

CBPF-NF-046/85

ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA MOSSBAUER DO
FERRO-DEXTRAN (IMFERON)

por

S.I. Araújo e J. Danon

RESUMO

Os complexos de ferro-dextran (imferon) são de muita importância no tratamento de anemias resultantes da deficiência em ferro. Estudos recentes por difração eletrônica indicaram que o imferon é estruturalmente diferente da ferritina, uma proteína que constitui a substância de reserva de ferro nos organismos. Entretanto, os resultados por nós obtidos no imferon via espectroscopia Mössbauer, em diferentes faixas de temperatura (ambiente, nitrogênio e He líquido), revelaram uma grande semelhança entre este composto e a ferritina.

Observou-se uma coordenação octaédrica distorcida do Fe^{3+} em ambos os compostos, o que concorda com medidas efetuadas na ferritina por EXAFS.

Apesar dos resultados concordantes, persistem, todavia, algumas discrepâncias. A ferritina parece ser ligeiramente mais iônica que o imferon, possivelmente devido à distância interatômica ligeiramente maior neste último composto. Em nossas medidas, encontramos um campo de $484,6 \pm 5$ kOe para o imferon que, comparado com o campo de 493 ± 10 kOe da ferritina, comprova ser esta um pouco mais iônica que o imferon. É, entretanto, uma pequena diferença, comparável à que existe entre os óxidos binários de Fe ($\beta FeOOH$ e $\gamma FeOOH$).

Palavras-chave: Complexos de ferro-dextran; Espectroscopia Mössbauer; Imferon.

INTRODUÇÃO

O ferro é armazenado no tecido animal sob duas formas: ferritina e haemosiderina.

A ferritina é uma proteína solúvel em água, que consiste de um núcleo inorgânico micelar de $(\text{FeOOH})_8$ ($\text{FeO} \cdot \text{OPO}_3\text{H}_2$) com, aproximadamente, 70 Å de diâmetro, circundado por uma camada orgânica com, aproximadamente, 120 Å de diâmetro total⁽¹⁾. Quando a proteína está repleta de Fe, seu peso molecular é de, aproximadamente, 900.000, igualmente distribuído entre a camada orgânica externa e o núcleo inorgânico. Sabe-se que o Fe no núcleo é trivalente⁽²⁾.

Baseado em análises de raios - X da haemosiderina, obtida a partir do baço de cavalo, Schwietzer⁽³⁾ sugeriu que o núcleo de Fe desta proteína, tanto quanto da ferritina, teria uma estrutura tipo γFeOOH .

Utilizando dados de espalhamento de raios - X com baixo ângulo, obtidos sobre polímeros contendo Fe, Brady e colaboradores⁽⁴⁾ sugeriram que os ligantes O^{2-} e OH^- estavam tetraedricamente distribuídos em torno dos íons Fe^{3+} .

Esta conclusão foi questionada por Gray⁽⁵⁾, que sugeriu um arranjo octaédrico dos ligantes.

Ainda que a ferritina possa ser cristalizada, não é possível determinar diretamente a estrutura do núcleo contendo Fe, através de técnicas de raios - X usuais, pois, os núcleos de Fe não possuem uma orientação definida em relação à camada externa. Entretanto, tal medida pode ser feita através da técnica de EXAFS, pois, o peso da micela não é um empecilho para a análise da distribuição local de Fe.

S. M. Heald e colaboradores⁽⁶⁾ fizeram um estudo detalhado da estrutura do núcleo contendo Fe na ferritina, através de EXAFS, concluindo por uma estrutura onde os átomos de Fe são envolvidos por 6 átomos de O, uma forma muito próxima da octaédrica. Cada Fe tem, também, 7 ± 1 vizinhos de Fe. Foi observada uma desordem estrutural considerável, que crescia à medida que a solução de ferritina era resfriada, indicando uma possível ocorrência de transição de fase a temperaturas mais baixas.

Por outro lado, os complexos de ferro-dextran (imferon), são largamente usados no tratamento de anemias provenientes da deficiência de ferro nos organismos. Estes compostos são formados de hidróxidos óxidos férricos, sob a forma tetragonal β FeOOH, segundo Marshall e Rutherford⁽⁷⁾.

Estudos cristalográficos realizados por Theil e colaboradores⁽⁸⁾ e por Heald e colaboradores⁽⁶⁾, utilizando a técnica de EXAFS, compararam a ferritina, o ferro-dextran, a ferro-glicina e um nitrato de ferro hidrolizado e concluíram que, para as substâncias estudadas, a distribuição de próximos vizinhos em redor da média de átomos de Fe era a mesma, quer no imferon ou na ferritina, tornando estes dois compostos "singularmente similares".

Porém, a técnica de EXAFS, apesar de ser muito sensível a ordenamentos de curto alcance, sendo especialmente usada em compostos amorfos⁽⁹⁾, é, entretanto, de difícil interpretação para materiais cristalinos que possuam ordenamentos de longo alcance.

Em seu trabalho publicado em 1981, Kenneth M. Towe⁽¹⁰⁾ contesta a afirmação de que a ferritina e o imferon são "singularmente similares". Usando a técnica de difração de eletrons, o autor sustenta que a distribuição de próximos vizinhos do Fe e o ordenamento de curto alcance na ferritina e no imferon, podem ser idênticos, se interpretados a partir de estudos espectroscópicos de EXAFS; porém, os dados de difração de eletrons confirmam que existem importantes diferenças cristalográficas entre ferritina e o imferon.

Com a intenção de esclarecermos se existem ou não diferenças entre estes dois compostos, efetuamos uma série de medidas no imferon, usando Espectroscopia Mössbauer.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A radiação gama usada em espectroscopia Mössbauer é a proveniente do nível $E_0 = 14,4$ keV da cascata do ^{57}Fe . O isótopo do ^{57}Fe possui características físicas que favorecem ao efeito Mössbauer.

As medidas efetuadas foram realizadas por geometria de transmissão, com a fonte de radiação mantida em aceleração constante,

através de um transdutor eletromagnético, construído nos laboratórios da Universidade Técnica de Munique. Este transdutor é excitado por uma forma de onda senoidal. Um gerador de pulso da alta frequência comanda independentemente o avanço de canais. Os dados foram coletados num analisador multicanal Hewlett Packard de 1024 canais, operando em regime de multi-scaler.

O detetor utilizado foi uma fotomultiplicadora dotada de um cristal cintilador de NaI(Ta) de 0.4 mm de espessura.

A fonte adotada foi de ^{57}Co difundido em uma matriz de Rh, com atividade de 25 mC. O ^{57}Co tem uma meia vida de 270 dias e decai ao estado excitado de 136 keV do ^{57}Fe por captura eletrônica.

Nossas calibrações foram efetuadas, usando-se a radiação gama de 14,4 keV para ressonância Mössbauer no ^{57}Fe natural. Este nível tem uma meia vida de $9,77 \times 10^{-8}$ s; a largura de linha a meia altura, com este absorvedor, é de 0,28 mm/s. A abundância do isótopo do Fe natural é de 2.19 %.

As medidas efetuadas no presente trabalho foram realizadas à temperatura ambiente (295°K), à temperatura do nitrogênio líquido (77°K) e à temperatura do He líquido ($4,2^\circ\text{K}$).

Para as medidas a 77°K e $4,2^\circ\text{K}$, usamos um criostato especial, construído pela Sulfin Cryogenics, onde fonte e absorvedor são mantidos nessas temperaturas. Para realizar as medidas, adaptou-se ao transdutor senoidal um longo tubo metálico, que continha no seu interior uma haste fina, que propaga o movimento oscilatório.

RESULTADOS E CONCLUSÕES.

Os espectros Mössbauer do inferon obtidos à temperatura do nitrogênio líquido, podem ser observados nas figuras 1 e 2. Nota-se que são, a priori, o mesmo espectro, porém, obtidos a velocidades diferentes.

Na figura 3, observa-se o espectro Mössbauer do inferon à temperatura ambiente.

Na figura 4, fazemos uma comparação entre os espectros Mössbauer por nós obtidos no inferon e os espectros Mössbauer obtidos por Boas e Window ⁽¹¹⁾ na ferritina, a 295° K e 77° K.

O espectro Mössbauer do inferon à temperatura do He líquido pode ser observado na figura 5.

Por fim, na figura 6, fazemos uma comparação entre os espectros Mössbauer a 4,2° K do inferon e da ferritina.

Os resultados obtidos nas medidas efetuadas no inferon, são mostradas na tabela 1; na tabela 2, apresentamos os resultados obtidos por Boas e Window ⁽¹¹⁾ na ferritina.

Ao fazermos uma análise comparativa dos resultados obtidos por espectroscopia Mössbauer no inferon e aqueles provenientes da ferritina ⁽¹¹⁾, notamos que existe uma grande semelhança entre estes dois compostos.

Observou-se, em ambos, uma coordenação octaédrica distorcida do Fe^{3+} , visto na figura 4, o que concorda com medidas efetuadas na ferritina por EXAFS ⁽⁶⁾.

Como na ferritina, os espectros do inferon a 77° K e 295° K se compõem de uma raia paramagnética, desdobrada por acoplamento quadrupolar, sendo afetados por um deslocamento isomérico, cujos valores podem ser observados na tabela 1.

A medida que se diminui a temperatura, raias hiperfinas aparecem, persistindo, ainda, a raia paramagnética, até desaparecer completamente, a 4,2° K, como pode ser observado nas figuras 5 e 6.

Este processo pode ser relacionado ao que acontece com as partículas finas de $\alpha-Fe_2O_3$ ou pós ultrafinos de $NiFeO_4$, que apresentam a característica superparamagnética. De acordo com o tamanho das partículas, os spins eletrônicos têm um tempo de relaxação maior ou menor em relação ao tempo da precessão nuclear de Larmor, em torno de 10^{-8} s, que é a duração da medida do efeito Mössbauer. Portanto, de acordo com os valores do tempo de relaxação dos spins, estes momentos apresentam um comportamento magnético ordenado ou desordenado.

Entretanto, apesar dos resultados concordantes entre o inferon e a ferritina, notamos certas diferenças, ainda que poucas, entre estes dois compostos.

De fato, em nossas medidas feitas no imferon, encontramos um campo de $484,6 \pm 5$ kOe (veja tabela 1) que, se comparado com o campo de 493 ± 10 kOe encontrado na ferritina (veja tabela 2), prova ser esta um pouco mais iônica que o imferon.

Deve-se ressaltar o fato de que os dados constantes da tabela 2 foram obtidos em relação ao aço inox.

Trata-se, entretanto, de uma pequena diferença, tal como a que existe entre os óxidos binários de ferro β FeOOH e γ FeOOH⁽¹²⁾, o que nos leva a admitir que, do ponto de vista da espectroscopia Mössbauer, não existe diferença aparente entre imferon e ferritina.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Kenneth Towe da Smithsonian Institution, Washington D.C., por ter chamado a atenção para o problema e pelas amostras de Imferon.

LEGENDA DAS FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Espectro Mössbauer do imferon a 77° K e 5 mms^{-1} de velocidade máxima.

FIGURA 2 - Espectro Mössbauer do imferon a 77° K e 2 mms^{-1} de velocidade máxima.

FIGURA 3 - Espectro Mössbauer do imferon a 295° K.

FIGURA 4 - Comparação entre os espectros Mössbauer:
{ a - da ferritina
 b - do imferon
 a 77° K e 295° K.

FIGURA 5 - Espectro Mössbauer do imferon a $4,2^{\circ}$ K.

FIGURA 6 - Comparação entre os espectros Mössbauer:
{ a - da ferritina
 b - do imferon
 a $4,2^{\circ}$ K.

TABELA 1 - Resultados das medidas por espectroscopia Mössbauer no imferon.

TABELA 2 - Resultados das medidas por espectroscopia Mössbauer na ferritina, segundo J.F. Boas e B. Window.

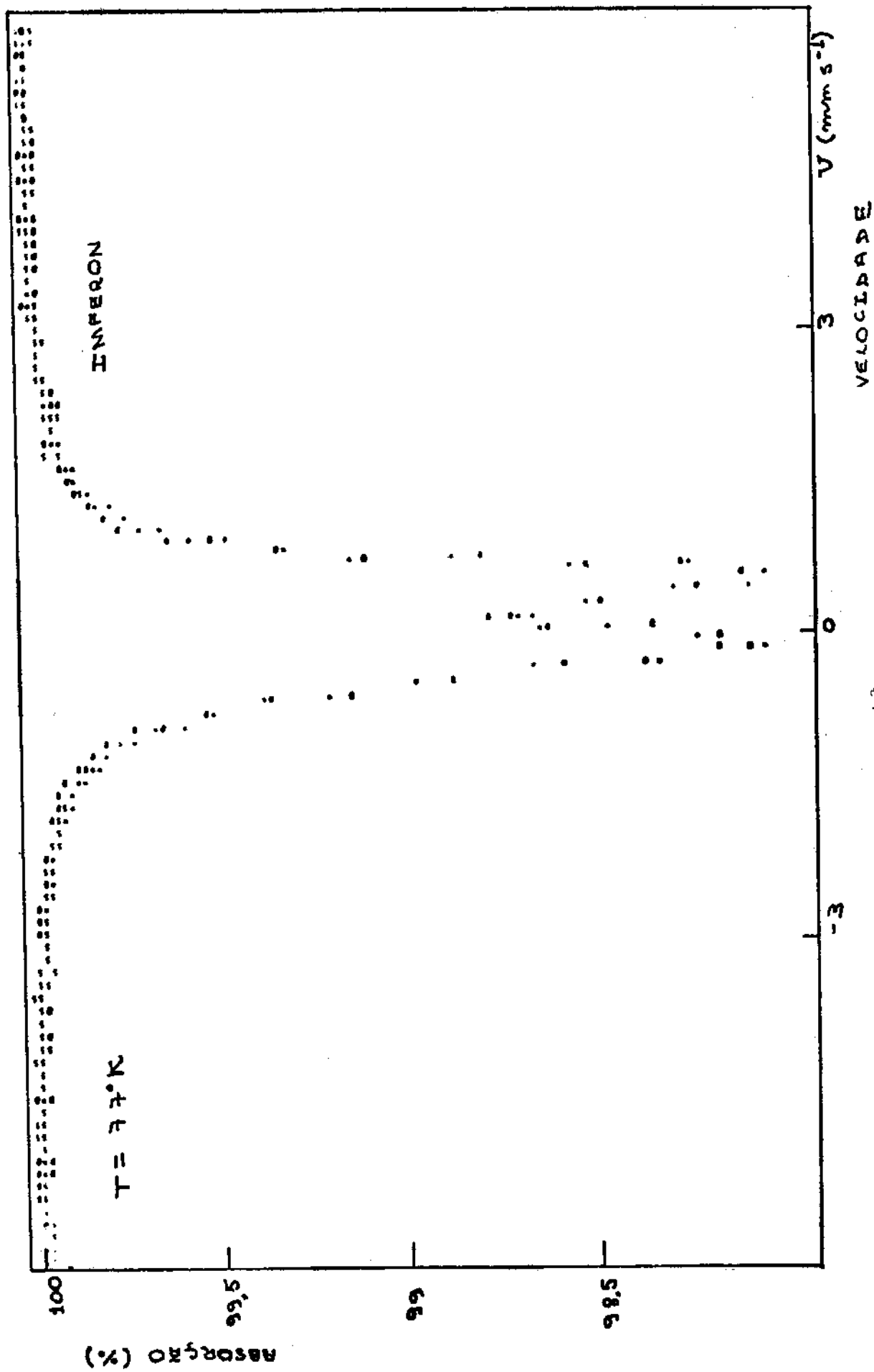


FIGURA 1

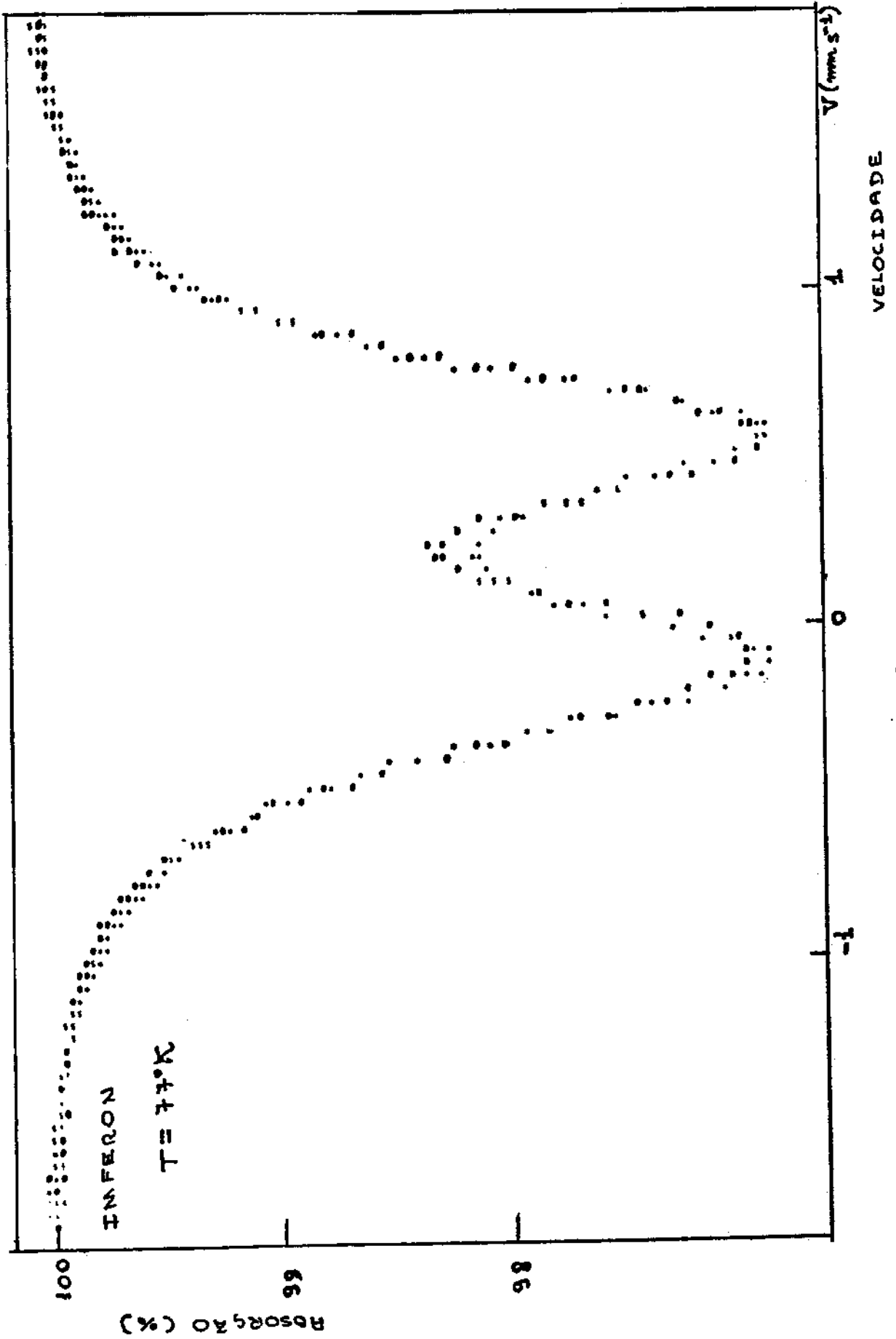


FIGURA 2

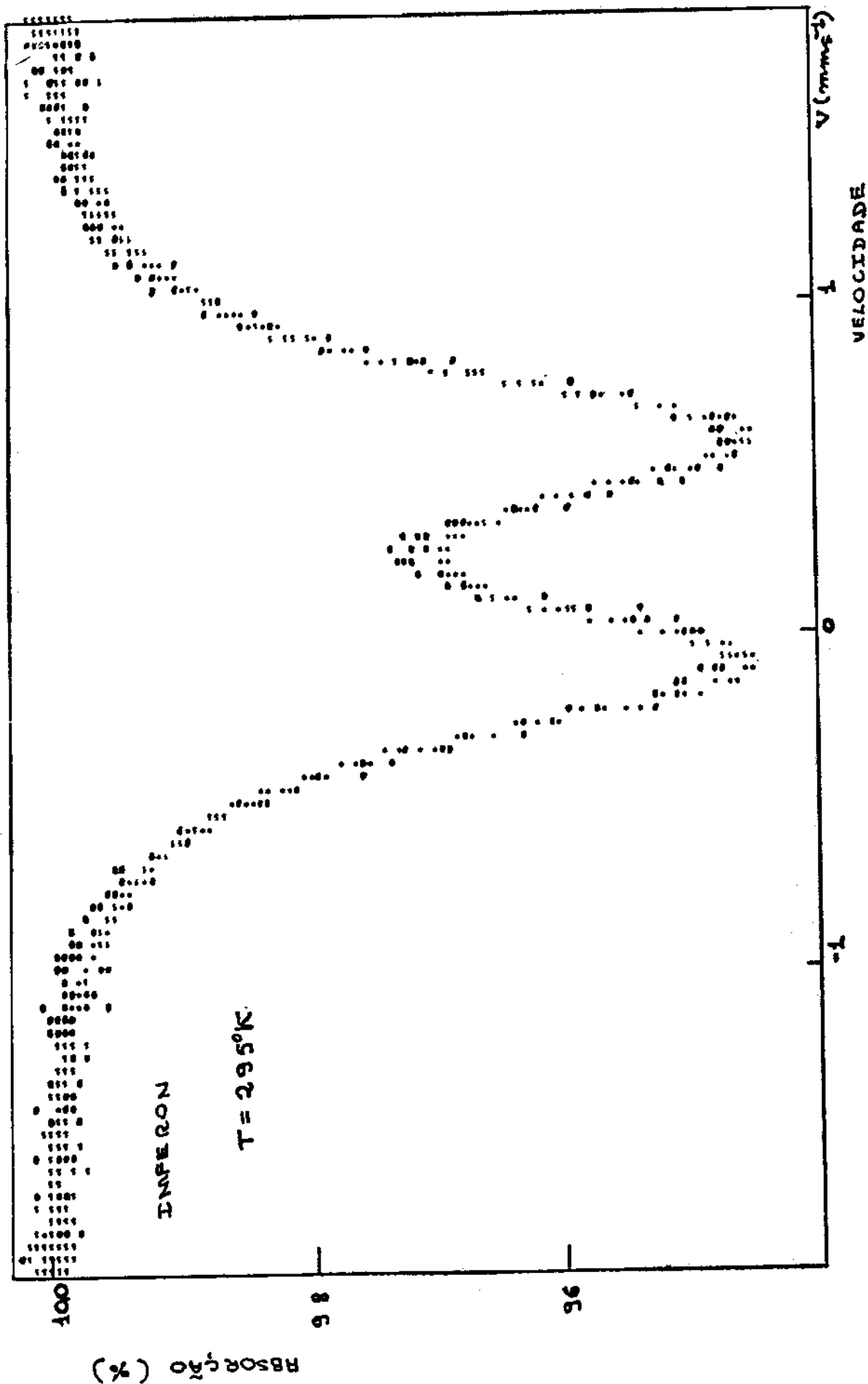
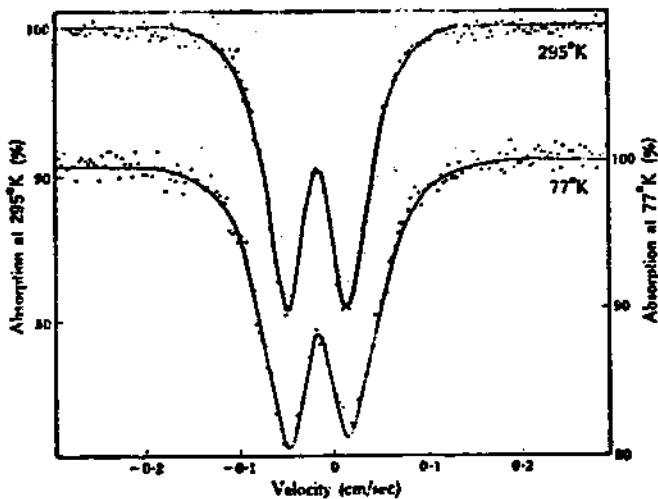
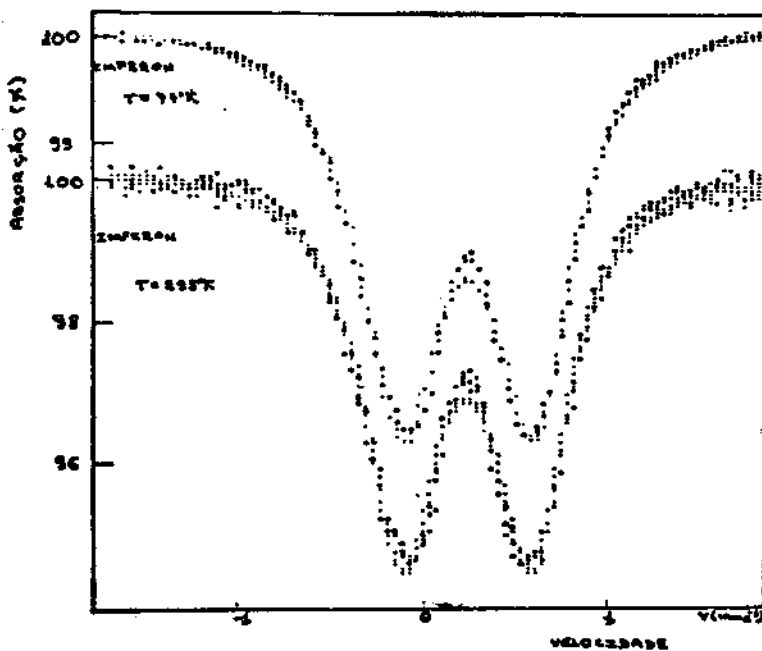


FIGURA 3



- a -



- b -

FIGURA 4

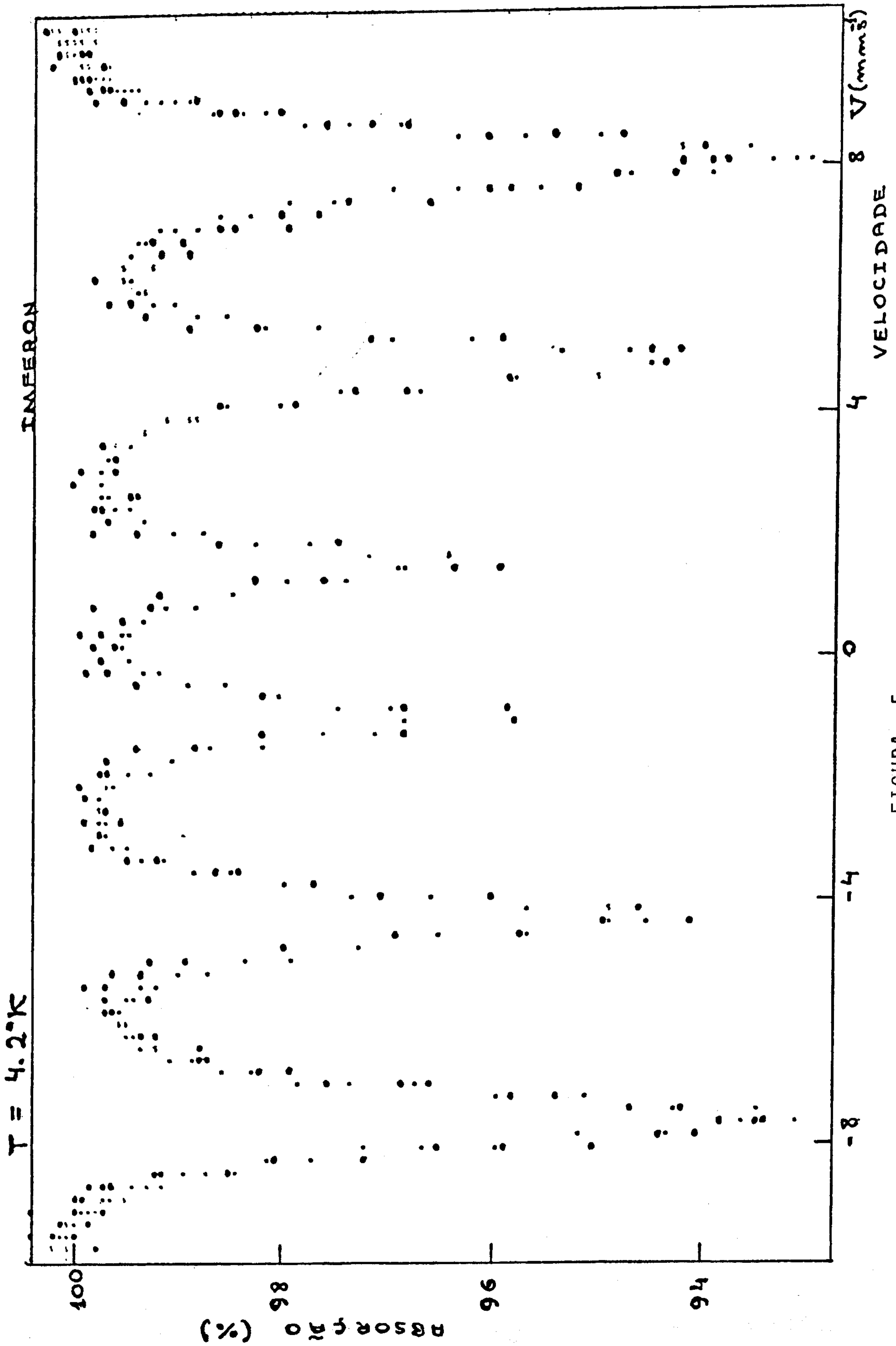
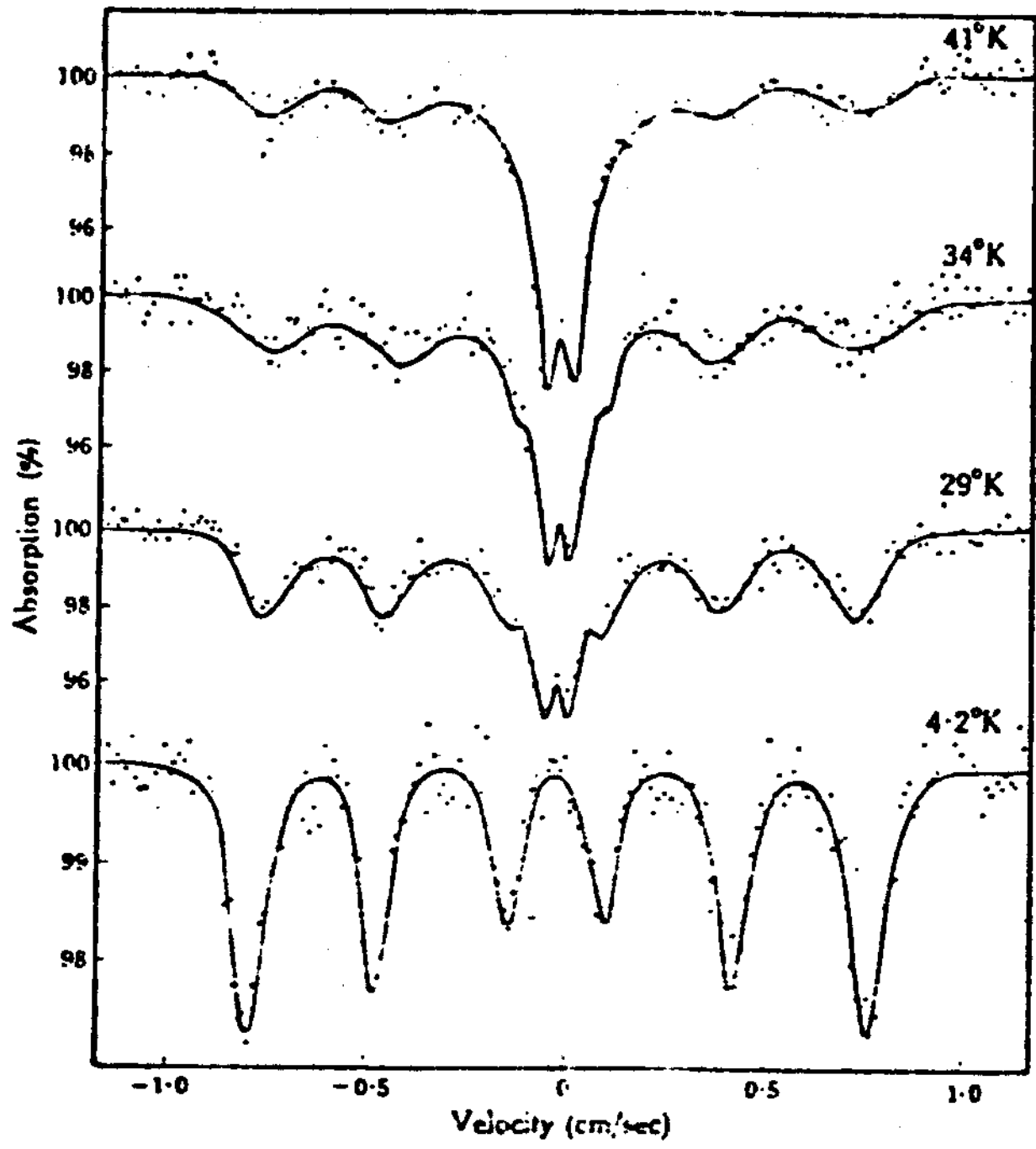
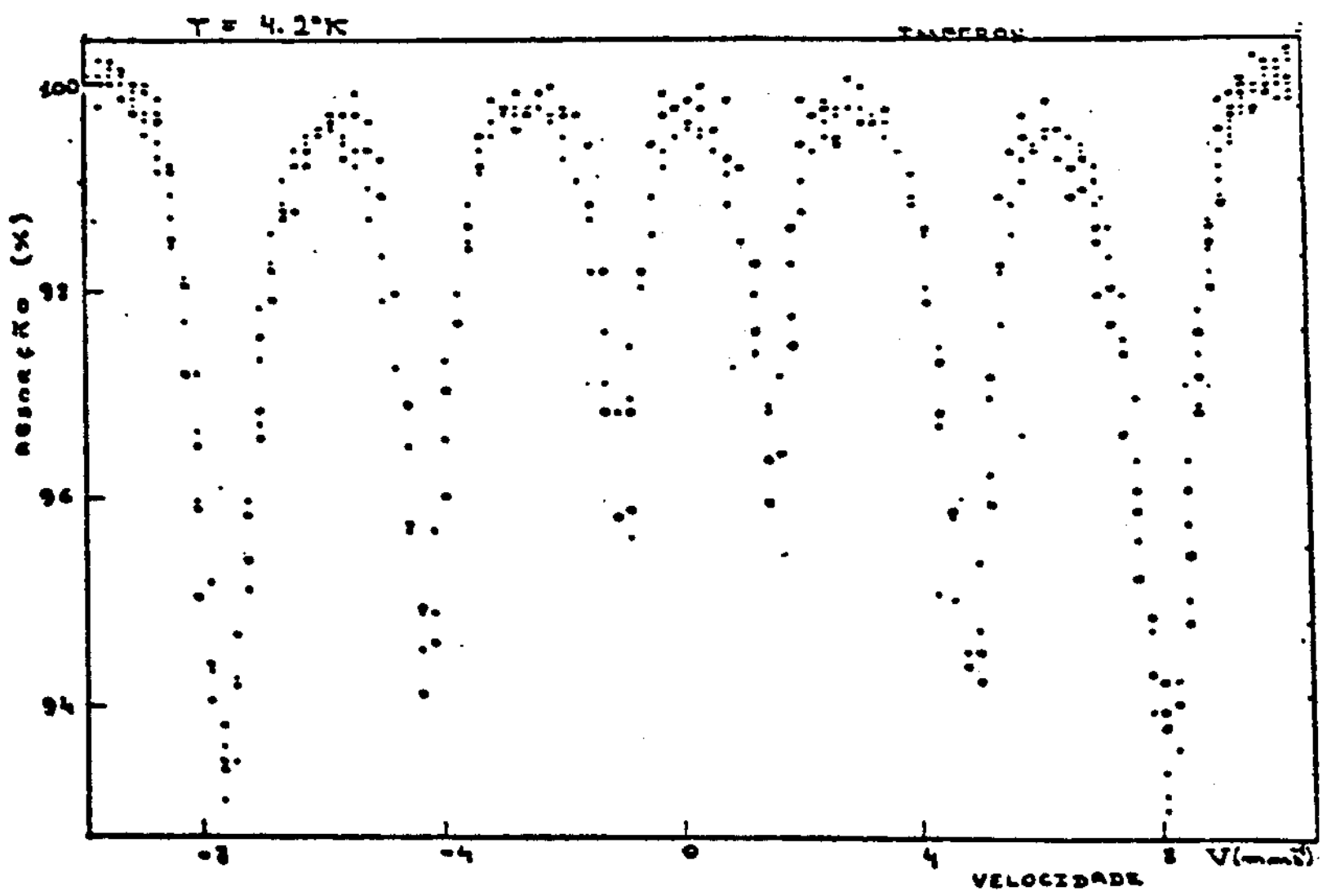


FIGURA 5



- a -



- b -

FIGURA 6

TABELA 1

IMFERON*				
T ($^{\circ}\text{k}$)	Γ (mmS^{-1})	I.S. (mmS^{-1})	ΔE_Q (mmS^{-1})	H (kO_e)
295	0.48	0.24	0.70	
77	0.51	0.23	0.71	
77	0.55	0.24	0.71	
4.2	0.95	0.24		484.6 \pm 5

*FONTE: ^{57}Co (Rh) -25mc

TABELA 2

FERRITINA*			
J.F. Boas and B. Window - Awst. J. Phys. <u>19</u> , 573 (1966)			
T (°k)	I.S.** (mm ^s ⁻¹)	ΔE_{Q1} (mm ^s ⁻¹)	H (kO _e)
77 e acima	0.47-0.50	0.70-0.74	
4.2	0.47-0.50		493±10

* FONTE: ⁵⁷Co em Cu

** Em relação ao aço inox ou 0.26-0.29, em relação ao ⁵⁷Co(Rh).

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Belig, H.J.; Kratky, O.; Rohns, G. and Wawra, H.
Biochem. Biophys. Acta, 112, 110, (1966)
- 2 - Blaise, A.; Chappert, J. and Giradet, J.
C. R. Acad. Sci., 261, 2310, (1965)
- 3 - Schwietzer, C. H.
Acta Haematol., 10 , 174, (1953)
- 4 - Brady, G. W.; Kurkjian, C. R.; Lyden, E. F. X.; Robin, M. B.;
Saltman, P.; Spiro, T., and Terzis, A.
Biochemistry, 7 , 2185, (1971)
- 5 - Gray, H. B.
Adv. Chem. Ser., 100 , 365, (1971)
- 6 - Heald, S. M.; Stern, E. A.; Bunker, B. A.; Holt, E. M. and
Holt, S. L.
J. Am. Chem. Soc., 101, 67, (1979)
- 7 - Marshall, P. R. and Rutherford, D.
J. Colloid Interface Sci., 37, 390, (1971)
- 8 - Theil, E. C.; Sayers, D. E. and Brown, M. A.
J. Biol. Chem., 254, 8132, (1979)
- 9 - Stern, E. A.
Sci. Am., 234, 96, (1976)
- 10- Towe, K. M.
The Journal of Biological Chemistry, 256, N^o 8, 9377 (1981)
- 11- Boas, J. F. and Window, B.
Aust. J. Phys., 19, 573, (1966)
- 12- Dézsi, I.; Keszthelyi, L.; Kulgawczuk, D.; Meinár, B. and
Eissa, N. A.
Phys. Stat. Sol., 22 , 617, (1967)