

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS



one

INTERAÇÃO HIDROFÓBICA DE MIOGLOBINA
COM "SPIN LABEL" TEMPO

Oswaldo Baffa Filho

Dissertação apresentada ao IFQSC,
para obtenção do título de Mestre
em Física.

Orientador:

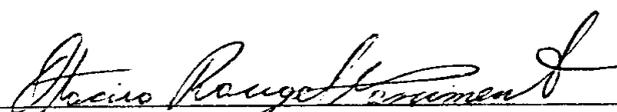
Otacíro Rangel Nascimento

Departamento de Física e Ciência dos Materiais
São Carlos - 1980

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE _____
OSWALDO BAFFA FILHO

APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 11 DE agosto DE 1980.

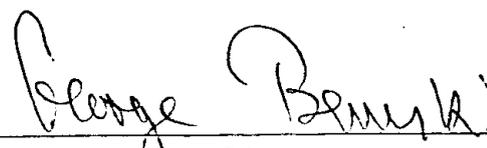
COMISSÃO JULGADORA:



Dr. Otaciro Rangel Nascimento - Orientador



Dr. Marcel Tabak



Dr. George Benski

A

meus pais,
minha esposa e
minha filha.

R E S U M O

Cristais de mioglobina tipo A foram dopados por processo de difusão com o marcador 2, 2, 6, 6 - tetrametil-1-oxil (TEMPO). Observa-se a existência de uma espécie de marcador isotrópica e outra anisotrópica, que exibe uma simetria axial com $A_{\parallel} = 23,4$ G, $A_{\perp} = 20,6$ G e $g = 2,0056$. São estimados os tempos de correlação rotacional $\tau_{\parallel} = 7,2 \cdot 10^{-9}$ S e $\tau_{\perp} = 4,8 \cdot 10^{-9}$ S. Uma análise do grau de hidrofobicidade dos resíduos, situados na parte interna da molécula, sugere como um possível sítio de localização para o TEMPO o bolso formado na região da tirosina 103 - hélice H e 151 - terminal 3HC. Este bolso tem tamanho suficiente para abrigar o radical e posição coerente com a heme, o que não acontece com outros sítios.

Observa-se uma mudança conformacional da proteína, induzida pela temperatura na região 20-30^o. Esta pode ser atribuída a um movimento da hélice H. Este resultado somado ao de outros autores indica uma mudança conformacional de grande extensão na molécula.

A B S T R A C T

Type A myoglobin single crystals were doped with the 2,2,6,6 - tetramethyl-1-oxyl (TEMPO) spin label by a diffusion process. We observed one isotropic spin label type, and another anisotropic type which shows an axial symmetry with $A_{\parallel} = 23,4\text{G}$, $A_{\perp} = 20,6\text{G}$, and $g = 2,0056$. The rotational correlation times are estimated to be $\tau_{\parallel} = 7,2 \cdot 10^{-9}$ sec. and $\tau_{\perp} = 4,8 \cdot 10^{-9}$ sec. A quantitative analysis on the hydrophobic nature of the residues situated inside the molecule suggests, as a possible site for the TEMPO, the pocket formed in the region of tyrosine 103-helix H and tyrosine 151-terminal 3HC. This pocket is of sufficient size to contain the radical and is positioned in such fashion as to be compatible with the heme group, this not holding for other sites.

A temperature induced conformational change in the protein is observed in the region $20-30^{\circ}\text{C}$, which may be ascribed to a shift of the H helix. This fact, together with the finds of other authors, seems to indicate a generalized temperature induced conformational alteration in the molecule.

AGRADECIMENTOS

Enumerar todas as pessoas que contribuíram para este trabalho seria praticamente impossível, no entanto não podemos deixar de citar aqueles que trabalharam mais intimamente conosco, dando uma contribuição marcante.

Ao Prof. Tabak pela sugestão do tema e pela paciência nas explicações dos aspectos químicos envolvidos no problema.

Ao Prof. Otaciro pela orientação segura com que conduziu o trabalho e pela amizade que este nos proporcionou.

Ao Prof. Renê Ayres pelas discussões acerca de vários aspectos dessa tese.

Aos nossos colegas do laboratório de Biofísica, Ignez, Izabel, Sanches e Pires pelo excelente convívio durante esses anos.

À Sra. Wilma e Sr. Rui pela presteza e perfeição com que datilografaram o manuscrito.

Ao Paulinho pelos desenhos desta tese.

Aos Setores Oficina Mecânica, Vidraria, Baixa Temperatura e Eletrônica pela presteza com que sempre nos atenderam.

À Iraides, minha esposa, que soube se desdobrar na tarefa de cuidar de nossa filha Lina, e nos estimular nos momentos de desânimo.

Ao povo brasileiro que através do CNPq, FAPESP, CAPES e FINEP forneceram o suporte financeiro necessário.

E finalmente, a todos os professores e funcionários do DFCM que não constam dessa página, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

INTRODUÇÃO

A primeira aplicação da técnica de EPR a cristais de mioglobina (Mb) foi apresentada por Bennett, Gibson e Ingram¹ em 1957. Neste trabalho os autores determinaram a orientação das hemes em relação aos eixos cristalinos através da análise da variação angular do espectro do Fe^{3+} presente na heme.

Desta data até os dias de hoje muito se tem feito com técnicas de EPR objetivando uma melhor compreensão da estrutura e funcionamento desta molécula. A maioria das aplicações desta técnica à molécula de Mb pode ser colocada em duas classes: de terminação da estrutura eletrônica do seu centro ativo e detecção de mudanças conformacionais induzidas por fatores externos como temperatura, pH, pO_2 , etc...

Essas informações são obtidas através do espectro de EPR do centro paramagnético presente na molécula. Como a mioglobina possui somente um desses centros junto à heme, a nossa informação sobre possíveis mudanças conformacionais ficam restritas à vizinhança próxima do Fe^{3+} . Um artifício frequentemente empregado para aumentar o nosso campo de "visão" na molécula é a marcação com centros paramagnéticos em outros sítios que não a região da heme, assim foram inicialmente empregados ions de transição², e.g. Cu^{2+} que se liga covalentemente à histidina his-A10, lisina-A14 e asparagina-GH4, e mais recentemente (1965) foram desenvolvidos os radicais (-N-O) que funcionam como marcadores de spin ("Spin labels") que podem ligar-se à molécula covalentemente ou não.

No primeiro capítulo apresentamos um resumo da teoria utilizada para abordar o problema do cálculo dos tempos de correlação rotacional, no capítulo dois fazemos uma descrição sumária da molécula de Mb e no terceiro capítulo são apresentados os resultados experimentais.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - O MÉTODO DO MARCADOR DE SPIN	1
1. A hamiltoniana em coordenadas angulares	4
2. Forma de linha e movimento rotacional	9
3. Difusão rotacional de Debye	15
4. Métodos práticos para a determinação do tempo de correlação rotacional	17
CAPÍTULO II - A MOLÉCULA DA MIOGLOBINA	25
CAPÍTULO III - MÉTODOS E RESULTADOS EXPERIMENTAIS	29
1. Amostra	29
2. Equipamento	30
3. Resultados	30
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	33
BIBLIOGRAFIA	42

CAPÍTULO I

O MÉTODO DO MARCADOR DE SPIN

Como vimos na breve introdução apresentada queremos colocar um marcador de spin em determinados sítios da molécula de tal maneira que este possa nos reportar o que está acontecendo na sua vizinhança. Este marcador para funcionar como tal terá que cumprir várias exigências. A primeira questão que surge, e talvez a mais fundamental, é até que ponto a informação transmitida pelo marcador é algo intrínseco à molécula ou algo criado pela sua presença.

Obviamente, todo marcador causa uma perturbação em sua vizinhança sendo na prática impossível obter-se a situação ideal. Consequentemente, toda informação obtida deve ser tratada tendo esse fato em mente.

Outras propriedades que os marcadores devem possuir são: estabilidade nas condições de pH, temperatura e concentração salina, encontradas nas moléculas biológicas. Devem ser sensíveis à polaridade, acidez, viscosidade e limitações de movimento. Além do mais é interessante que possuam um espectro relativamente fácil de ser interpretado.

Um radical que praticamente possui todas essas propriedades é o nitróxido (N-O) cuja fórmula geral é a seguinte:

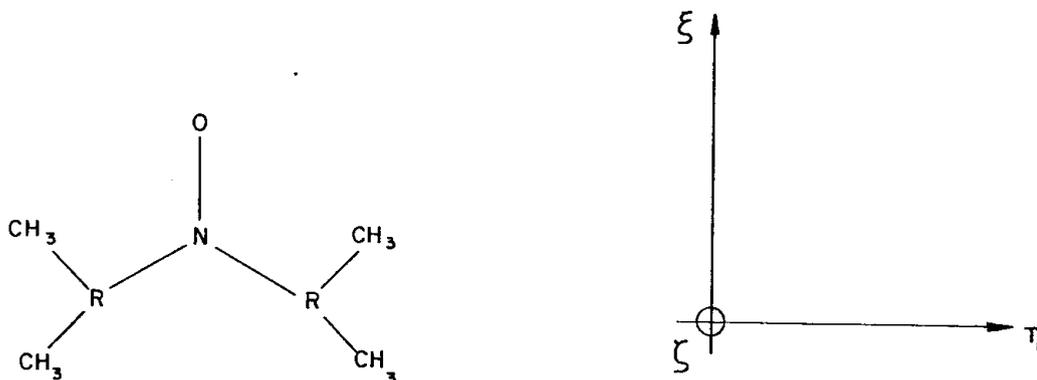


FIGURA 1

onde R_1 e R_2 são radicais convenientes.

O sinal de EPR obtido provém do elétron desemparelhado do oxigênio. Como o isótopo mais abundante do oxigênio não possui momento magnético nuclear, o desdobramento hiperfino deve-se à interação com o nitrogênio e prótons vizinhos, sendo a interação com o primeiro determinante, visto que de 80 a 90% da função de onda do elétron está confinada no orbital $2P\pi$ do nitrogênio.

Antes de continuarmos vamos precisar qual o nosso objetivo. Um radical N-O quando colocado numa matriz diamagnética pode executar movimentos rotacionais e estamos interessados em saber como estes movimentos mudam o aspecto do sinal de EPR para, a partir deste, tirarmos conclusões sobre o meio em que está imerso o radical.

Entre as teorias existentes^{3, 4} para abordar este problema podemos citar a de Bloch e Redfield na qual a interação dos spins com todos os graus de liberdade do sistema (relaxação spin-rede) é tratada como uma pequena perturbação. Esta condição limita o cálculo dos parâmetros de relaxação às situações em que os spins executam movimentos aleatórios rápidos. Isto pode ser posto de maneira quantitativa como segue:

$$\sigma\tau \ll 1 \quad (1)$$

onde τ é o tempo que caracteriza as rotações aleatórias e σ é a parte anisotrópica da interação magnética do radical em unidades de frequência. Esta condição significa que a frequência de reorientação do radical $\nu = \tau^{-1}$ tem que ser muito maior que a frequência de interação spin-rede.

Teorias mais recentes⁵ tem abordado a situação em que

$$\sigma\tau \gg 1 \quad (2)$$

nestas teorias o mecanismo básico de relaxação é uma modulação das interações magnéticas anisotrópicas do radical pelas suas rotações aleatórias, a interação com a rede pode ter qualquer magnitude e as amostras são magneticamente diluídas, possibilitando o cálculo do espectro de EPR a partir de um único radical em movimento.

Para amostras magneticamente diluídas a hamiltoniana (\mathcal{H}) de spin efetivo para o radical N-O tem a seguinte forma:

$$\mathcal{H} = \sum_{\alpha, \alpha' = x, y, z} \beta H_{\alpha} g_{\alpha\alpha'} S_{\alpha}^+ I_{\alpha'} S_{\alpha} - \hbar \gamma_n H_{\alpha} I_{\alpha} + \hbar \gamma \vec{h}(t) \cdot \vec{S} \quad (3)$$

Os símbolos que aparecem nesta expressão tem o seguinte significado: β = magneton de Bohr; $g_{\alpha\alpha'}$ e $A_{\alpha\alpha'}$ = tensor de interação Zeemann e hiperfina, respectivamente; γ_n e γ = razão giromagnética nuclear e eletrônica; \vec{I} = operador de spin nuclear; \vec{S} = operador de spin eletrônico e $\vec{h}(t)$ um campo estocástico.

Estamos incluindo nesta hamiltoniana além da interação Zeemann (nuclear e eletrônica) e hiperfina a interação com o campo estocástico $\vec{h}(t)$ gerado pelos dipolos vizinhos. Este campo provoca um pequeno alargamento das linhas de absorção e será tratado como um incremento imaginário na largura da linha de absorção.

O alargamento de linha devido ao termo Zeemann nuclear é muito menor que o devido à estrutura hiperfina para movimentos moleculares lentos. Vamos então desprezar os dois últimos termos da hamiltoniana acima.

Esta hamiltoniana, sem os dois últimos termos, escrita no sistema de eixos $\zeta\xi\eta$ (fig. 1) fixos na molécula tem a seguinte forma:

$$\mathcal{H} = \beta(g_{\xi\xi} H_{\xi} S_{\xi} + g_{\eta\eta} H_{\eta} S_{\eta} + g_{\zeta\zeta} H_{\zeta} S_{\zeta}) + A_{\xi} I_{\xi} S_{\xi} + A_{\eta} I_{\eta} S_{\eta} + A_{\zeta} I_{\zeta} S_{\zeta} \quad (4)$$

No sistema xyz do laboratório escolhendo a direção do campo magnético externo H coincidente com z e na aproximação de campo forte ($g\beta H \tau / \hbar \gg 1$), que nos permite desprezar termos que não comutam com S_z (não seculares), a hamiltoniana pode ser escrita como segue:

$$\mathcal{H} = (g_{zz} \beta H + A_{zx} I_x + A_{zy} I_y + A_{zz} I_z) S_z \quad (5)$$

1. A HAMILTONIANA EM COORDENADAS ANGULARES

Como estamos interessados na influência do movimento rotacional do radical sobre o espectro nada mais natural do que escrever a hamiltoniana (5) como função dos ângulos de Eüler, que seriam as novas coordenadas que descrevem o movimento.

A mudança de coordenadas pode ser feita transformando os tensores que aparecem em \mathcal{H}_0 do sistema de referência do laboratório (xyz) para o sistema de eixos moleculares fixos à molécula e, como este último pode ser determinado através de ângulos de Euler, teríamos a transformação desejada. No entanto, é mais prático expressar os tensores cartesianos (xyz) numa base esférica e depois então realizar a transformação de base desejada.

O livro de Edmonds⁶ nos ensina como construir tensores esféricos, como transformá-los de um sistema para outro, etc. Seguindo esta referência (pp. 53) vamos deduzir os elementos de matriz para rotações finitas em torno dos eixos do sistema de referência. A rotação do sistema S para o sistema S' através dos ângulos $(\alpha\beta\gamma)$ será estudada através de uma função $f(r,\theta,\phi)$ que descreve um campo escalar. Um ponto (r,θ,ϕ) no sistema S possui um valor associado $f = f(r,\theta,\phi)$. No sistema rodado S' esse ponto terá outras coordenadas (r, θ', ϕ') , mas o seu valor associado deve permanecer inalterado, sendo, no caso geral expresso por outra função $f'(r,\theta',\phi')$

$$f(r,\theta,\phi) = f'(r,\theta',\phi') \quad (6)$$

O efeito da rotação do sistema de referência pode ser expressado pela seguinte equação operacional:

$$D(\alpha\beta\gamma)f(r,\theta,\phi) = f'(r,\theta',\phi') = f(r,\theta',\phi') \quad (7)$$

a função f pode ser calculada substituindo os valores de $\theta'(\theta, \phi, \alpha\beta\gamma)$ e $\phi'(\theta, \phi, \alpha\beta\gamma)$ na expressão (7).

Suponhamos agora que a função f é autofunção do operador momentum angular \vec{L}^2 . Como este operador é invariante frente a uma rotação do sistema de referência, temos que no novo sistema S' a função f' que descreve o campo escalar é ainda autofunção de \vec{L}^2 com o mesmo autovalor ℓ . Então as autofunções $y_{\ell m}(\theta, \phi)$ do momentum angular transformam-se segundo o esquema:

$$D(\alpha\beta\gamma)Y_{\ell m}(\theta, \phi) = Y_{\ell m}(\theta', \phi') = \sum_{m'=-\ell}^{\ell} Y_{\ell m'}(\theta, \phi) \langle \ell m' | D(\alpha\beta\gamma) | \ell m \rangle \quad (8)$$

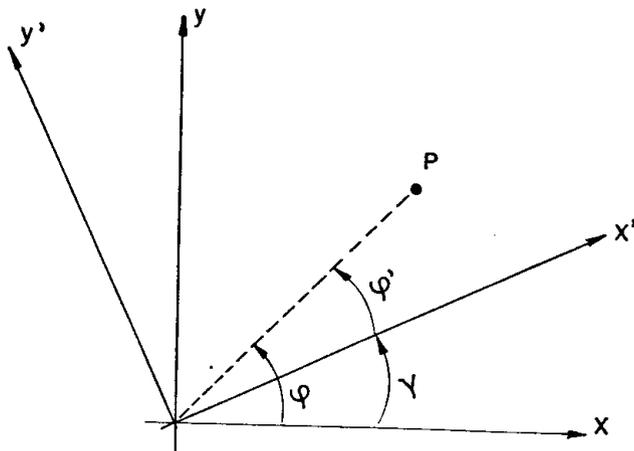
Uma expressão semelhante vale para as autofunções $u(j, m)$ do momentum angular total j ,

$$D(\alpha\beta\gamma)u(jm) = \sum_{m'=-j}^j u(j, m') \langle jm' | D(\alpha\beta\gamma) | jm \rangle \quad (9)$$

As expressões (8) e (9) mostram-nos que para um conhecimento da nova função, i.e., a função do campo escalar no sistema rodado, é fundamental o cálculo dos elementos de matriz $\langle jm' | D(\alpha\beta\gamma) | jm \rangle$. Precisamos então conhecer explicitamente o operador $D(\alpha\beta\gamma)$.

Suponhamos que o sistema S seja rodado de um ângulo γ em torno do eixo z . Um ponto com coordenada ϕ' no novo sistema S' terá no sistema S uma coordenada $\phi = \phi' + \gamma$. Mas como o ponto é o mesmo o valor da função será o mesmo.

$$f'(\theta, \phi') = f(\theta, \phi) \quad (10)$$



A expressão (10) leva-nos à seguinte relação diferencial

$$\frac{\partial}{\partial \gamma} D(\alpha\beta\gamma) f(\theta, \phi) = D(\alpha\beta\gamma) \frac{\partial}{\partial \phi} f(\theta, \phi) \quad (11)$$

mas como $L_z = -i\hbar \frac{\partial}{\partial \phi}$ temos que

$$\frac{\partial}{\partial \gamma} D(\alpha\beta\gamma) f(\theta, \phi) = D(\alpha\beta\gamma) \frac{i}{\hbar} L_z f(\theta, \phi) \quad (12)$$

O operador $D(\alpha\beta\gamma)$ para uma rotação em torno do eixo z é encontrado da solução da equação (12).

$$D(\alpha\beta\gamma) = C(\alpha\beta) \exp \frac{i\gamma}{\hbar} L_z \quad (13)$$

Usando o mesmo procedimento para os outros eixos temos:

$$D(\alpha\beta\gamma) = \exp \frac{i\alpha L_z}{\hbar} \exp \frac{i\beta L_y}{\hbar} \exp \frac{i\gamma}{\hbar} L_z \quad (14)$$

Os elementos de matriz do operador $D(\alpha\beta\gamma)$ são escritos de maneira compacta como segue:

$$\langle jm' | D(\alpha\beta\gamma) | jm \rangle = D_{m',m}^j(\alpha\beta\gamma) \quad (15)$$

$$D_{m',m}^j(0\beta 0) = d_{m',m}^j(\beta) \quad (16)$$

Como trabalhamos numa representação em que j_z é diagonal a expressão (15) tem a seguinte forma:

$$D_{m',m}^j(\alpha\beta\gamma) = \exp im'\alpha d_{mm'}^j(\beta) \exp im\gamma \quad (17)$$

onde

$$d_{mm'}^j(\beta) = \langle jm' | \exp \frac{i\beta j_y}{\hbar} | jm \rangle \quad (18)$$

A expressão (17) possibilita a definição de um tensor esférico de ordem ℓ , representado por $2\ell+1$ componentes, como uma grandeza que transforma-se segundo a relação:

$$T^{\ell}(jm) = \sum_{m'} D_{m',m}^{\ell}(\alpha\beta\gamma) T^{\ell}(jm') \quad (19)$$

Como m, m' podem assumir os $2j+1$ valores da projeção de j os coeficientes do somatório (19) formam uma matriz de dimensão $2j+1$ conhecida como matriz de Wigner.

Para uma rotação inversa à (19) temos:

$$\begin{aligned}
 T^{(jm)} &= \sum_{m'} D_{m',m}^j(-\alpha-\beta-\gamma) T^{(jm')} \\
 &= \sum_{m'} D_{mm'}^{j*}(\alpha\beta\gamma) T^{(jm')} \\
 &= \sum (-1)^{m-m'} D_{-m_1-m}^j(\alpha\beta\gamma) T^{(jm')} \quad (20)
 \end{aligned}$$

A construção de tensores esféricos de qualquer ordem ℓ começa com a definição do tensor de ordem 1 e a partir deste utilizando as regras de multiplicação de tensores chegamos aos de ordem mais elevada. O tensor esférico de ordem 1 é definido como:

$$\begin{aligned}
 T^{(1,1)} &= \frac{-1}{\sqrt{2}} (T_x + iT_y) \\
 T^{(1,0)} &= T_z \\
 T^{(1,-1)} &= \frac{1}{\sqrt{2}} (T_x - iT_y)
 \end{aligned} \quad (21)$$

e a regra de multiplicação entre dois tensores de ordem ℓ_1 e ℓ_2 é:

$$T^{(\ell,m)}(AB) = \sum_{m_1} C(\ell_1 \ell_2 \ell; m_1, m-m_1) A^{(\ell_1 m_1)} B^{(\ell_2, m-m_1)} \quad (22)$$

onde $C(\ell_1 \ell_2 \ell, m, m-m_1)$ são os coeficientes de Clebsch-Gordon que são diferentes de zero somente para $|\ell_1 - \ell_2| \leq \ell \leq |\ell_1 + \ell_2|$

Seguindo essa linha (fórmulas (21) e (22)), Nordio⁷ apresenta-nos uma tabela de expressões gerais para as componentes esféricas irredutíveis correspondentes a tensores cartesianos de segunda ordem.

A discussão anterior pode também ser estendida para operadores, assim as componentes I_x , I_y e I_z do operador \hat{I} podem ser escritas como operadores esféricos de maneira análoga a (21).

A hamiltoniana (5) possui somente as interações Zeemann e hiperfina que de modo geral são escritas como segue:

$$\vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \vec{S} = \sum_{ij} H_i g_{ij} S_j$$

$$\vec{I} \cdot \vec{A} \cdot \vec{S} = \sum_{ij} I_i A_{ij} S_j$$
(23)

Estas expressões podem ser encaradas como a contração de dois tensores, e.g., g_{ij} e $H_i S_j$, que são produtos escalares entre tensores e, portanto, invariantes frente a rotações do sistema de referência.

De acordo com a equação para a contração de tensores a hamiltoniana de um sistema magnético pode ser expressa como segue⁷:

$$\mathcal{H} = \sum_{\mu} \sum_{\ell m} (-1)^m F'_{\mu}(\ell, -m) A_{\mu}(\ell, m)$$
(24)

onde μ especifica a interação, $F'_{\mu}(\ell, -m)$ são as componentes esféricas irredutíveis do tensor cartesiano e $A_{\mu}(\ell, m)$ é o operador da interação.

Normalmente os operadores de spin são expressos no sistema de laboratório e os tensores de interação magnética no sistema de coordenadas moleculares. É conveniente expressar $F'(\ell, -m)$ em termos destas componentes moleculares $F(\ell, m)$. Usando a lei de transformação (20) temos:

$$\mathcal{H} = \sum_{\mu} \sum_{\ell, m, m'} (-1)^{m'} F_{\mu}(\ell, -m') D_{mm'}^{\ell}(\alpha\beta\gamma) A_{\mu}(\ell, m)$$
(25)

Aplicando estes resultados à hamiltoniana (5) temos⁸, finalmente:

$$\mathcal{H}(\Omega) = \hbar S_z \left[a(\Omega) + a_0(\Omega) I_z - a_{-1}(\Omega) I_1^{+1} - a_1(\Omega) I_1^{-1} \right]$$
(26)

onde os coeficientes $a(\Omega)$, $a_0(\Omega)$ e $a_{\pm 1}(\Omega)$ estão relacionados com os valores principais dos tensores A e g da seguinte maneira:

$$a(\Omega) = \frac{g\beta H}{\hbar} + \frac{\beta H}{\hbar} \left\{ D_{0,0}^2(\Omega) + \sqrt{\frac{2}{3}} \left[D_{0,2}^2(\Omega) + D_{0,-2}^2(\Omega) \right] \Delta g \right\} + i\delta$$

$$a_0(\Omega) = \frac{A}{\hbar} + D_{0,0}^2 \frac{\Delta A}{\hbar} + \sqrt{\frac{2}{3}} \left[D_{0,2}^2(\Omega) + D_{0,-2}^2(\Omega) \right] \frac{\Delta A_{\perp}}{\hbar} \quad (27)$$

$$a_{\pm 1}(\Omega) = \frac{\sqrt{3}}{2} D_{\pm 1}^2(\Omega) \frac{\Delta A}{\hbar} + \frac{1}{\sqrt{2}} \left[D_{\pm 1,2}^2(\Omega) + D_{\pm 1,-2}^2(\Omega) \right] \frac{\Delta A_{\perp}}{\hbar}$$

e

$$g = \frac{1}{3}(g_{\xi\xi} + g_{\eta\eta} + g_{\zeta\zeta}) \quad \Delta g = g_{\zeta\zeta} - g \quad \Delta g_{\perp} = \frac{1}{2}(g_{\xi\xi} - g_{\eta\eta}) \quad (28)$$

$$A = \frac{1}{3}(A_{\xi\xi} + A_{\eta\eta} + A_{\zeta\zeta}) \quad \Delta A = A_{\zeta\zeta} - A \quad \Delta A_{\perp} = \frac{1}{2}(A_{\xi\xi} - A_{\eta\eta})$$

$$I_1^{\pm 1} = \pm \frac{1}{\sqrt{2}} (I_x \pm I_y)$$

Nestas expressões $\Omega = (\alpha\beta\gamma)$ e δ é o incremento da largura de linha devido ao campo estocástico $h(t)$.

A hamiltoniana (26) juntamente com o conjunto de expressões (27) mostram claramente a dependência angular. Os níveis de energia são funções do ângulo que por sua vez é uma variável aleatória do tempo. A forma do sinal de EPR vai depender tanto das interações anisotrópicas (Δg , Δg_{\perp} , ΔA , ΔA_{\perp}) quanto destas orientações aleatórias. Estas rotações são caracterizadas pelo tempo de correlação rotacional τ , que depende da temperatura, viscosidade do meio, etc... As interações anisotrópicas podem ser caracterizadas pelo seguinte parâmetro:

$$\sigma = \max \left\{ \frac{\Delta g \beta H}{\hbar}, \frac{\Delta g_{\perp} \beta H}{\hbar}, \frac{\Delta A}{\hbar}, \frac{\Delta A_{\perp}}{\hbar} \right\} \quad (29)$$

Para os nitróxidos em banda X, $\lambda \approx 3$ cm, $H \approx 3.300$ G e $\sigma \approx 4,5 \cdot 10^8$ S⁻¹, de onde vemos que a condição de Bloch-Redfield(1) deixa de ser satisfeita para esses radicais quando

$$\tau > 10^{-9} \text{ s} \quad (30)$$

2. FORMA DE LINHA E MOVIMENTO ROTACIONAL

Toda informação obtida pelo marcador de spin é passada através de uma linguagem cifrada que é a linguagem dos espectros. Para extrairmos estas informações temos que saber inter

pretar os espectros corretamente. Além do desdobramento hiperfino o espectro apresenta formas de linha que dependem do tempo de correlação rotacional, que na maioria dos casos é o parâmetro experimental que fornece as informações desejadas.

Nesta seção daremos uma idéia geral de como pode ser abordado o problema de forma de linha.

Vamos imaginar a seguinte experiência de EPR: tem-se uma amostra num campo magnético constante $H_0 \hat{z}$ e aplica-se simultaneamente um campo alternado, de frequência na faixa de micro-onda, numa direção perpendicular a H_0 , e.g., $H_x \hat{x}$. Pergunta-se: Qual a potência média absorvida pela amostra num ciclo? A potência P absorvida instantaneamente será:

$$P = - \langle \vec{M} \rangle \cdot \frac{d\vec{H}_x}{dt} = - \langle M_x \rangle \frac{dH_x}{dt} \quad (31)$$

A potência média \bar{P} será a média de P num ciclo, i.e.:

$$\bar{P}(\omega) = - \frac{\omega}{2\pi} \int_0^{2\pi/\omega} \langle M_x \rangle \cdot \left(\frac{dH_x}{dt} \right) dt \quad (32)$$

Para o cálculo da potência precisamos conhecer $M_x(t)$, que pode ser obtido resolvendo a equação diferencial da densidade de matriz $\rho(t)$ que governa a evolução temporal do operador. Antes porém vamos fazer algumas simplificações na expressão de M_x .

No sistema do laboratório, M_x tem a seguinte forma:

$$M_x = \beta (g_{xx} S_x + g_{xy} S_y + g_{xz} S_z) \quad (33)$$

O elemento diagonal do tensor g_{xx} é da ordem de g (equação 28), enquanto g_{xy} e g_{xz} são da ordem de Δg . Consequentemente o 2º e 3º termos desta expressão são menores que o 1º por um fator $g/\Delta g \sim 10^2$ e podem ser desprezados. Então

$$M_x = \beta g_{xx} S_x \quad (34)$$

$$\bar{P}(\omega) = - \frac{\omega \beta g_{xx}}{2\pi} \int_0^{2\pi/\omega} \langle S_x \rangle \left(\frac{dH_x}{dt} \right) dt \quad (35)$$

A determinação da forma de linha implica num conheci

mento da evolução temporal da magnetização média que está ligada ao operador de Spin S_x . A equação de Heisenberg para $S_x(t)$ é a seguinte:

$$\frac{dS_x(t)}{dt} = \frac{i}{\hbar} \cdot [\mathcal{H}(\Omega(t)), S_x(t)] \quad (36)$$

O valor médio $S_x(t)$ pode ser obtido resolvendo a equação (36) para um $\Omega(t)$ qualquer e em seguida efetuando a média sobre todas as configurações possíveis. Isto porém é praticamente impossível e normalmente procedemos de maneira inversa, calculamos a média de $S_x(t)$ e depois resolvemos a equação (36). Para que isso seja possível um modelo "ad hoc" tem que ser feito para descrever o movimento do radical.

Para situações em que a equação (1) é satisfeita, a teoria de Bloch-Redfield é utilizada gerando uma equação para a matriz densidade ρ semelhante à (36)

$$\frac{d\rho_{\alpha\alpha'}}{dt} = -i [E, \rho]_{\alpha\alpha'} + R_{\alpha\alpha', \beta\beta'} \rho_{\beta\beta'} \quad (37)$$

onde E é a parte da hamiltoniana que contém somente operadores de spin e o campo magnético externo, α e β são índices dos estados de Spin e $R_{\alpha\alpha', \beta\beta'}$ é a matriz relaxação que contém todas as interações com a "rede", os seus elementos são independentes do tempo e obtidos através de teoria de perturbação, o que limita sua utilização à situações descritas pela equação (1).

Estamos particularmente interessados em situações em que a condição (1) não é cumprida, ie. $\sigma \gg 1$. Iniciaremos o estudo desta situação partindo de um caso bastante restrito que será generalizado posteriormente.

Suponhamos que o radical possa assumir somente um número finito de orientações discretas $\Omega_1, \Omega_2, \dots, \Omega_n$; a mudança de uma posição Ω_j para Ω_k é feita instantaneamente depois que o radical permaneceu um certo tempo na orientação Ω_j .

Para a descrição completa deste processo vamos definir duas grandezas: a) o tempo médio que o radical permanece em cada orientação Ω_j , $\tau(\Omega_j)$ onde $j = 1, \dots, n$, o recíproco deste tempo, $\tau^{-1}(\Omega_j)$, tem o significado de probabilidade de mudança de orientação por unidade de tempo; b) a probabilidade $p(\Omega_j, \Omega_k)$ de que ocorra uma transição da orientação Ω_j para Ω_k .

A probabilidade de ocorrer todas as transições é:

$$\sum_{k=1}^n P(\Omega_j, \Omega_k) = 1 \quad (38)$$

O tempo $\tau(\Omega_j)$ e a probabilidade $P(\Omega_j, \Omega_k)$ devem ser independentes do tempo para processos estacionários. Para um intervalo de tempo Δt , em que não ocorra mais de uma mudança de orientação

$$P_j(t) = \frac{\Delta t}{\tau(\Omega_j)} \quad (39)$$

é a probabilidade de que neste tempo o radical mude de orientação onde Δt tem que cumprir a seguinte condição:

$$\Delta t \ll \tau(\Omega_j) ; j = 1, 2, \dots, n \quad (40)$$

Seja o radical numa posição Ω_k no tempo t . A hamiltoniana que corresponde a esta situação é $\mathcal{H}(\Omega_k)$, vamos denotar o operador S_x na orientação Ω_k e tempo t como $S_x(\Omega_k, t)$. A equação (36) será usada para determinarmos a evolução temporal de $S_x(t)$ num tempo Δt que satisfaça a inequação:

$$\Delta t \omega_{mn} \ll 1 \quad (41)$$

onde $\omega_{m,n}$ é qualquer frequência permitida pela hamiltoniana $\mathcal{H}(\Omega_k)$. Se o radical está numa posição Ω_k no tempo t , esta posição será mantida durante o tempo Δt . A equação:

$$\frac{dS_x(\Omega_k, t)}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega_k), S_x(\Omega_k, t)] \quad (42)$$

juntamente com a condição (41) fornece o valor de S_x no tempo $t + \Delta t$,

$$S_x(\Omega_k, t + \Delta t) = \{S_x(\Omega_k, t) + \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega_k), S_x(\Omega_k, t)] \Delta t\} (1 - \frac{\Delta t}{\tau(\Omega_k)}) \quad (43)$$

onde o termo entre parentesis é a probabilidade do radical permanecer na orientação Ω_k .

Além da possibilidade do operador $S_x(\Omega_k, t)$ atingir o

valor $S_x(\Omega_k, t+\Delta t)$ é possível que outros operadores com mesmo valor mas de orientações diferentes Ω_j , mudem para Ω_k no tempo Δt . Isto pode ser calculado como segue:

$$S_x(\Omega_k, t+\Delta t) = \sum_{j \neq k} \frac{P(\Omega_j, \Omega_k)}{\tau(\Omega_j)} S_x(\Omega_j, t) \Delta t \quad (44)$$

Somando (43) com (44) e conservando somente os termos lineares em Δt , temos a expressão para a variação total de $S_x(t)$ no tempo Δt :

$$S_x(\Omega_k, t+\Delta t) - S_x(\Omega_k, t) = \left\{ \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega_k), S_x(\Omega_k, t)] - \frac{S_x(\Omega_k, t)}{\tau(\Omega_k)} + \sum_{j \neq k} \frac{P(\Omega_j, \Omega_k)}{\tau(\Omega_j)} S_x(\Omega_j, t) \right\} \cdot \Delta t \quad (45)$$

Dividindo ambos os lados por Δt e tomando o limite quando Δt tende a 0, Chegamos finalmente a um sistema de equações para $S_x(\Omega_k, t)$:

$$\frac{dS_x(\Omega_k, t)}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega_k), S_x(\Omega_k, t)] - \frac{S_x(\Omega_k, t)}{\tau(\Omega_k)} + \sum_{j \neq k} \frac{P(\Omega_j, \Omega_k)}{\tau(\Omega_j)} S_x(\Omega_j, t) \quad (46)$$

$K = 1, 2, \dots, n$

Precisamos de uma condição inicial para determinarmos $S_x(\Omega_k, t)$. Esta pode ser a probabilidade \mathcal{P}_k de achar o radical na orientação Ω_k no tempo $t=0$, então:

$$S_x(\Omega_k, 0) = \mathcal{P}_k S_x \quad (47)$$

O valor médio $\langle S_x(t) \rangle$ é obtido somando o valor $S_x(\Omega_k, t)$ sobre todas as orientações possíveis:

$$\langle S_x(t) \rangle = \sum_{k=1}^n S_x(\Omega_k, t) \quad (48)$$

A partir de (46) podemos generalizar a abordagem para um caso contínuo, em que o radical pode ocupar qualquer posição Ω , tomando o limite quando N tende a infinito. Vamos definir as seguintes funções:

$$\lim_{\Delta\Omega \rightarrow 0} \frac{\sum_i P(\Omega' \Omega_i)}{\Delta\Omega} = f(\Omega' \Omega) \quad (49)$$

onde $\sum_i P(\Omega' \Omega_i)$ é a soma das probabilidades de transição do radical ir de Ω' para Ω_i que está no intervalo $\Omega < \Omega_i < \Omega + \Delta\Omega$. A função (49) é a densidade de probabilidade de transição. Do mesmo modo:

$$\lim_{\Delta\Omega \rightarrow 0} \frac{\sum_i S_x(\Omega_i, t)}{\Delta\Omega} = \bar{S}_x(\Omega t) \quad (50)$$

O comportamento do radical é descrito pelo seguinte modelo: o radical fica na orientação Ω' durante um tempo médio $\tau(\Omega')$ e então muda instantaneamente para a nova orientação Ω com a probabilidade

$$\frac{f(\Omega' \Omega)}{\tau(\Omega')} ;$$

fazendo estas substituições na (46) temos:

$$\frac{d\bar{S}_x(\Omega, t)}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega), \bar{S}_x(\Omega t)] - \frac{S_x(\Omega t)}{\tau(\Omega)} + \int \frac{f(\Omega' \Omega)}{\tau(\Omega')} S_x(\Omega' t) d\Omega' \quad (51)$$

A condição inicial agora deve ser expressa com uma densidade de probabilidade de encontrar o radical no intervalo $\Delta\Omega$, então:

$$\mathcal{P}(\Omega) = \lim_{\Delta\Omega \rightarrow 0} \frac{\sum_i \mathcal{P}(\Omega_i)}{\Delta\Omega} \quad (52)$$

Dado o caráter contínuo da distribuição de variáveis Ω o valor médio $S_x(t)$ sobre todas as orientações é:

$$\langle S_x(t) \rangle = \int \bar{S}_x(\Omega t) d\Omega \quad (53)$$

3. DIFUSÃO ROTACIONAL DE DEBYE*

A equação (51) pode ser adaptada para descrever a difusão rotacional. Vamos inicialmente fazer algumas simplificações, a primeira é que $\tau(\Omega)$ é uma função independente de Ω , $\tau(\Omega) = \tau$, e a segunda é que $f(\Omega'\Omega)$ depende somente do módulo do vetor $\vec{\epsilon}$ que leva a orientação Ω' em Ω , e não depende de Ω' nem de Ω , então $f(\Omega'\Omega) = f(\epsilon)$.

A integral que aparece em (51) fica:

$$\frac{1}{\tau} \int f(\epsilon) \bar{S}_x(\Omega't) d^3\epsilon \quad (54)$$

A equação de difusão rotacional é obtida quando fazemos mais duas hipóteses concernentes a $f(\epsilon)$, a saber: existe um intervalo de tempo Δt tal que todos os momentos da função distribuição $f(\epsilon)$ além do segundo podem ser desprezados e $f(\epsilon) = f(-\epsilon)$, ie, a probabilidade de ir de Ω' para Ω é idêntica à da rotação no sentido inverso, para um intervalo $\Delta\Omega$.

Na integral (54) S_x é função do tempo e de Ω' , enquanto que o restante da expressão apresenta dependência somente em Ω' . Admitindo-se que $S_x(\Omega't)$ possa ser expandido em série de potências de Ω , temos:

$$\bar{S}_x(\Omega',t) = \exp(i\epsilon\vec{J}) \bar{S}_x(\Omega,t) \quad (55)$$

onde \vec{J} é um operador para rotações infinitesimais semelhante ao momento angular. Substituindo (54) e (55) em (51) temos:

$$\frac{d\bar{S}_x(\Omega t)}{dt} = \frac{i}{\hbar} \left[\mathcal{H}(\Omega), \bar{S}_x(\Omega t) \right] - \frac{\bar{S}_x(\Omega t)}{\tau} + \frac{1}{\tau} \int f(\epsilon) \exp(i\epsilon\vec{J}) S_x(\Omega t) d^3\epsilon \quad (56)$$

Expandindo $\exp(i\epsilon\vec{J})$ em potências de ϵ_α até segunda ordem a equação (56) pode ser reescrita como segue:

$$\frac{\partial \bar{S}_x(\Omega t)}{\partial t} = \frac{i}{\hbar} \left[\mathcal{H}(\Omega), \bar{S}_x(\Omega, t) \right] - \dot{\epsilon}_\alpha D_{\alpha\beta} \dot{\epsilon}_\beta \bar{S}_x(\Omega t) \quad (57)$$

onde

$$D_{\alpha\beta} = \frac{1}{2\tau} \int d^3\epsilon \epsilon_\alpha \epsilon_\beta f(\epsilon) \quad (58)$$

* Alguns autores referem-se a esta difusão como difusão rotacional Browniana.

A influência do movimento rotacional na evolução do operador $S_x(\Omega t)$ está contida no último termo da equação (57). Os termos $D_{\alpha\beta}$ são os elementos do tensor de difusão rotacional que para difusão esfericamente simétrica reduz-se a $D_{\alpha\beta} = D\delta_{\alpha\beta}$.

Nessa simetria (58) toma a forma:

$$\frac{\partial \bar{S}_x(\Omega t)}{\partial t} = \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega), \bar{S}_x(\Omega t)] + D \nabla_{\Omega}^2 \bar{S}_x(\Omega t) \quad (59)$$

onde ∇_{Ω}^2 é o laplaciano visto que $\mathcal{H}_{\alpha} = \partial/\partial\alpha$.

O valor $\bar{S}_x(\Omega t)$ fornecido pela equação (59) é uma média parcial de S_x sobre o processo de difusão rotacional. A média total $\langle S_x(t) \rangle$ é obtida fazendo a integral para todos os ângulos Ω , o que elimina a dependência em Ω .

A equação (51) e as equações (57) e (59) derivadas desta podem ser escritas de modo geral como:

$$\frac{d\bar{S}_x(\Omega t)}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega), \bar{S}_x(\Omega, t)] - L_{\Omega} \bar{S}_x(\Omega t) \quad (60)$$

onde o último termo possui toda informação sobre a interação com a "rede" contida no operador L_{Ω} e sua forma explícita depende do modelo adotado para descrever esta interação. No caso geral:

$$L_{\Omega} = \left\{ \frac{1}{\tau(\Omega)} - \int \frac{f(\Omega', \Omega)}{\tau(\Omega')} \dots \dots d\Omega' \right\} \quad (61)$$

Para a difusão rotacional contínua:

$$L_{\Omega} = \mathcal{H}_{\alpha} D_{\alpha\beta} \mathcal{H}_{\beta} \quad (62)$$

Se o radical pode assumir somente orientações discretas:

$$L_{\Omega} = \{L_{jk}\} ; L_{jk} = \begin{cases} -\frac{P(\Omega_j, \Omega_k)}{\tau(\Omega_j)} & \text{para } j \neq k \\ 1/\tau(\Omega_k) & \text{para } j = k \end{cases} \quad (63)$$

Da equação (51) podemos ver que o operador L_{Ω} determina a evolução da probabilidade $\mathcal{P}(\Omega t)$ do radical ter a orientação Ω no tempo t da seguinte maneira:

$$\frac{d \mathcal{P}(\Omega t)}{dt} = -L_{\Omega} \cdot \mathcal{P}(\Omega t) \quad (64)$$

4. MÉTODOS PRÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CORRELAÇÃO ROTACIONAL (τ)

Na seção anterior discutimos o modelo de difusão rotacional de Debye (A) para o radical nitróxido. Nesse modelo o operador L_{Ω} toma a forma $R \nabla_{\Omega}^2$ quando se pressupõe uma simetria esférica e um meio isotrópico envolvendo o marcador. Além disso, existem mais dois modelos bastante utilizados na simulação de espectros e cálculo de tempos de correlação rotacional (τ).

A variante mais simples do modelo A é conhecida como modelo de saltos não correlacionados (B). Ele pressupõe que a molécula possui uma dada orientação Ω' durante um tempo médio τ_a e então muda para a orientação Ω instantaneamente. A ocupação dos vários ângulos é equiprovável e não existe nenhuma correlação entre duas mudanças de orientação sucessivas. A equação de relaxação para este modelo pode ser obtida substituindo-se $\tau(\Omega) = \tau_a$ e $f(\Omega, \Omega') = 1/8 \pi^2$ na equação (51), obtendo-se o seguinte resultado:

$$\frac{d \bar{S}_x(\Omega t)}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}(\Omega), \bar{S}_x(\Omega t)] - \frac{\bar{S}_x(\Omega t)}{\tau_a} + \frac{1}{8\pi^2} \langle S_x(t) \rangle \quad (65)$$

O modelo de difusão livre (C) supõe que a molécula roda livremente durante o tempo $\tau = I/B$ (onde I é o momento de inércia e B o coeficiente de atrito do meio) entre duas orientações consecutivas.

A equação (64) para o modelo A tem a seguinte forma:

$$\frac{d \mathcal{P}(\Omega t)}{dt} = R \nabla_{\Omega}^2 \cdot \mathcal{P}(\Omega t) \quad (66)$$

onde ∇_{Ω}^2 é o operador Laplaciano sobre a superfície de uma esfera unitária e R é o coeficiente de difusão rotacional. Na aproximação de que a molécula é uma esfera rígida de raio "a" rodando num meio de viscosidade η , a relação de Stokes-Einstein fornece-nos

$$R = KT/8\pi a^3 \eta \quad (67)$$

A equação (66) é idêntica à de um pião esférico cujas autofunções são dadas por⁹:

$$\phi_{km}^L(\Omega) = \left[(2L+1)/8\pi^2 \right]^{1/2} \cdot D_{km}^{\ell}(\Omega) \quad (68)$$

com auto valores $RL(L+1)$, onde $D_{km}^{\ell}(\Omega)$ são as matrizes de rotações de Wigner.

Para uma molécula com um eixo de simetria a equação (66) é semelhante à do pião simétrico. Escolhendo o eixo z como o de simetria temos:

$$L_{\Omega} \phi_{km}^L = \left[R_{\perp} L(L+1) + (R_{\parallel} - R_{\perp}) \cdot K^2 \right] \cdot \phi_{km}^L$$

Os tempos de correlação rotacional para os três modelos têm as seguintes expressões:

$$\text{Modelo A} \quad \tau_L^{-1} = L(L+1)R$$

$$\text{Modelo B} \quad \tau_L^{-1} = L(L+1)R / [1+R\tau L(L+1)] \quad (69)$$

$$\text{Modelo C} \quad \tau_L^{-1} = L(L+1)R / [1+R\tau L(L+1)]^{1/2}$$

As expressões (69) A, B e C podem ser escritas como:

$$\tau_L^{-1} = B_L \cdot L(L+1)R \quad (70)$$

onde B_L é um parâmetro característico do modelo adotado e vale 1 para o modelo A, $[1+L(L+1)]^{-1}$ para o B, com $R\tau = 1$, e $[1+L(L+1)]^{-1/2}$ para o C, com $R\tau = 1$ também. Objetivando uma comparação entre os tempos de correlação fornecidos pelos vários modelos vamos definir o seguinte tempo de correlação:

$$\tau_R = (6 \cdot B_2 \cdot R)^{-1} \quad (71)$$

onde B_2 é o parâmetro de modelo calculado para $L = 2$, que é o termo importante na região de movimento rápido.

Várias correlações têm sido propostas para comparar os parâmetros experimentais e o parâmetro de modelo que caracteriza a rotação calculado teoricamente. Quase todas as relações envolvem de uma maneira ou de outra as posições das li

nhas de campo baixo ($I=1$) e campo alto ($I=-1$) da derivada do sinal de absorção do nitróxido.

Kuznetsov¹¹ propôs o seguinte parâmetro:

$$K = \frac{H_{\pm 1}(\tau) - H_{\pm 1}(\tau \rightarrow 0)}{H_{\pm 1}(\tau \rightarrow \infty) - H_{\pm 1}(\tau \rightarrow 0)} \quad (72)$$

onde $H_{\pm 1}(\tau)$ é a posição da linha em relação ao campo magnético, para $10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-8}$, a linha de campo alto é bastante achatada, sendo mais preciso determinar K a partir da linha de campo baixo. O denominador da (72) é a diferença entre a posição da linha quando o nitróxido está imobilizado ($\tau \rightarrow \infty$) e quando roda livremente ($\tau \rightarrow 0$).

A figura 2 ilustra o parâmetro K como função de τ calculado para o modelo de saltos não correlacionados.

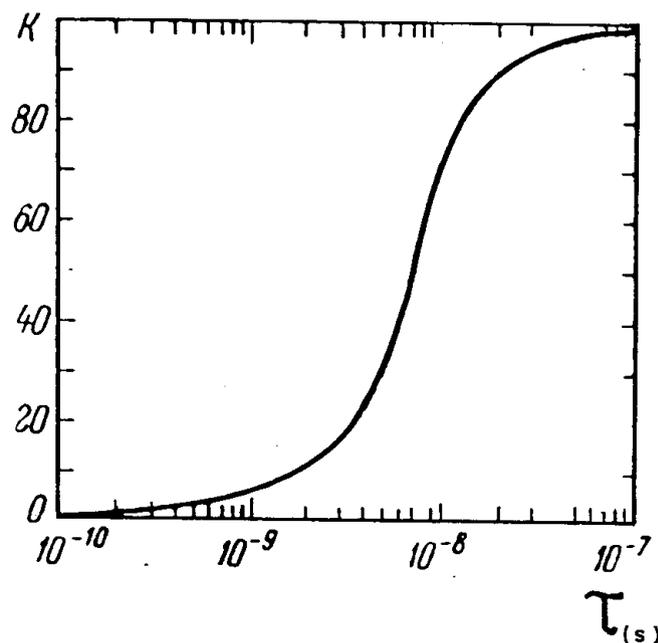


FIGURA 2 - Gráfico de k em função de τ , calculado através do modelo de saltos não correlacionados.

Mc Calley, Shimshick e Mc Connell¹² usaram o corrimento, $\Delta H_{\pm 1}(\tau)$, da linha em relação à posição desta completamente imobilizada,

$$\Delta H_{\pm 1}(\tau) = H_{\pm 1}(\tau \rightarrow \infty) - H_{\pm 1}(\tau)$$

A figura 3 mostra-nos este parâmetro calculado para dois modelos, difusão rotacional (linha contínua) e saltos não correlacionados (linha tracejada).

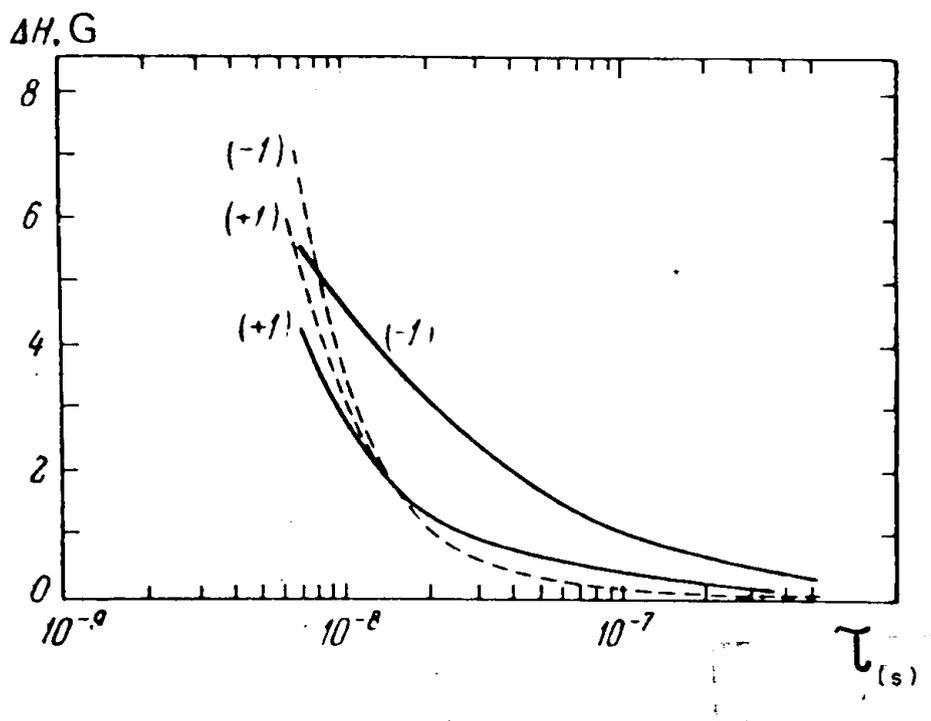


FIGURA 3 - Gráfico de $\Delta H_{\pm 1}$ em função de τ , as curvas tracejadas são para o modelo de saltos e as contínuas para a difusão rotacional de Debye.

Goldman, Bruno e Freed¹³ propuseram o parâmetro $S = A'_z/A_z$ para caracterizar o espectro. O valor de A_z é a meia distância entre as duas linhas externas no limite de rotação rígida e A'_z é a mesma grandeza para rotações lentas do marcador, a figura 4 mostra a definição destas grandezas.

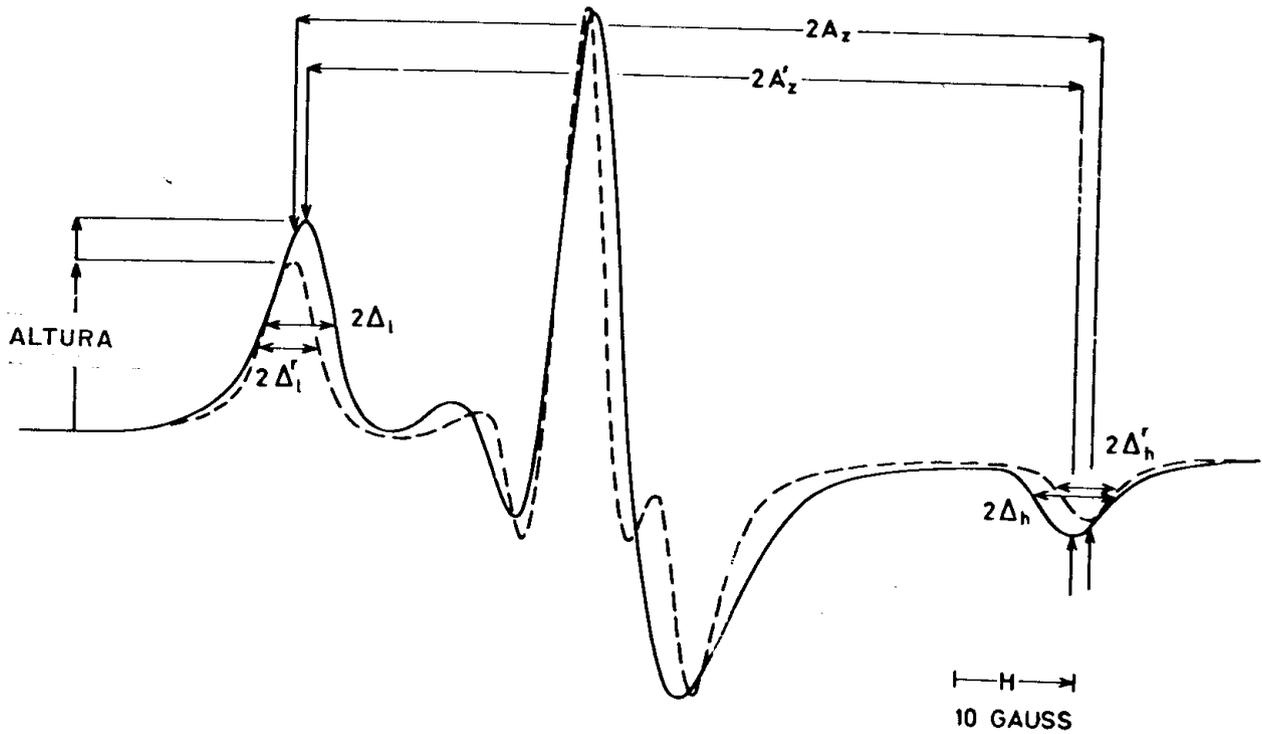


FIGURA 4 - Superposição de dois espectros mostrando a definição dos parâmetros utilizados na determinação de τ . A linha contínua representa um espectro parcialmente imobilizado e a linha tracejada completamente imobilizado.

Verificamos que S é uma função monotônica de τ_R , a figura 5 ilustra a variação de S com τ_R para os modelos de difusão rotacional contínua, de saltos não correlacionados e difusão livre, com $A_z = 32$ G e largura pico a pico das derivadas igual a 0,3 e 3 G. As curvas da figura 5 podem ser ajustadas pela expressão:

$$\tau_R = a (1-S)^b \quad (74)$$

A Tabela 1 fornece a e b para os três modelos em função da largura de linha, o ajuste tem um erro de 2, 3 e 5% no valor de τ_R para um dado S quando o cálculo é feito nos modelos de salto, difusão rotacional e livre.

As curvas da figura 5 também podem ser utilizadas para calcular τ_R no caso de difusão anisotrópica. Supondo Z o eixo de simetria e $R_{\parallel} > R_{\perp}$ podemos redefinir τ_R como:

$$\tau_R = (6 R_{\perp})^{-1} \quad (75)$$

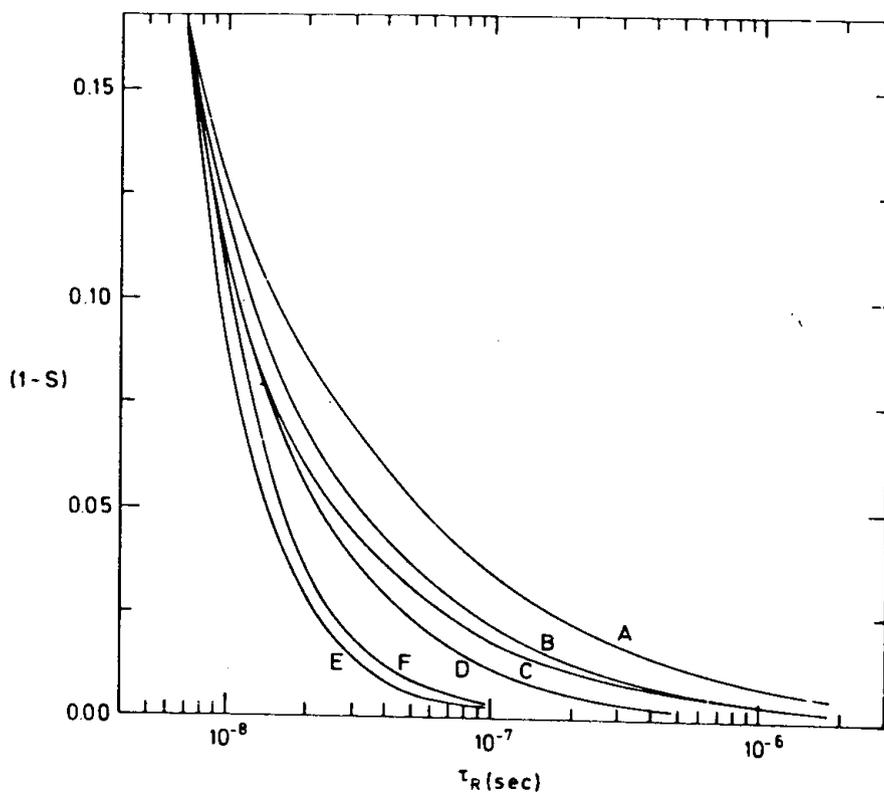


FIGURA 5 - Gráfico de (1-S) em função de τ_R , ver Tabela 1.

TABELA 1 - Parâmetros para o ajuste de τ_R

Modelo de Difusão	δ -largura de linha (G)	a	b	Curva
DEBYE	0,3	$2,57 \cdot 10^{-10}$	-1,78	A
	3,0	$5,4 \cdot 10^{-10}$	-1,36	B
	5,0	$8,52 \cdot 10^{-10}$	-1,16	-
	8,0	$1,09 \cdot 10^{-9}$	-1,05	-
LIVRE	0,3	$6,99 \cdot 10^{-10}$		C
	3,0	$1,10 \cdot 10^{-9}$		D
SALTOS NÃO CORRELACIONADOS	0,3	$2,46 \cdot 10^{-9}$		E
	3,0	$2,55 \cdot 10^{-9}$		F

Para um movimento completamente anisotrópico não existe uma expressão simples que permita o cálculo de τ_R , restando como única alternativa a simulação digital do espectro.

Para tempos de correlação rotacional da ordem de 10^{-7} s as expressões discutidas anteriormente para o cálculo de τ a partir dos vários parâmetros experimentais são bastante imprecisas. Freed e Mason¹⁴ propuseram um novo parâmetro que relaciona τ com a meia largura Δ , cf. figura 4. Eles mostraram através de simulação digital do espectro que:

$$\frac{\sqrt{3}}{2} \delta = |\gamma_e|^{-1} T_{2a}^{-1}$$

$$2\Delta_{\ell}^r = 1,59 \delta \quad (76)$$

$$2\Delta_h^r = 1,81 \delta$$

onde os subscriptos ℓ e h referem-se a campo baixo e alto respectivamente, o símbolo r significa aproximação do limite de espectro rígido e T_{2a}^{-1} é uma largura de linha invariante por rotações que nesse limite corresponde à largura de linha de um espectro de pó; em outras palavras T_{2a}^{-1} é um alargamento de linha que não pode ser atribuído aos tensores \vec{A} e \vec{g} .

Este resultado não depende de δ para $1,0 < \delta < 4,0$ G e parece não depender de A_z no intervalo de $27 < A_z < 40$ G nem de A_x , A_y e g . O parâmetro definido é:

$$W_i = \frac{\Delta_i}{\Delta_i^r} \quad (77)$$

onde i indica campo alto ou baixo, a figura 6 mostra a variação de W_i^{-1} em função de τ calculado através de um programa de computador.

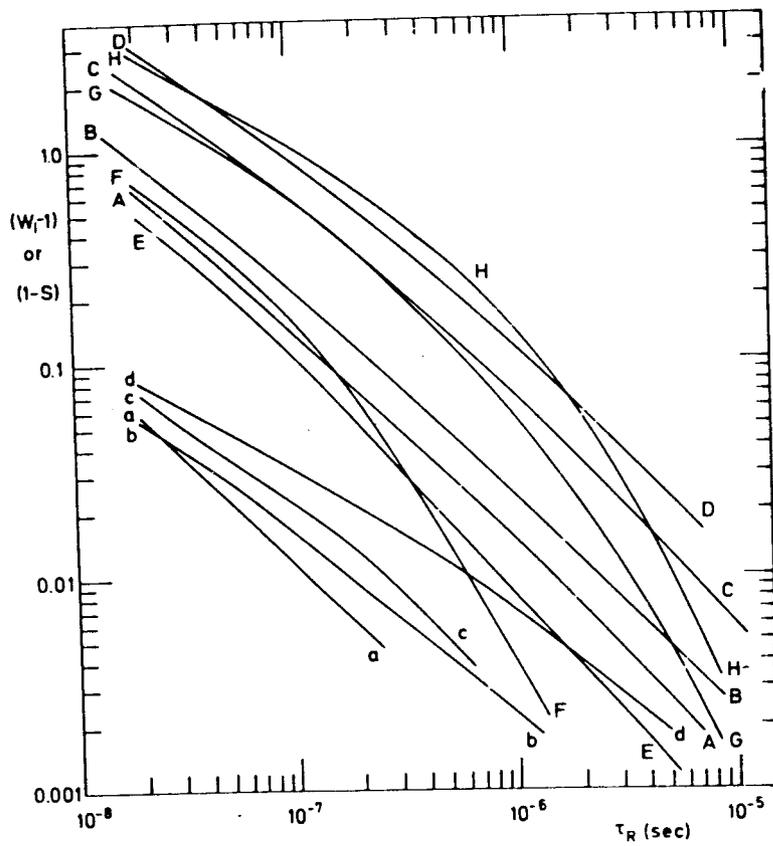


FIGURA 6 - Gráfico de $W_i - 1$ em função de τ_R . As curvas A e B, $\delta = 3,0G$, linha de campo alto e baixo, respectivamente, C e D idem A e B com $\delta = 1,0G$, calculados para o modelo de difusão livre. Curvas E, F, G e H correspondem a A, B, C e D respectivamente para a difusão de Debye. Também são mostradas as curvas de $(1-S)$ (a,b,c,d).

CAPÍTULO II

A MOLÉCULA DA MIOGLOBINA

A resolução da estrutura tridimensional da mioglobina (Mb) feita por J. Kendrew em 1957 (resolução de 6 Å) foi um importante passo em direção à compreensão da estrutura e funcionamento de outras grandes proteínas como, e.g., a hemoglobina. Até então a maior estrutura resolvida pelo raio X era a da vitamina B₁₂ que possui um peso molecular inferior aos 17800 Daltons da Mb. Esta é encontrada nas células musculares e ocorre em abundância nas dos mamíferos que mergulham, como a baleia, a foca, o hipopótamo, etc..., sua função fisiológica é o armazenamento e transporte do oxigênio na célula.

A Mb de baleia é composta de uma única cadeia polipeptídica com 153 aminoácidos e um grupo prostético, a heme, arranjados de forma globular. A cadeia polipeptídica possui 8 segmentos de hélice, orientados para a direita, aproximadamente lineares ligados entre si por 5 dobramentos que não apresentam estrutura de hélice (Fig. 1).

A heme (Fig. 2) é constituída de um átomo de ferro ligado à protorfirina IX, sendo que quando complexada com a cadeia polipeptídica o ferro liga-se na 5^a coordenação com nitrogênio da histidina (F8) proximal (Fig. 3) e na 6^a coordenação pode ligar-se ao O₂ formando a oximioglobina (Oxi-Mb) ao Co formando a carboximioglobina (Co-Mb), à água formando a metamioglobina (Met-Mb) e outros ligantes como o NO, N₃, etc...

Toda esta estrutura é bastante compacta, com os grupamentos polares dos aminoácidos da cadeia polipeptídica localizados na superfície externa da molécula, enquanto quase todos os grupamentos hidrofóbicos ou não polares estão no interior da molécula, afastados da exposição à água.

Num trabalho recente Matthew¹⁵ et.al. calcularam a acessibilidade de um solvente (água) para a Met-Mb. O conceito de acessibilidade (A) definido por Lee e Richards é o da "área superficial acessível" que consiste na "área ao redor de um átomo sobre o qual o centro da molécula do solvente pode ser colocado, possibilitando a manutenção dos contactos de Van der

Walls deste átomo sem a penetração de outro átomo na proteína.

O parâmetro A normalizado e expresso em porcentagem de alguns grupos de aminoácidos apolares ou que possuem regiões apolares da Met-Mb é mostrado a seguir:

Resíduo	Hélice	A
1 val	1 N A	38,6
66 val	9 E	26,8
103 Tyr	4 G	21,3
146 Tyr	23 H	0,0
151 Tyr	2 H C	33,0

Também foi mostrado por Takano¹⁶ através da análise de raio X (2,0Å) que a Met-Mb não possui nenhuma molécula de água interior, além daquela ligada à sexta coordenação do ferro.

Em nossos estudos utilizamos monocristais tipo A de Mb de baleia na forma meta (Met-Mb). Os cristais foram crescidos pelo método de Kendrew e Parrish¹⁷ que consiste em fazer uma solução concentrada da proteína (tipicamente 10%) e adicionar algum sal nesta solução. O sal tem a propriedade de reduzir a solubilidade da maioria das proteínas, em solução, favorecendo a cristalização.

Dependendo do sal adicionado, duas formas de cristalização podem ser obtidas com a Mb; para o sulfato de amônia obtemos a forma monoclínica chamada tipo A e para um tampão de fosfato, a ortorrômbica, tipo B.

A figura 4 ilustra o cristal tipo A mostrando a orientação relativa das duas hemes presentes na célula unitária. O valor das dimensões a, b e c e do ângulo β são dados na tabela abaixo para o cristal seco e molhado.

	a(Å)	b(Å)	c(Å)	β	Volume (Å ³)
Molhado	64,6	31,1	34,8	105,5°	68.500
Seco	61,6	26,9	33,9	105,5°	52.400

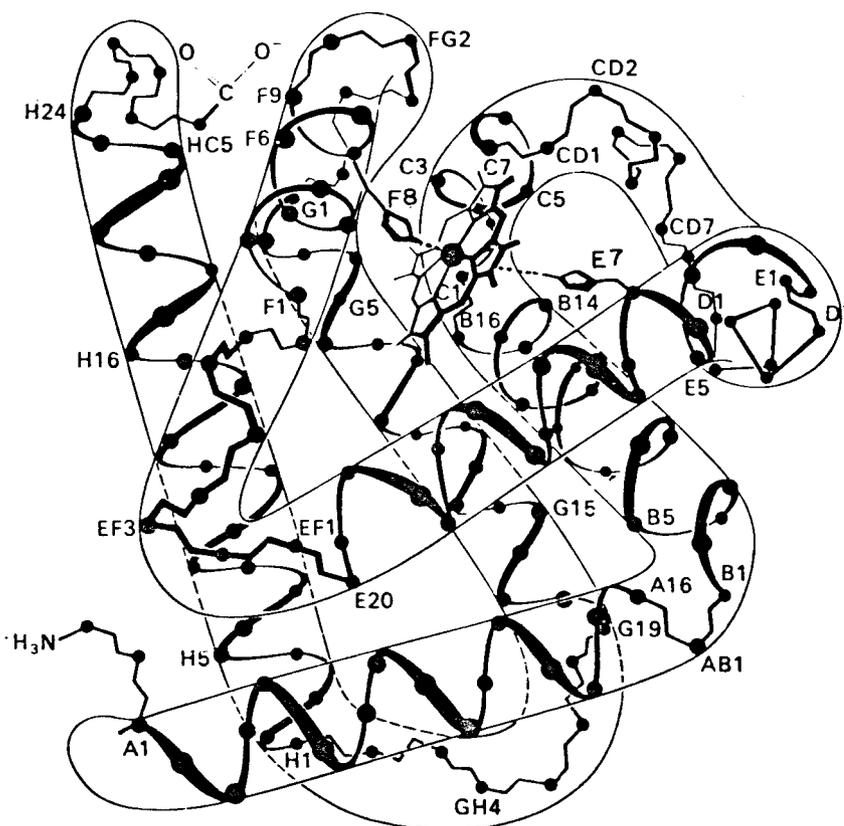
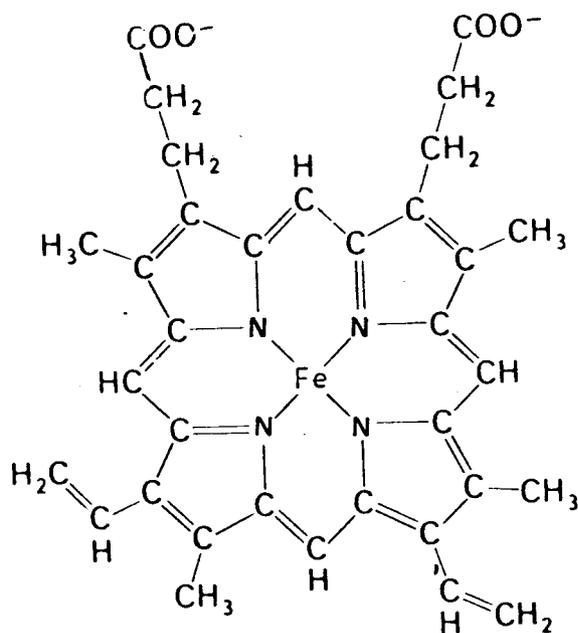


Figura 1 - Modelo da molécula de Mb mostrando os carbonos α , o grupo heme e alguns resíduos de aminoácidos.



Hemo
(Fe-protoporfirina IX)

Figura 2 - A heme mostrando o átomo de ferro com quatro das seis coordenações possíveis.

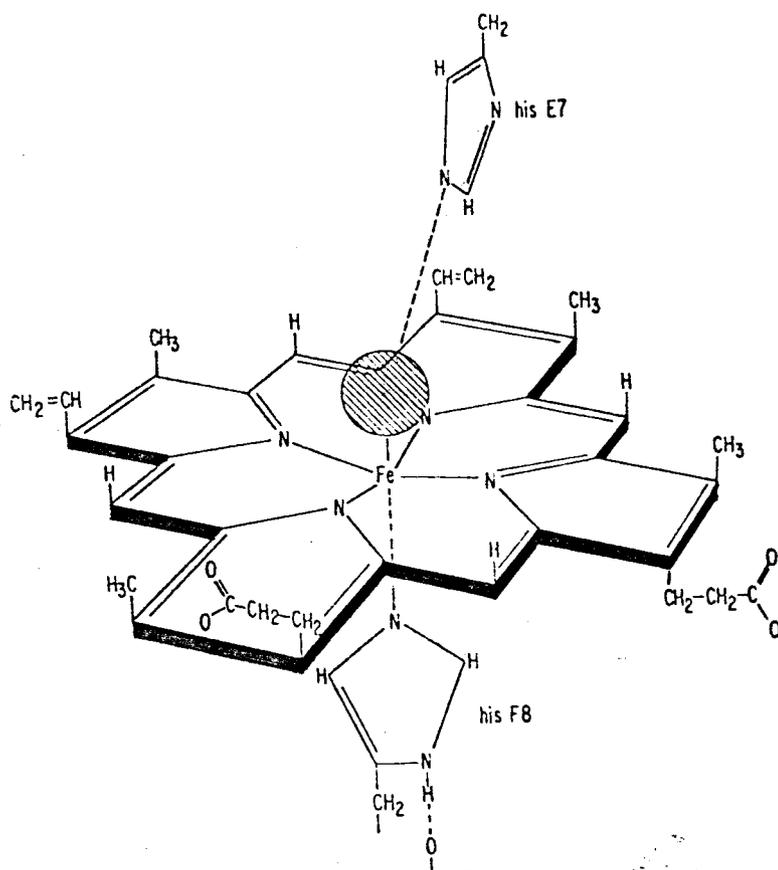


Figura 3 - A estrutura da heme com as histidinas proximal (F8) e distal (E7) a esfera hachurada é o sexto ligante.

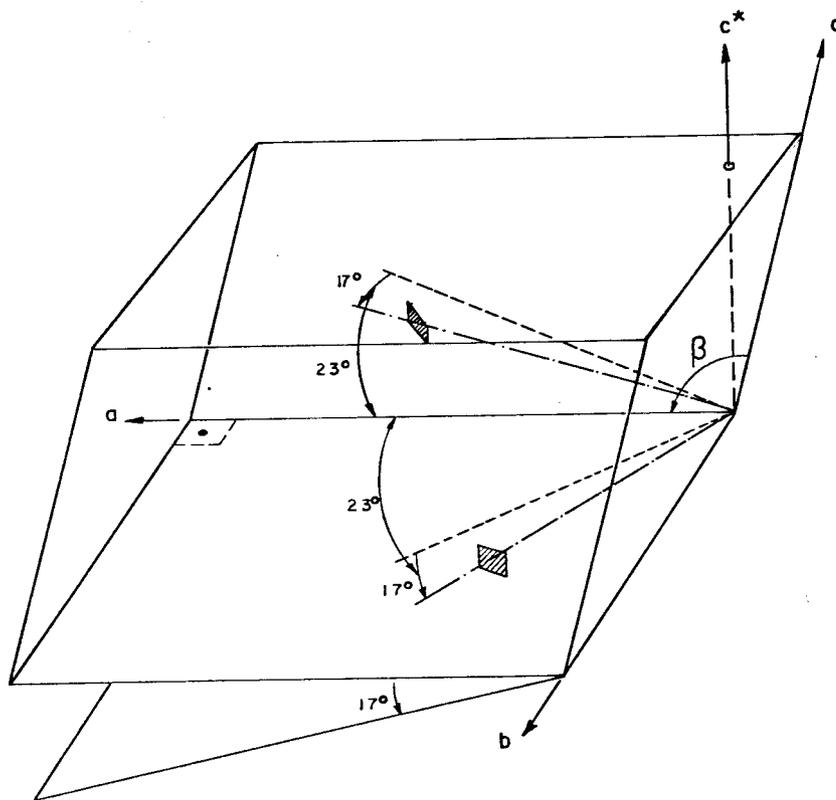


Figura 4 - O cristal de Mb tipo A

oxidação do precursor 2, 2, 6, 6 - tetrametil-piperidino, obtido comercialmente (Aldrich - Co).

CAPÍTULO III

MÉTODOS E RESULTADOS EXPERIMENTAIS

1. AMOSTRA

Os cristais de Mb de cachalote (Sperm Whale Myoglobin, Sigma Co.) tipo A foram crescidos segundo o método de Kendrew e Parrish. A obtenção do cristal dopado com o marcador normalmente é obtida pela adição deste à solução de crescimento do cristal, possibilitando a complexação da molécula antes da cristalização. Este método não oferece bons resultados para o 2, 2, 6, 6 tetrametil-1-oxil (TEMPO), visto que este marcador não se liga covalentemente à proteína devido ao seu caráter hidrofóbico.

O método usado para dopar os cristais foi a difusão, obtida através da incubação destes na solução de crescimento do cristal saturada do marcador (0,02-0,05M), durante 20 minutos e à temperatura de 40°C, pois nessa temperatura a molécula deve sofrer alguma mudança conformacional reversível que facilita a difusão (cf. ref. 2).

O cristal foi então retirado da solução e lavado com sulfato de amônia (8M) até que todo marcador superficial fosse retirado, e selado num tubo com uma goticulada solução livre do marcador, afim de manter uma atmosfera saturada e impedir a de composição do cristal que ocorre sempre que a água intersticial é perdida.

O marcador foi sintetizado em nosso laboratório pelo Prof. M. Tabak, segundo o método de Rozantsev, que consiste na oxidação do precursor 2, 2, 6, 6 - tetrametil-piperidino, obtido comercialmente (Aldrich - Co).

PLANO

TABELA I

ac*	bc*	ab
$g_{\perp} = 2,0049$	$2,0049$	$2,0057$
$g_{\parallel} = 2,0055$	$2,0058$	$2,0067$
$\Delta g \approx 0,0004$	$0,0004$	$0,0004$

Figura 1 - O marcador 2, 2, 6, 6 - tetrametil-1-oxil (TEMPO)

2. EQUIPAMENTO

As experiências foram realizadas com um espectrômetro Varian, série "Line Century", modelo E-109, banda X, frequência de modulação 100 KHz. Os espectros da variação angular foram obtidos com a cavidade Varian cilíndrica rotativa (E-233) e a temperatura variável com o controlador Varian E-257/WL 257 e a cavidade retangular "multi-purpose" (E-231).

3. RESULTADOS

Espectros - a figura 2 mostra alguns espectros do marcador TEMPO difundido no cristal de Mb em diversas orientações do eixo b relativamente ao campo magnético H. As condições típicas de medida foram: $H_0 = 3412$ G, $\Delta H = 80$ G/2 minutos, modulação 2,5 G pico a pico, ganho $3,2 \cdot 10^4$, constante de tempo 0,250 S, potência 2mw e frequência 9,58GHz.

Fica evidente da variação angular da linha de campo alto ($I = -1$) a existência de duas espécies do marcador, o desdobramento máximo entre as duas linhas de absorção associadas a essas espécies é da ordem de 4 gauss. Da tabela I verificamos que a variação em g está dentro do erro experimental indicando um fator g isotrópico.

Foram feitas curvas de variação angular da espécie anisotrópica do marcador nos três planos cristalinos (figuras 3, 4 e 5), estas mostram uma simetria axial com os seguintes valores do tensor de interação hiperfina: $A_{\perp} = 20,6$ gauss e $A_{\parallel} = 23,4$ gauss. A direção de A_{\parallel} para uma das moléculas da célula unitária possui os seguintes cossenos diretores: 0,38; 0,66 e 0,65 em relação aos eixos a, b e c^* respectivamente. A direção de A_{\parallel} e A_{\perp} da outra molécula presente na célula pode ser obtida por uma rotação de 110° do plano formado por A_{\parallel} e c^* , em torno do eixo c^* , de modo que suas projeções no plano ab tenham o eixo b como bissetor (ver figura 5).

Nos planos ac^* e bc^* observamos somente uma curva de variação angular, devido ao fato que os dois marcadores das moléculas da célula unitária são magneticamente equivalentes. Ao contrário do que acontece em ab onde aparecem duas curvas de variação angular defasadas de 110° aproximadamente, o que nos permite inferir que este não é um plano de simetria para os marcadores como ac^* e bc^* e que existe somente uma espécie de marcador por molécula.

Um cálculo do ângulo formado entre a direção normal ao plano da heme e a direção A_{\parallel} fornece um valor de 40° , aproximadamente.

Variação térmica - como é sabido a Mb sofre mudanças conformacionais induzidas pela temperatura que podem ser caracterizadas por dois isômeros A e B. O isômero tipo A é o de mais baixa temperatura e o tipo B de mais alta, a diferença de energia entre essas duas formas não é maior que 1 ou 2 Kcal/mol¹⁸.

Usando a técnica de EPR estas mudanças já foram observadas pelo espectro do íon de cobre complexado na molécula², pelo espectro do marcador isotiocianoto ligado ao terminal amina¹⁹, através de medidas de NMR do tempo de relaxação spin-rede dos prótons da água¹⁸ e também pelo espectro do iminoxil que provavelmente liga-se à his. 48, his. 81 e his. 119¹⁸.

Seguindo essa linha tentamos monitorar esta mudança a-

através do parâmetro $A = \left(\frac{I_0}{I_-}\right)^{1/2}$, onde I_0 é a intensidade da linha central e I_- a intensidade da linha de campo alto do espectro do TEMPO. O motivo dessa escolha deve-se a que o fator A está ligado ao tempo de correlação rotacional do marcador (τ). (cf. ref. 7 pág. 30).

O gráfico de A X T (cf. figura 6) mostra uma função que muda a inclinação abruptamente na temperatura de 30°C indicando uma mudança conformacional da molécula. O trecho inicial da curva (temperaturas altas) é caracterizado por uma energia de ativação de 1,55Kcal/mol e o trecho final (temperaturas baixas) por uma energia de ativação de 0,896Kcal/mol, isto é, há uma variação de 42% na energia de ativação do marcador.

Tempo de correlação rotacional - os tempos de correlação rotacional (τ) foram calculados através de curva de calibração proposta por KUZNETSOV et al¹¹, figura 7, que permite o cálculo de τ a partir da posição da linha de absorção de microonda no campo magnético ($H_{\pm 1}(\tau)$).

A expressão (72) do primeiro capítulo pode ser colocada em função da componente z da interação hiperfina, como segue:

$$K = \frac{A_z(\tau) - A_z(\tau \rightarrow 0)}{A_z(\tau \rightarrow \infty) - A_z(\tau \rightarrow 0)} \times 100 \quad (78)$$

Os valores de $A_z(\tau \rightarrow 0)$ e $A_z(\tau \rightarrow \infty)$ foram obtidos de um espectro do marcador livre em solução e na molécula de Mb completamente imobilizado ($T = -40^\circ\text{C}$), estes valores são 13,0 G e 30,0 G respectivamente, substituindo na expressão temos:

$$K = \frac{A_z(\tau) - 17,0}{13} \cdot 100 \quad (79)$$

Os valores de K encontrados para A_{\parallel} e A_{\perp} são $K = .49$ e $K = 28$ que fornecem os tempos de correlação rotacional $\tau_{\parallel} = 7,2 \cdot 10^{-9}$ s e $\tau_{\perp} = 4,8 \cdot 10^{-9}$ s, respectivamente, o valor $\tau_R = \sqrt{\tau_{\parallel} \tau_{\perp}}$ é $5,9 \cdot 10^{-9}$ s.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

O presente trabalho determinou os seguintes valores para os parâmetros de interação magnética do TEMPO difundido na molécula de Mb:

$$g = (2,0056 \pm 0,0004)$$

$$A_{\parallel} = 23,4G$$

$$A_{\perp} = 20,6G$$

Uma análise do grau de hidrofobicidade dos resíduos situados na parte interna da molécula de Mb sugere como um possível sítio de localização para o TEMPO o bolso "retangular" formado na região da tirosina 146, hélice 23H e 151 terminal 3HC. Além da baixa acessibilidade da água a essa região, dois outros fatores justificam essa afirmação, a saber: a) tamanho do bolso suficiente para abrigar o radical, o que não acontece com os outros resíduos mostrados na tabela do capítulo II; b) posição do plano definido pelo bolso coerente com o ângulo formado entre A e a normal ao plano do heme (cf. figura 8).

A baixa energia de ativação ($\approx 1Kcal/mol$) do TEMPO na Mb, comparada com outras matrizes e marcadores, também pode ser uma evidência a favor deste sítio pela sua acessibilidade relativamente fácil dada a sua proximidade da dobra terminal. Isto é corroborado pelo curto tempo de difusão do marcador, aproximadamente 20 minutos a $40^{\circ}C$.

Como citado no capítulo III a variação térmica do parâmetro A está ligada a uma mudança conformacional. Nascimento² (p.p. 63) discute esta mudança através de um afastamento da hélice A em relação à dobra GH, Atanasov et. al.²⁰ propõem um movimento da hélice F e Lichtenstein e col.¹⁸ sugerem movimentos dos trechos CD, EF e GH. Recentemente Fedorov e Denesyuk²¹ através do espalhamento de R-X a alto ângulo mostraram que a dobra GH da Mb sofre um pequeno deslocamento ($\approx 2,0\text{Å}$) em relação à dobra EF quando passa da fase cristalina para a solução, figura 9. Por este método não é possível aceitar ou rejeitar mudanças nos trechos CD e EF.

Os nossos resultados mostram que também existe um movimento da hélice H e do terminal HC. Todos esses resultados le-

vam-nos a crer que a mudança conformacional, induzida pela temperatura, deve afetar a estrutura global da proteína e não apenas a região vizinha ao marcador.

O deslocamento da dobra GH pode também explicar a dificuldade encontrada para dopar a molécula em solução, discutida no capítulo III, seção 1, uma vez que este alarga mais o bolso diminuindo a estabilidade do marcador neste sítio. Além disso a variação térmica do parâmetro A na Mb em solução (10%) marcada com o TEMPO é uma curva que se mantém constante, na mesma faixa de temperatura estudada no cristal (cf. fig. 6).

Isso mostra que se ocorre alguma mudança do isômero A para B, da proteína em solução, o TEMPO não pode detectar. No estado cristalino o isômero A (baixa temperatura) deve, devido às interações intermoleculares, manter o bolso menos acessível, o que concorda com a referência 21. O aumento de temperatura mostra que a molécula no estado cristalino sofre uma mudança conformacional em direção ao isômero A na solução.

Finalizando gostaríamos de ressaltar os seguintes pontos:

1. O processo de marcação, para marcadores hidrofóbicos, em cristais empregado neste trabalho é original (capítulo III, seção 1) e forneceu resultados positivos.

2. As constantes de interação magnética, bem como os tempos de correlação rotacional indicam um movimento anisotrópico do marcador com um tempo $\tau \approx 10^{-8}$ s, convém frizar que até o presente momento não existem teorias que permitam calcular os tempos de correlação rotacional anisotrópicos com precisão.

3. A diferença de energia de ativação (0,654Kcal/mol) entre as duas fases do Mb está dentro do previsto pelas medidas do tempo de relaxação dos prótons da água de hidratação, no máximo 1 ou 2Kcal/mol.

4. Existe uma mudança conformacional, induzida pela temperatura, que deve ser de grande extensão afetando toda a estrutura da proteína.

Como sugestão para trabalhos futuros fica a confirmação do sítio proposto para a localização do marcador por meio de difração de raios X e fluorescência das tirosinas presentes no Mb com e sem o marcador.

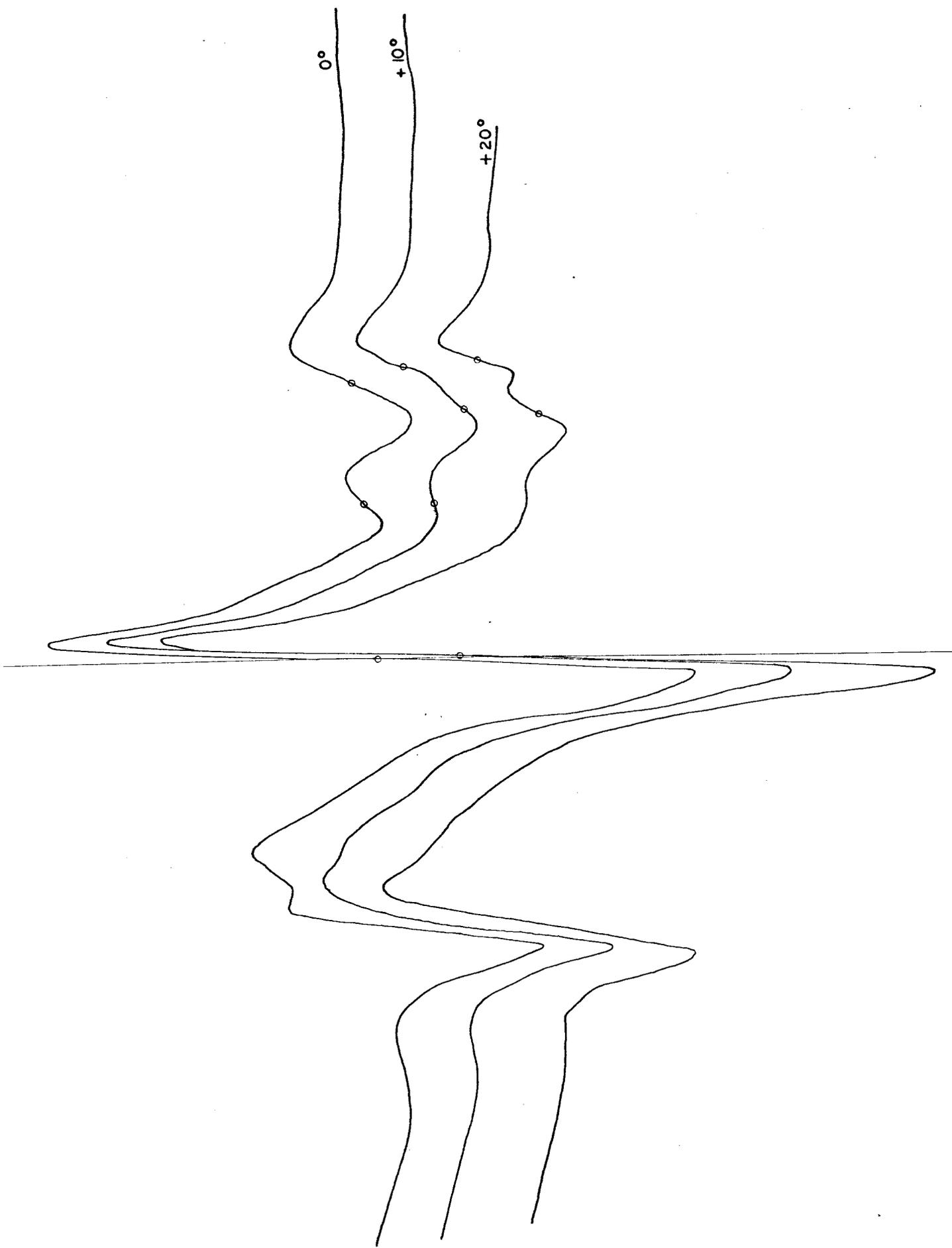


FIGURA 2 - ESPECTROS DO TEMPO EM ALGUMAS ORIENTAÇÕES NO PLANO ab

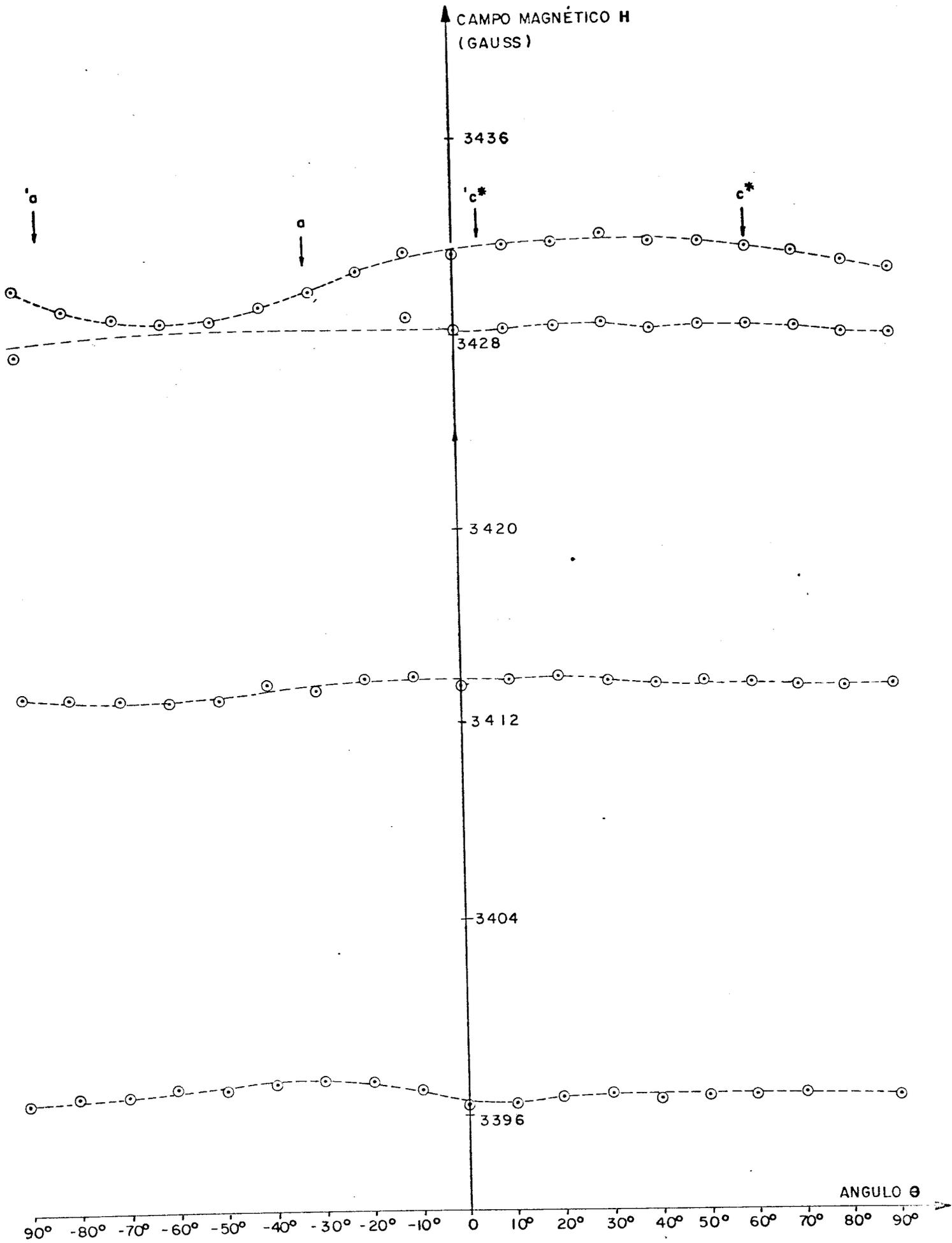


FIGURA 3 - VARIAÇÃO ANGULAR DO TEMPO NO CRISTAL DE Mb - PLANO ac^*

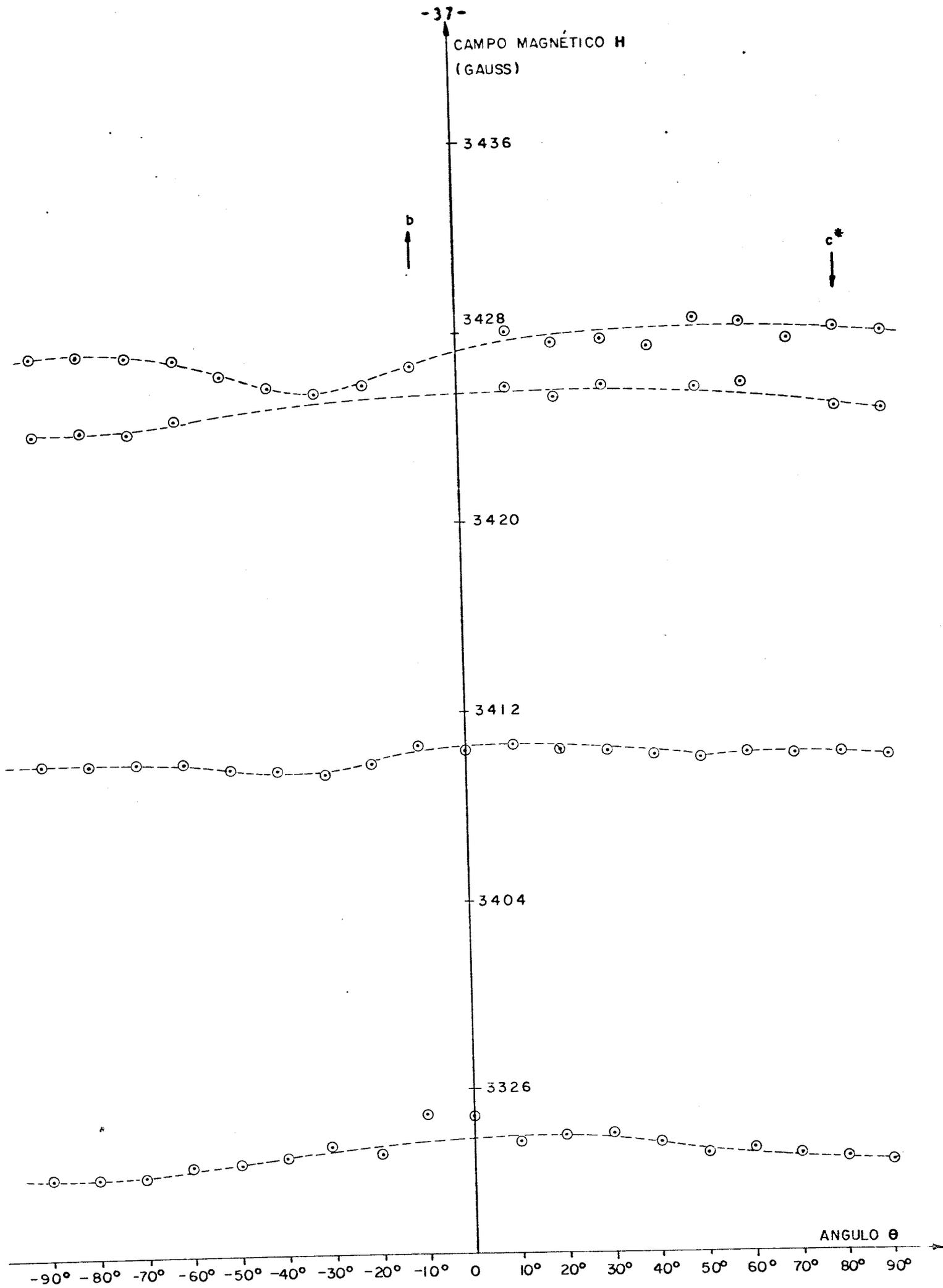


FIGURA 4 - VARIACÃO ANGULAR DO TEMPO NO CRISTAL DE Mb-PLANO bc^*

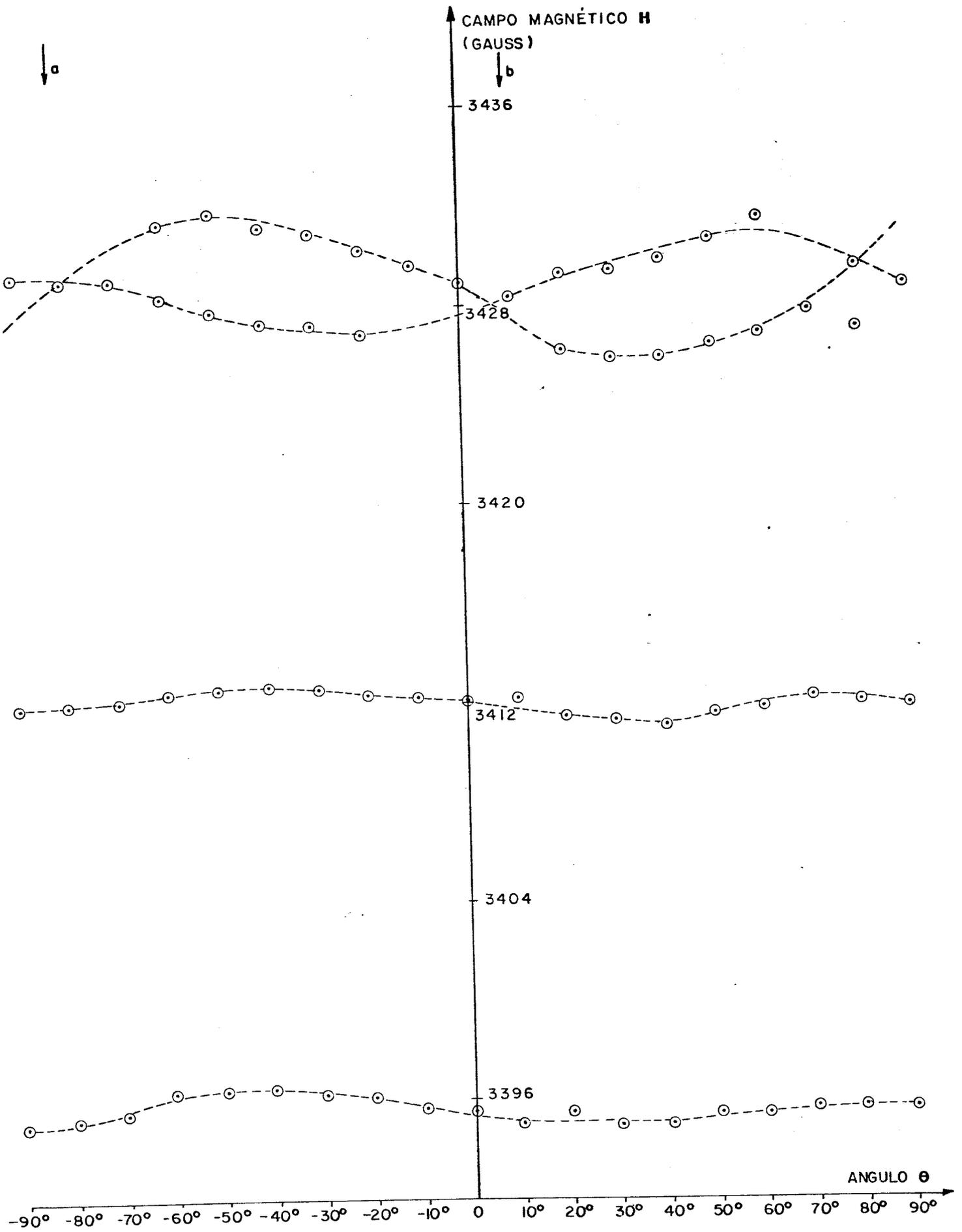


FIGURA 5 - VARIAÇÃO ANGULAR DO TEMPO NO CRISTAL DE Mb- PLANO **ab**

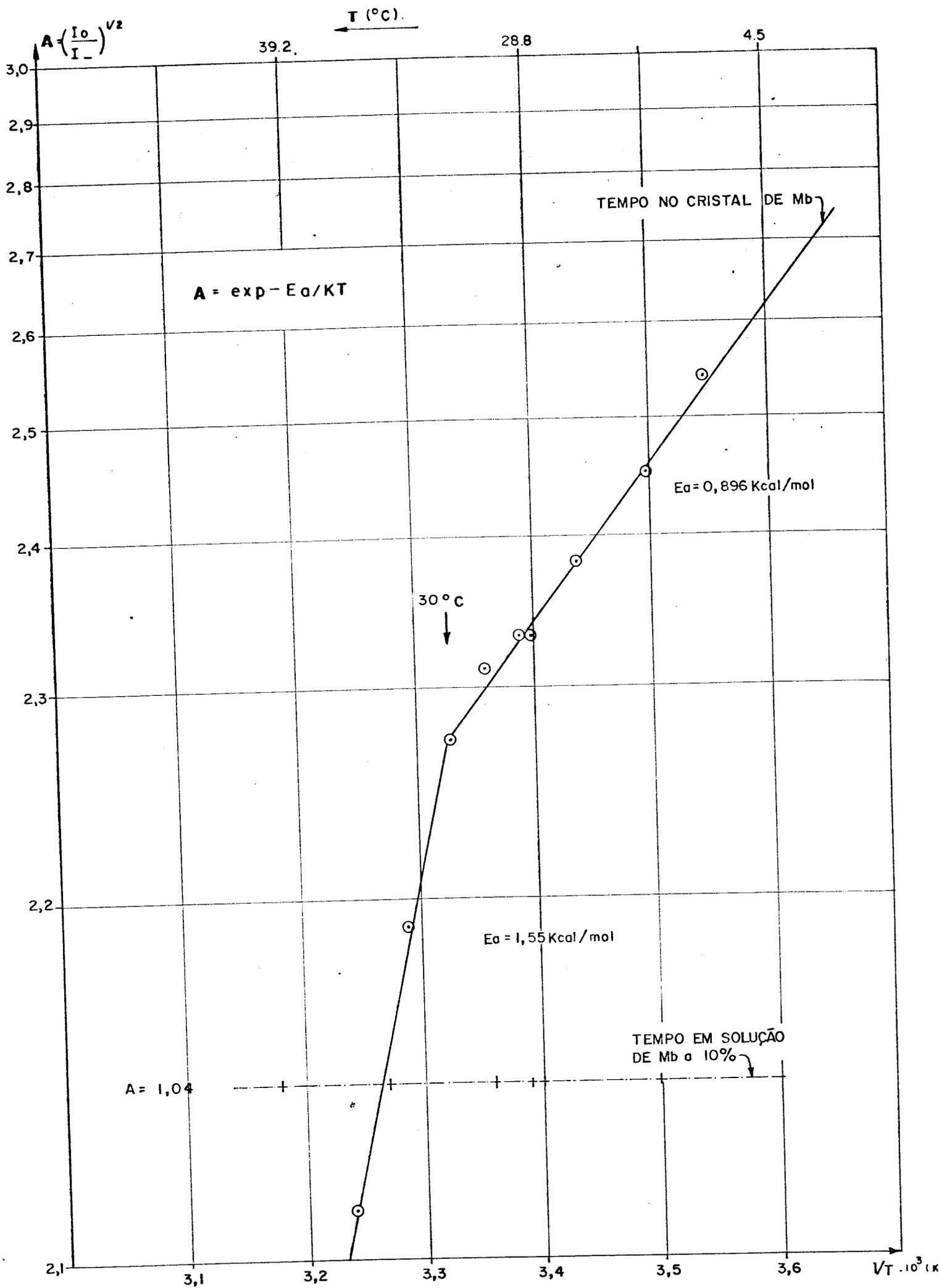


FIGURA 6 - A EM FUNÇÃO DE T

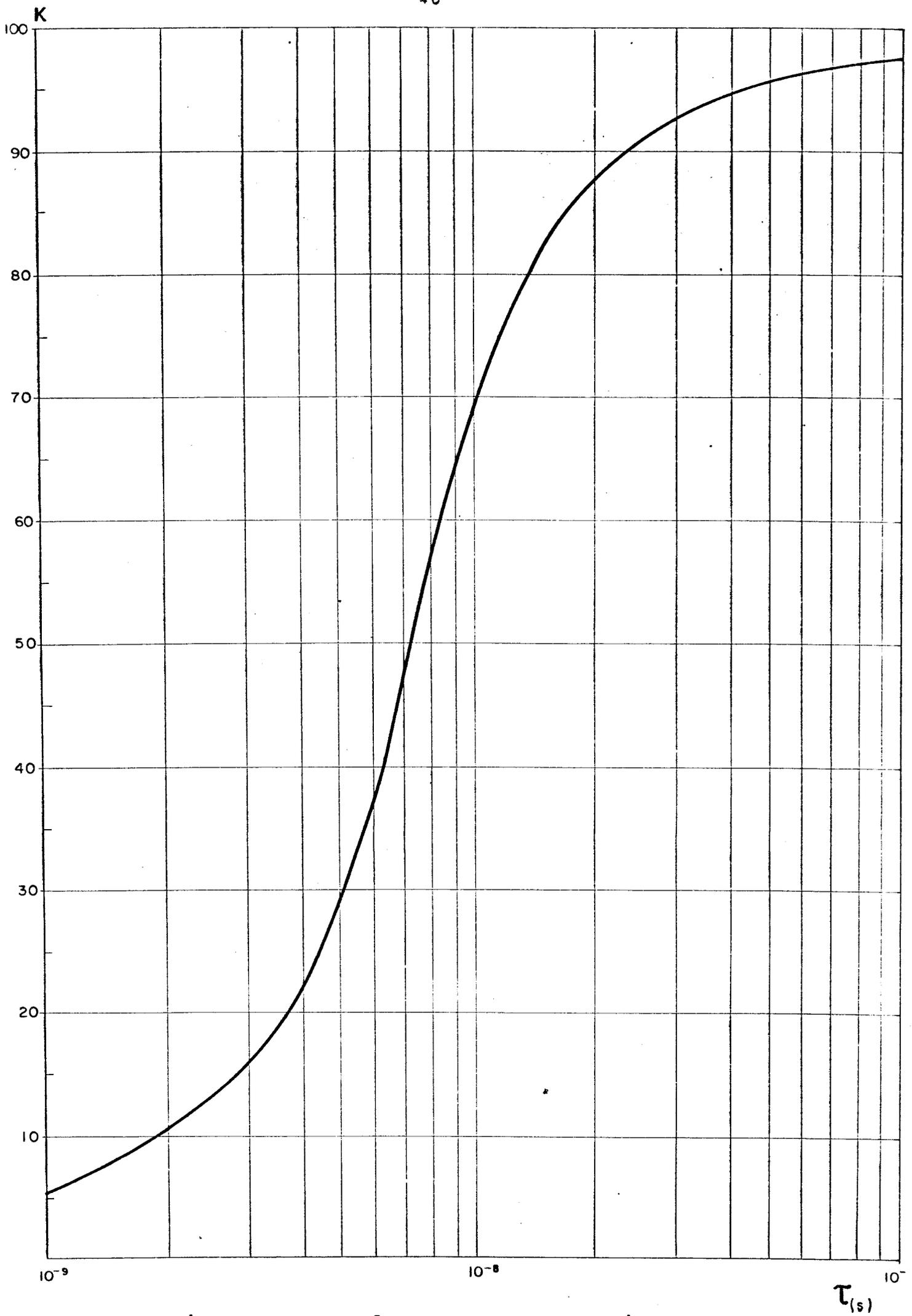


FIGURA 7 - GRÁFICO DE K EM FUNÇÃO DE τ , CALCULADO ATRAVÉS DO MODELO DE SALTOS NÃO CORRELACIONADOS.

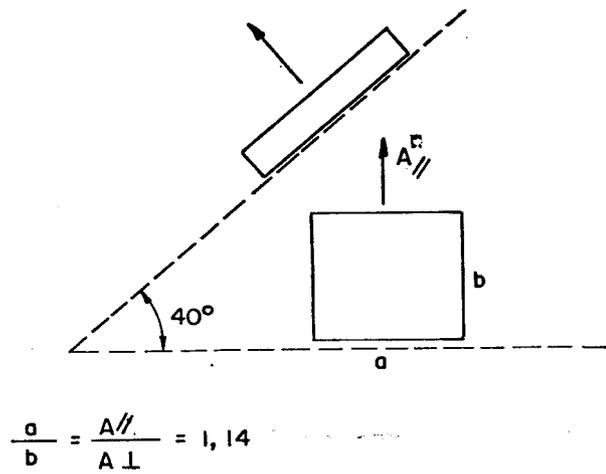


FIG. 8 - POSIÇÃO DO BOLSO RELATIVAMENTE AO PLANO DO HEME

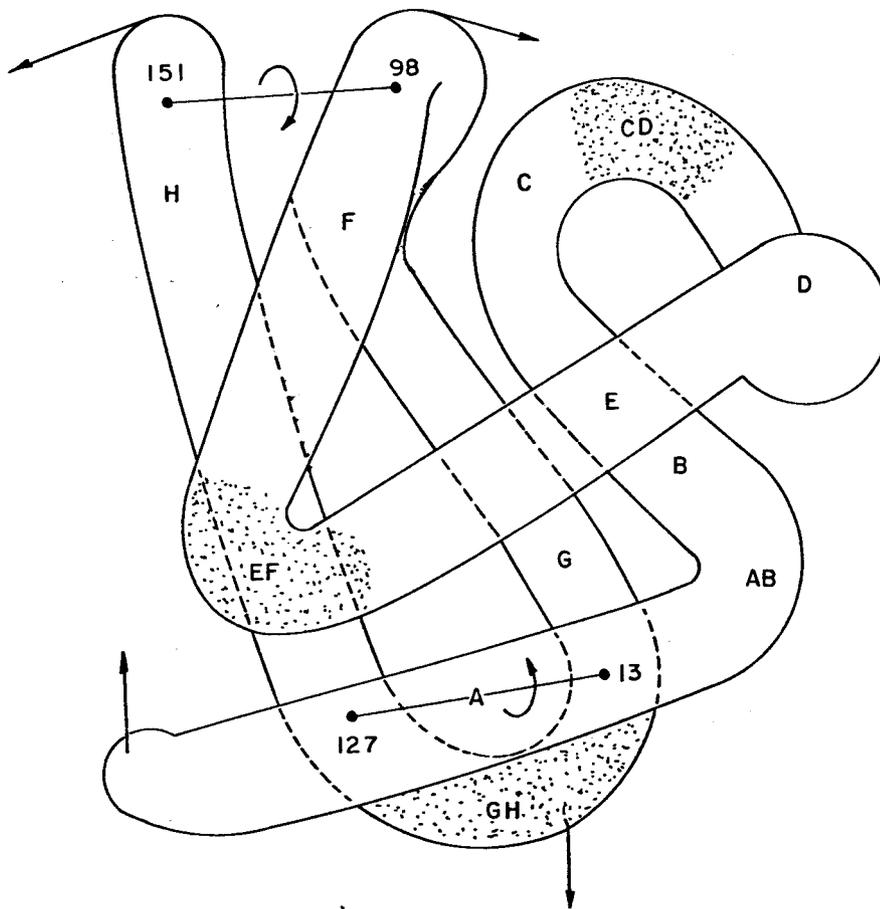


FIG. 9 - A MOLÉCULA DE Mb INDICANDO OS POSSÍVEIS MOVIMENTOS

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bennett, J.E., Gibson, J.F. and Ingram, D.J.E. (1957) Proc. Roy. Soc. (London) A 240, 67.
- 2) Nascimento, O.R., Costa Ribeiro, S., Bemski, G. (1977) Bio phys. J., 19, 95-101.
- 3) Bloch, F. (1957) Phys. Rev. 105, 1206.
- 4) Redfield, A. (1957) IBM.J. Res. and Develop. 1, 19.
- 5) Freed, J. and Fraenkel, J. (1963) J. Chem. Phys., 39, 326; 40, 1845.
- 6) Edmonds, A.R. (1957) "Angular Momentum in Quantum Mechanics" Princeton Univ. Press, Princeton, N.J.; cap. 4.
- 7) Nordio, P.L. "Spin Labeling - Theory and Applications" editor L.J. Berliner, cap. 2, pp. 47 - Academic Press.
- 8) Korst, N.N. e Antsiferova, L.I. (1978) Sov. Phys. USP. 21(9) sept.
- 9) Landau, L. e Lifchitz, E., "Quantum Mechanics", § 103.
- 10) Freed, J. in "Spin Labeling - Theory and Applications", cap. 3.
- 11) Kuznetsov, A., Vasserman, A., Volkov, A. and Korst, N. (1971) Chem. Phys. Lett. 12, 103.
- 12) Mc Calley, R., Shimshick, E. and Mc Connell, R. (1972) Chem. Phys. Lett, 13, 115.
- 13) Goldman, S.A., Bruno, G.V. and Freed, J.H.- J. Phys. Chem. 76, 1858-1860.
- 14) Mason, R., Polnaszek, C.F. e Freed, J.H. (1974) J. Phys. Chem. 78, 1324-1329.
- 15) Matthew, J.B., Hanania, G.I.H., Gurd, F.R.N. (1978) BBRC 81, nº 2, pp. 410-412.
- 16) Takano, T. (1977) J. Mol. Biol. 110, 537-68.
- 17) Kendrew, J.C., Parrish, P.G. (1956) Proc. Roy. Soc. A 238, 305-324.

- 18) Atanasov, B.P. (1971) Nature Vol. 233, 560.
- 19) Wajnberg, E., Ribeiro, P.C., Nascimento, O.R., and Bemski, G. (1978) FEBS-Lett, 91, n° 2, 257-260.
- 20) Derzhanski, A., Georgieva, A., Kotev, K., Atanasov, B.P. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 214, 83-93.
- 21) Fedorov, B.A. e Denesyuk, A.I. (Apr. 1978) FEBS-Letters, 88, n° 1.