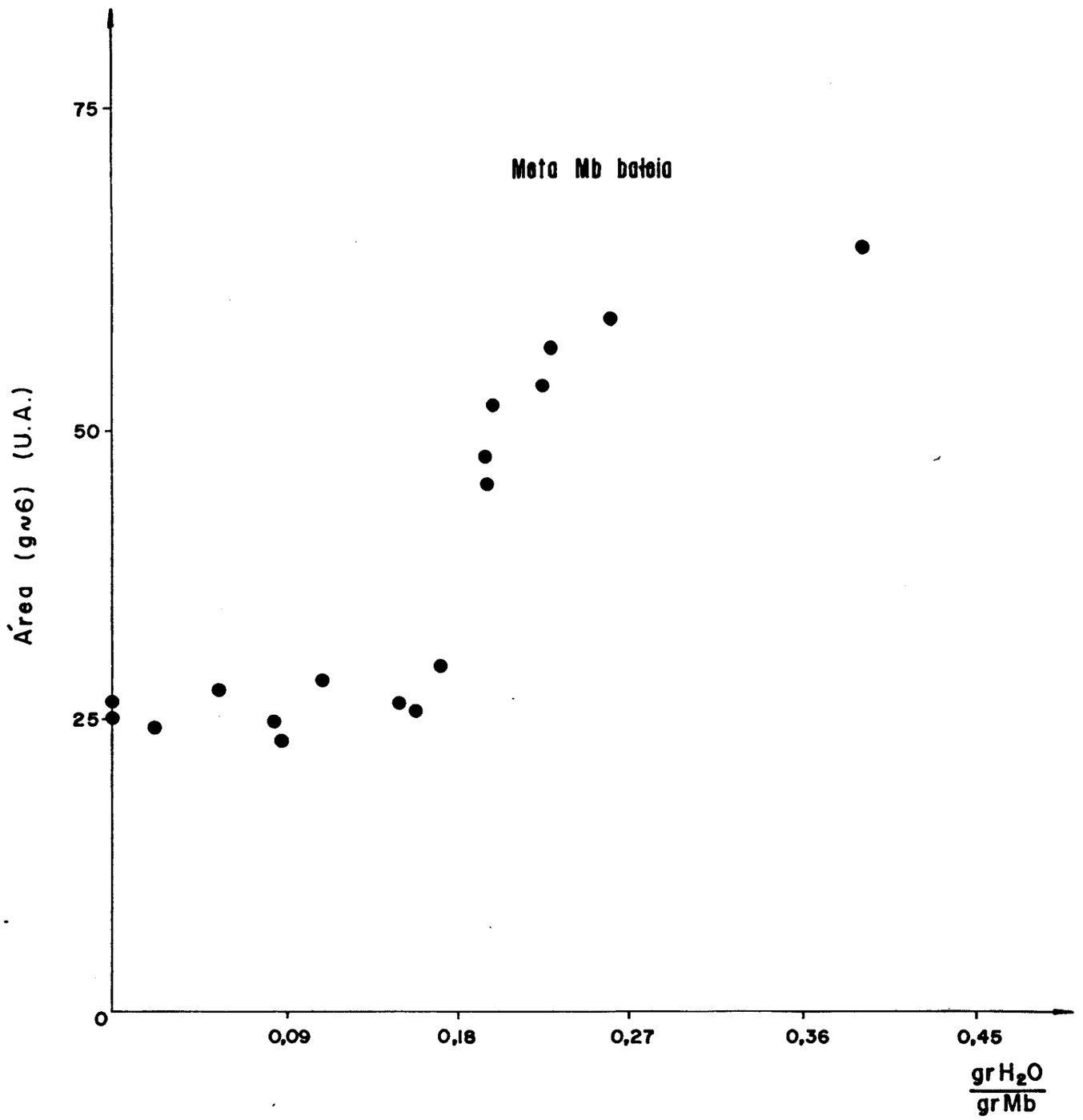



**Figura 34**. Gráfico da área de sinal com g ~ 6 em função do grau de hidratação, para a meta Mb de baleia.

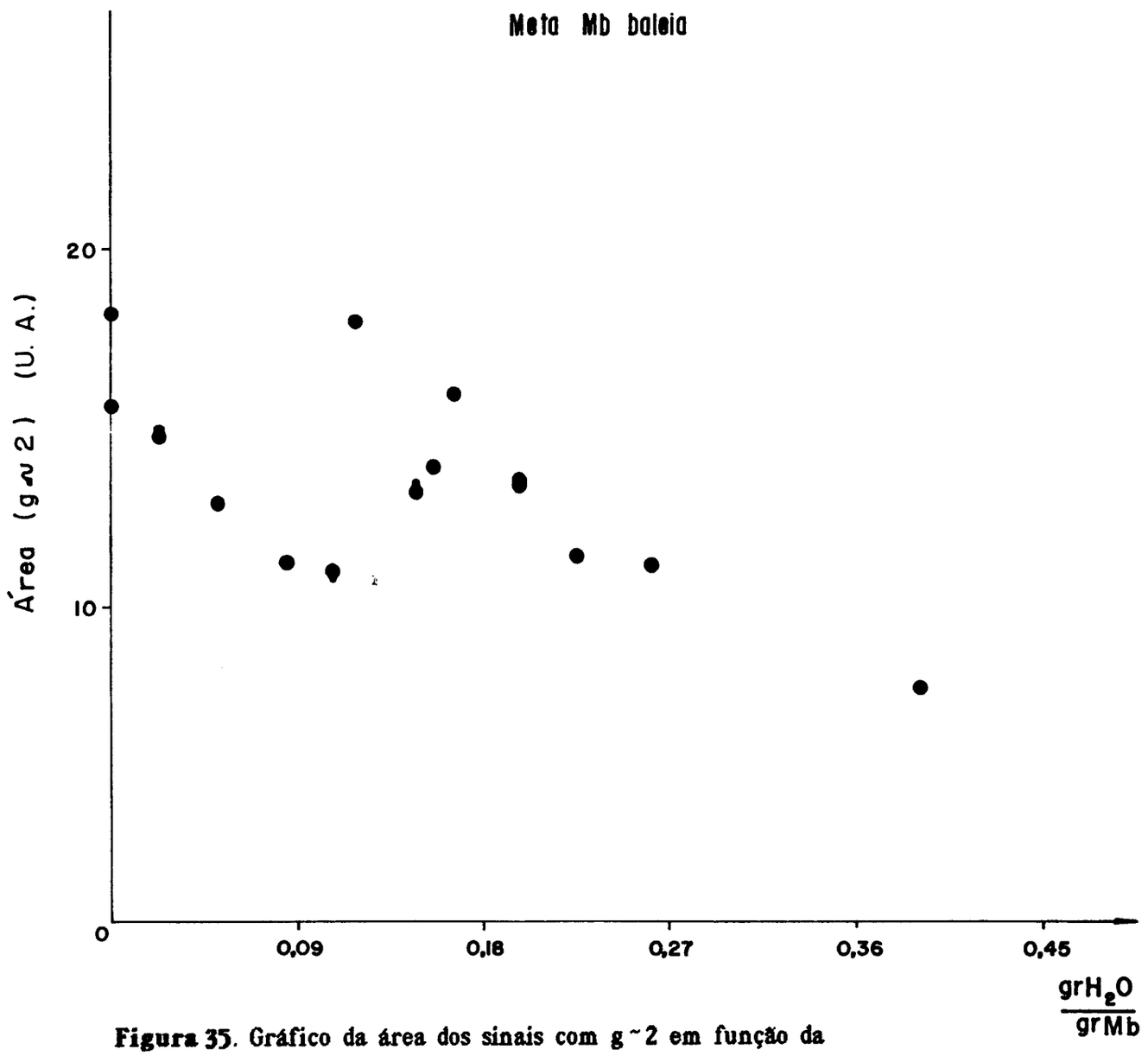



**Figura 35**. Gráfico da área dos sinais com g ~ 2 em função da hidratação, para a meta Mb de baleia.

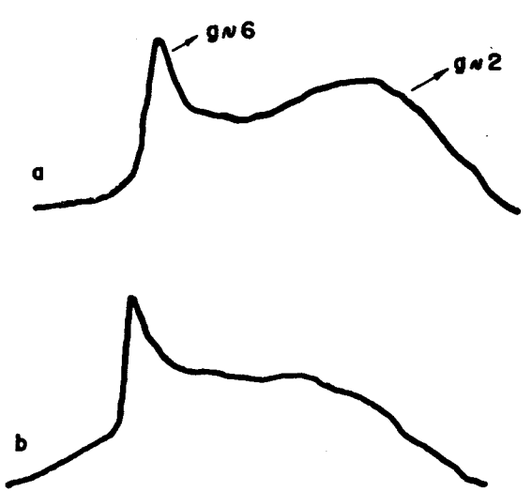



**Figura 36**. Espectros de absorção de RPE da meta Mb de baleia:
**a)** 0,03 g $H_2O$/g Mb
**b)** 0,24 g $H_2O$/g Mb.

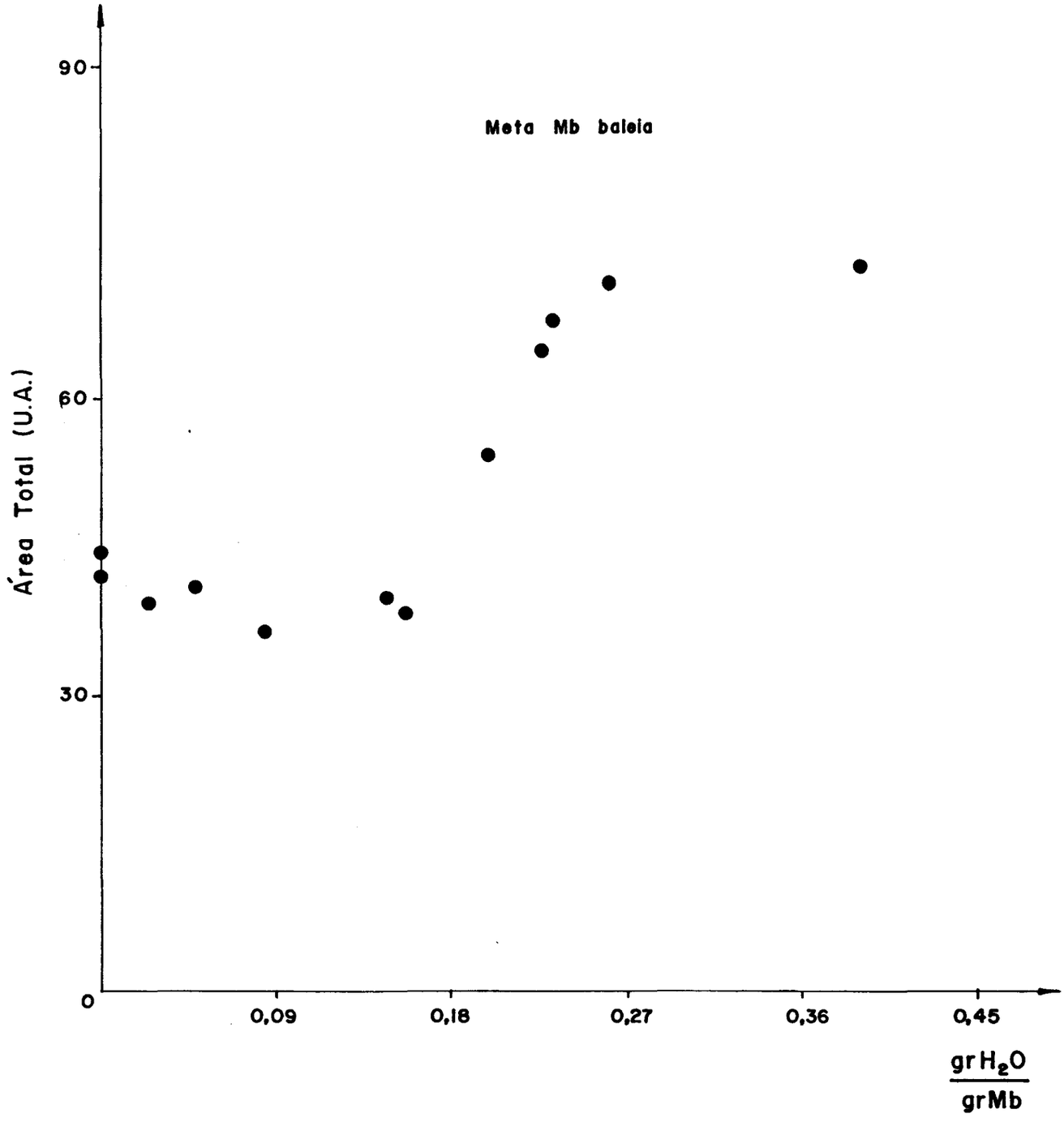



**Figura 37**. Gráfico da área total das absorções de RPE em função do grau de hidratação para a meta Mb de baleia.

e) A área da linha de absorção com g = 4,3 ( obtida a partir da aproximação $I . \Delta H^2$ - Poole & Farach, 1972 ) é pequena ( em torno de 1% do total observado por RPE ). Na Figura 38 mostra-se a curva correspondente, para a meta Mb de baleia, onde é evidente que em hidratação superior a 0,20 g $H_2O$/g Mb a área assume valores mais reduzidos. Na Figura 39 mostra-se o espectro de uma amostra de meta Mb equina seca na estufa ( T = 105°C, t = 24 horas ) onde o sinal de g = 4,3 tornou-se mais intenso;

f) Na Figura 40 mostra-se como a intensidade da linha de absorção do radical livre ( g = 2,01 ) diminuiu com o aumento do grau de hidratação para a meta Mb baleia. Nota-se que acima de 0,45 g $H_2O$/g Mb o sinal não foi mais observado. O mesmo comportamento foi mostrado pela meta Mb equina;

g) Amostras liofilizadas de meta Mb equina foram redissolvidas em água e para uma das alíquotas alterou-se o pH para 9,8 , mantendo outra alíquota em pH = 7,3. Em seguida foram passadas em colunas de sephadex e novamente liofilizadas. Os espectros correspondentes são mostrados na Figura 41. As linhas com g = 2,56, g = 2,18 e g = 1,84, na amostra obtida da solução com pH = 9,8, são devido ao derivado hidroxi-Mb ( Rachmilewitz, 1974). Observa-se também nas duas amostras a presença do radical livre g = 2,01.

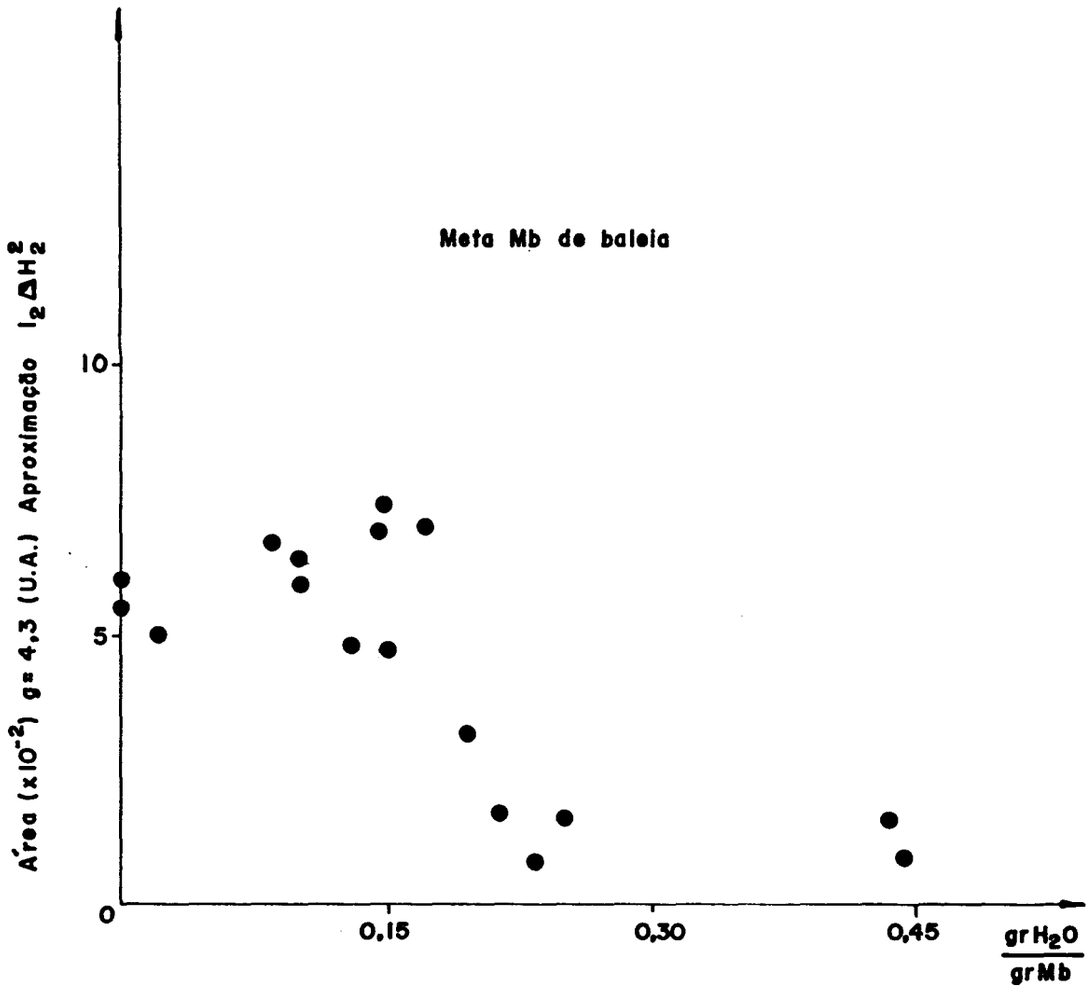



**Figura 38**. Variação do sinal com g = 4,3 em função do grau de hidratação para a meta Mb de baleia obtida pela aproximação $I \cdot \Delta H^2$.

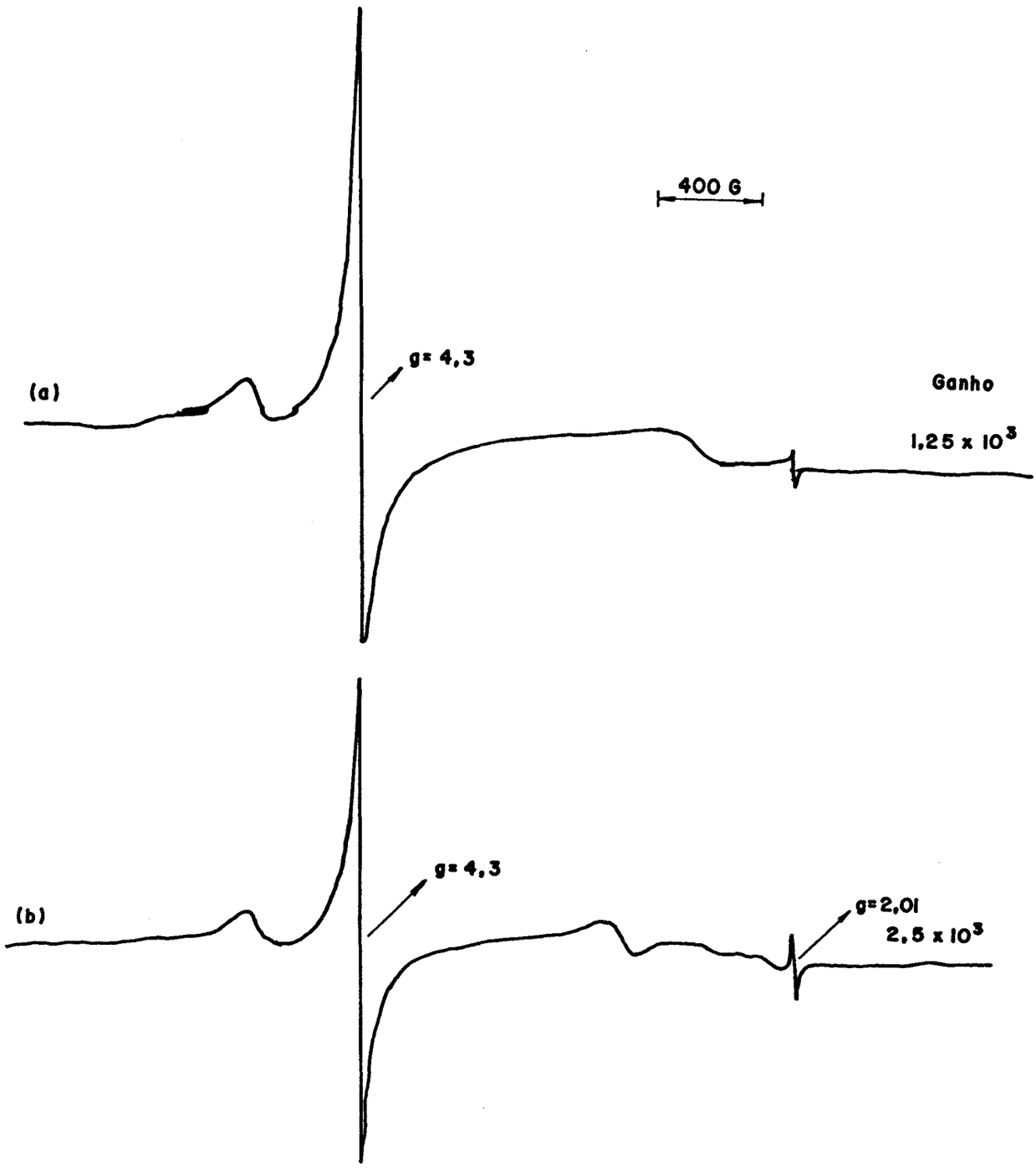



**Figura 39.** Espectros de RPE ( T = -160°C ) de amostras secas em uma estufa a T = 105°C por 24 horas:

**a)** meta Mb equina

**b)** meta Hb bovina

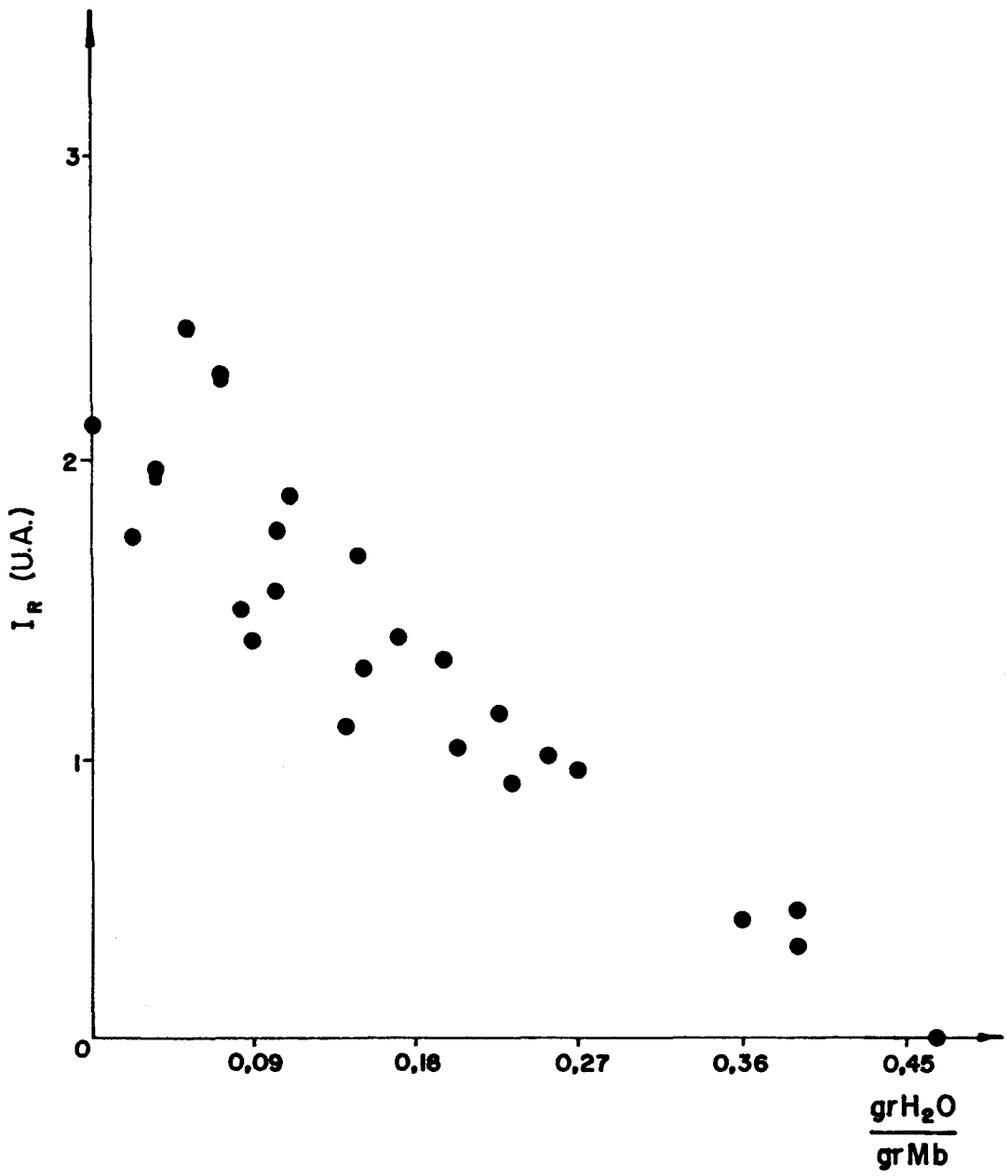



**Figura 40.** Gráfico da Intensidade do sinal do radical ( g = 2,01 ) em função da hidratação, na meta Mb de baleia.

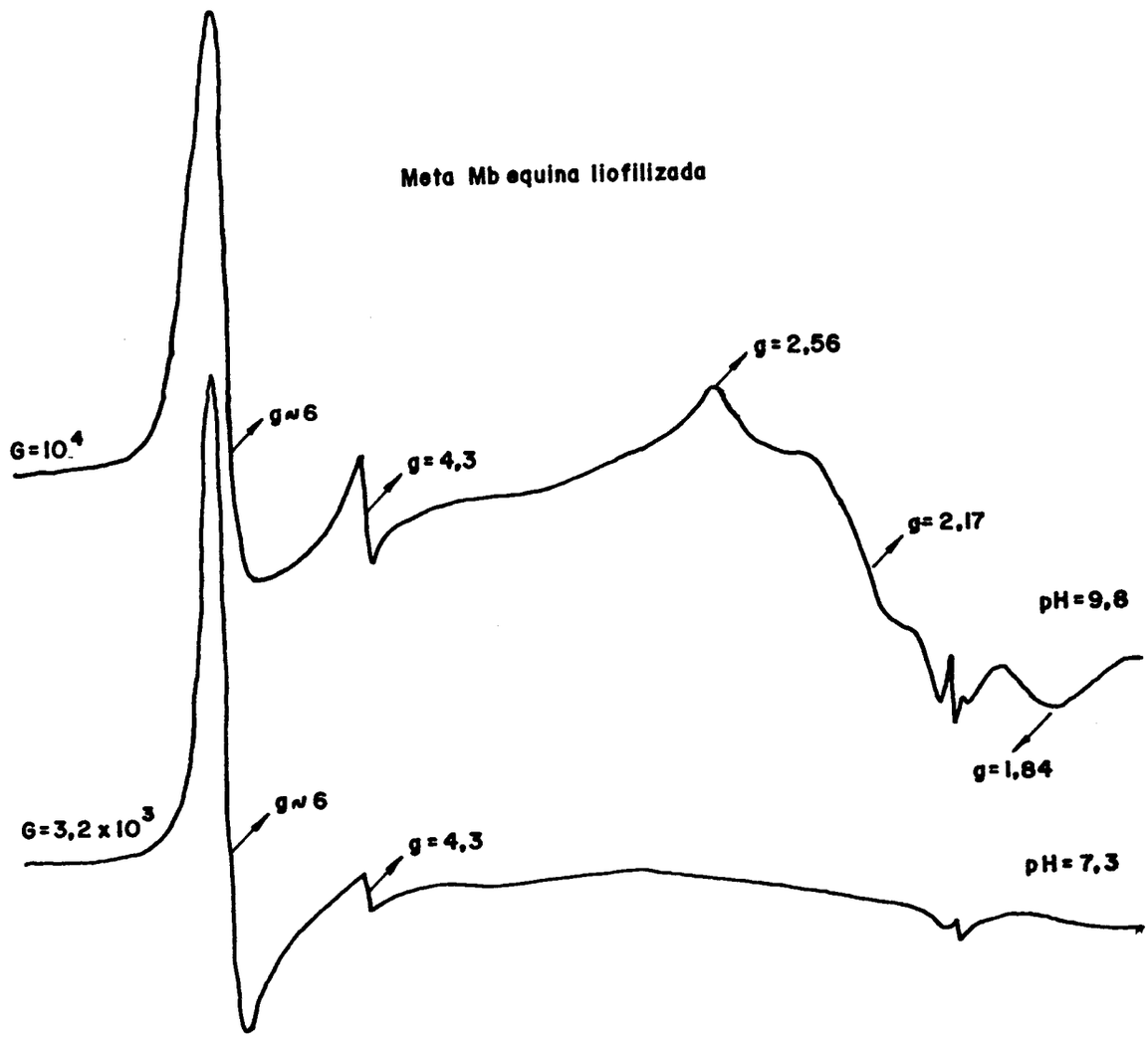



**Figura 41**. Espectros de RPE ( T = -160°C ) da meta Mb equina liofilizada obtida a partir de soluções com os seguintes pHs:

**a)** pH = 9,8

**b)** pH = 7,3

As linhas de absorções de RPE do derivado meta Mb ( ou Hb ), devido ao íon ferro (III), estado de spin 5/2, se estende da região de campo magnético de 1100 Gauss ( g ~ 6 ) a 3200 Gauss ( g ~ 2 ) ( em Banda X ) e vai se sobrepor as linhas do hemicromo ( g ~ 2 ). A contribuição para a área total da linha com S = 5/2 é muito maior na região de g ~ 6 , devido ao fato de representar 2/3 da população detectável ( direções x e y ) e também pela probabilidade de transição ser maior ( proporcional a $g^2$ ), que g ~ 2. O valor esperado é dezoito vezes maior [ $(6/2)^2 \times 2$ ] ( Feher, 1970 ). Com base nesses dados um cálculo da área total devido a S = 5/2 envolvendo somente a região em torno do sinal com g ~ 6 é uma boa aproximação.

Assim, utilizou-se uma "varredura" de campo magnético de 1 K Gauss ( de 700 a 1700 Gauss ) para o cálculo da área para S = 5/2. Para o cálculo do hemicromo observou-se a absorção de 1700 Gauss a 3700 Gauss.

Para comprovar experimentalmente esse resultado tomou-se uma solução de meta Mb de baleia e mediu-se a área total de absorção, devido ao estado de spin 5/2 ( puro nesse caso ), utilizando varreduras crescentes de campo magnético. Em seguida adicionou-se azida sódica ( $Na N_3$ ) a essa solução de meta Mb coordenando a azida ( $N_3^-$ ) ao ferro (III). Isso gera um complexo baixo spin para o ferro ( Figura 42 ).

As áreas das curvas de RPE foram obtidas com o sistema desenvolvido por Thomaz, 1987. Da comparação das áreas obteve-se:

Area ( Azida - Mb - S = 1/2 ) = Area [ meta Mb - S = 5/2 / varredura 100 - 4100 Gauss ]

Área ( meta Mb - S = 5/2 / varredura 100 - 4100 Gauss ) =

= 3 . Área ( meta Mb - S = 5/2 / varredura - 700 - 1700 Gauss )

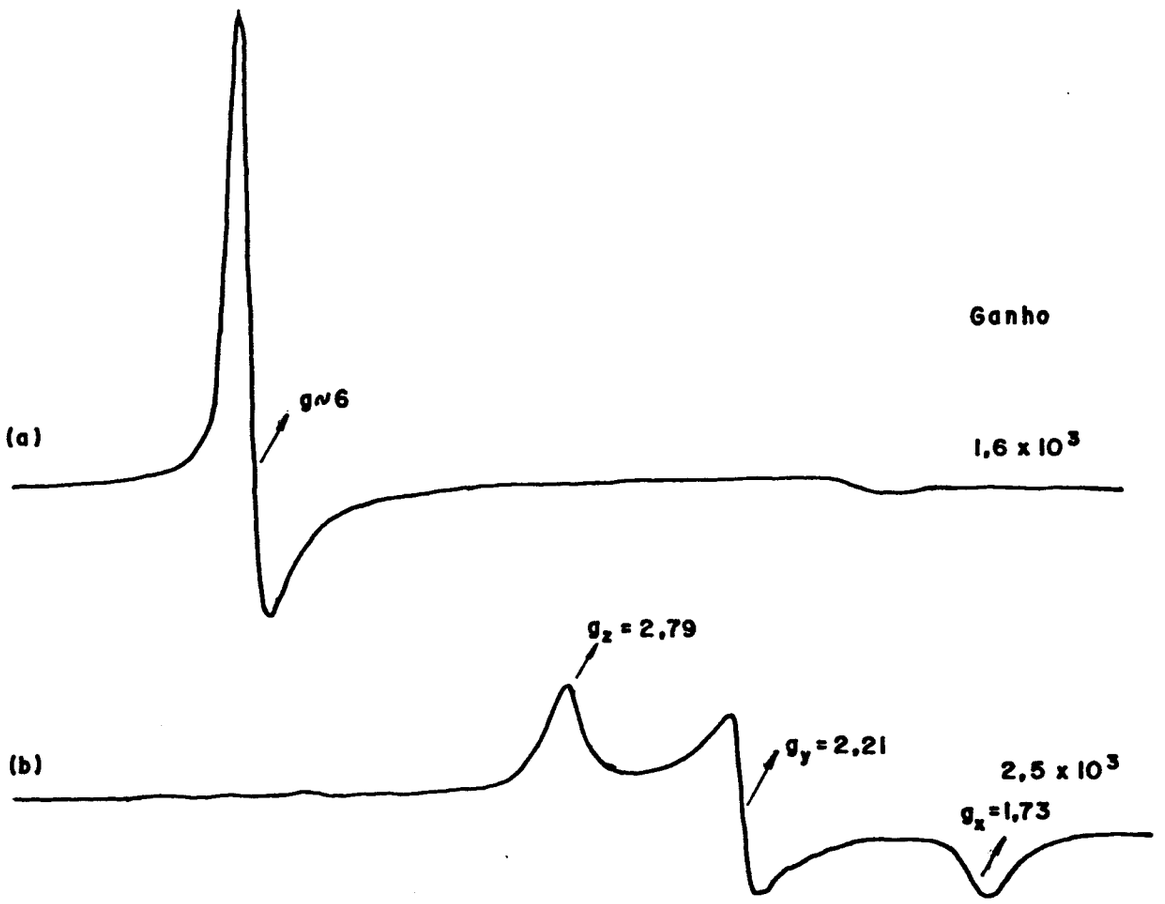



**Figura 42**. Espectros de RPE:

**a)** solução de meta Mb ( T = -160°C )

**b)** mesma solução de a) depois da adição de azida sódica.

A explicação para esse fator elevado (3) é devido principalmente ao procedimento com a correção de linha de base no cálculo efetuado e de possíveis sinais "back-ground" da cavidade ressonante na região, com g ~ 2. Na Figura 43 observa-se o espectro de absorção do sinal, g ~ 6 utilizando a varredura 700 - 1700 G ( obtido

da tela do osciloscópio do espectrômetro de RPE e que foi gerado pelo sistema desenvolvido por Thomaz, 1987 ) antes e depois da correção da linha de base. Observa-se que parte da própria área de absorção é subtraída na correção de linha de base.

### 5.1.2. Medidas com "spin-trap"

Na tentativa de identificação do radical livre formado no processo de desidratação das proteínas utilizou-se o método de "spin-trap", conforme descrito em 4.4.

Na Figura 44 mostra-se o espectro de meta Mb equina com spin-trap: amostra liofilizada e depois de liofilizada e dissolvida em água. Em ambas observa-se o sinal típico do radical NO nas diferentes condições ( amostra policristalina e solução ).

### 5.1.3. Medidas a temperaturas abaixo de $N_2$ líquido

Na Figura 45 mostra-se o espectro de uma amostra de meta Mb de baleia com 6,4% $H_2O$, obtido a T = 8K. No gráfico da Figura 46 é apresentado a variação da largura de linha com g ~ 6 ( $\Delta H_1$ ) em função da temperatura da medida, para amostras em diferentes graus de hidratação.

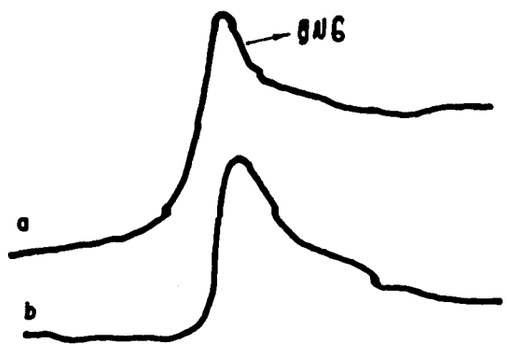



**Figura 43.** Espectros de absorção de RPE da meta Mb de baleia, obtido da tela do osciloscópio do espectrômetro:
**a)** antes correção linha base
**b)** depois correção linha base.

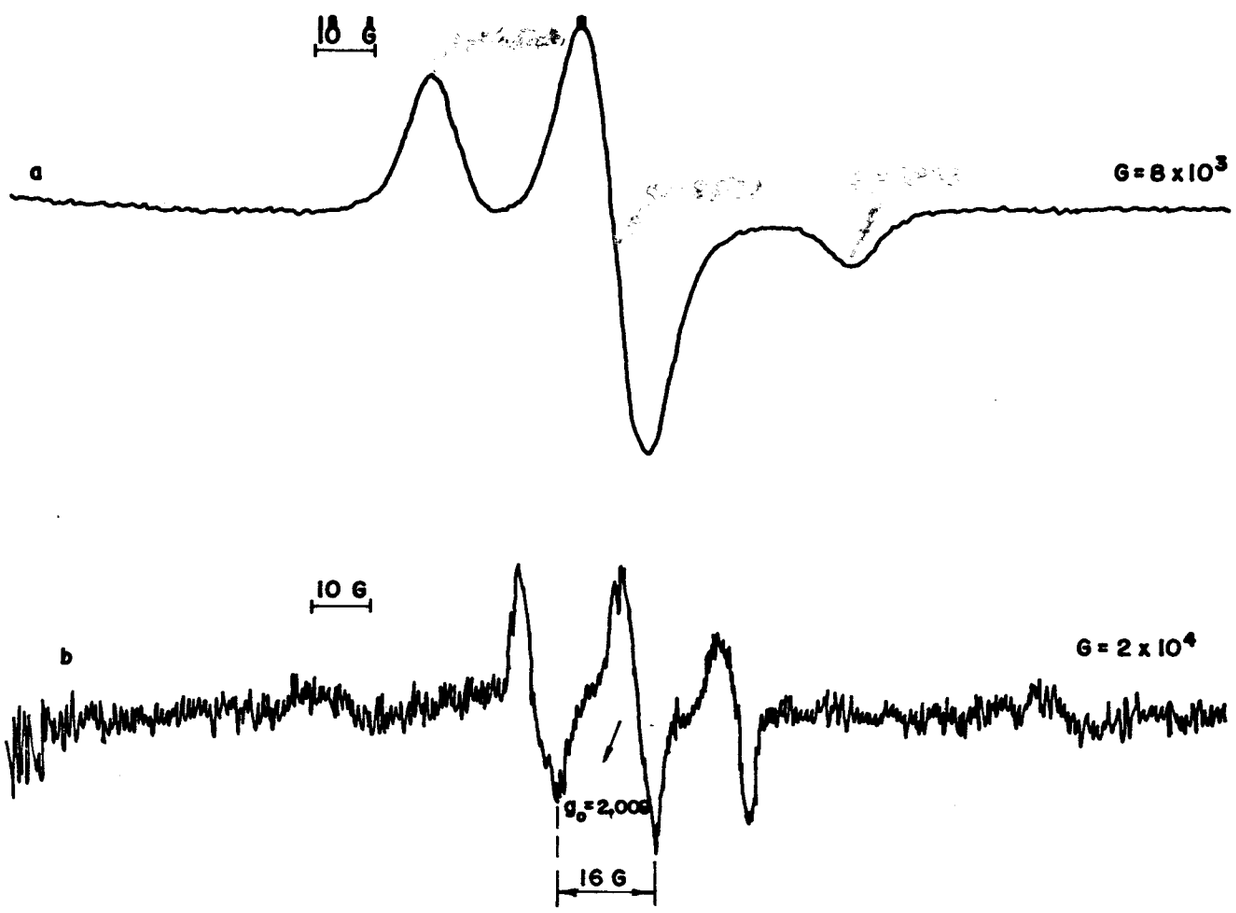



**Figura 44.** Espectros de RPE da meta Mb equina com "spin-trap" mostrando:
**a)** espectro do "spin-trap" na meta Mb equina liofilizada, medido a T = -160°C
**b)** espectro da mesma amostra que a) dissolvido em água e medido a T = 25°C.

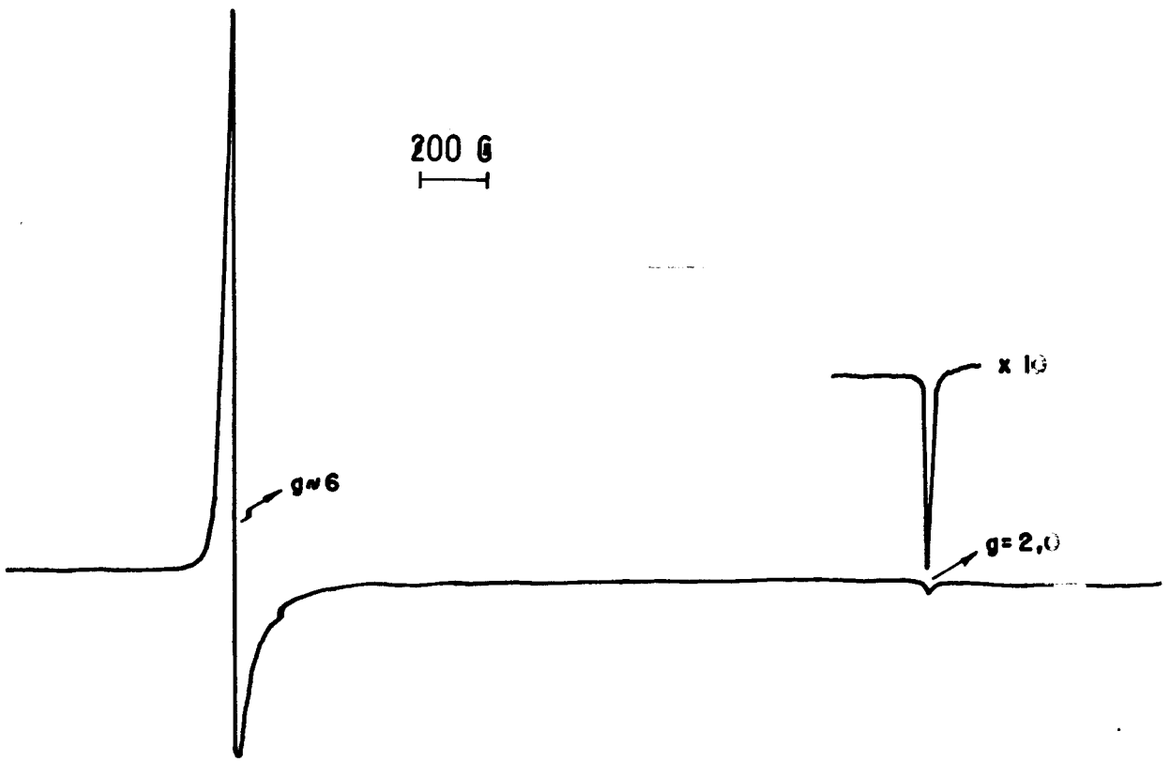



**Figura 45**. Espectro de RPE da meta Mb de baleia com 0,06 g $H_2O$/g Mb medido a T = 8 K.

## 5.2. Meta Hemoglobina

Efetuou-se medidas utilizando meta Hb bovina obtida da Sigma e meta Hb humana, preparada conforme descrito no Capítulo IV, item 1. Os espectros foram obtidos a T = -160°C, e nas figuras 47 e 48 são mostrados alguns deles em diferentes graus de hidratação.

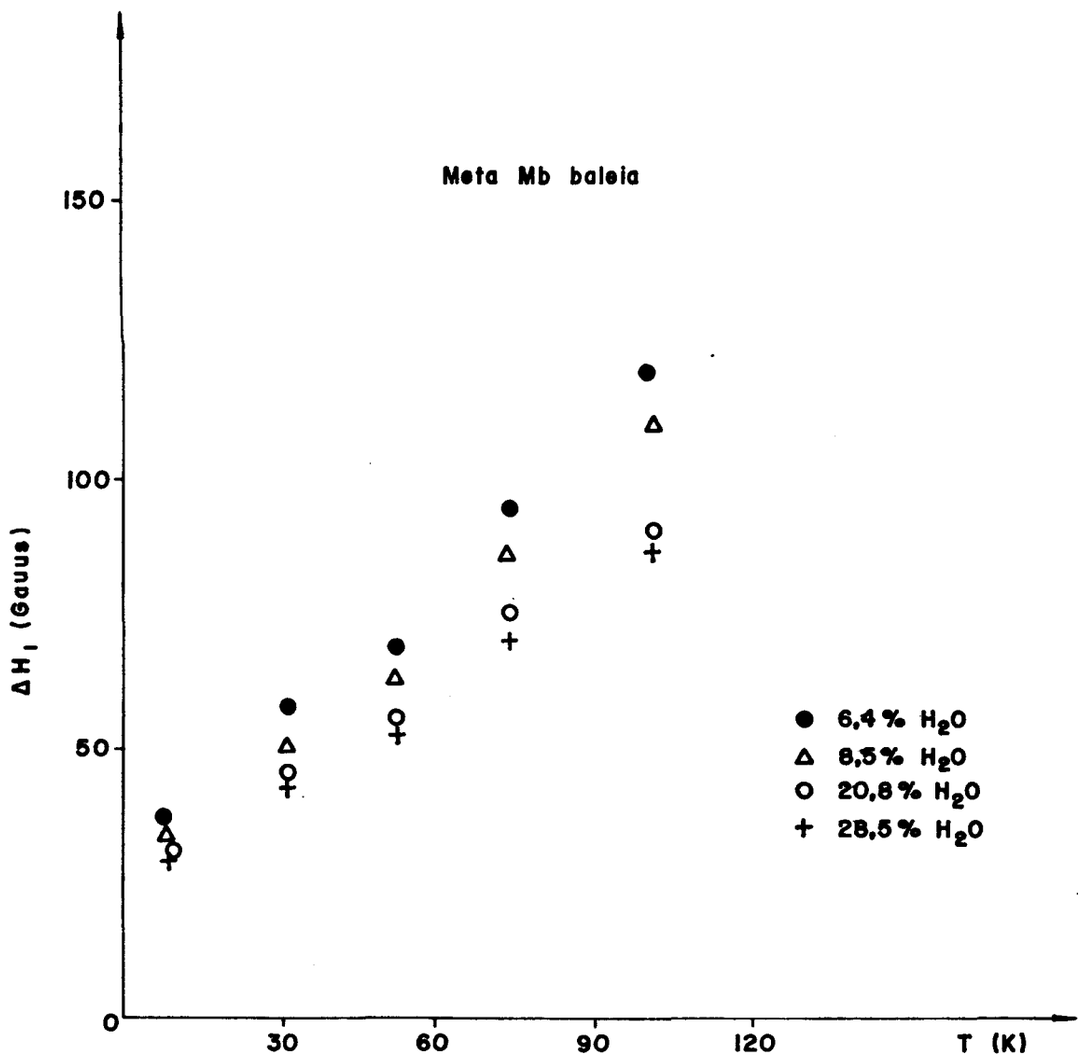



**Figura 46**. Gráfico da largura de linha ( $\Delta H_1$ ) para amostras em diferentes graus de hidratação em função da temperatura da medida, para a meta Mb de baleia.

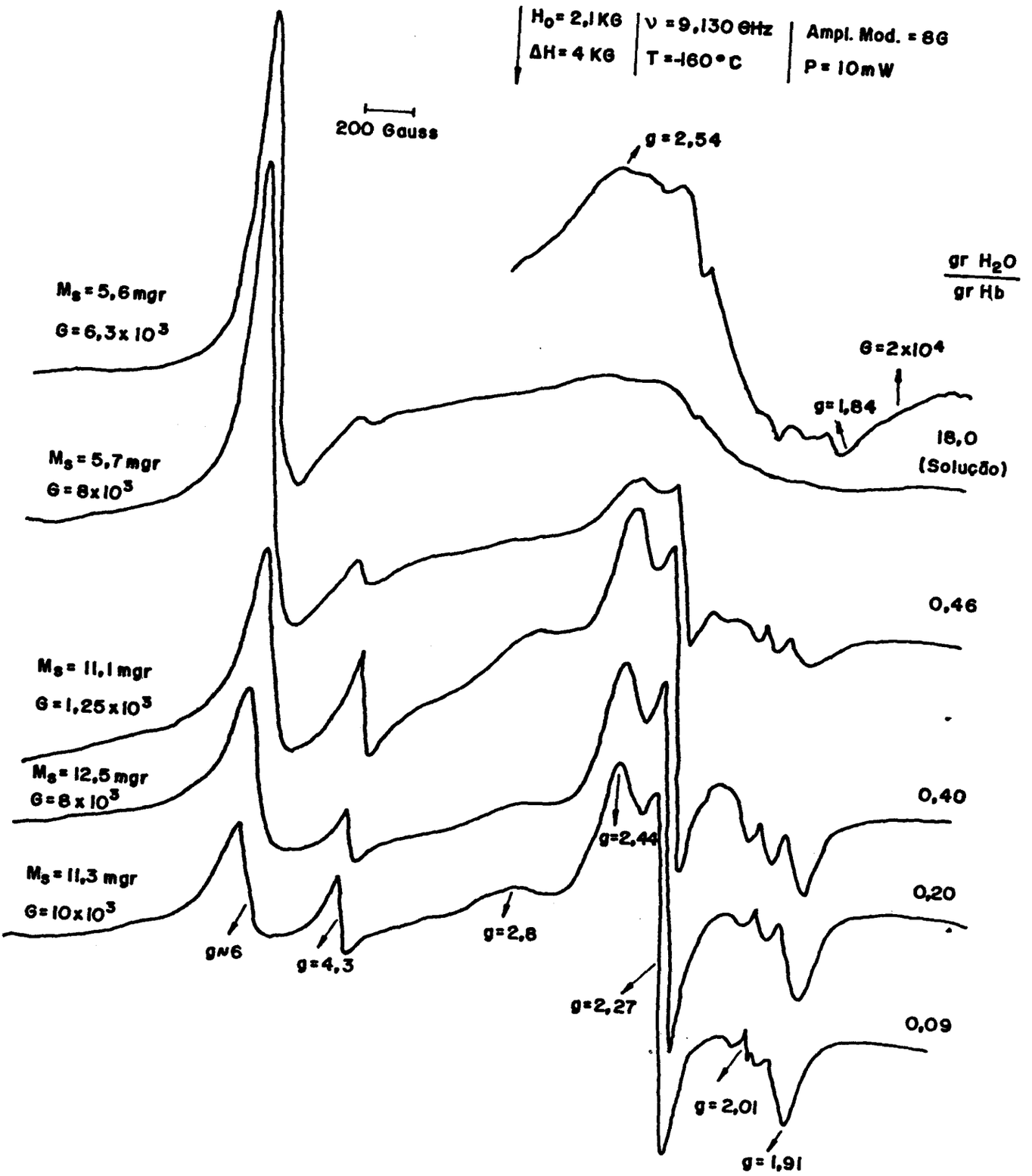



**Figura 47**. Espectros de RPE ( T = -160°C ) ,da meta Hb humana em diferentes graus de hidratação.

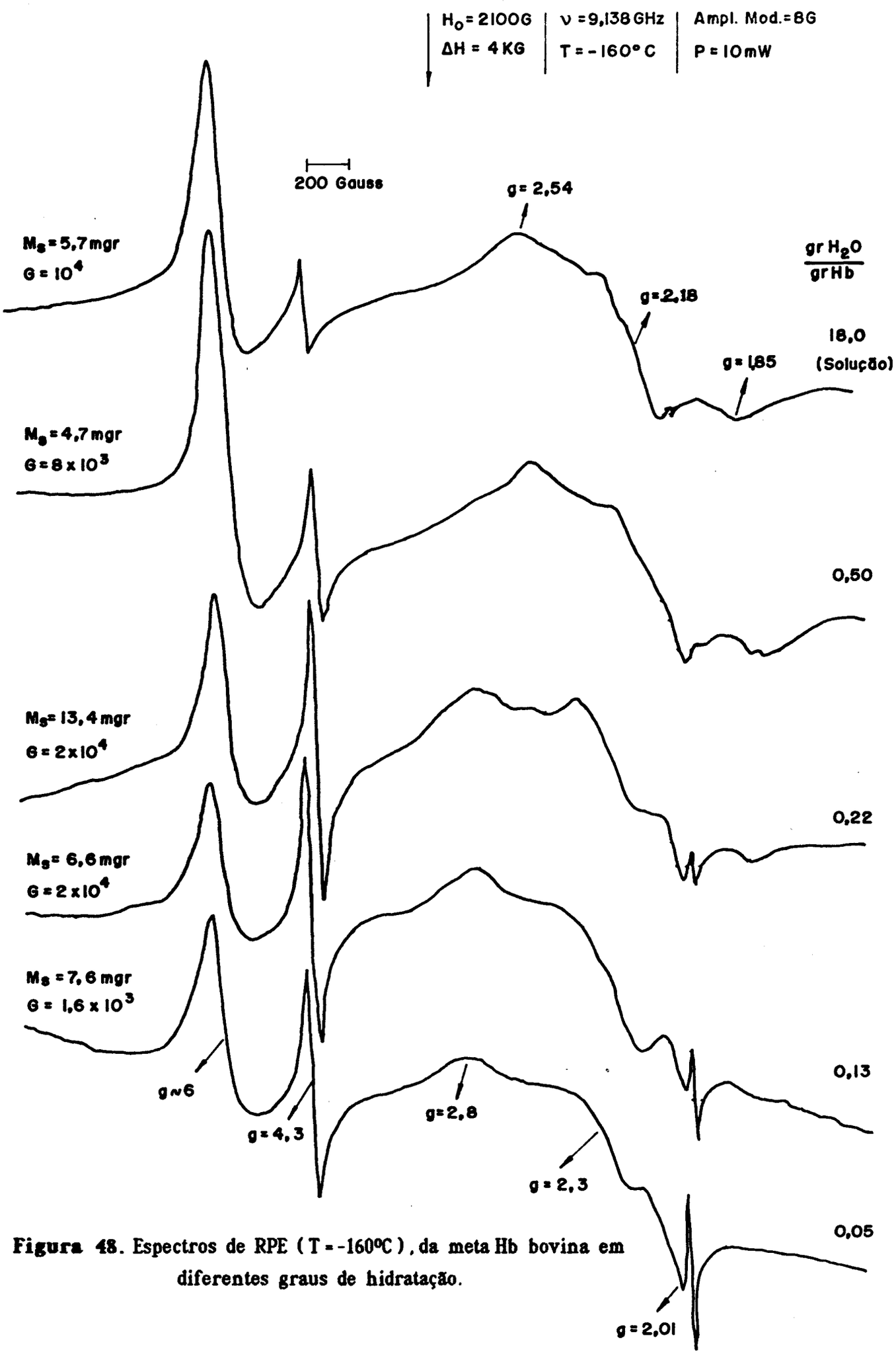



**Figura 48.** Espectros de RPE ( T = -160°C ), da meta Hb bovina em diferentes graus de hidratação.



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

As linhas de absorções com $g \sim 6$, $g = 4,3$, $g \sim 2$ ( $g_1 = 2,8$ e $g_2 = 2,3$ ) e $g = 2,01$ ( linha bem fina ) observadas na meta Hb bovina têm as mesmas origens que as observadas nas meta Mb, e descritas anteriormente. As linhas com $g = 2,54$, $g = 2,18$ e $g = 1,85$ observadas em hidratação acima de 40% e em solução são devidas ao derivado hidroxi Hb ( Rachmilewitz, 1974 ).

Para a meta Hb humana observou-se as linhas com $g \sim 6$ ; $g = 4,3$ e $g = 2,8$ e adicionalmente um conjunto de linhas com valores de $g = 2,45$ ; $g = 2,27$ e $g = 1,91$. Esse conjunto adicional de linhas é proposto na literatura ( Rachmilewitz, 1974 ) como sendo o hemicromo P e surge devido a coordenação de um átomo de enxofre na 5ª coordenação do ferro e de uma base nitrogenada na 6ª coordenação, conforme descrito no Capítulo I item 1.6.

O átomo enxofre que se coordena na 5ª coordenação do ferro poderia ser da cisteína da posição 93 das cadeias β da Hb ( na posição 92 está a histidina proximal que se coordena, normalmente, ao ferro e que nesse caso seria deslocada ). A base nitrogenada da 6ª coordenação deve ser a histidina distal E7.

Para verificar essa possibilidade os átomos de enxofre das cadeias β, posição 93 ( $\beta^{93}$ ) foram bloqueados com o marcador N - etil maleimida ( NEM ) ( Perussi, 1987 ) em uma solução de meta Hb humana obtida a partir de uma amostra liofilizada dissolvida em água. Na Figura 49 mostra-se o espectro correspondente da amostra liofilizada a partir dessa solução de meta Hb com NEM, onde não se observa mais o hemicromo P.

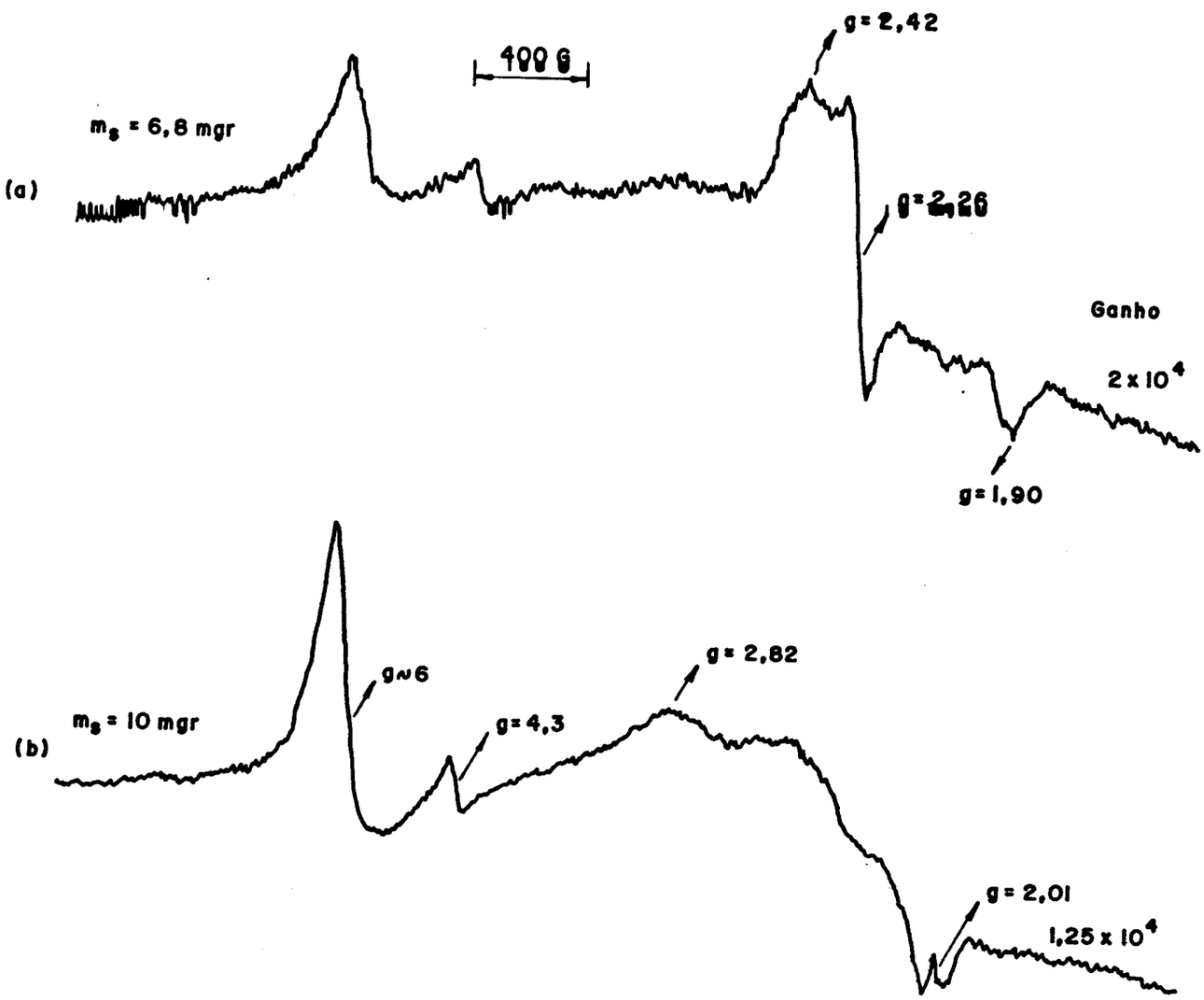



**Figura 49**. Espectros de RPE ( T = -160°C ) da meta Hb humana

**a)** amostra liofilizada ( normal )

**b)** amostra liofilizada a partir de uma solução na qual adicionou-se N-etil-maleimida ( NEM )

Testes utilizando meta Hb humana e meta Hb equina obtidas pela Sigma Co. mostraram a presença do hemicromo P, como pode ser visto nos espectros da Figura 50. Preparou-se também meta Hb bovina segundo procedimento descrito em 4.1 e observou-se as linhas do hemicromo P ( Figura 50 ).

As observações dos parâmetros de RPE em função da hidratação indicaram:

**a)** a largura de linha de g ~ 6 não mostrou uma correlação monotônica com o grau de hidratação como no caso das mioglobinas. Contudo observou-se que para a amostra seca ( $\Delta H$ = 200 Gauss ) a largura de linha é maior que em solução ( $\Delta H$ = 150 Gauss ). Na Figura 51 mostra-se as medidas para a meta Hb humana. O resultado para a meta Hb bovina é semelhante.

**b)** A área da linha de g ~ 6 para a meta Hb humana é mostrada na Figura 52. Observa-se que em hidratação superior a 0,40 g $H_2O$/g Hb há um aumento significativo dessa área. Para a meta Hb bovina obteve-se o mesmo comportamento conforme mostrado na Figura 53. No caso da Hb bovina o cálculo da área foi obtido utilizando a aproximação $I . \Delta H^2$ ( Poole & Farach, 1972 ).

**c)** A área das linhas com g ~ 2, devido aos hemicromos P e H, são mostradas na Figura 54 para a meta Hb humana. Observa-se o decréscimo da área com o aumento da hidratação. Em solução a absorção com g ~ 2 é devido ao derivado hidroxi, conforme mostrado na Figura 41.

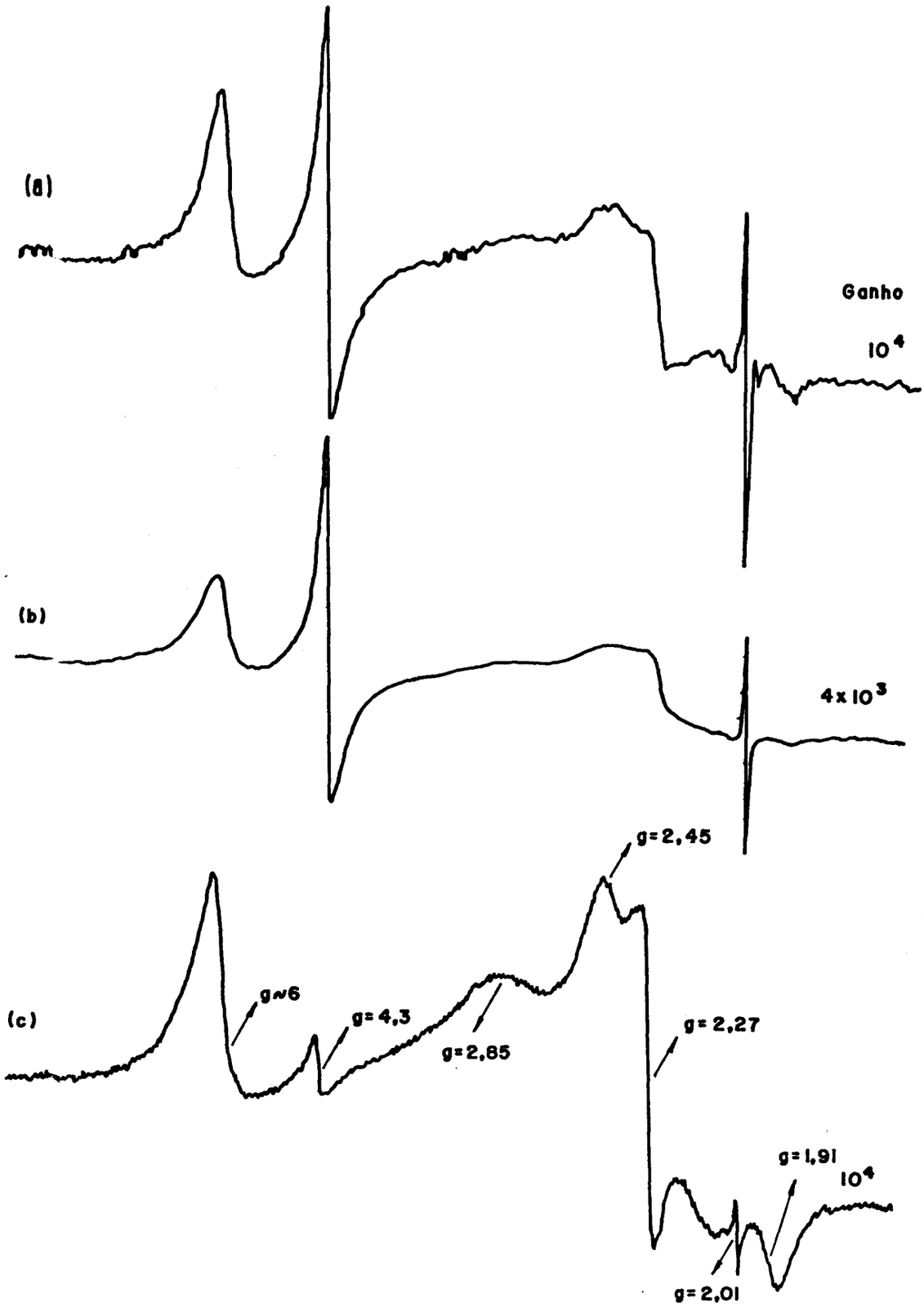



**Figura 50**. Espectros de RPE ( T = -160°C ):
**a)** meta Hb humana liofilizada ( Sigma )
**b)** meta Hb equina ( Sigma )
**c)** meta Hb bovina ( preparada no Laboratório de Biofísica ).

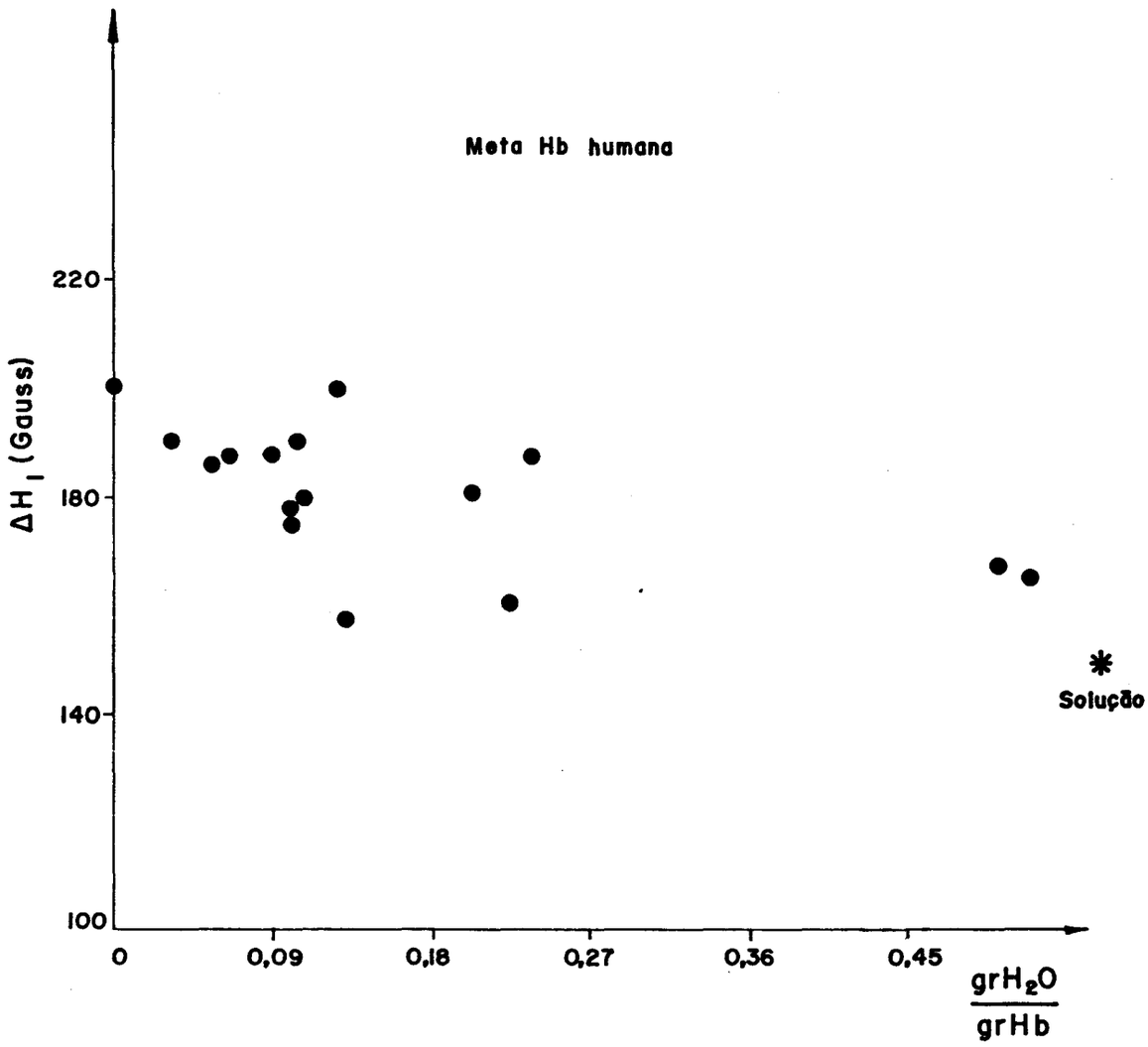



**Figura 51**. Gráfico da variação de $\Delta H_I$ em função do grau de hidratação para a meta Hb humana.

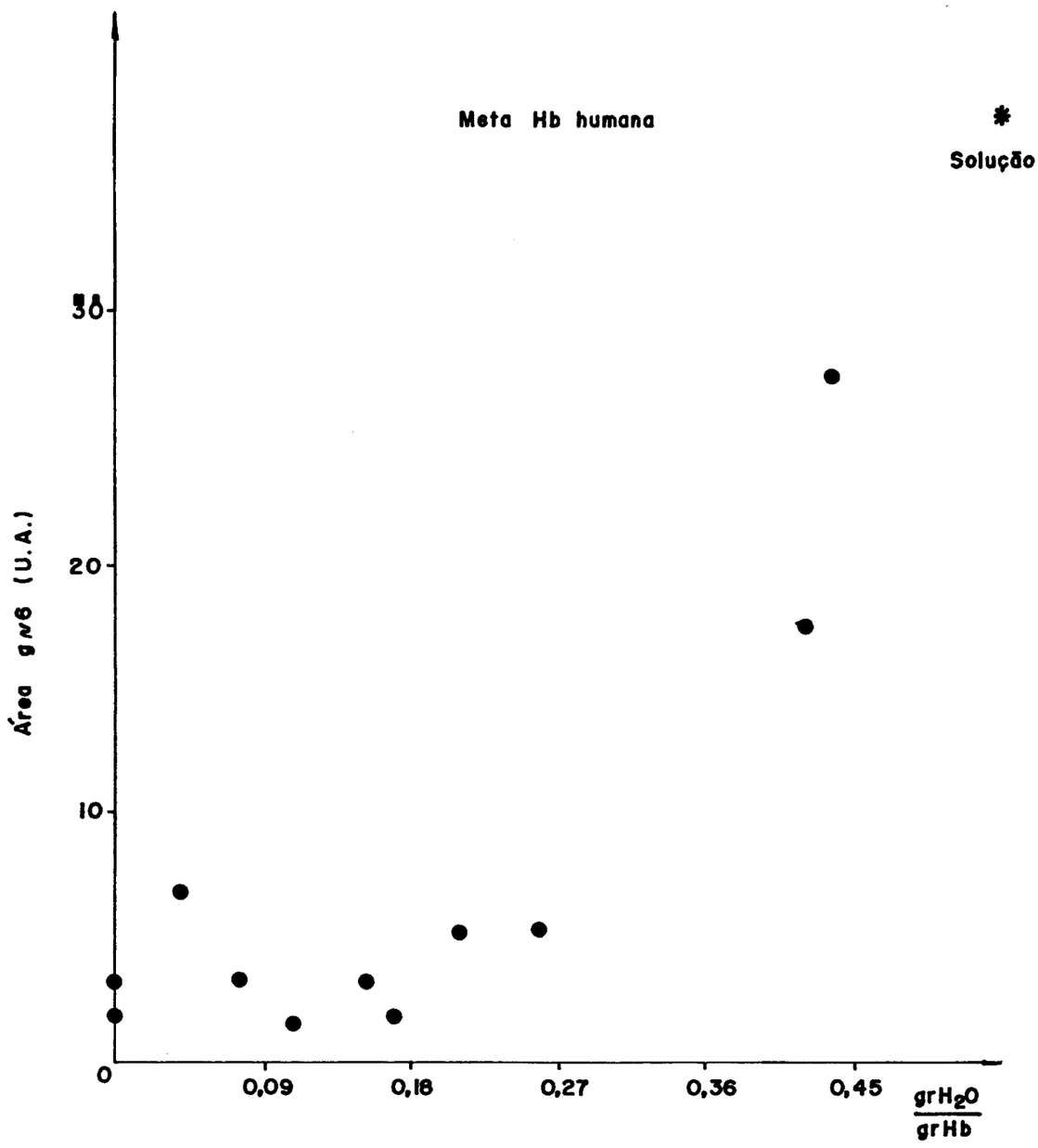



**Figura 52.** Variação da área do sinal com g~6 em função do grau de hidratação para a meta Hb humana.

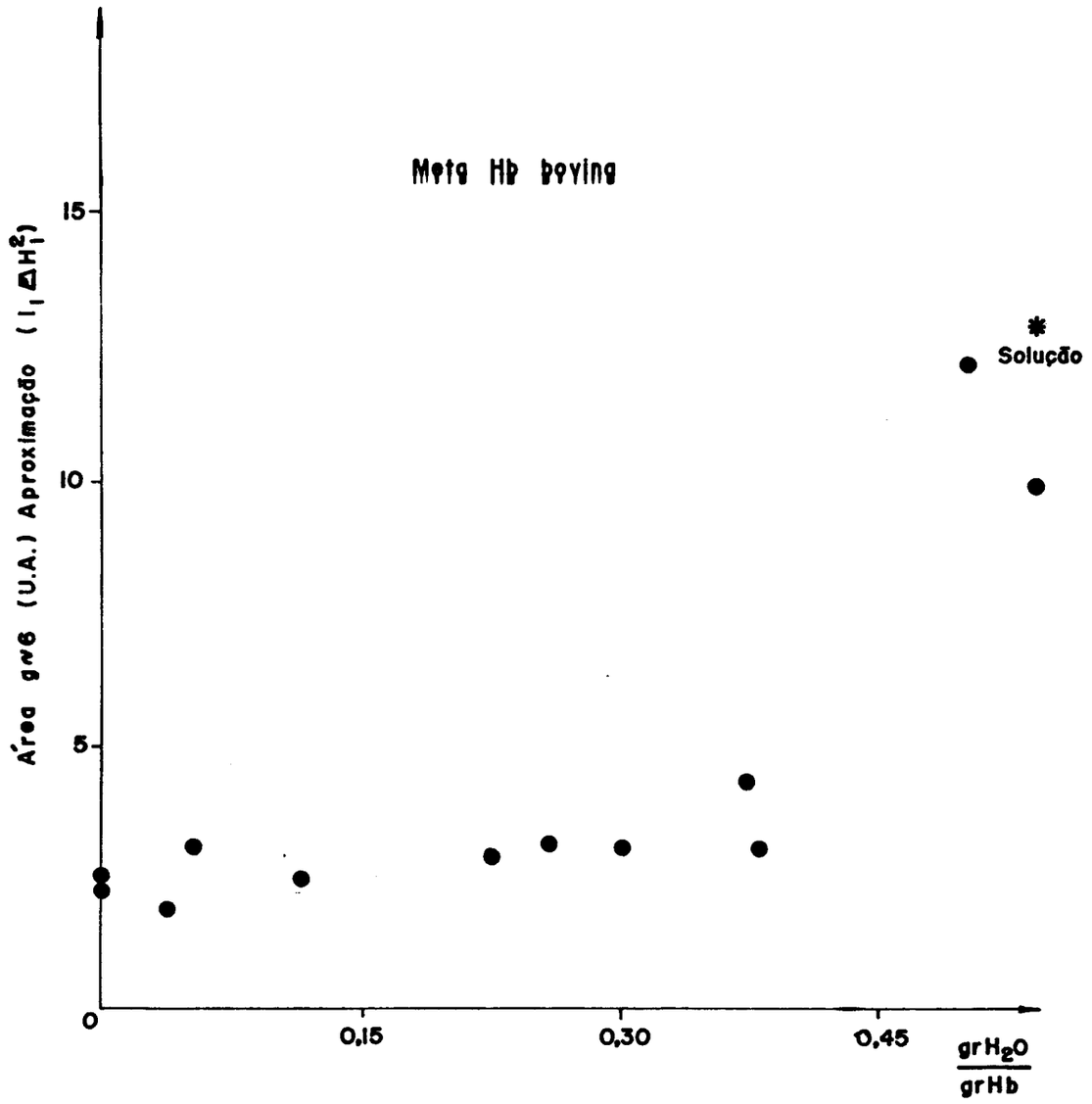



**Figura 53.** Variação da área do sinal com g ~ 6 em função da hidratação para a meta Hb bovina. Obtida pela aproximação $I . \Delta H^2$.

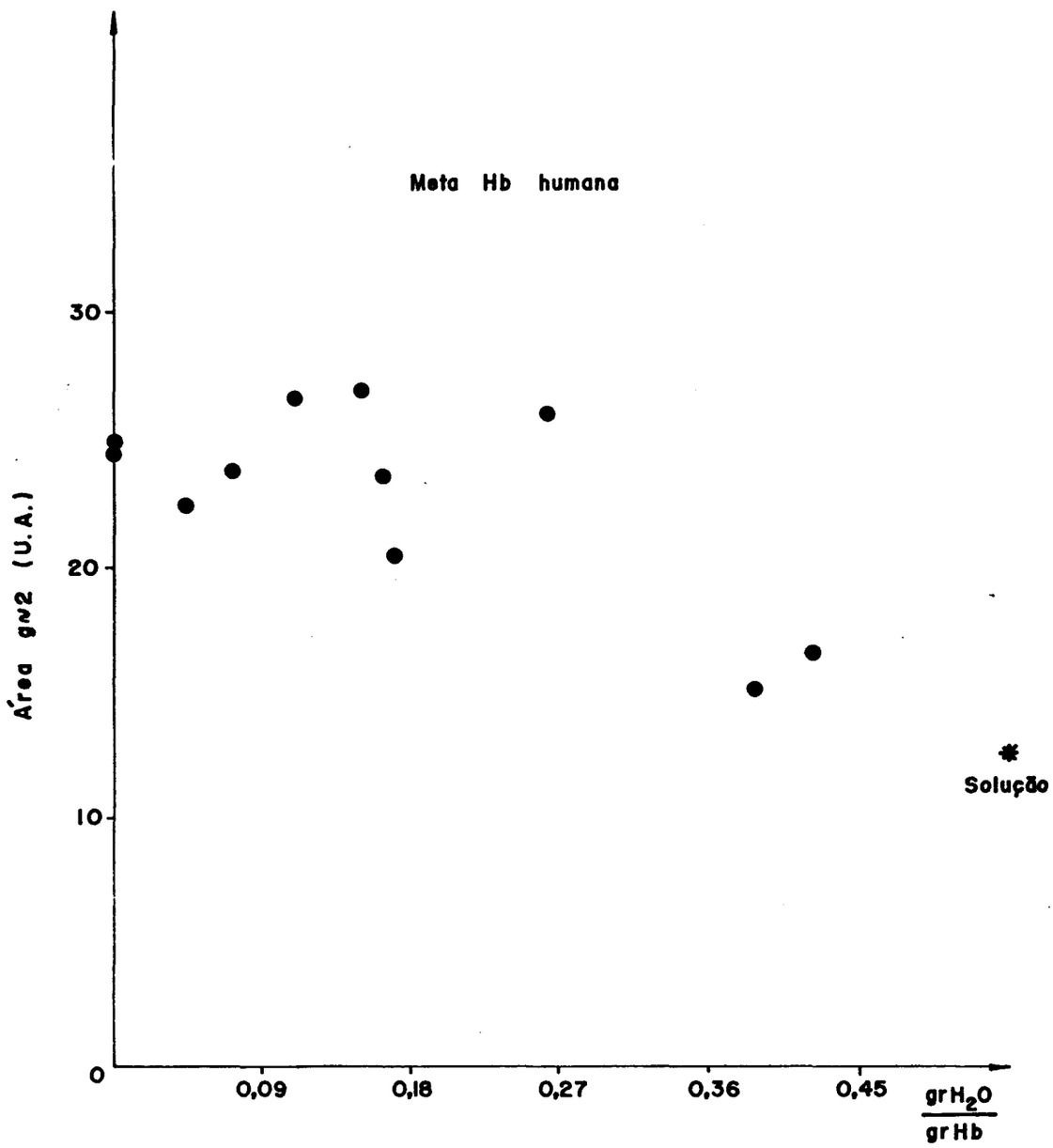



**Figura 54.** Variação da área das linhas com g~2 (hemicromos H e P) em função da hidratação para a meta Hb humana. Em solução a área com g ~2 é devido ao derivado hidroxi-Hb.

d) A soma das áreas de g ~ 6 e hemicromos, mostrada na Figura 55, indica que há um aumento real no número de centros paramagnéticos em hidratação superior a 0,40 g $H_2O$/g Hb.

e) A variação da área da linha de absorção com g = 4,3 para meta Hb humana mostrada na Figura 56, foi obtida pela aproximação $I.\Delta H^2$, e indica um máximo em torno de 0,15 g $H_2O$/g Hb. O valor dessa área é uma fração muito pequena dentro da área total observada por RPE ( em torno de 1% do total ). O valor máximo observado na Hb é superior ao encontrado para as mioglobinas. Quando a amostra de meta Hb bovina ( Sigma ) foi seca na estufa, obteve-se o resultado mostrado na Figura 39.

f) A variação da intensidade do sinal do radical livre, com g = 2,01, criado no processo de desidratação da meta Hb bovina ( Figura 57 ), tem um comportamento semelhante na meta Hb bovina Sigma em comparação aquele visto nas mioglobinas. Na meta Hb humana o radical só foi detectado em hidratação inferior a 10% de água ( Figura 47 ).

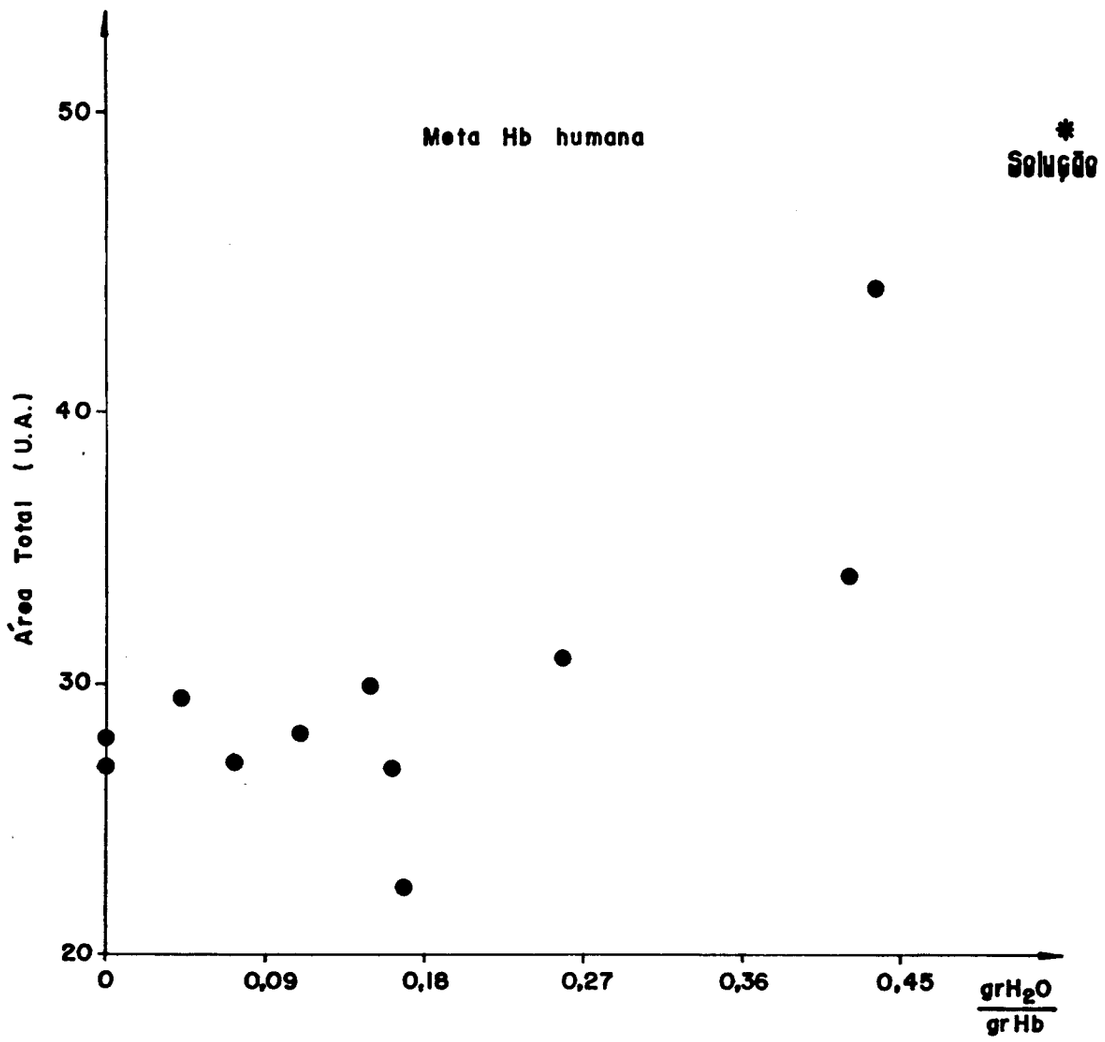



**Figura 55.** Variação da área total ( g ~ 6 + hemicromos ) em função do grau de hidratação para a meta Hb humana.

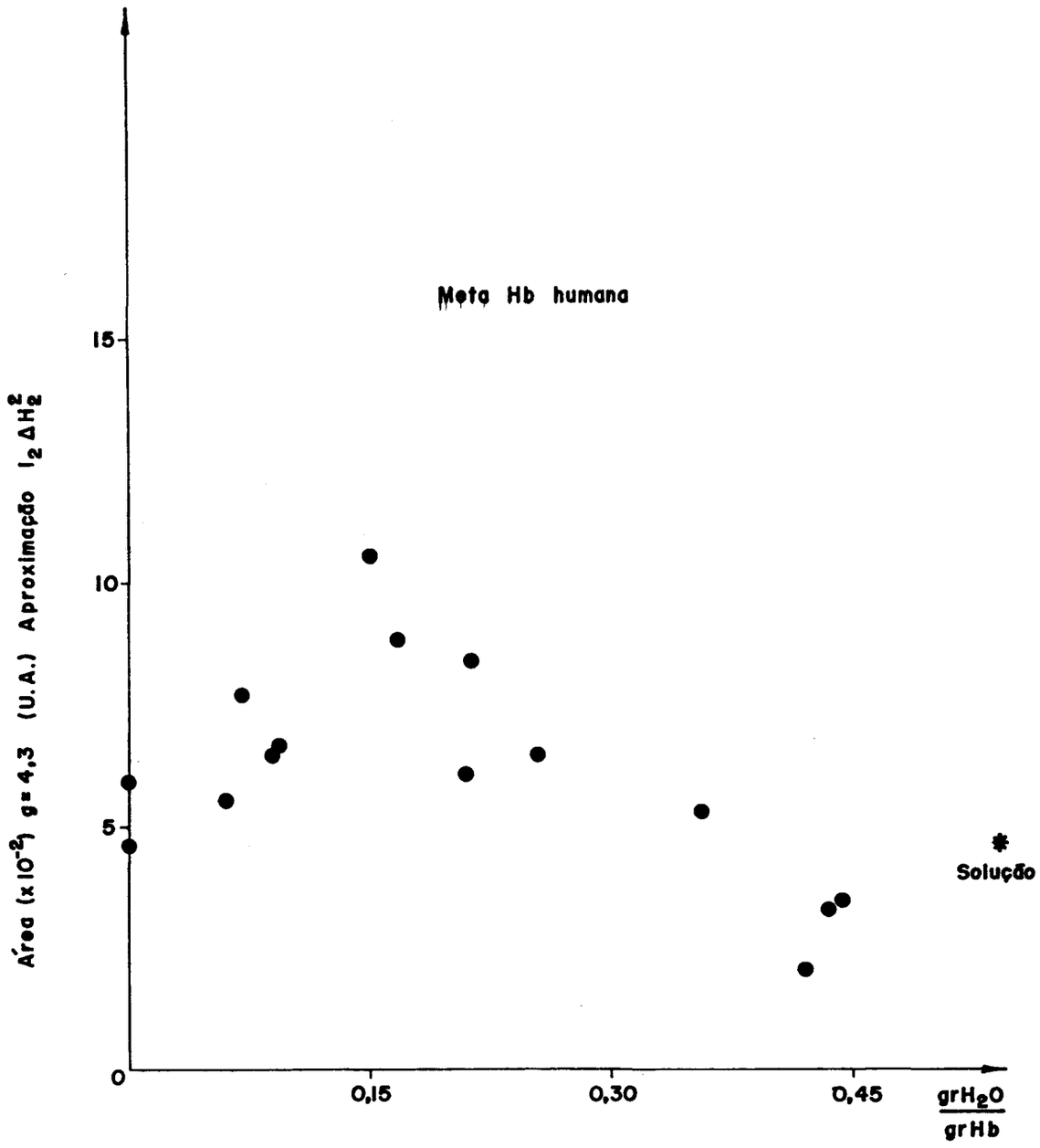



**Figura 56**. Variação da área do sinal com g = 4,3 em função da hidratação para a meta Hb humana. Obtida pela aproximação $I\Delta H^2$.

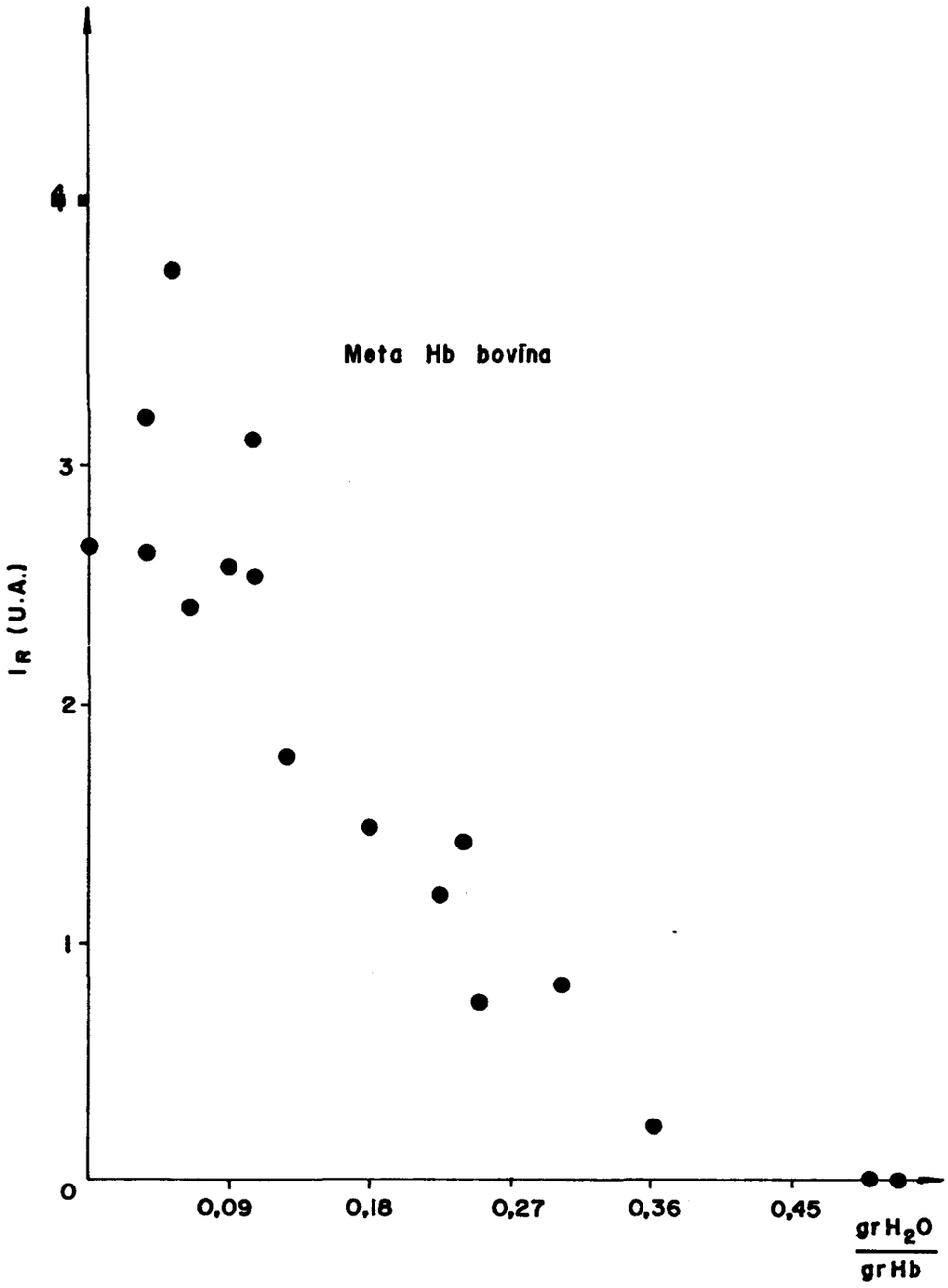



**Figura 57.** Variação da intensidade do sinal do radical livre (g = 2,01) em função da hidratação para a meta Hb bovina.

## 5.3. Cálculos a, b, c, $V/\lambda$, $\delta/\lambda$, $V/\delta$ para os hemicromos

Os diferentes valores de g obtidos para os hemicromos nas diferentes proteínas e condições foram:

| Proteína | $g_z$ | $g_y$ | $g_x$ |
|---|---|---|---|
| solução meta Mb equina pH = 9,8 | 2,57 | 2,18 | 1,84 |
| meta Mb baleia ( liofilizada - 5% $H_2O$ ) | 2,81 | 2,27 | não ident. |
| meta Hb bovina ( liofilizada - 50% $H_2O$ ) | 2,56 | 2,11 | 1,82 |
| meta Hb humana ( liofilizada - <40% $H_2O$ ) | 2,45 | 2,27 | 1,91 |

A partir da expressão 22 do Capítulo III obteve-se o valor de $g_x$ = 1,64 para o hemicromo H da meta Mb de baleia, equina e meta Hb bovina ( Sigma ).

Os valores obtidos para os coeficientes ( a , b , c ) das funções de onda da expressão 17 , Capítulo III, para separação tetragonal ( $\delta/\lambda$ ), rômbica ( $V/\lambda$ ) e grau de rombicidade ( $V/\delta$ ) ( definidos no Capítulo III, item 3.3.2.2. ) para os diferentes hemicromos são dados a seguir.

| Hemicromo | Proteína | a | b | c | $\nu/\lambda$ | $\delta/\lambda$ | $\nu/\delta$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| "hidroxi" * | meta Mb equina ( solução pH = 9,8 ) | 0,985 | 0,081 | 0,069 | 3,41 | 6,02 | 0,57 |
| H (bi-histidina) | meta Mb baleia, equina e meta Hb bovina ( liofilizada - $<$50% $H_2O$ ) | 0,966 | 0,223 | 0,120 | 2,26 | 3,65 | 0,62 |
| "hidroxi" * | meta Hb bovina ( liofilizada - $>$50% $H_2O$ ) | 0,978 | 0,094 | 0,062 | 3,24 | 7,48 | 0,43 |
| P | meta Hb humana ( liofilizada -$<$ 50% $H_2O$ ) | 0,996 | 0,114 | 0,076 | 4,59 | 4,87 | 0,94 |

*a rigor esse complexo não é um hemicromo, pois o 6º ligante ($OH^-$) é exógeno a proteína.

## 5.4. Nitrosil - Mb

Na Figura 58 mostra-se espectros de meta Mb de baleia, em diferentes graus de hidratação, antes e depois da adição do gás NO. No quadro, ao alto, é mostrado somente o espectro do NO ligado a proteína com os parâmetros de RPE medidos.

Verifica-se da Figura 58 que em baixa hidratação há um sinal considerável do complexo $Fe^{2+}$ - NO. Quando a hidratação aumenta o sinal do NO decresce sendo muito baixo em uma hidratação de 25%.

Importante observar que amostras com hidratação acima de 25% e com NO ligado praticamente não exibiram sinal de RPE ( do NO ou $Fe^{3+}$ ). Observou-se ainda uma mudança de coloração da amostra de marrom ( sem NO ) para verde ( com NO ).

Quando essa amostra de cor verde é dissolvida em água essa coloração permaneceu, indicando um complexo estável. Se gás NO é adicionado a essa solução, a coloração é mudada, muito lentamente, para marrom-avermelhada. Na Figura 59 mostra-se os espectros das soluções verde ( sem sinal RPE ) e marrom-avermelhada com sinais do $Fe^{2+}$ - NO e do íon $Fe^{3+}$.

Outra observação de interesse foi a diminuição do valor da largura de linha ( $\Delta H_1$ ) do sinal residual do íon ferro (III), com g ~ 6, depois da adição do gás NO nas amostras de meta Mb com baixas hidratação. Na Figura 60 mostra-se os espectros para duas hidratações diferentes e no gráfico da Figura 61 evidencia-se a dependência bem definida desse estreitamento com a hidratação.

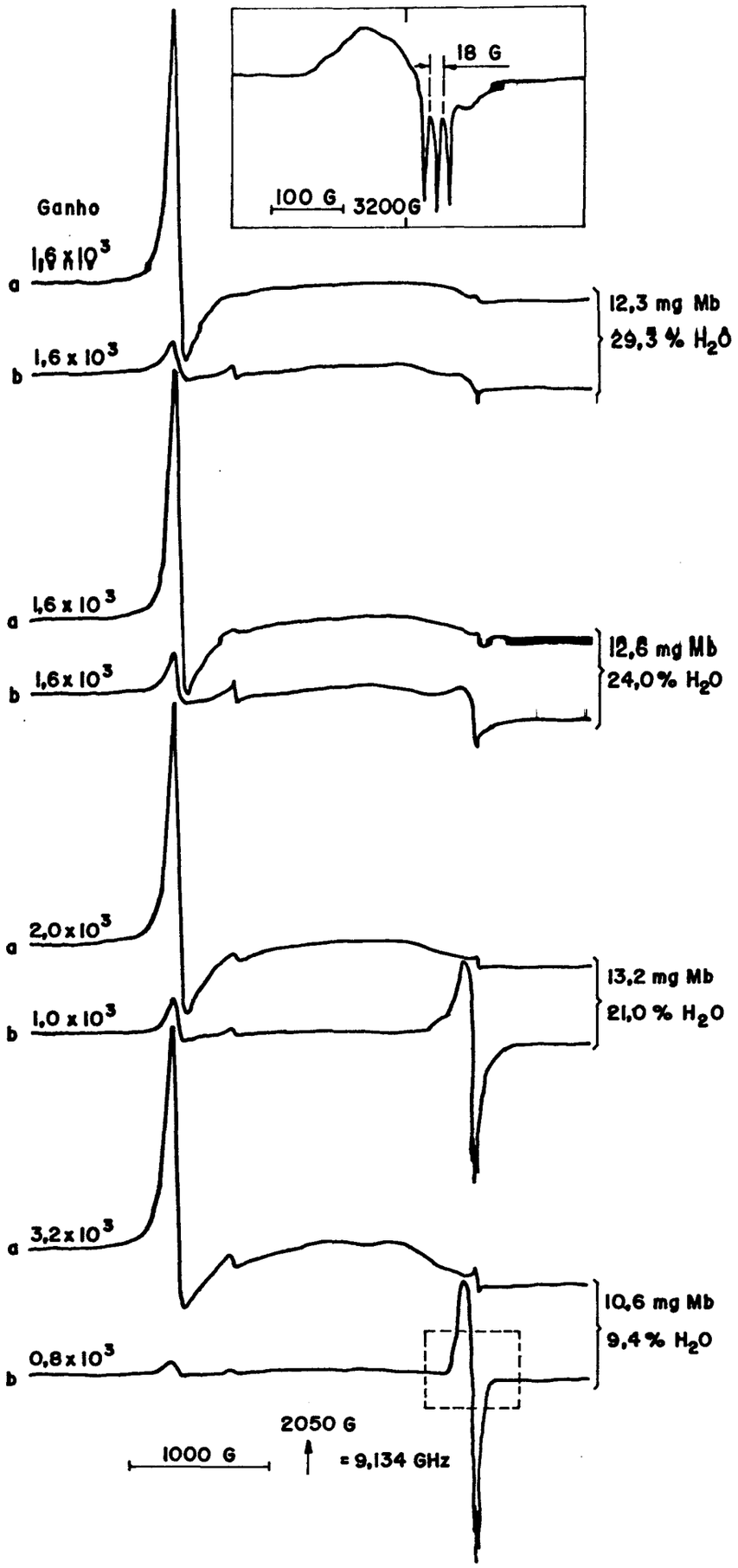



**Figura 58.** Espectros de RPE ( T = -160°C , Ampl. Mod. = 8G ) da meta Mb de baleia em diferentes graus de hidratação:
**a)** sem adição de gás NO.
**b)** depois da adição de NO
O quadro do alto mostra o espectro da espécie $Fe^{2+}$ - NO na amostra com 9,4% $H_2O$. Condições exp.: T = -160°C, potência microonda = 10 mW e amplitude de modulação = 2,5 Gauss.

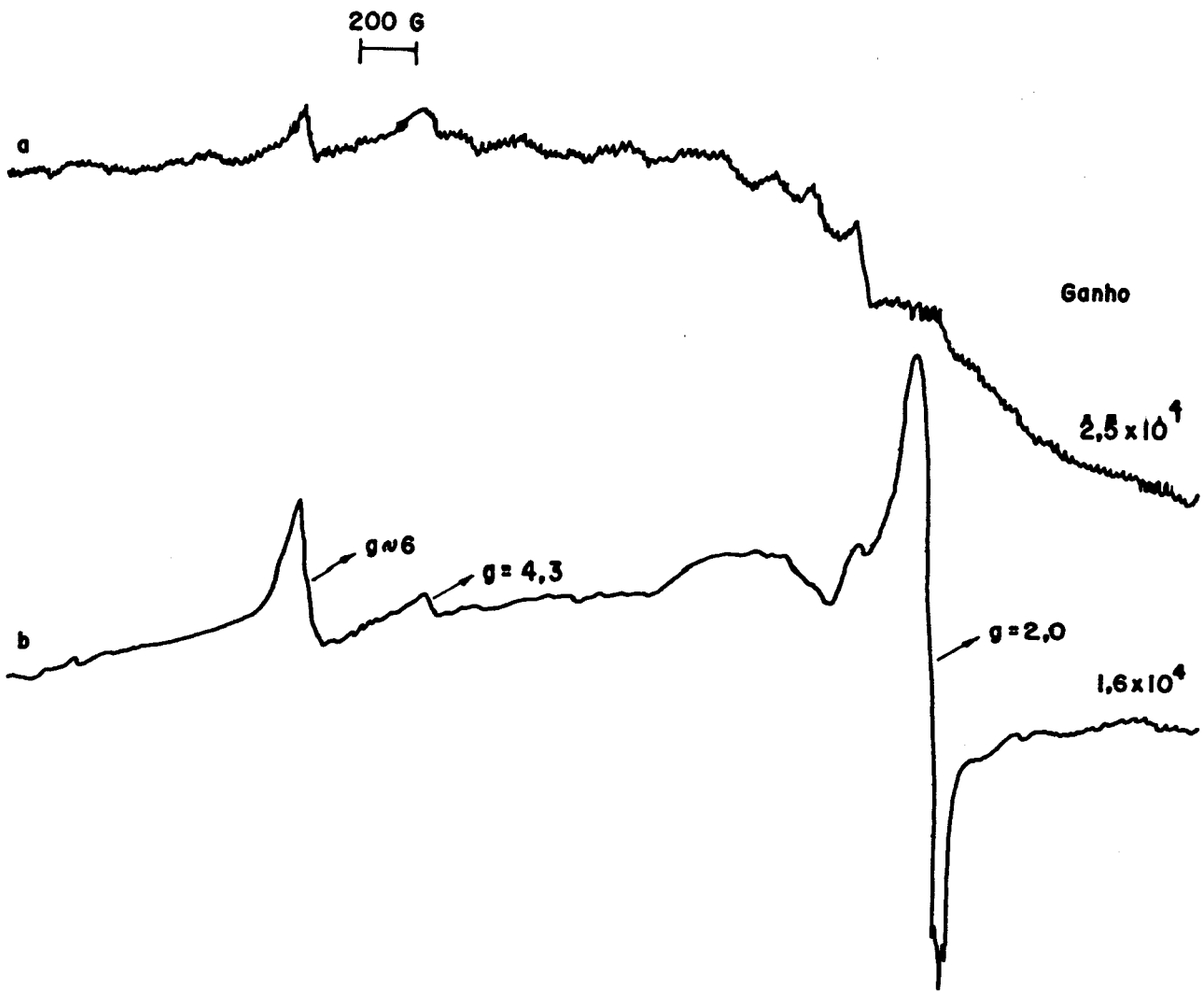



**Figura 59**. Espectros de RPE:

**a)** amostra de meta Mb com 0,30 g $H_2O$/g Mb na qual adicionou-se NO e depois foi dissolvida em água ( coloração verde ), medido a T = -160ºC, P = 10 mW, Ampl. Modulação = 8 Gauss.

**b)** mesma amostra de a) após adição de nova quantidade de NO na amostra em solução.



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

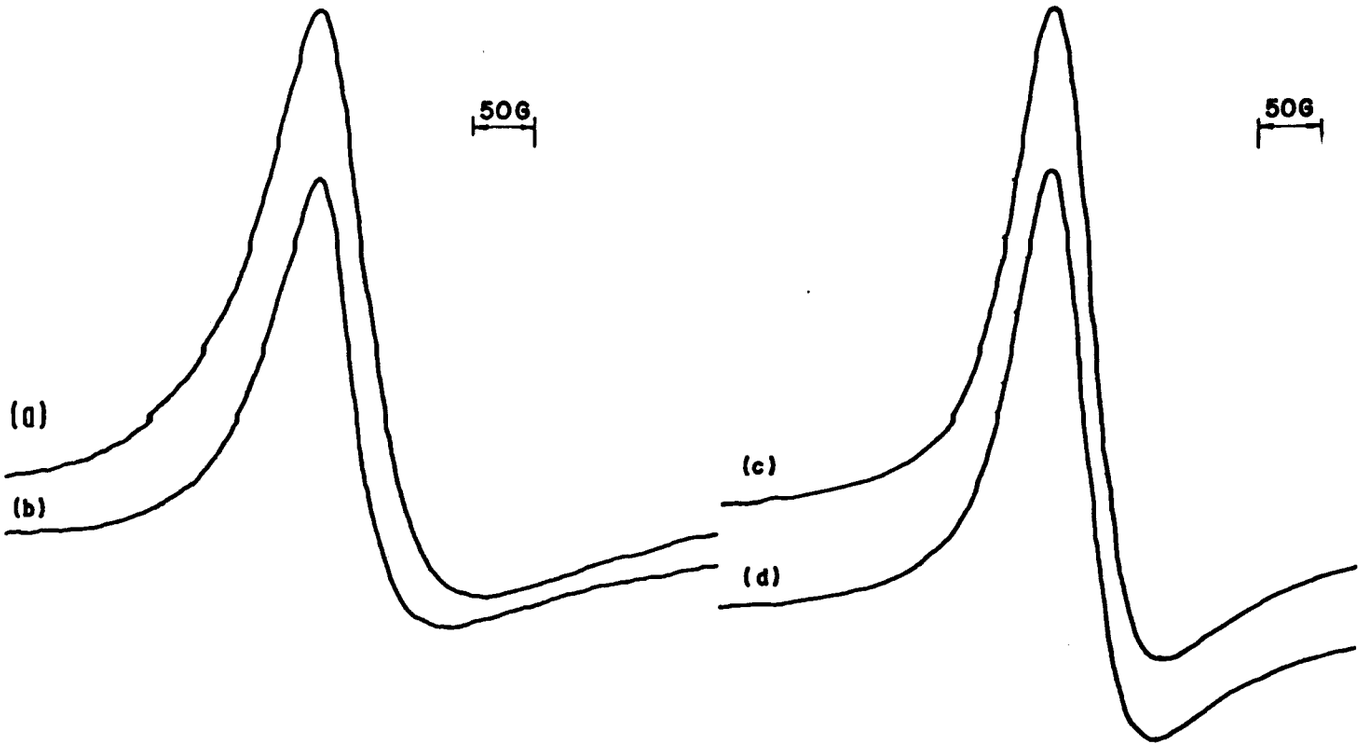



**Figura 60**. Espectros de RPE ( T = -160°C ) mostrando o sinal com g ~ 6, antes ( a e c ) e depois ( b e d ) da adição de gás NO na meta Mb de baleia em dois graus de hidratação diferentes:
a) e b) seca
c) e d) 0,30 g $H_2O$/g Mb.

Foi realizada também uma experiência para verificar o fator de proporcionalidade entre a área do sinal de $Fe^{3+}$ ( com a varredura 700 - 1700 Gauss ) e do sinal $Fe^{2+}$ - NO. Utilizou-se uma concentração conhecida de proteína para depois correlacionar esse sinal $Fe^{2+}$ - NO quantitado com o formado nas amostras liofilizadas. Meta Mb de baleia liofilizada foi dissolvida em água (C=1 mM) e obtido o espectro de RPE ( Figura 62 ). Calculou-se a área utilizando o sistema

desenvolvido por Thomaz, 1987. Em seguida, adicionou-se gás NO, em excesso, a essa solução e obteve-se a área do sinal $Fe^{2+}$ - NO, certificando que o $Fe^{3+}$ havia desaparecido completamente ( Figura 62 ). Da comparação das áreas obteve-se também um fator 3,0 , ou seja:

$$\text{Area}\,(Fe^{2+} - NO) = 3{,}0 \times \text{Area}\left[Fe^{3+} - H_2O\,(\text{varredura } 700 - 1700 \text{ Gauss})\right]$$

Mediu-se uma amostra de meta Mb de baleia liofilizada, de massa conhecida, na qual foi adicionada diretamente NO ( em excesso ). A partir do valor da área do sinal NO obtido nesse caso e comparando com o sinal do NO da amostra em solução, com concentração conhecida, obteve-se que 26% dos grupos heme deram origem ao sinal $Fe^{2+}$ - NO.

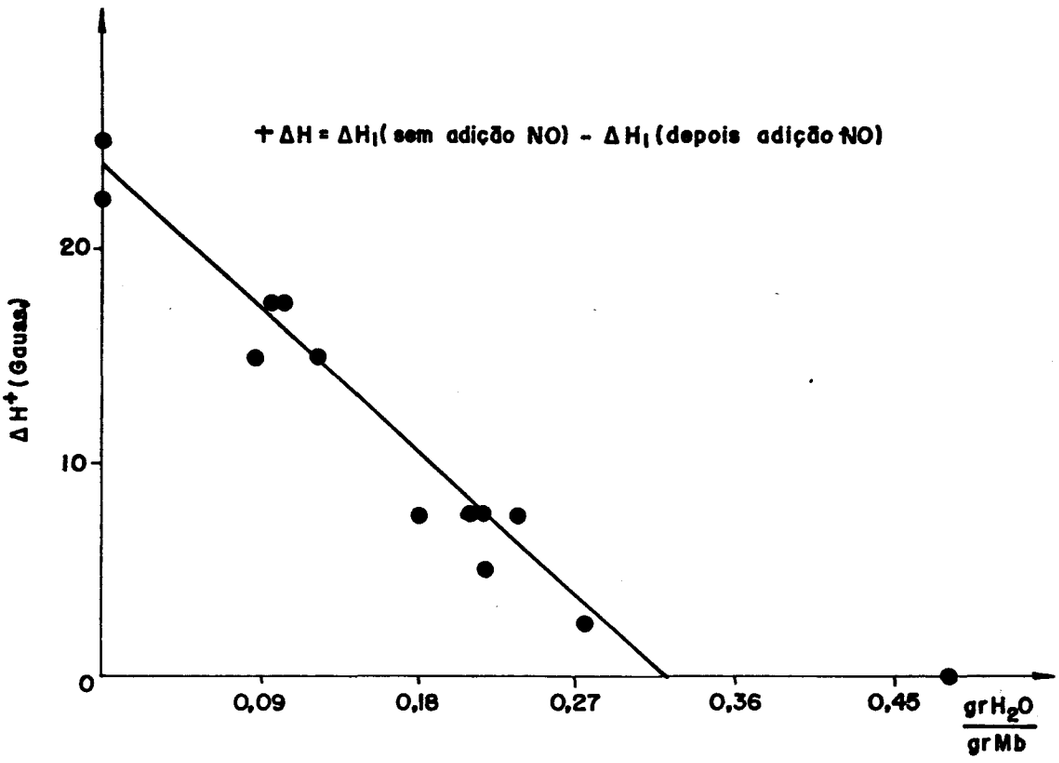



**Figura 61**. Gráfico da variação da diferença da largura de linha do sinal com g ~ 6 antes e depois da adição de gás NO na meta Mb de baleia em função do grau de hidratação.

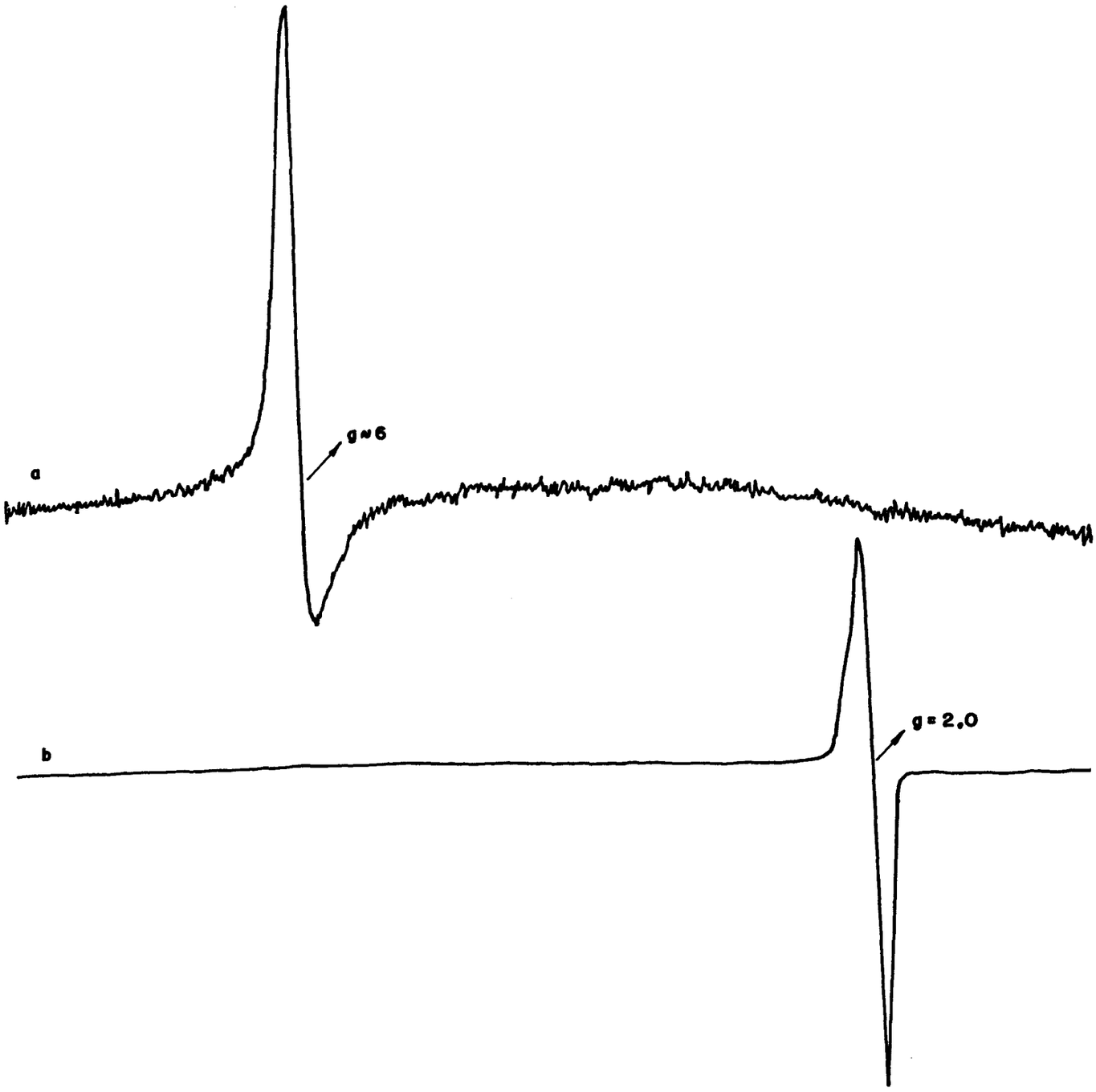



**Figura 62**. Espectro de RPE ( T = -160ºC ) :

**a)** solução de meta Mb de baleia - C = 1 mM

**b)** mesma amostra de a após adição de gás NO em excesso.

## 5.5. Testes Nitrosil - Hb

A adição do gás NO nas amostras de meta Hb bovina, meta Hb humana e meta Hb humana com NEM liofilizadas também mostraram o sinal de RPE do complexo $Fe^{2+}$ - NO, conforme mostra a Figura 63.

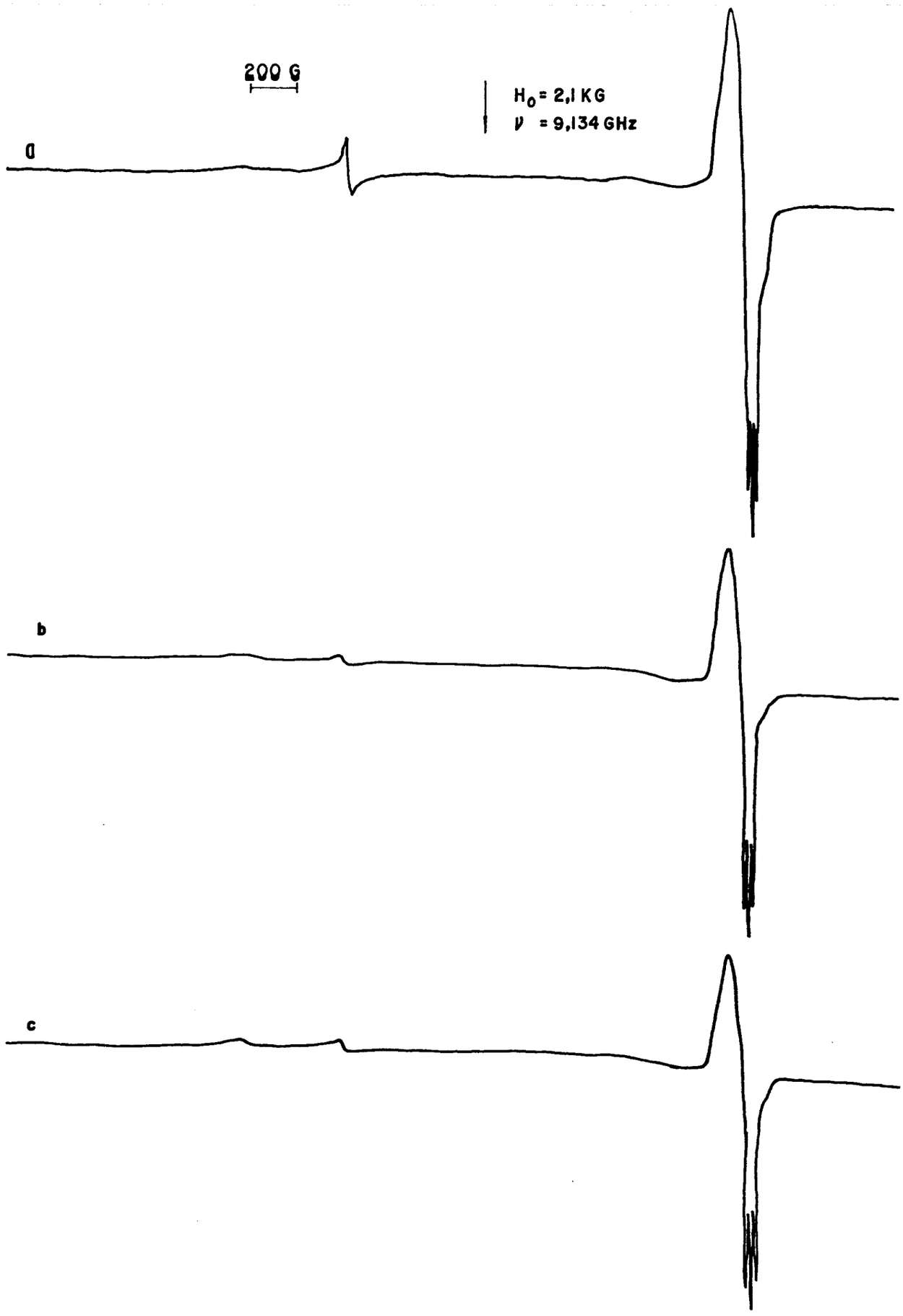



**Figura 63.** Espectros de RPE medidos a T = -160°C, P = 10 mW, Ampl. Mod. = 8G:

**a)** meta Hb bovina liofilizada ( Sigma ) + NO

**b)** meta Hb humana liofilizada + NO

**c)** ( meta Hb humana + NEM ) liofilizada + NO

# *Capítulo VI*

# *Discussão*

A desidratação de metamioglobinas e metahemoglobinas levaram a várias alterações no espectro de RPE em comparação com a amostra em solução. Essas mudanças foram basicamente de dois tipos:

a) mudança na forma e intensidade das linhas que existiam em solução;

b) surgimento de novas linhas de absorções.

## 6.1. Metamioglobina

Uma das primeiras observações feitas na desidratação das meta Mb foi o alargamento da linha com valor de g ~ 6 ( Figura 31 ). Essa linha é identificada como devido a absorção do íon ferro (III) em um estado de spin 5/2, componente perpendicular da simetria axial ( Bennet et al., 1955 ).

A largura de linha ( $\Delta H_1$ ) ( Figura 31 ) decresceu com o aumento do grau de hidratação até um conteúdo de água de 0,20 g $H_2O$/g Mb. Acima dessa hidratação passou a ter praticamente o mesmo valor da amostra em solução. Esse comportamento foi mostrado nas Figuras 32 e 33 para a meta Mb baleia e equina, respectivamente. A largura de linha máxima ( amostra seca ) da meta Mb equina é ligeiramente maior ( ~ 20 Gauss ) que a da meta Mb baleia.

A largura de linha de um sinal de RPE pode ser modulada por vários fatores: tempo de relaxação, simetria, interação entre centros paramagnéticos e outros.

Supondo uma situação em que atua somente o tempo de relaxação tem-se que uma linha de absorção é mais estreita quanto maior o tempo de relaxação.

Em altas hidratações é esperado que uma proteína tenha maior mobilidade. Essa mobilidade possibilitaria uma relaxação mais eficiente e rápida, que na amostra desidratada, o que levaria a um alargamento da linha de absorção. Esse efeito é contrário ao observado na desidratação das meta Mb. No entanto como as medidas foram feitas a baixa temperatura ( 113 K ) a mobilidade adicional proposta para amostras mais hidratadas é inibida ( pelo congelamento ) e os tempos de relaxação não devem ser diferentes. Resultados recentes de medidas Mössbauer ( Parak et al., 1981 ), relaxação dielétrica ( Singh et al., 1981 ) e infravermelho ( Doster et al., 1986 ) mostraram que somente acima de 180-190 K começa-se a observar mudanças dos parâmetros medidos e que são associados ao descongelamento da água de hidratação.

No caso de hemoproteínas o alargamento de linha pode estar associado a desvios da simetria axial ( Peisach et al., 1971; Calvo & Bemski, 1976 ). Assim uma explicação possível é que quanto mais desidratada está a amostra maior o desvio da simetria axial. Esse desvio seria diminuído com o aumento da hidratação até que em 20% de $H_2O$ ter-se-ia uma situação muito próxima a da solução, pelo menos do ponto de vista de simetria em torno do íon ferro (III). Esse valor de 0,20 g $H_2O$/g Mb é concordante com 0,24 g $H_2O$/g Mb obtido por

Kuntz, 1971 a , a partir de medidas de NMR, valor este onde é admitido que a camada de água ligada se completa. Rosen, 1963 por sua vez obteve que o aumento no valor da "constante" dielétrica ocorre em uma hidratação de 0,235 g $H_2O$/g Mb.

Uma vez que a diferença de largura de linha ( a T= -160°C ) entre a amostra em solução e a mais seca está em torno de 70 Gauss poder-se-ia esperar que este alargamento fosse produzido por um desdobramento das componentes $g_x$ e $g_y$, da linha com g ~ 6. Medidas em temperaturas baixas deveriam revelar este desdobramento porque o tempo de relaxação é maior em temperaturas menores, e leva a um estreitamento das linhas. No entanto, conforme mostrado na Figura 45 o espectro de meta Mb com 6% de água , a T = 8 K, não mostrou tal desdobramento, mas somente um acentuado estreitamento da linha de g ~ 6 como um todo.

As medidas em temperaturas menores mostraram que o valor da largura de linha mantém a mesma dependência com a hidratação ( maior nas amostras mais secas - Figura 46 ). Ressalte-se ainda que o decréscimo percentual da largura de linha com a temperatura é praticamente o mesmo nas amostras com diferentes hidratações.

Assim a origem do alargamento da linha poderia ser mesmo devido a pequenos desvios da simetria axial da meta Mb. Esses desvios estariam se manifestando por um mecanismo tipo alargamento "g-strain". Esse alargamento é atribuído a uma distribuição de conformações da proteína que resultam em estresses ligeiramente diferentes no centro ativo de cada molécula ( More et al., 1987 ). Os estresses diferentes levam a uma flutuação nos valores de g de cada

sítio gerando o alargamento de linha resultante. A razão para os estresses serem diferentes seria explicado por uma distribuição de conformações distintas nas proteínas desidratadas em relação as hidratadas.

A amostra totalmente sem água é a mais afetada, dando origem a conformações mais afastada da nativa ( em solução ) e assim tem-se o maior alargamento. A medida em que a hidratação aumenta a distribuição de conformações se aproximam da amostra em solução e o alargamento vai se reduzindo.

Portanto o mecanismo de alargamento tipo "g-strain" pode explicar as observações feitas. Contudo um outro dado experimental obtido a partir das medidas com o derivado nitrosil-Mb poderia dar uma explicação alternativa para o alargamento de linha dependente da hidratação.

Na Figura 60 mostra-se que após a adição do gás NO na meta Mb além da diminuição da intensidade da linha do ferro com g ~ 6 houve também redução da largura de linha do sinal remanescente. Esse estreitamento da linha é dependente do grau de hidratação sendo mais efetivo em baixa hidratação ( Figura 61 ).

Esse resultado pode ser entendido se o NO coordena-se preferencialmente em moléculas de Mb com uma maior distorção conformacional, que de alguma maneira facilita o acesso do NO ao heme. Com a coordenação do NO o íon ferro (III) é reduzido para ferro (II) e deixa de apresentar absorção de RPE. Uma vez que as moléculas que tem maior distorção conformacional não estão mais contribuindo para o sinal de RPE em g ~ 6, somente o sinal residual

das conformações mais simétricas são observadas e a largura de linha correspondente é menor.

O fato do NO se ligar preferencialmente em determinadas moléculas indica que a distorção conformacional deve ser bem definida. Assim é possível esperar um número discreto de estados conformacionais com distorção na desidratação e não contínuo como sugerido pelo alargamento "g-strain".

O conceito de estados discretos de conformações vai de encontro com a proposição de Austin et al., 1975 da existência de subestados conformacionais.

De acordo com Frauenfelder et al., 1979 uma proteína em uma configuração de equilíbrio pode existir em vários subestados conformacionais. As proteínas em diferentes subestados tem a mesma estrutura global mas diferem em configurações locais. Rotações em torno de ligações simples ou mudanças de ligações de hidrogênio podem ocorrer. Subestados conformacionais tem a mesma função biológica, mas possivelmente com velocidades diferentes ( Austin et al., 1975 ).

A transição de um subestado para outro geralmente é feito vencendo uma barreira de energia potencial, e o comportamento dinâmico depende da temperatura. Em temperaturas suficientemente altas, a proteína move-se rapidamente interconvertendo-se de um subestado para outro, mudando a estrutura conformacional continuamente. Em baixa temperatura a maior parte da relaxação conformacional é perdida e cada molécula pode permanecer em um subestado particular ( Frauenfelder et al., 1979 ).

A hidratação deve desempenhar papel análogo a temperatura, ou seja, com sua diminuição há a redução de possibilidades de transição entre os subestados. A medida que a hidratação aumenta vai sendo restabelecida a possibilidade de interconversão entre os subestados até atingir a situação em solução ( análoga a altas temperaturas ).

A distribuição de subestados que surgem na desidratação podem ser modulados pela hidratação local de cada molécula. Numa hipótese simples em que somente a hidratação determinaria a conformação da proteína, poder-se-ia propor que com uma hidratação de 0 a 10% há somente moléculas com grande distorção conformacional ( subestado S, por exemplo ). Entre 10 e 20% de $H_2O$ existiria um outro subestado ( M ) com uma distorção conformacional menos acentuada que S e com uma largura de linha menor. Acima de 20% de $H_2O$ já estaria restabelecida a conformação que existe em solução ( subestado H ).

Na amostra seca existe predominantemente o subestado S e a largura de linha é a maior. Com uma hidratação de 9% devem existir também moléculas com hidratação local maior que 10% e que estariam no subestado M. A largura de linha resultante portanto vai depender da distribuição das populações nos subestados ( S e M ). Na situação real o número de subestados pode ser mais de três criando uma maior mistura de subestados conformacionais, em uma determinada hidratação.

Uma outra mudança observada na desidratação foi a redução de 65% da área da linha com g ~ 6. Isso ocorre porque parte das moléculas de meta Mb perdem a água que ocupa a sexta

coordenação do ferro. O gráfico da Figura 34 mostra que para uma hidratação em torno de 20% há um aumento significativo de moléculas que voltam a ter a $H_2O$ na 6ª coordenação do ferro (III).

Parte das moléculas de Mb que perderam a água da 6ª coordenação, na desidratação, vão dar origem ao hemicromo H com a coordenação do nitrogênio da histidina E7 na 6ª coordenação. Para isso ocorrer deve haver uma mudança conformacional aproximando a hélice E do heme.

Na Figura 35 é mostrado o comportamento da área do sinal de RPE do hemicromo H em função da hidratação. Em baixa hidratação há uma flutuação razoável dos valores obtidos , mas a quantidade obtida em alta hidratação tem valores menores e em solução não se detecta a existência desse hemicromo.

Esse tipo de resultado foi reportado para a meta Hb por Keilin & Hartree, 1952 a partir de medidas de absorção óptica e mais recentemente por Alter, 1983, a partir de medidas de espectroscopia fotoacústica.

Somente através da formação do hemicromo H não é possível explicar toda redução do sinal da meta Mb. Na Figura 37 está mostrado que a área total detectada por RPE ( meta Mb + hemicromo H ) sofre uma redução de cerca de 40% para hidratações menores que 20%.

Essa redução da área detectável por RPE na desidratação de meta Mb já havia sido observada por Yonetani & Schleyer, 1967, conforme mostrado na Figura 10. Esses autores não deram explicação sobre a razão desta redução. Propuseram, contudo, que na desidratação da meta Mb não há uma reação de um único passo ou seja, somente a

conversão meta Mb → hemicromo H, mas também envolve outros estágios que, segundo eles, precisavam ser identificados.

Lamy et al., 1976, observaram que em uma solução de meta Mb obtida de amostra liofilizada, da Sigma, existe uma fração de ferro dos grupos heme que estavam na forma 2+ ( oxi - Mb ). Recentemente Caracelli, 1987 associou o espectro de RPE constituído de um tripleto, formado na adição de NO a meta Mb, como tendo sua origem na pequena fração ( 13% ) de oxi Mb existente na solução de meta Mb ( amostra liofilizada Sigma ).

Em extensão aos resultados de Lamy et al., 1976 e Caracelli, 1987 propõe-se que a redução do paramagnetismo observada em hidratações inferiores a 20% para a meta Mb liofilizada é devido a formação de cerca de 40% de grupos heme com ferro na forma 2+. O ferro na forma 2+ seria a oxi-Mb e ou algum hemocromo formado. Essa proposição para a redução da área do sinal de RPE será novamente discutida na interpretação dos resultados da nitrosil-Mb.

Observou-se também o surgimento de uma linha com g = 4,3 na desidratação da meta Mb. Essa linha é atribuída ao íon ferro (III), S = 5/2 , em um estado de máxima rombicidade ( E/D = 0,33 ) ( Kotani & Morimoto, 1967 ) e está associada a proteína desnaturada. A amostra seca na estufa ( T = 105°C por 24 horas ) ( Figura 39 ) mostrou um aumento acentuado dessa linha e o desaparecimento das demais relacionado ao ferro (III). Na Figura 38 mostra-se que o complexo formado, que origina o sinal com g = 4,3 , é reversível na re-hidratação da amostra. Novamente em uma hidratação de 20% observou-se que o sinal decresceu consideravelmente. A

população responsável por essa absorção, contudo, é muito pequena, da ordem de 1% do total.

Finalmente na desidratação das meta Mb observou-se a formação de um radical livre. Na Figura 40 mostra-se que a intensidade do sinal decresce com o aumento do grau de hidratação. Acima de 0,45 g $H_2O$/g Mb não foi mais observado. Na meta Hb bovina esse radical livre mostrou comportamento idêntico ( Figura 57 ), a menos da intensidade que foi ligeiramente maior. Na meta Hb humana é bem observado em hidratações inferiores a 10%, e está sobreposto aos sinais do hemicromo P, formado nessa proteína.

Este radical livre não está associado diretamente ao íon ferro pois pode ser observado a temperatura ambiente, o que não ocorre com o sinal do ferro em hemoproteínas. Na tentativa de identificação do radical utilizou-se o método de "spin-trap" que detectou sua formação no processo de liofilização. Contudo com as características espectrais do aduto formado não foi possível identificá-lo ( Figura 44 ). Interessante notar que a hidratação na qual o radical não é mais detectado 0,45 g $H_2O$/g proteína, é muito próximo do valor bem aceito para o qual a camada de hidratação de proteínas está completa, 0,40 g $H_2O$/g proteína ( Kuntz & Kauzmann, 1974 ).

Assim pela dependência bem definida com a hidratação esse radical poderia se constituir em um padrão interno para determinação do grau de hidratação dessas hemoproteínas. Para confirmar essa proposição é de fundamental importância explicar o mecanismo de sua formação.

## 6.2. Metahemoglobina

A largura de linha ( $\Delta H_l$ ) para a absorção com g ~ 6 nas meta Hb não mostrou uma dependência bem definida com o grau de hidratação, como foi observado nas meta Mb. Observou-se contudo que as amostras desidratadas tem uma largura de linha maior que a amostra em solução indicando possível dependência da hidratação ( Figura 51 ).

O comportamento da largura de linha ( $\Delta H_l$ ) em baixa hidratação pode estar relacionado a necessidade de uma quantidade de água mais elevada para promoção de mudanças conformacionais na Hb. Além disso, as interações entre as subunidades da Hb desempenham papel importante na estabilização da conformação da proteína ( Dickerson & Geis, 1983 ) e um situação muito distinta da Mb deve existir.

Outra observação distinta da Mb é a formação do hemicromo P, na meta Hb humana. Nesse hemicromo há a coordenação de um átomo de enxofre da cisteína $\beta^{93}$ ( cadeia β, posição 93 ) na 5ª coordenação do íon ferro e implica no deslocamento da histidina proximal F8 ( $\beta^{92}$ - cadeia β, posição 92 ) que originalmente ocupa essa posição ( Rachmilewitz, 1974 ). Na 6ª coordenação do ferro deve sair a molécula de água e entrar o nitrogênio da histidina distal E7.

Esse tipo de hemicromo só pode ser formado nas cadeias β uma vez que nas cadeias α nas posições vizinhas a histidina F8 não há nenhum aminoácido contendo enxofre * ( Dickerson & Geis, 1983 ). Nos espectros da figura 47, da meta Hb humana, nota-se que o hemicromo H ( bi-histidina ) também é formado e deve originar das cadeias α, principalmente.

A proposição para a formação do hemicromo P foi baseado nas características espectrais de RPE ser idêntica aos do citocromo P-450, um sistema onde um dos ligantes axial do ferro é um átomo de enxofre ( Hill et al., 1970 ). E semelhante também a vários compostos baixo spin obtido de heme ( $Fe^{3+}$ ) onde um ligante é um mercapeptídeo e outro uma base nitrogenada ( Blumberg et al., 1972 ). Observou-se ainda que ele só pode ser formado a partir da interação de salicilato com Hb A ( normal ) ou Hb H ( talassemia α - ausência de cadeias α ) e cadeias β isoladas ( Rachmilewitz, 1974 ). Quando o enxofre da cisteína $\beta^{93}$ foi bloqueado com paramercúrio benzoato ( PMB ), nas cadeias β isoladas ou nas Hb A ou Hb H, não foi mais obtido o hemicromo P ( Rachmilewitz, 1974 ).

Rein et al., 1975 observaram em meta Hb a pH = 10,5 a formação de um complexo baixo spin com as mesmas características espectrais do citocromo P-450, o qual foi associado a coordenação de um átomo de enxofre de uma cisteína. O valor da rombicidade V/δ

---

Essa situação ocorre também nas mioglobinas.

( Capítulo V - item 3 ) obtido para o hemicromo P foi 0,94 enquanto para a meta Hb pH = 10,5 obteve-se 1,03 e para o citocromo P-450 , 0,87 ( Rein et al., 1975 ) indicando tratar-se de complexos semelhantes.

Ao adicionar-se N-etil maleimida ( NEM ), um reagente específico para enxofre, em uma solução de meta Hb, não houve mais a formação do hemicromo P após a liofilização, como ocorre nas amostras sem adição de NEM ( Figura 49 ).

Para a cisteína $\beta^{93}$ ligar ao heme, a hélice F teria que girar sobre seu eixo para posicionar o átomo de enxofre em direção ao átomo de ferro. Tal rotação deixaria expostos os grupos hidrofóbicos, originalmente dentro da molécula, ao solvente enquanto os grupos hidrofílicos se voltariam para dentro ( Peisach et al., 1972 ) ( Figura 64 ).

A hélice F deve girar cerca de 1/4 de volta para formar o hemicromo P. Esse giro ocorre devido as distorções conformacionais geradas pela desidratação. No entanto, a partir de um determinado nível de hidratação a proteína deve minimizar a energia de interação e expõe os resíduos hidrofílicos ao solvente e a hélice F retorna a sua posição original. No retorno da hélice F a coordenação do enxofre ao ferro é quebrada e a do nitrogênio ( histidina proximal ) refeita.

Com um mecanismo desse tipo é possível, pelo menos do ponto de vista qualitativo, entender a formação do hemicromo P e sua dependência com a hidratação.

Observa-se que o decréscimo da quantidade de hemicromo P ocorre a uma hidratação ligeiramente acima de 0,40 g $H_2O$/g Hb, concomitante com o aumento da absorção da forma meta ( Figura 47 ). E

perfeitamente plausível, portanto, a interconversão hemicromo P → meta com a hidratação.

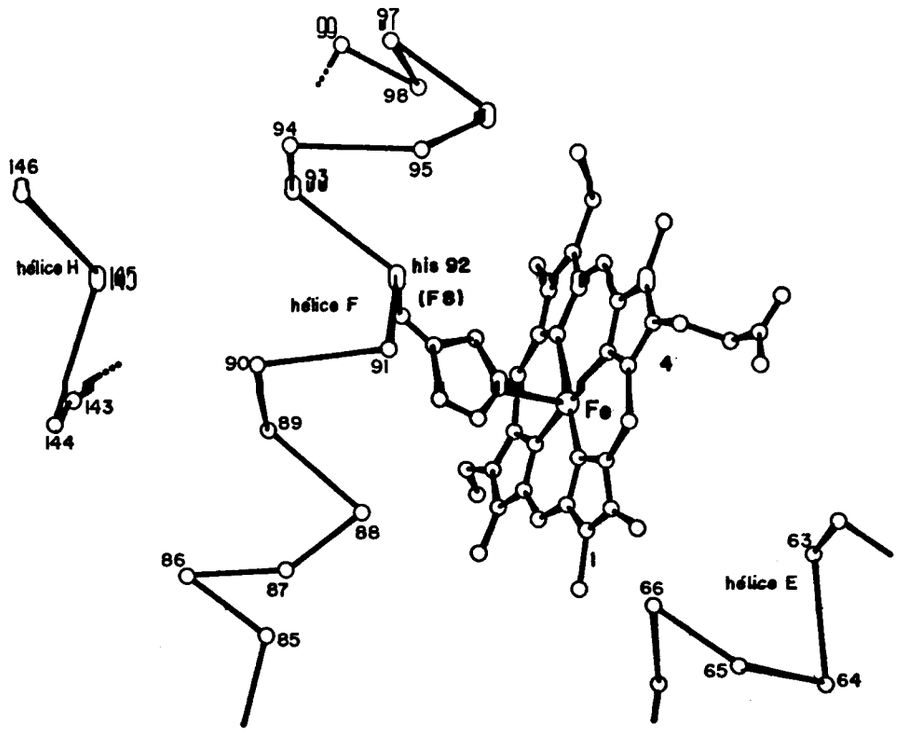
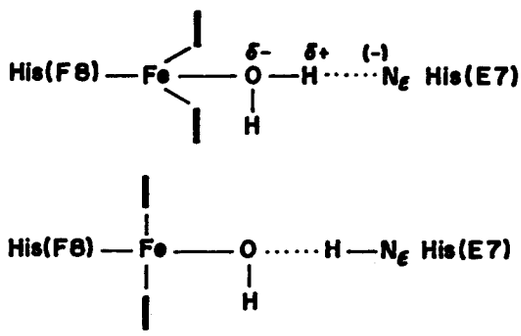



**Figura 64.** Região próximo ao heme na cadeia β da oxi Hb mostrando a hélice F, com o resíduo histidina proximal ( posição 92 ) coordenado ao ferro. O aminoácido da posição 93 é a cisteína ( $\beta^{93}$ ).

Os espectros obtidos para meta Hb bovina ( Sigma ) não mostraram a formação do hemicromo P, mas somente do hemicromo H ( bi-histidina ). O valor de hidratação no qual ocorre o aumento significativo da absorção da forma meta também é em torno de 0,40 g $H_2O$/g Hb.

Acima do valor de 0,40 g $H_2O$/g Hb, além do aumento da quantidade da forma meta, há a redução do sinal do hemicromo H e o aparecimento das linhas do derivado hidroxi-Hb ( Figura 48 ). Esse resultado pode ser entendido se o arranjo estereoquímico da histidina

distal E7 muda a ponte de hidrogênio existente entre a água e o $N_\varepsilon$ da histidina distal, que é fortemente básico. Como consequência desse processo um complexo baixo spin é formado com estrutura semelhante ao hidróxido ( Rein et al., 1975 ). No esquema abaixo mostra-se tal efeito:




A formação desse composto baixo spin ( hidroxi ) está conectado portanto com o rearranjo da região do heme, principalmente com a histidina distal, induzido pela hidratação.

Nota-se que nas soluções das meta Hb ( bovina e humana ) há uma fração de derivado hidroxi formado ( Figuras 47 e 48 ).

Os resultados obtidos com as proteínas meta Hb humana e meta Hb bovina ( Sigma ) são concordantes no que se refere a nível de hidratação necessário para a recuperação da forma meta, em torno de 0,40 g $H_2O$/g Hb. Nessa hidratação na meta Hb humana houve também o decréscimo da quantidade de hemicromo P enquanto na meta Hb bovina

houve o decréscimo do hemicromo H e o aparecimento do derivado hidroxi. A forma hidroxi deve ser formada também na meta Hb humana, nessa hidratação, pois as linhas de $g_z$ ( 2,45 ) e $g_x$ ( 1,91 ) do hemicromo P estão ligeiramente alargadas ( Figura 47 ) indicando superposição do sinal hidroxi ( $g_z = 2,56$ e $g_x = 1,83$ ).

O valor de hidratação de 0,40 g $H_2O$/g Hb é proposto a partir de resultados de NMR ( Kuntz, 1971 a, b ) como aquele no qual a camada de água ligada se completa na Hb. Essa concordância entre o valor de hidratação proposto para a camada de água ligada se completar e a detecção de grandes alterações nos parâmetros de RPE, relacionados a interconversão de complexos formados, mostram que somente após a formação da camada de água ligada é possível ocorrer mudanças conformacionais em direção a estrutura nativa ( existente em solução ).

Na meta Hb bovina ( Sigma ) não foi observada a formação do hemicromo P. Para verificar se essa diferença, em relação a meta Hb humana, era devido a problemas no método de preparação e liofilização das amostras executado no Laboratório de Biofísica mediu-se outras hemoglobinas ( obtidas da Sigma ). Na Figura 50 mostram-se os espectros da meta Hb equina e humana e também de uma meta Hb bovina ( preparada no Laboratório de Biofísica ). Observou-se a formação do hemicromo P nas três amostras, em quantidades diferentes ( a maior é na preparada no Laboratório de Biofísica ).

Uma vez que as quantidades de hemicromo P formado nas amostras Sigma são diferentes entre si e também quando comparadas com as obtidas no Laboratório de Biofísica acredita-se que esse fato está relacionado com a velocidade da retirada de água na liofilização.

Quando as hemoglobinas equina e humana ( Sigma ) foram dissolvidas em água e novamente liofilizadas observou-se um aumento considerável na quantidade de hemicromo P formado nessas amostras. Esse resultado é concordante com a proposição da dependência da velocidade da retirada de água da proteína para a formação do hemicromo P.

Contudo para a meta Hb bovina ( Sigma ) mesmo depois de dissolvida em água e liofilizada novamente não houve o aparecimento do hemicromo P. Medidas de titulação do grupo SH ( $\beta^{93}$ ) com para - cloro mercuri-PCMB ( método de Boyer, 1954 ) ( Figura 65 ) e reação com "spin-label", derivado da maleimida ( Figura 66 ), mostraram que o grupo SH ( $\beta^{93}$ ) está bloqueado na meta Hb bovina ( Sigma ) utilizada. Para a meta Hb humana ( preparada no Laboratório de Biofísica ) a titulação com PCMB mostrou que praticamente todo SH está livre ( números SH tituláveis por proteína = 1,82 ). Esse resultado também indica a reversibilidade, com a hidratação, do hemicromo P detectado na amostra de meta Hb humana desidratada. No espectro de RPE do "spin-label" adicionado a uma solução de meta Hb bovina ( Sigma ) observa-se somente o sinal típico do marcador em solução enquanto para a meta Hb humana ( Biof. ) além do sinal do marcador em solução aparecem as linhas típicas do "spin-label" ligado ao grupo SH ( $\beta^{93}$ ) ( Perussi, 1987 ).

A área total da absorção de RPE da meta Hb humana mostrou um decréscimo de cerca de 40% em hidratações menores que 0,40 g $H_2O$/g Hb, em relação a amostra em solução, semelhante ao ocorrido na meta Mb.

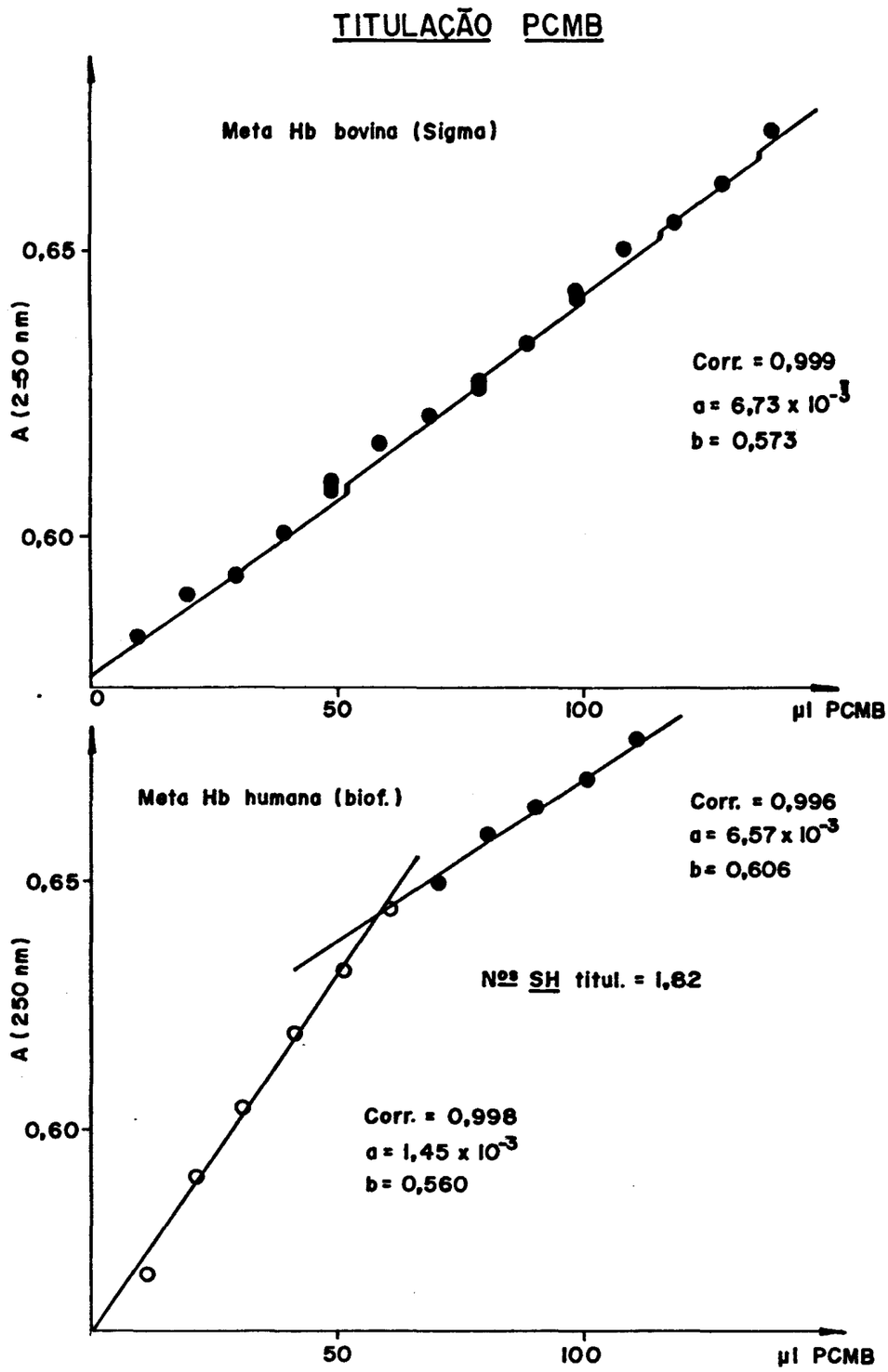



**Figura 65**. Titulação com PCMB ( método de Boyer, 1954 ) para a meta Hb bovina ( Sigma ) e meta Hb humana ( biof. )

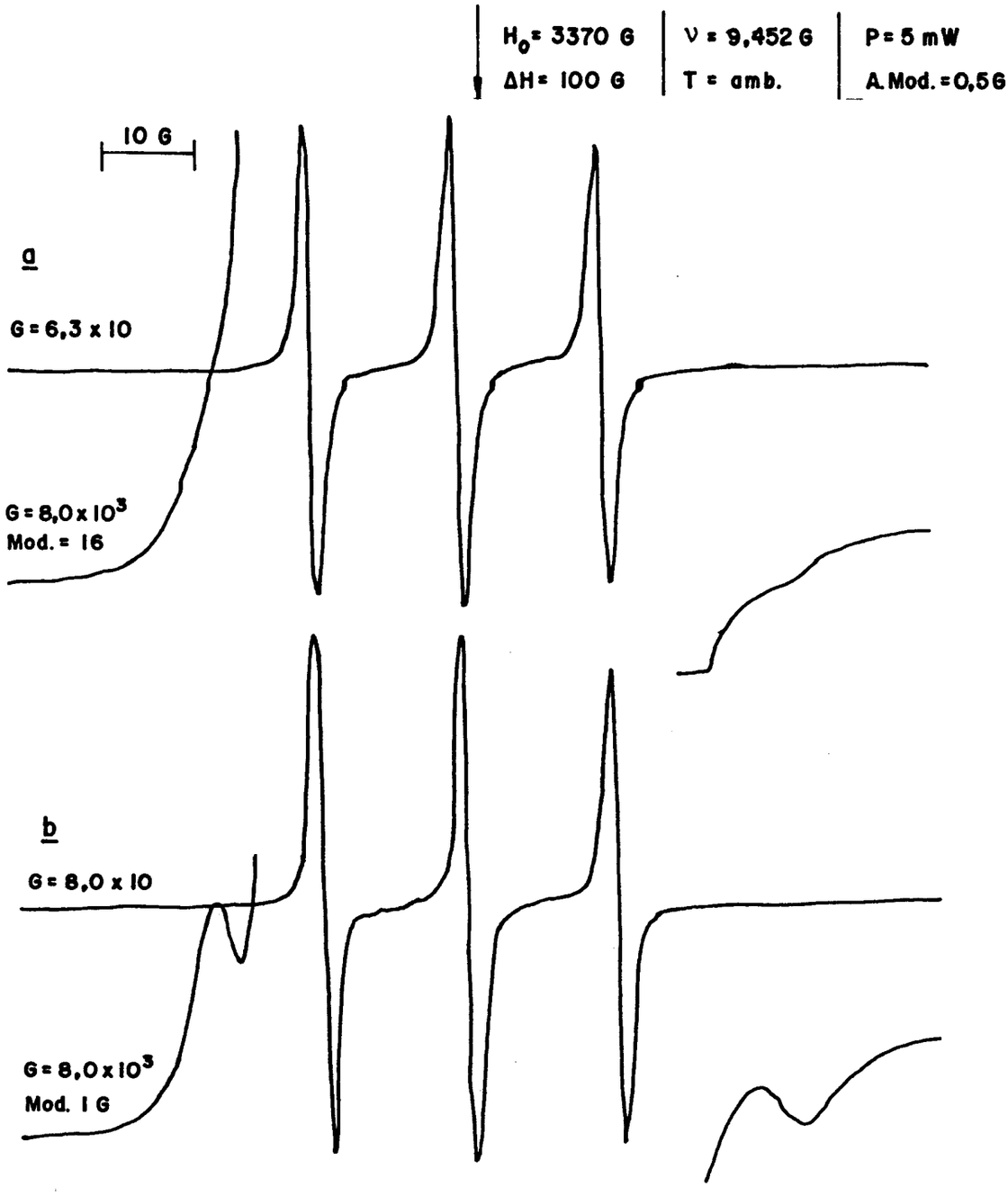



**Figura 66**. Espectros de RPE ( medidos a temperatura ambiente ) de solução de meta Hb ( 1 mM ) à qual adicionou-se spin-label ( 5 mM ), derivado da maleimida:

**a)** meta Hb bovina ( Sigma )

**b)** meta Hb humana ( biofísica ). As linhas que aparecem ( com ganho = 8 x $10^3$ ) em campo magnético superior e inferior ao tripleto central são do "spin-label" ligado ao grupo SH ( $\beta^{93}$ ).

Haberditzl et al., 1961 demonstraram que a susceptibilidade magnética da meta Mb decresce consideravelmente na desidratação. Estimaram um valor de 2,91 magnétons de Bohr para o momento magnético efetivo da meta Hb desidratada.

Utilizando os valores do momento magnético em números de magnétons de Bohr ( n ) dados por Iizuka & Yonetani, 1970 e as frações populacionais obtidas por RPE dos derivados existentes em baixa hidratação e com o valor do momento magnético efetivo ( n = 2,91 ) proposto por Haberditzl et al. pode-se estimar a quantidade de moléculas com $Fe^{2+}$ que deve existir em baixa hidratação. Para o caso de S = 2 para o íon $Fe^{2+}$ n vale 4,9 e obtém-se

$$2,91 = 5,92 \times 0,05 + 1,73 \times 0,55 + 4,9 \times X_{Fe^{2+}}$$

$$X_{Fe^{2+}} = 0,34$$

Ou seja, 34% das moléculas na meta Hb desidratada devem estar com o ferro na forma 2+. A partir dos cálculos de RPE obteve-se que em torno de 40% das moléculas deveriam estar com o ferro reduzido.

Os resultados mostram boa concordância e indicam que o estado de spin das moléculas com $Fe^{2+}$ deve ser $2^+$ como no caso da desoxi Hb ( Iizuka & Yonetani, 1970 ).

Na meta Hb humana 95% das moléculas perderam a água da 6ª coordenação e deram origem aos hemicromos ( 55% ) e as moléculas com $Fe^{2+}$ ( 40% ). Na meta Mb 65% das moléculas perderam a água da 6ª coordenação originando hemicromos ( 25% ) e moléculas com $Fe^{2+}$ ( 40% ). A maior formação de hemicromos na meta Hb deve



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

estar associada ao hemicromo P, onde a coordenação do enxofre ao ferro das cadeias β deve impedir sua redução.

Da mesma forma que nas meta Mb a área do sinal com g = 4,3 mostrou uma dependência com o grau de hidratação. Contudo o gráfico da variação dessa área com o grau de hidratação ( Figura 56 ), mostrou um máximo mais definido em torno de 0,15 g $H_2O$/g Hb. Apesar do número de moléculas responsável por esse sinal ser uma fração muito pequena do total detectado na meta Hb ( e meta Mb ) trata-se de um complexo muito estável ( associado a proteína desnaturada ). A possibilidade da hidratação "renaturar" essas moléculas dá mais uma indicação da capacidade da água gerar mudanças conformacionais significativas.

## 6.3. Nitrosil Mb

Conforme mostrado na literatura é possível correlacionar alterações no espectro de RPE do NO com mudanças conformacionais em hemoproteínas ( Kon, 1975; Louro et al., 1979 ). Dessa forma, poder-se-ia através de um novo "label" acompanhar as possíveis alterações provocadas pela hidratação da mioglobina.

Partiu-se do derivado meta Mb pois assim seria possível acompanhar a redução e as possíveis mudanças no espectro de RPE do ferro (III). Sabe-se também que é muito difícil obter uma amostra liofilizada de Mb com o ferro exclusivamente na forma 2+.

Na Figura 58 são mostrados espectros de amostras em diferentes graus de hidratação antes e depois da adição do NO. Observou-se que:

- em baixa hidratação após a adição do NO ocorre uma formação considerável do complexo $Fe^{2+}$ - NO e também a redução do sinal do ferro (III);

- em hidratações superiores a 25% após a adição do NO houve o decréscimo do sinal do íon ferro (III) mas o sinal de NO observado é muito reduzido. Essas amostras tiveram uma mudança de coloração de marrom ( sem NO ) para verde ( c/ NO ).

Os resultados obtidos puderam ser entendidos com base no mecanismo de reação do NO com meta Mb ( ou Hb ) proposto por Ehrenberg & Sczepkowsky, 1960 e Chien 1969 b, a partir de estudos em solução:

$$(\text{heme } Fe^{3+}) + NO \rightleftharpoons (\text{heme Fe NO})^{3+} \qquad (a)$$

$$(\text{heme Fe } NO^{3+}) \rightleftharpoons (\text{heme } Fe^{2+}) + NO^{+} \qquad (b)$$

$$(\text{heme } Fe^{2+}) + NO^{+} + 2\,OH^{-} \rightleftharpoons (\text{heme Fe } NO_2)^{+} + H_2O \qquad (c)$$

$$(\text{heme Fe } NO_2)^{+} + NO \rightleftharpoons \underbrace{(\text{heme Fe NO})^{2+}}_{\text{paramagnético}} + NO_2^{-} \qquad (d)$$

No mecanismo proposto para cada heme ( $Fe^{3+}$ ) são necessárias duas moléculas de NO para a reação ocorrer totalmente, isto é, para que o ferro seja reduzido ( para $Fe^{2+}$ ) e ocorrer a formação do nitrosil-ferroso-heme. Há ainda dependência da presença de grupos $OH^-$, e consequentemente do pH, para que a reação ocorra completamente.

As medidas foram feitas com amostras com hidratações menores que 0,50 g $H_2O$/g Mb ( praticamente toda água ligada da

proteína ) e portanto não há grupos $OH^-$ disponíveis, o que impede a realização do passo c da reação, proposta anteriormente. Dessa forma, a reação para no passo b com a formação do complexo diamagnético ( $Fe^{2+}$ - $NO^+$ ).

Nas amostras com hidratações entre 25 e 50% praticamente todo sinal de RPE desaparece e assim o composto verde formado deve ser o complexo diamagnético $Fe^{2+}$ - $NO^+$.

A formação de complexo $Fe^{2+}$ - NO ( paramagnético ) em baixas hidratações só pode ser entendida se o NO combinar diretamente com íons $Fe^{2+}$. Essa possibilidade existe e foi a explicação dada para a redução da área detectável por RPE nas amostras com hidratações abaixo de 20% da meta Mb ( obtido da medida da área total integrada - Figura 37 ).

O valor da redução, de acordo com os cálculos de área da meta Mb é cerca de 40%. Obteve-se para uma amostra de meta Mb liofilizada ( ~ 0,12 g $H_2O$/g Mb ) que 26% dos grupos heme presentes na amostra deram origem ao complexo $Fe^{2+}$ - NO. Nota-se assim boa concordância entre a hidratação onde é possível obter sinal razoável de $Fe^{2+}$ - NO ( abaixo de 25% ) e onde ocorre a redução do paramagnetismo na meta Mb ( ~ 20% ). Também a quantidade formada de complexo de $Fe^{2+}$ - NO ( 26% ) e de redução do paramagnetismo ( ~ 40% ) é de razoável concordância.

Ao dissolver em água a nitrosil-Mb ( $Fe^{2+}$ - $NO^+$ ) de coloração esverdeada ( formada em altas hidratações ), e adicionar nova quantidade de NO nessa amostra obteve-se o sinal do complexo $Fe^{2+}$ - NO, de acordo com os passos c e d da reação proposta por Ehrenberg & Sczepkowsky e Chien.

Na sequência de experimentos realizados foi possível acompanhar todos os passos da reação da meta Mb com NO e inclusive identificar pela primeira vez, o intermediário $Fe^{2+}$ - $NO^{+}$.

Foi feito a tentativa de quantificar o sinal $Fe^{2+}$ - NO, nas diferentes hidratações porém há uma flutuação considerável nos resultados ( abaixo de 25% de $H_2O$ ). Observou-se também razoável dispersão para o comportamento da formação do hemicromo na desidratação da meta Mb ( Figura 35 ) enquanto o cálculo da forma meta mostra um comportamento com pouca flutuação ( Figura 34 ). Uma possível explicação seria que na desidratação da meta Mb há sempre um número constante de moléculas que mantém a água da 6ª coordenação ( forma meta ) contudo as moléculas que perdem essa água têm duas possibilidades: dar origem a um composto onde o ferro está reduzido ( $Fe^{2+}$ ) ou formar hemicromos.

O espectro do NO obtido em baixa hidratação, na Mb, é caracterizado por um tripleto de linhas ( Figura 58 ). Esse tipo de espectro está associado a um complexo onde o ferro (II) está pentacoordenado ( Kon, 1975 ). Isso indica que a histidina proximal F8 afastou-se do ferro do heme. Essa observação mostra que a quebra da ligação ferro-nitrogênio ( histidina proximal F8 ) provocada pela desidratação pode ocorrer, tornando possível a entrada de um novo grupo em seu lugar.

Nas cadeias β da Hb pode entrar o átomo de enxofre da cisteína ( $\beta^{93}$ ), no lugar da histidina F8, formando o hemicromo P. Nas cadeias α da Hb e nas Mb não há aminoácidos com grupos reativos ( como o enxofre ) próximos ao heme e a possibilidade do ferro ficar sem o 5º ligante deve ser maior. Contudo não se descarta a

possibilidade do ferro nas cadeias β de algumas moléculas de Hb ficar sem o 5º ligante. A entrada do enxofre da cisteína $\beta^{93}$ requer um giro acentuado da hélice F e situações intermediárias podem ocorrer, por exemplo, num giro pequeno da hélice F a histidina F8 sairia mas o enxofre permaneceria distante para se coordenar ao ferro.

## 6.4. Testes Nitrosil-Hb

Conforme mostrado na Figura 63 as meta Hb humana, meta Hb humana com adição do NEM e meta Hb bovina ( Sigma ) mostraram após adição de NO na amostra liofilizada, o sinal tripleto do complexo $Fe^{2+}$ - NO. A formação desse complexo indica a presença de íons $Fe^{2+}$ nas meta Hb liofilizadas e que o composto é pentacoordenado.

# *Capítulo VII*

# *Conclusões*

## 7.1. Meta Mioglobina

**a)** A explicação para o aumento da largura de linha do sinal com $g \sim 6$ ( $\Delta H_1$ ) em função do decréscimo da hidratação ( abaixo de 0,20 g $H_2O$/g Hb ) é devido ao surgimento de conformações distintas para Mb desidratada, em comparação com a proteína suficientemente hidratada, gerando desvios da simetria axial em torno do íon ferro (III);

**b)** A redução de 65% da área do sinal com $g \sim 6$ , com hidratações menores que 20%, indicam que grande parte das moléculas de Mb perdem a água da 6ª coordenação, dando origem a outros complexos, um deles o hemicromo H (bi-histidina);

**c)** A formação do hemicromo H na desidratação é explicado admitindo que a hélice E da cadeia proteica da Mb se desloca em direção ao heme e o nitrogênio da histidina distal E7 se coordena ao ferro (III) na 6ª posição. Esse composto mostra um caráter reversível com o aumento da hidratação desaparecendo completamente em solução;

**d)** A área total de absorção de RPE ( meta Mb + hemicromo) mostra um decréscimo em torno de 40% para níveis de hidratação abaixo de 0,20 g $H_2O$/g Mb. Essa redução foi associada a redução do $Fe^{3+}$ para $Fe^{2+}$ em parte das moléculas de Mb desidratada. Essa proposição ficou evidenciada nos resultados do derivado nitrosil-

Mb onde somente para hidratações menores que 25% há a formação do complexo $Fe^{2+}$ - NO. Acima desse valor de hidratação formou-se somente o complexo $Fe^{2+}$ - $NO^{+}$ ( diamagnético ), a partir dos íons $Fe^{3+}$ que são reduzidos na reação;

**e)** A área do sinal com g = 4,3 ( associado a proteína desnaturada ), corresponde a aproximadamente 1% do total dos íons ferro (III) detectado por RPE, e mostrou um decréscimo para níveis de hidratação acima de 0,20 g $H_2O$/g Mb. O caráter reversível desse sinal com a hidratação revelou a capacidade da água em "recuperar" moléculas com acentuadas distorções conformacionais. Resultado semelhante foi observado nas meta Hb;

**f)** Observou-se a formação de um radical livre no processo de desidratação das meta Mb e meta Hb. A intensidade desse sinal mostrou dependência bem definida com a hidratação e pode vir a se tornar um padrão interno do nível de hidratação dessas proteínas. Não foi possível determinar o mecanismo de formação desse radical;

**g)** O valor observado de 0,20 g $H_2O$/g Mb como a hidratação crítica de mudanças nos parâmetros de RPE é compatível com a quantidade de $H_2O$ necessária para a completa formação da camada de hidratação ( Kuntz, 1971a ). Este valor de hidratação representa papel fundamental na estabilização da conformação "nativa" e é bem sentida pelo centro ativo da Mb.

## 7.2. Meta Hemoglobina

**a)** As amostras de meta Hb desidratada mostraram uma largura de linha do sinal com g ~ 6 ( $\Delta H_1$ ) maior que a amostra em

solução. Contudo a dependência bem definida de $\Delta H_1$ com o grau de hidratação não foi observado ( como na meta Mb ). Essa diferença de comportamento foi atribuído aos aspectos estruturais distintos entre as duas proteínas. Na Hb as interações entre subunidades devem desempenhar papel fundamental na estabilização da proteína;

**b)** A redução da área do sinal com g ~ 6 para meta Hb desidratada é em torno de 95%. Esse resultado mostra que na meta Hb quase toda água da 6ª coordenação é perdida na desidratação. Para valores de hidratação superiores a 0,40 g $H_2O$/g Hb houve um aumento significativo dessa área indicando mudanças conformacionais em direção a forma "nativa";

**c)** Na meta Hb humana houve a formação de dois dipos de hemicromos: H ( bi-histidina ) e P ( um dos ligantes é um enxofre da cisteína $\beta^{93}$ ). O hemicromo P pode ser formado somente nas cadeias β, onde há uma cisteína na posição 93 ( vizinha a histidina proximal 92 ). Nas cadeias α ( e na Mb ) não há resíduos de aminoácidos contendo enxofre próximo ao heme e o hemicromo P não é observado. Para a formação desse hemicromo há a necessidade da hélice F girar cerca de 1/4 de volta em torno de seu eixo para colocar o grupo SH na posição do anel imidazólico da histidina F8 e consequente coordenação com o $Fe^{3+}$. Observou-se que a fração percentual de hemicromos na meta Hb humana, em baixa hidratação ( < 40% $H_2O$ ) é aproximadamente 55% . Na meta Mb baleia foi em torno de 30%. A maior formação de hemicromos na Hb deve estar associado a formação do hemicromo P, que não deve permitir, nesse caso, a redução do ferro. Como nas cadeias α da Hb e nas mioglobinas não existe um grupo que substitua a histidina na ligação com o ferro o resultado da saída dessa histidina é a formação de um hemocromo

com a redução do ferro (III). Acima de 0,40 g $H_2O$/g Mb há uma redução significante do sinal do hemicromo P, e em solução praticamente desaparece;

**d)** Obsevou-se uma redução de cerca de 40% da área detectável por RPE nas amostras com baixa hidratação (0,40 g $H_2O$/g Hb). Na reação do NO com amostras em baixa hidratação também houve a formação do complexo $Fe^{2+}$ - NO, como na Mb, evidenciando a presença de moléculas com $Fe^{2+}$ disponíveis;

**e)** Da mesma forma que nas meta Mb houve ótima concordância entre os valores de hidratação ( ~ 0,40 g $H_2O$/g Hb ) onde ocorrem as alterações acentuadas na região do centro ativo ( detectadas por RPE ) e o valor no qual a camada de hidratação se completa ( Kuntz, 1971 ). A Hb, contudo, necessita de uma quantidade maior de água que a Mb para promover mudanças conformacionais em direção a estrutura nativa.

## 7.3. Nitrosil-Mb

**a)** Observou-se a formação significante de complexos $Fe^{2+}$ - NO somente nas amostras com graus de hidratação menores que 0,25 g $H_2O$/g Mb. Esse resultado indica a disponibilidade de íons $Fe^{2+}$ somente em baixa hidratação, concordante com a redução do sinal detectável por RPE observado na meta Mb nessa mesma região de hidratação.

**b)** Acima de 0,25 g $H_2O$/g Mb após a adição do NO a amostra tornou-se praticamente diamagnética ( com uma coloração esverdeada ) e o complexo formado é o $Fe^{2+}$ - $NO^+$. O mecanismo de

reação proposto por Ehrenberg & Schzepkowsky, 1960 e Chien, 1969 b para a reação de meta Mb ( ou Hb ) com NO, indica a necessidade de grupos $OH^-$ para se formar o complexo $Fe^{2+}$ - NO. Em baixa hidratação não há $OH^-$ disponíveis e a reação não se completa parando no intermediário diamagnético ( $Fe^{2+}$ - $NO^+$ ), identificado pela primeira vez. Em hidratações menores devido a disponibilidade de íons $Fe^{2+}$ o NO reage diretamente com estes íons e há a formação do complexo $Fe^{2+}$ - NO;

c) Ao dissolver em água o composto diamagnético ( $Fe^{2+}$ - NO - de coloração verde ) com a adição de nova quantidade de NO houve a formação de complexo $Fe^{2+}$ - NO, com a mudança de coloração da amostra para marrom-avermelhado, em plena concordância com a reação proposta por Ehrenberg e Chien ;

d) O tripleto de linhas apresentado pelo NO indica que o omplexo formado pelo $Fe^{2+}$ é pentacoordenado e que a histidina proximal F8 está afastada do heme.

## 7.4. Sugestões para continuidade dos estudos

Em continuidade ao estudo apresentado é de muito interesse enfocar os seguintes aspectos:

- Identificar os mecanismos de redução do $Fe^{3+}$ e da formação do radical livre na desidratação da meta Mb e meta Hb;
- Separar cadeias α e β da Hb e verificar se, na desidratação, a formação de $Fe^{2+}$ ocorre preferencialmente nas cadeias α.

- Estudar os complexos nitrosil-Mb em função do grau de hidratação utilizando pulsos de luz e medindo recombinação via RPE e absorção ótica para caracterizar os possíveis subestados S e M assumidos nesse trabalho.

- Estudar o derivado $Fe^{2+}$ - $NO^{+}$ identificado nesse trabalho com a utilização de outras técnicas, como absorção óptica, infravermelho, etc.

# *Apêndice I*

**Programa elaborado para o cálculo da segunda integral do espectro de RPE. Está incluída a possibilidade de correção de linha de base do espectro, quando necessário.**

```
        CHARACTER FILE*20
        INTEGER*2 J2
        DIMENSION X(500),Y(500),F(500),FS(500),FSM(500)
        TYPE '(A)', 'S NOME DO ARQUIVO = '
        ACCEPT '(Q,20A)', JF,(FILE(I:I),I=1,JF)
        CALL ASSIGN(2,FILE,JF)
        TYPE '(A)', 'S FORNECA Y0 = '
        ACCEPT *,Y0
        DELX = 0.889
        READ(2)
        READ(2)
        I = 0
1       I = I + 1
        READ (2,END = 1000) J2,X(I),Y(I)
        Y(I) = Y(I)-Y0
        TYPE *,X(I),Y(I)
        GOTO 1
1000    N = I - 1
D       Y(1) = Y(3)
D       Y(2) = Y(4)
        F(1) = Y(1)*(DELX/2.)
        DO I = 2,N
           DO J = 2,I
              F(I) = F(I) + (Y(J-1)+Y(J))
           END DO
           F(I) = F(I)*(DELX/2.)
        END DO
        CALL PLOT (1,1,N,X,F,0,1)
        A = F(N)/X(N)
        DO I = 1,N
           FS(I) = F(I)-(A*X(I))
        END DO
        CALL PLOT (1,1,N,X,FS,1,1)
        SOMA = 0.0
        FSM(1) = FS(1)
        SOMA = SOMA+FSM(1)
        DO I = 2,N
           FSM(I) = (FS(I-1)+FS(I))
           SOMA = SOMA+FSM(I)
        END DO
        SOMA = SOMA*(DELX/2.)
        TYPE *,'AREA =',SOMA
        STOP
        END
```

# *Referências Bibliográficas*


- AASA, R. & VÄNNGÅRD, T. (1975). Journal of Magnetic Resonance, **19**, 308-315.

- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. (1971). Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

- ALTER, G. (1983). The Journal of Biological Chemistry, **258**, 14960-14965.

- AUSTIN, R. H., BEESON, K. W., EINSTEIN, L., FRAUENFELDER, H. & GUNSALUS, I. C. (1975). Biochemistry, **14**, 5355-5373.

- BENNET, INGRAM, GEORGE & GRIFFITH (1955). Nature, **176**, 394.

- BIRKTOFT, J. J. & BLOW, D. (1972). J. Mol. Biol., **68**, 187.

- BLUMBERG, W. E. & PEISACH, J. (1971). In Genetical Functional and Physical Studies of Hemoglobins ( Arends, T., Bemski, G. & Nagel, R. L., eds. ) S. Karger, Basel, 224-231.

- BLUMBERG, W. E., PEISACH, J., RACHMILEWITZ, E. A. & BRADLEY, T. B. (1972). Proc. Intern. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Research, Cagliari ( Franconi, C., ed. ), Gordon and Breach, New York, 125-129.

- BOGATYRENKO, V. R. & LIKHTENSHTEIN, G. I. (1985). Biophysics, **30**, 1046-1050.

- BÖHM, S. & ABATUROV, L. V. (1977). FEBS Letters, **77**, nº 1, 21-24.

- BOYER, P. D. (1954). J. Amer. Chem. Soc., **76**, 4331.

- BRAUSSE, G., MAYER, A., NEDETZKA, T. , SCHLECHT, P. & VOGEL, H. (1968). The Journal of Physical Chemistry, **72**, nº 9, 3098-3105.

- BRUNAUER, S., EMMET, P. H., TELLER, E. (1938). J. Amer. Chem. Soc., **60**, 309.

- BULL, H. B. & BREESE, K. (1968a). Arch. Biochem. Biophys., **128**, 488.

- BULL, H. B. & BREESE, K. (1968b). Arch. Biochem. Biophys., **128**, 497.

- CALVO, R. & BEMSKI, G. (1976). The Journal of Chemical Physics, **64**, nº 5, 2264-2265.

- CANTOR, C. R. & SCHIMMEL, P. R. (1980). Biophysical Chemistry, Part I e II, W. H. Freeman and Company, E.U.A.

- CARACELLI, I. (1987). Tese de Doutoramento, IFQSC-USP, São Carlos, SP.

- CARDEW, M. H. & ELEY, D. D. (1958). "Fundamental Aspects of the Dehydration of Foodstuffs", The Chemical Society, London.

- CARRERI, G., GIASANTI, A. & GRATTON, E. (1979). Biopolymers, **18**, 1187-1203.

- CARRERI, G., GRATTON, E. , YANG, P. H. & RUPLEY, J. A. (1980). Nature, **284**, 572-573.

- CAUGHEY, W. S., FUJIMOTO, W. Y., BEARDEN, A. J. & MOSS, T. H. (1966). Biochemistry, **5**, 1255.

- CHIEN, J. C. W. (1969a). J. Chem. Phys., **51**, 4220-4227.

- CHIEN, J. C. W. (1969b). J. Am. Chem. Soc., **91**, nº 8, 2166-2168.

• COOKE, R. & KUNTZ, I. D. (1973). Annv. Rev. Biophys. Bioeng.

• DICKERSON, R. E. & GEIS, I. (1983). Hemoglobin. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California.

• DICKINSON, L. C. S. & SYMONS, M. C. R. (1983). Chem. Soc. Rev., **12**, 387-414.

• DOETSCHMAN, D. C., SCHWARTZ, S. A. & UTTEREBACK, S. G. (1980). Chem. Phys., **49**, 1-8.

• DOSTER, W., BEECE, D., BOWNE, S. F., DIIORIO, E., EISENSTEIN, L., FRAUENFELDER, H., REINISCH, L., SHYAMSUNDER, S., WINTERHALTER, K. H. & YUE, K. T. (1982). Biochemistry, **21**, 4831-4839.

• DOSTER, W., ANTON, B., RAINER, D., MANFRED, H. & EDGAR, L. (1986). Biophys. J., **50**, 213-219.

• EHRENBERG, A. & SZCZEPKOWSKI, T. W. (1960). Acta Chem. Scand., **14**, 1684-1692.

• EISENBERG, D. & KAUZMANN, W. (1969). The Structure and Properties of Water. Oxford University Press.

• FEHER, G. (1970). Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology, Gordon & Breach, New York.

• FRAUENFELDER, H., PETSKO, G. A. & TSERNOGLOU, D. (1979). Nature, **280**, 558-563.

• FRIEND, S. H. & GURD, F. R. W. (1979). Biochem., **18**, 4612.

• FROLOV, E. N., LICHTENSTEIN, G. I.. GOLDSNAKII, V. I., in Proceedings of the International Conference on Mössbauer Spectroscopy, Cracow,

1975, editado por Hrynkievicz, A. Z. & Sawicki, J. A. ( Akademi Gorniczo Hutnicza, Cracow, 1976).

- GRANT, E. H., KEEFE, S. E. & TAKASHIMA, S. (1968). J. Phys. Chem., **72**, 4373.

- HABERDITZL, W., HAVEMANN, R. & FELGENTREU, I. (1961). Z. Phys. Chem., **218**, 354-366.

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

- HEARSHEN, D. O., DUCHAM, W. R., SAWDS, R. H, & GRANDE, H. J. (1982). in Electron Transport and Oxygen Utilization ( C. Ho, ed. ), Elsevier, Amsterdam/New York, 395.

- HEIWZ, R. (1890). Virchows Arch. Path. Anat. Physiol., **122**, 100-124.

- HILL, H. A. O., RÖDER, A. & WILLIAMS, R. J. P. (1970). Naturwiss, **57**, 69-72.

- HOPFINGER, A. J. (1977). Intermolecular Interactions and Biomolecular Organization. John Wiley & Sons, Inc., E.U.A.

- HORI, H., IKEDA-SATO, M. & YONETANI, T. (1981). J. Biol. Chem. , **256**, 7849-7555.

- IIZUKA, T. & YONETANI, T. (1970). Advan. in Biophys., **1**, 157-182.

- JOESTEN, G. (1974). Hydrogen Bond. Marcel Dekker and Co.

- KEILIN, D. & HARTREE, E. F. (1937). Nature, **139**, 548.

- KEILIN, D. & HARTREE, E. F. (1952). Nature, **170**, 161.

- KELLER, H. & DEBRUNNER, P. G. (1980). Phys. Rev. Lett. **45**, 68-71.



BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

- KNOWLES, P. F., MARSH, D., RATTLE, H. W. E. (1976). Magnetic Resonance of Biomolecules. John Wiley & Sons, Ltd., London.
- KOENIG, S. H. & SCHILLINGER, W. E. (1969). J. Biol. Chem., **244**, 6520-6526.
- KON, H. (1968). J. Biol. Chem., **243**, 4350-4357.
- KON, H. (1969). Biochem. Biophys. Res. Commun. **35**, 423-427.
- KON, H. (1975). Biochem. Biophys. Acta **379**, 103-113.
- KOTANI, M. & MORIMOTO, H. (1967). Magnetic Resonance in Biological Systems, eds. A. Ehrenberg, B. G. Malmstrom and T. Vanngard, Pergamon Press, p. 135.
- KRUPJANSKI, Y., PARAK, T., GRAUBMANN, E. E., WAGNER, F. M., GOLDANSKII, V. I., MÖSSBAUER, R. L., VOGEL, H., LITTERST, F. J. 7 SWZDALEV, I. P. (1980). J. Phys. ( Paris ), Coll. **41**, C1-489.
- KUNTZ, I. D. (1971a). J. Am. Chem. Soc., **93**, 514.
- KUNTZ, I. D. (1971b). J. Am. Chem. Soc., 93, 516.
- KUNTZ, I. D. & KAUZMANN, W. (1974). Adv. Protein Chem., **28**, 239-245.
- JACOBSON, & KRUEGER (1975). Biochimica et Biophysica Acta, **393**, 274-283.
- JANZEN, E. (1980). Free Radicals in Biology, Vol. IV ( Pryor, W. A. editor ). Academic Press, Inc. New York.
- LAMY, M. T. , COSTA RIBEIRO, O. & NASCIMENTO, O. R. (1976). FEBS Letters, **71**, 29-32.

• LIJAS, A., KANNAN, K. K., BERGSTEN, P. C., WAARA, I., FRIDBORG, K., STANDBERG, B., CARLBOM, U., JARUP, L., LOUGREN, S. & PETEF, M. (1972). Nature ( New Biol. ) **235**, 131.

• LOURO, J. R. W., RIBEIRO, P. C., BEMSKI, G. (1981). Biochimica et Biophysica Acta, **670**, 56-63.

• MARICIC, S., PIFAT, G. & PRAVDIC, V. (1964). Biochim. Biophys. Acta, **79**, 293-300.

• MORE, C., BERTRAND, P. & GAYDA, J. P. (1987). Journal of Magnetic Resonance, **73**, 13-22.

• MORSE, R. H. & CHAN, S. I. (1980). J. Biol. Chem., **255**, 7876-7882.

• MREVLISHVILI, G. M. & PRIVALOV, P. L. (1969). In Water in Biological systems ( L. P. Kayuskin, Ed. ). Plenum, New York, p. 63.

• MUN, S. K., CHANG, J. C., DAS, T. P. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. LISA, **76**, 4842-4846.

• PAKE, G. & ESTLE, T. L. (1973). The Physical Principles of Electron Paramagnetic Resonance, W. A. Benjamin Inc., New York.

• PARAK, F., FINCK, P., KUCHEIDA, D. & MÖSSBAUER, R. L. (1981). Hyperfine Interact. **10**, 1075.

• PARAK, F. & FORMENCK, H. (1971). Acta Cryst. **A27**, 593.

• PEISACH, J., BLUMBERG, W. E. & ADLER, A. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **206**, 310-327.

• PEISACH, J., BLUMBERG, W. E. & RACHMILEWITZ, E. A. (1972). In Struktur und Funktion der Erythrozyten VI Internationales

Symposium ( Rapoport, S. & Jung, F., eds. ), Akademie Verlarg, Berlin, pgs. 121-128.

- PEISACH, J., BLUMBERG, W. E. & RACHMILEWITZ, E. A. (1975) Biochim. Biophys. Acta, **393**, 404-418.

- PEISACH, J., BLUMBERG, W. E., OGAWA, S., WITZ, E. A. & RACHMILEWITZ, E. A. (1971) J. Biol. Chem., **246**, 3342-3355.

- PERUSSI, J. R. (1987). Tese de Doutoramento, IFQSC-USP, São Carlos, SP.

- PERUTZ, M. F. (1978). Science, **201**, 1187-1191.

- PETHIG, R. (1979). Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials. John Wiley & Sons Ltd., London.

- POOLE Jr., C. P. (1983). Electron Spin Resonance. John Wiley & Sons., Inc., E.U.A.

- POOLE Jr., C. P. & FARACH, H. A. (1972). The Theory of Magnetic Resonance. John Wiley & Sons, Inc., E. U. A.

- RACHMILEWITZ, E. A. (1974). Seminars in Hematology, **11**, nº 4, 441-461.

- REIN, H., RISTAU, O. & RUCKPAUL, K. (1975). Biochimica et Biophysica Acta, **393**, 373-378.

- ROSEN, D. (1963). Trans. Faraday Soc., **59**, 2178.

- RUPPLEY, J. A., GRATTON, E., CARERI, G. (1983). TIBS, 18-22.

- RUPPEY, J. A., YANG, P. H. & TOLLIN, G. (1980). Water in Polymers. ACS Symnposium Series 127 ( Rowland, S. P. ed.), 111-132.

- SCHNEIDER, M. J. T. & SCHNEIDER, A. S. (1972). J. Membrane Biol., 9, 127-140.

- SINGH, G. P., PARAK, F., HUNKLINGER, S., DRANSFELD, K. (1981). Physical Review Letters, **47**, nº 9, 685-688.

- STRYER, L. (1975). Biochemistry, Freeman and Company, San Francisco.

- TAKASHIMA, S. (1969). In Principles and Techniques of Proteins Chemistry ( S. J. Leach, Ed. ). Academic Press, New York, Parte A, p. 291.

- TAYLOR, C. P. S. (1977). Biochimica et Biophysica Acta, **491**, 137-149.

- THOMAZ Jr., U. B. (1987). Tese de Doutoramento, IFQSC-USP, São Carlos, SP.

- TRITTELVITZ, E., GERSONDE, K. & WINTERHALTER, K. H. (1975). Europ. J. Biochem., **51**, 33-42.

- WALTER, J. A. & HOPE, A. B. (1971). Aust. J. Biol. Scil., **24**, 497.

- WATARI, H. (1967). In Magnetic Resonance in Biological Samples, eds. A. Ehrenberg, B. G. MALMSTROM e T. VANNGARD, Pergamon, Oxford, p. 149.

- WEISSBLUTH, M. (1967). Structure and Bonding, **2**, 1-25, Springer - Verlag, New York.

- WICKMAN, H. H., KLEIN, M. P., SHIRLEY, D. A. (1965). The Journal of Chemical Physics, **42**, nº 6, 2113-2116.

- YANG, P. H. & RUPLEY, J. A. (1979). Biochemistry, **18**, 2654-2661.

• YONETANI, T. & SCHLEYER, H. (1967). J. Biol. Chem., **242**, 3926-3933.

• YONETANI, T., DROTT, H. D., LEIGH Jr., J. S., REED, G. H., WATERMAN, M. R. & ASAKURA, T. (1970). J. Biol. Chem., **245**, 2998-3003.

• ZEYNEK, R. (1926). Noving Lekarskie, Posnan, **38**, 406.