

MARÍLIA PAIXÃO LINHARES

ESTUDOS DE FOTODISSOCIAÇÃO DA NITROSIL - HEMOGLOBINA

POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

TESE DE DOUTORADO

CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS - CNPq

Rio de Janeiro-1989

## DEDICATÓRIA

AOS MEUS FILHOS PEDRO E ANDRÉ.

## AGRADECIMENTOS

Uma tarefa foi cumprida, o trabalho de tese de doutorado. Desejo agradecer àqueles que estiveram ao meu lado neste período.

Aos orientadores George Bemski e Eliane Wajnberg pelos ensinamentos e pelo carinho que me dedicaram.

À Léa El-Jaick pela colaboração no trabalho e perseverança que me transmitiu.

Ao professor Otaciro Rangel Nascimento pelas discussões e sugestões e em particular por ter nos cedido o programa que permitiu a análise dos espectros de RPE.

Aos amigos Darci Mota Esquível e Henrique Lins e Barros pelo trabalho que vêm realizando incentivando e consolidando o grupo de Biofísica e pelas valiosas discussões.

Ao Raphael de Haro Junior pela colaboração na edição da tese e principalmente pela amizade.

À Elena Mavropoulos pelo apoio na elaboração das amostras.

Ao apoio técnico do DME.

Aos colegas do Departamento de Física Matemática da UFRJ.

À família que pacientemente esperou por este momento, incentivando e ajudando nas tarefas diversas: Pedro, André, Rita, Paula, Cisa, Bernardo, Milton, Carolina, Regina, Claudinha, Cláudia, Gole, Avany, Rodolpho, Maria Cláudia, Tiana, Tereza e Alexandre.

Aos amigos pelo apoio e incentivo.

## RESUMO

Neste trabalho foi observado o retorno intramolecular do ligante NO à heme, em hemoglobina, abaixo de 20K. O objetivo é relacionar os resultados cinéticos com fatores estruturais observados nos espectros de ressonância paramagnética eletrônica.

Para analisar as experiências de cinética utilizou-se o modelo de Subestados Conformacionais no regime de tunelamento. O valor da barreira de energia do pico da distribuição obtido para nitosil-hemoglobina na conformação R foi 4.9 kJ/mol.

Mostra-se que no regime de temperaturas baixas a cinética do estado geminado do NO pode ser estudada durante a iluminação da amostra.

Através do estudo comparativo das três amostras de nitosil-hemoglobina nas conformações R, RT e T, observa-se que a fração dissociada de NO cresce na ordem R, RT e T indicando que a barreira de energia para a reassociação do ligante decresce na mesma ordem.

Observam-se pequenas diferenças nos espectros de ressonância paramagnética eletrônica, antes e durante a iluminação da amostra, indicando alteração(ões) na(s) configuração(ões) da(s) espécie(s) paramagnética(s).

Efeitos de saturação e variação térmica indicam a existência de duas espécies paramagnéticas.

O resultado obtido das experiências de saturação contínua indica um processo de relaxação anômalo para hemoproteínas. A taxa de relaxação é proporcional à temperatura elevada ao expoente  $2.3 \pm 0.3$  para a região entre 7.5K e 104K.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	I
Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Lista de Figuras.....	VI
Lista de Tabelas.....	XV
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 - HEMOPROTEÍNAS.....	5
1.1 - Íon de Ferro em Hemoproteínas.....	8
1.2 - Globina.....	12
1.3 - Resultados de Espectroscopia.....	14
CAPÍTULO 2 - DINÂMICA DE PROTEÍNAS.....	18
2.1 - Subestados Conformacionais.....	20
2.1.1 - Reação da Mb com CO.....	23
2.1.2 - Experiências de Reassociação com COMb.....	28
2.2 - Experiências de Powers e Chance.....	34
2.3 - Experiências de Cinética com Hb.....	36
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 - Preparação da Hb.....	40
3.2 - Preparação de Proteínas Saturadas com NO....	41
3.3 - Preparação de Amostras com IHP.....	42
3.4 - Amostras Desidratadas.....	43

3.5 - Controle de Temperatura e Sistema de Iluminação.....	44
3.6 - Medidas de RPE.....	45
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	46
4.1 - Amostra Padrão.....	48
4.2 - Curvas de Dissociação de Amostras Mais Concentradas.....	52
4.3 - Espectros de RPE da Amostra R.....	57
4.3.1 - Variação Térmica.....	57
4.3.2 - Saturação Contínua.....	60
4.3.3 - Fotodissociação.....	63
4.4 - Amostra T.....	64
4.4.1 - Variação Térmica e Saturação.....	64
4.4.2 - Fotodissociação.....	68
4.5 - Amostra RT.....	70
4.6 - Amostra Desidratada.....	71
CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO.....	73
5.1 - Avaliação dos Modelos de Distribuição de Energia.....	73
5.2 - Modelo para Dissociação.....	79
5.3 - Análise das Curvas da Amostra Padrão.....	83
5.4 - Comparação entre os Resultados de Cinética..	87
5.5 - Análise dos Espectros de RPE.....	90
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	95
APÊNDICE A - MODELO DE YOUNG E BOWNE.....	99
APÊNDICE B - MODELO DE AGMON E HOPFIELD.....	104
REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.1 - Estrutura da heme mostrando também as histidinas proximal F8 e distal E7. A esfera representa a posição do sexto ligante.
- Fig. 1.2 - Grupo heme: através dos grupos carboxilatos das posições 6 e 7, o grupo heme se liga à porção protéica da Hb e Mb<sup>(7)</sup>.
- Fig. 1.3 - Representação do movimento das subunidades da Hb<sup>(7)</sup>.
- Fig. 1.4 - a) Ocupações possíveis dos orbitais d pelos elétrons dos íons FeII e FeIII.  
b) Efeito do campo cristalino  $\Delta$  no estado de spin do íon FeIII<sup>(8)</sup>.
- Fig. 1.5 - Dependência angular das funções de onda 3d.
- Fig. 1.6 - Efeito do campo cristalino nos níveis de energia dos orbitais d<sup>(8)</sup>.  
a) Íon livre  
b) Vizinhança octaédrica  
c) Octaedro com distorção tetragonal.
- Fig. 1.7 - a) Simetria da molécula de Hb representada por quatro objetos simétricos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ .  
b) Resultado da rotação de  $180^\circ$  em torno dos eixos A, B e C.
- Fig. 1.8 - a) Heme na deoxyHb  
b) Heme com o ligante x antes da transição entre os

estados T e R; a tensão produzida na heme está indicada por S.

c) Heme relaxada depois da transição de T para R<sup>(77)</sup>.

Fig. 1.9 - Espectros de RPE, 4.2K, das subunidades  $\alpha$  NO e  $\beta$  NO em vários híbridos da Hb<sup>(41)</sup>.

Fig. 1.10 - Espectros de RPE das subunidades nas temperaturas 4.2K e 77K<sup>(41)</sup>.

Fig. 2.1 - Representação da energia de Gibbs (G) em função da coordenada conformacional (cc) da proteína:

a) subestados conformacionais

b) sistema quase harmônico<sup>(81)</sup>.

Fig. 2.2 - Hierarquia de subestados na Mb. Representação da energia de Gibbs (G) em função da coordenada (cc). Cada vale ou subestado se subdivide em outros vales separados por barreiras menores, e assim sucessivamente<sup>(80)</sup>.

Fig. 2.3 - Representação esquemática dos estados, subestados, flutuações de equilíbrio (FC) e movimentos funcionais importantes (MFI)<sup>(80)</sup>.

Fig. 2.4 - Secção transversal da heme na Mb com o CO ligado ao ferro. O bolso da heme (B), a globina (H) e o solvente (S), estão indicados na figura<sup>(80)</sup>.

Fig. 2.5 - Representação do movimento do ligante através dos poços de potencial da proteína: solvente (S), globina (H), bolso da heme (B) e ferro (A)<sup>(80)</sup>.

Fig. 2.6 - Representação da propagação da tensão liberada na heme com a dissociação ou associação do



ligante<sup>(190)</sup>.

Fig. 2.7 - Curvas de cinética da COMb depois da fotodissociação, para temperaturas entre 190K e 320K<sup>(21)</sup>.

Fig. 2.8 - Curvas de cinética da COMb depois de fotodissociação, abaixo de 160K<sup>(21)</sup>.

Fig. 2.9 - Experiências de flashes múltiplos com COMb, em intervalos de 18s, a 70K.

Fig. 2.10- Distribuições de energia  $g(E)$ , para CO — e O<sub>2</sub> ---- com Mb, cadeia  $\beta$ -Hb e cadeia  $\beta$ -Hb Zurich<sup>(81)</sup>.

Fig. 2.11- Modelo de tunelamento: poço retangular (A) e parabólico (B);  $(H-E_i)$  é a altura da barreira de energia e  $(d-d')$ , a largura<sup>(60)</sup>.

Fig. 2.12- Curvas de cinética da  $\beta$ -HbCO depois de fotodissociação;  $\Delta A(t)$  é a variação da intensidade do sinal da absorção ótica<sup>(47)</sup>.

Fig. 2.13- Representação do modelo de Powers e Chance: o ângulo entre o FeII-C-O de cada estrutura corresponde aos estados MbCO e deoxiMb e aos estados geminados Mb\* e Mb\*\*<sup>(20)</sup>.

Fig. 2.14- Representação esquemática da energia de Gibbs das estruturas R — e T ..... da Hb. O último gráfico representa o modelo proposto a partir das experiências<sup>(52)</sup>.

Fig. 4.1 - Espectros de RPE das amostras de NOHb utilizadas nas experiências de cinética. As setas indicam a posição do campo magnético onde a experiência foi

realizada. A concentração de ferro, o pH, o ganho e a percentagem de NO são: a) 0.2mM, 6.5, 7.2K,  $2 \times 10^9$  e 100%; b) 1.2 mM, 6.5, 11.7K,  $5 \times 10^2$  e 100%; c) 0.4mM, 6.2, 10.1K,  $5 \times 10^2$  e 100%; d) 0.4mM, 6.2, 10.6K,  $2 \times 10^8$  e 14%; e) 0.4mM, 6.2, 10.4K,  $4 \times 10^8$  e 7%

Fig. 4.2 - Curva experimental de cinética da amostra padrão (0.2mM de ferro). a)  $\Delta I_L(t)$  - variação da intensidade do sinal sob iluminação; b)  $\Delta I_D(t)$  - variação da intensidade do sinal no escuro; o ganho em a) é duas vezes o de b).

Fig. 4.3 -  $F_L(t) = \Delta I_L(t)/I_0$  - fração de ligantes dissociados da amostra padrão, sob iluminação:  $\circ$  9.2K,  $\diamond$  11.9K,  $\Delta$  12.5K,  $\times$  13.8 K e  $\nabla$  15.5K. A linha contínua representa a curva teórica obtida do ajuste com a soma de exponenciais. O erro experimental está indicado na curva menor ( $I_0$  é a intensidade do sinal antes da iluminação).

Fig. 4.4 - Curvas normalizadas da amostra padrão:  $N_{L,D}(t) = \Delta I_{L,D}(t)/\Delta I(\infty)$  - fração normalizada de NO desligado: a) com luz:  $\times$  6.2 K,  $\circ$  9.2K, 11.9K, 12.5K,  $\Delta$  13.8K,  $\nabla$  15,5K; b) sem luz:  $\times$  7.2K, 9.2K,  $\nabla$  12.5K, 13.8K. As linhas contínuas representam os ajustes com a distribuição de energia ( $\Delta I(\infty)$  é a variação final da intensidade do sinal).

Fig. 4.5 - Curvas experimentais normalizadas da amostra NOHb com 1.2mM de ferro, pH=6.5 e 100% de NO, sob iluminação:  $\square$  11.7K,  $+$  14.8K,  $\diamond$  16.9K.

Fig. 4.6 - Fração de ligantes dissociada  $F_L(t)$  da amostra NOHb

com 0.4mM de ferro e pH=6.2, na conformação R, sob iluminação: □ 5.9K, + 7.0K, Δ 9.1K, × 12.3K.

Fig. 4.7 - Fração de ligantes dissociados  $F_L(t)$  da amostra de NOHb com 0.4mM de ferro e pH=6.2, na conformação RT, sob iluminação: □ 9.0K, + 10.0K, 11.0K, Δ 12.2K, × 15.5K.

Fig. 4.8 - Fração de ligantes dissociados  $F_L(t)$  da amostra NOHb com 0.4mM de ferro e pH=6.2, na conformação T, sob iluminação: □ 10.4K, + 16.2K, 17.4K, Δ 19.6K

Fig. 4.9 - Curvas experimentais normalizadas  $N_L(t)$  da amostra de NOHb com 0.4mM de ferro e pH=6.2, na conformação R, sob iluminação: a) 5.9K, b) 12.3K

Fig. 4.10- Curvas experimentais normalizadas  $N_L(t)$  da amostra de NOHb com 0.4mM de ferro e pH=6.2, na conformação T, sob iluminação: as curvas obtidas através do ajuste com a distribuição de energia estão representadas pelo símbolo +: a) 10.4K, b) 16.2K, c) 17.4K, d) 19.6K.

Fig. 4.11- Curvas experimentais normalizadas  $N_L(t)$  da amostra de NOHb com 0.4mM de ferro e pH=6.2, na conformação RT, sob iluminação, para 10.0K. Pode-se observar o efeito dos pulsos de luz sobre a curva de cinética.

Fig. 4.12- Espectros de RPE da amostra com 0.4mM de ferro e pH=6.2 na conformação R: as temperaturas e os ganhos relativos aos espectros são, de cima para baixo, respectivamente: 8.1K e  $4 \times 10^2$ , 10.1K e  $5 \times 10^2$ , 22.7K e  $6.3 \times 10^2$ , 53.7K e  $1.25 \times 10^3$ , 76.8K e  $2 \times 10^3$ , 105.3K e  $2.5 \times 10^3$ ; o espectro marcado com

círculos escuros corresponde a temperatura e ganho de 6.3K e  $3.2 \times 10^2$  (potência de microonda PM =  $5 \times 10^{-2}$  mW).

Fig. 4.13- a) Espectros de RPE a 7.5K da amostra com 0.4mM de ferro e pH=6.2 na conformação R: as PM e os ganhos relativos aos espectros são, de cima para baixo:  $1.2 \times 10^{-4}$  mW e  $4 \times 10^3$ ,  $5.2 \times 10^{-4}$  mW e  $8 \times 10^2$ ,  $1.6 \times 10^{-1}$  mW e  $1.25 \times 10^2$ ,  $1.8 \times 10$  mW e  $10^2$ ,  $2.0 \times 10$  mW e  $10^2$ ,  $7 \times 10$  mW e  $10^2$ ,  $2.3 \times 10^2$  mW e  $10^2$ . As setas indicam as posições do espectro onde o processo de relaxação foi investigado.

b) Espectros obtidos através de combinações dos espectros relativos às potências  $1.2 \times 10^{-4}$  mW (A) e  $2.3 \times 10^2$  mW (B): as proporções são, de cima para baixo, respectivamente: (A+0.2B), (A+0.4B), (A+0.9B), (A+B), (0.3A+B), (0.1A+B). Os valores  $g_A=2.038$  e  $g_B=1.991$  indicados por setas correspondem às intensidades máxima e mínima do espectro final.

Fig. 4.14- Gráfico de  $\log(P_{1/2}) \times \log(T)$ : as retas foram traçadas visualmente e a inclinação média corresponde a  $n=2.3 \pm 0.3$ .

Fig. 4.15- Espectro inicial e a diferença entre o espectro inicial e o dissociado das experiências de cinética da amostra R para 5.9K e 7.0K: o ganho e o fator de multiplicação do espectro dissociado são respectivamente:  $4 \times 10^2$  e 2,  $5 \times 10^2$  e 2.

Fig. 4.16- Espectros da amostra com 0.7mM de ferro e pH=6.2 na

conformação T: os ganhos e as temperaturas são:  $5 \times 10^8$  e 188.3K (D),  $5 \times 10^8$  e 102.0K,  $5 \times 10^8$  e 90.0K,  $4 \times 10^8$  e 74.1K,  $4 \times 10^8$  e 78.1K,  $4 \times 10^8$  e 47.2K,  $2.5 \times 10^8$  e 38.1K,  $1.6 \times 10^8$  e 22.7K,  $10^8$  e 16.7K. Os três últimos espectros estão superpostos ao de  $10^8$  e 11.7K (C) ( $PM=4.9 \times 10^{-2}$  mW).

Fig. 4.17- Espectros obtidos através de combinações dos espectros (C) e (D): as proporções são, de cima para baixo, respectivamente:  $(0.2C+D)$ ,  $(0.6C+D)$ ,  $(C+D)$ ,  $(C+0.4D)$ ,  $(C+0.2D)$ ,  $(C+0.1D)$ .

Fig. 4.18- a) Espectros da amostra com 0.7mM de ferro e  $pH=6.2$ , na conformação T, 11.7K: PM e G são, de cima para baixo, respectivamente:  $2.0 \times 10$ mW e  $4 \times 10^{-2}$  (E),  $1.8 \times 10$ mW e  $5 \times 10^2$ ,  $4.9 \times 10^{-2}$  mW e  $10^8$ ,  $1.5 \times 10^{-2}$  e  $10^8$  (F).

b) Espectros obtidos através das combinações de (E) e (F): as proporções são, de cima para baixo, respectivamente:  $(0.3E+F)$ ,  $(0.6E+F)$ ,  $(E+F)$ ,  $(E+0.6F)$ ,  $(E+0.3F)$ .

Fig. 4.19- Espectros inicial (a) e dissociado (b) da amostra com 0.4mM de ferro na conformação T, 10.4K,  $4.9 \times 10^{-2}$  mW e  $G=4 \times 10^8$ . O espectro (b) foi multiplicado por um fator  $\gamma = 2.6$ .

Fig. 4.20- Espectro inicial e a diferença entre os espectros (a) e (b) da figura anterior, com  $\gamma = 3.0$ .

Fig. 4.21- Combinação dos espectros das amostras nas conformações R (0.4mM de ferro e 10.4K) e T (0.7mM

de ferro e 11.7K), indicados na figura por R e T. As proporções são respectivamente:  $(R+0.2T)$ ,  $(R+0.4T)$ ,  $(R+0.6T)$ ,  $(R+T)$ ,  $(0.8R+T)$ ,  $(0.6R+T)$ ,  $(0.4R+T)$ ,  $(0.2R+T)$ . O espectro RT é relativo à amostra na conformação RT com 0.4mM de ferro e 10.6K.

- Fig. 4.22- Espectro inicial e a diferença entre o espectro inicial e o dissociado das experiências de cinética da amostra R, 10.4K, com 0.4mM de ferro, pH=6.2 e  $\gamma = 2$ .
- Fig. 4.23- Espectros da amostra desidratada nas temperaturas: 7.5K, 12.2K, 18.5K, 25.5K, 31.5K, 47.4K, 54.7K, 67.0K (PM=2mW).
- Fig. 4.24- Espectro inicial e diferença entre o espectro inicial e o dissociado das experiências de cinética da amostra desidratada (12.2K e  $\gamma = 1$ ).
- Fig. 5.1 - Curvas de cinética da COHb-carpa<sup>(85)</sup>. Ajuste dos dados experimentais com o modelo B; — nossos ajustes; ---- ajustes de Cobau et al.
- Fig. 5.2 - Curvas de cinética da COHb-carpa. Ajuste com o modelo C.
- Fig. 5.3 - Curvas de cinética da COHb-carpa. Ajustes com os modelos: — A1; ---- A2.
- Fig. 5.4 - Distribuição de energia  $g(E)$  para os modelos: ..... A1; — A2; ---- B; -.-.-.- C.
- Fig. 5.5 - Distribuição de energia de ativação obtida através do ajuste das curvas experimentais da amostra padrão com o modelo da distribuição.
- Fig. 5.6 - Distribuição de energia obtida através do ajuste das

curvas experimentais da amostra na conformação T.

Fig. 5.7 - Gráfico de  $\log [N(t)] \times \log(t)$ : — ajuste com a distribuição de energia da figura anterior. As curvas experimentais estão representadas pelos símbolos:  $\square$  10.4K,  $+$  16.2K,  $\circ$  17.4K,  $\Delta$  19.6K.

Fig. A.1 - Representação do potencial  $V(r,x)$  em função da coordenada da reação  $r$ ;  $x=0$  — e  $x \neq 0$  ----<sup>[26]</sup>.

Fig. A.2 - Distribuições de energia  $g(E)$  obtidas através dos ajustes dos dados experimentais com: cadeia isolada  $\beta$ -HbCO, MbCO e LbO<sub>2</sub> e LbCO (Lb  $\equiv$  soy bean leg Hb)<sup>[26]</sup>, para  $T < 140K$ .

Fig. A.3 - Distribuições de energia  $g(E,T)$  para  $T > 200K$  da MbCO<sup>[26]</sup>.

Fig. B.1 - Energia potencial  $V_A$  e  $V_B$  em função da coordenada da reação  $r$ , para os estados ligado e não ligado da Mb<sup>[25]</sup>.

LISTA DE TABELAS

- Tab. 5.1 - Parâmetros obtidos através do ajuste dos resultados experimentais da COHb-carpa pelo modelo B.
- Tab. 5.2 - Parâmetros obtidos através do ajuste dos resultados experimentais da COHb-carpa pelo modelo C.
- Tab. 5.3 - Parâmetros obtidos através do ajuste dos resultados experimentais da COHb-carpa pelo modelo A.
- Tab. 5.4 - Comparação dos resultados obtidos com os três modelos de distribuição ( $\lambda$  é a largura da distribuição).
- Tab. 5.5 - Parâmetros obtidos através do ajuste das curvas experimentais da amostra padrão com a soma de duas exponenciais ( $B=0.24$  e  $k_p=0.07s^{-1}$ ).
- Tab. 5.6 - Parâmetros obtidos através do ajuste das curvas experimentais da amostra padrão com a distribuição de energia ( $n = 0.3$  e  $\alpha = 1.6\text{mol/kJ}$ ).
- Tab. 5.7 - Parâmetros obtidos através do ajuste das curvas experimentais da NOHb na conformação T, com o modelo de distribuição de energia.



## INTRODUÇÃO

A mioglobina (Mb) e a hemoglobina (Hb) são proteínas que desempenham as funções de armazenar e distribuir o oxigênio. Os estudos atuais sobre hemoproteínas levam em conta a estrutura dinâmica dessas macromoléculas para a compreensão dos mecanismos de dissociação e associação dos ligantes. A reação entre o ligante ( $O_2$ ) e a proteína ocorre através de etapas consecutivas de eventos. A primeira etapa é a entrada do ligante do solvente para a proteína. Nas etapas intermediárias o ligante pode interagir com resíduos de aminoácidos no interior da molécula antes da última etapa: fixação à heme. Nas temperaturas fisiológicas a proteína flutua e os átomos vibram em torno de posições médias de equilíbrio produzindo subestados conformacionais (SC) distintos. A comprovação experimental dos SC foi obtida por estudos de difração de raios X sobre a distribuição espacial do movimento da metaMb <sup>[1]</sup>.

Determinar a influência da superestrutura dinâmica sobre a entrada do ligante no interior da globina, sobre o caminho até a heme e sobre a reação propriamente dita, não é tarefa simples.

Muitos trabalhos teóricos e experimentais sobre dinâmica de proteínas vem sendo realizados. Entender esta reação é dar um passo importante no entendimento da função de proteínas.

Estudos de fotodissociação com COMB <sup>[2]</sup> mostraram que abaixo de 200K a reassociação do ligante não é caracterizada por

um único valor de velocidade de reação. O retorno ocorre através de uma distribuição de energia de ativação. Os diferentes valores de energia estão associados aos SC. Nas temperaturas fisiológicas as moléculas flutuam rapidamente e o retorno do ligante dissociado reflete uma barreira de energia de valor médio.

Os estudos cinéticos sobre a reatividade da heme refletem a mudança de estrutura terciária e quaternária da proteína. Para elucidar a relação entre estrutura e função, a observação da reação com diferentes ligantes e proteína é fundamental.

O espectro de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) do NO ligado à Hb reflete a variação da estrutura quaternária da proteína e as diferenças entre as subunidades.

A reassociação do ligante NO ao citrocromo C, após fotólise foi observada por RPE e a distribuição de energia de ativação foi determinada<sup>[8]</sup>.

Estudos de fotodissociação de NOHb por RPE e absorção ótica a 4,2K foram realizados para avaliar as diferenças entre os espectros da NOHb antes e depois da fotólise<sup>[4]</sup>. Entretanto, a curva de cinética não foi analisada e a distribuição de energia não foi determinada.

Neste trabalho foi observado o retorno intramolecular do NO à heme abaixo de 20K. O objetivo é relacionar os resultados cinéticos com fatores estruturais observados nos espectros de RPE.

O trabalho foi realizado de acordo com as seguintes etapas:

(1)-Depois de optar pelo modelo de SC foi feita uma comparação entre os três modelos de distribuição de energia<sup>(5)</sup> descritos na secção 2.1.2 e nos apêndices A e B, utilizando os resultados experimentais da reassociação do CO à Hb da carpa após flash fotólise (secção 5.1).

(2)-Foram procuradas as condições experimentais adequadas para obtenção das curvas de cinética por RPE através de iluminação prolongada. O retorno do ligante à heme foi acompanhado durante e após a iluminação (secção 4.1).

(3)-O modelo cinético para interpretar a reassociação do ligante foi adaptado às condições experimentais de iluminação prolongada (secção 5.2) e utilizado na interpretação dos resultados de uma amostra padrão<sup>(6)</sup> (secção 5.3). Os resultados também foram interpretados com o modelo de soma de exponenciais.

(4)-Outras amostras foram preparadas variando hidratação, concentração, pH e saturação da amostra com o ligante NO para comparar as respectivas propriedades cinéticas (secções 4.2 e 5.4).

(5)-Os espectros de RPE das experiências de cinética antes e depois de fotodissociação foram analisados. Surgiu a necessidade de estudar os efeitos da variação de temperatura e potência da microonda sobre os espectros de RPE das amostras diferentes. Os resultados obtidos e a respectiva análise estão apresentados nas secções 4.3-6 e 5.5.

O conteúdo de cada capítulo é apresentado a seguir.

No capítulo 1 é apresentada uma breve descrição da Mb e da Hb e as características do sítio ativo. Estudos espectroscópicos destes sistemas são abordados.

No capítulo 2 é feita uma revisão sobre os trabalhos de dinâmica de proteínas e experiências de fotodissociação com Mb e Hb.

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho são descritos no capítulo 3.

No capítulo 4 estão apresentados os resultados das experiências de cinética e os espectros de RPE de cada amostra obtidos na experiência de fotodissociação, variação de temperatura e potência de microonda.

No capítulo 5 é feita uma avaliação crítica dos modelos de distribuição. Os resultados de cinética e os espectros de RPE são analisados.

As conclusões e perspectivas estão no capítulo 6.

## CAPÍTULO 1

### HEMOPROTEÍNAS

As sofisticadas reações químicas que ocorrem nas células permitem a vida. Moléculas orgânicas são metabolizadas no interior da célula, em meio aquoso, à temperatura ambiente e em solução neutra, enquanto que em laboratório são necessárias condições muito especiais: baixa pressão, alta temperatura e poderosos solventes. O que permite o excelente desempenho celular são as enzimas, que aceleram as reações químicas até 100.000 vezes a velocidade normal. A variedade de enzimas é muito grande, mas o que todas têm em comum é que são proteínas, isto é, longas cadeias de aminoácidos. Duas das mais importantes proteínas dos vertebrados são a hemoglobina (Hb) e a mioglobina (Mb). A Hb exibe cooperatividade, carrega quatro dioxigênios ( $O_2$ ) sendo que o primeiro  $O_2$  encontra maior dificuldade para se ligar à proteína que os outros três. A proteína acelera a reação entre os  $O_2$  e o átomo de ferro central da heme, atuando como se fosse uma enzima. A Hb e a Mb são proteínas modelos para o estudo da estrutura e função das proteínas em geral.

A Hb e a Mb são responsáveis pela função respiratória. A Hb é uma proteína com peso molecular 64.650 e 64 Å de diâmetro e tem como função carregar e distribuir o oxigênio. Cada molécula de Hb tem quatro grupos heme, cada um

associado a uma cadeia polipeptídica. A Hb liga o oxigênio ao átomo de ferro da heme nos pulmões e solta-o nos tecidos. A segunda etapa do trabalho da proteína é trazer o dioxigênio de carbono para os pulmões e livrar-se dele. A Mb é equivalente a uma das quatro subunidades da Hb e armazena o oxigênio nos tecidos.

O centro ativo destas proteínas é o grupo heme: um átomo de ferro circundado por um anel porfírico. A heme é protegida por uma cadeia  $\alpha$ , com 141 aminoácidos, ou  $\beta$  com 146 aminoácidos e está localizada no bolso formado pela cadeia polipeptídica e unida a esta através da ligação covalente entre o átomo de ferro e a histidina proximal F8 e ligações de Van der Waals entre átomos do anel porfírico e da cadeia (fig. 1.1 e 1.2)<sup>[7]</sup>.

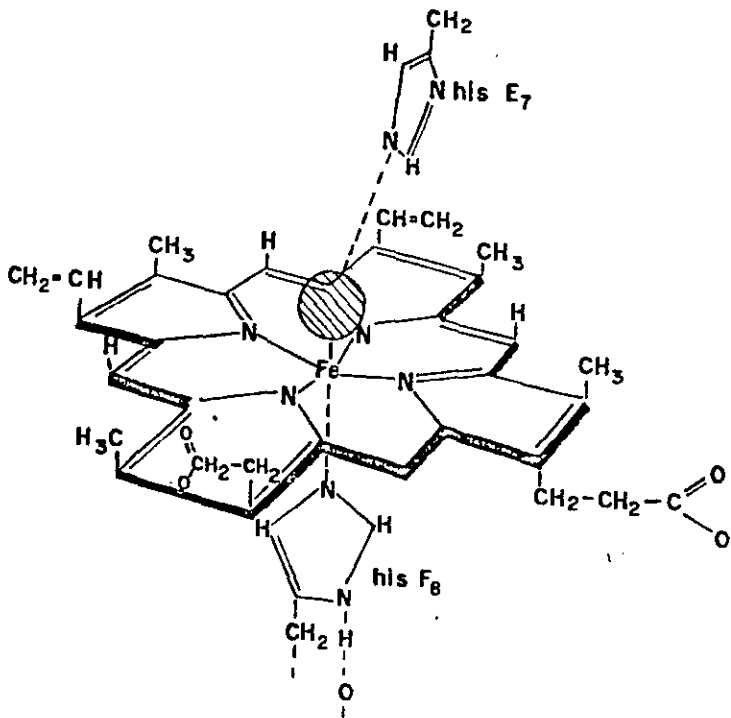


FIGURA 1.1

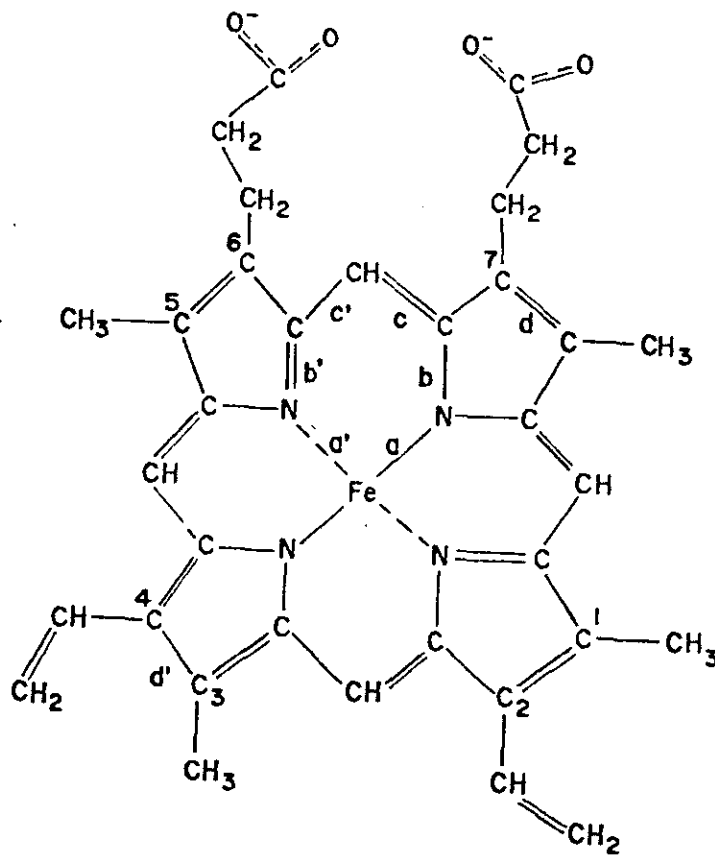


FIGURA 1.2

A estrutura das quatro cadeias da Hb está diretamente relacionada com a performance da proteína no desempenho da sua função biológica.

O átomo de ferro da heme tem coordenação 6, isto é, tem quatro posições ocupadas pelos nitrogênios do anel, a quinta posição pelo nitrogênio da histidina proximal F8 (N<sub>ε</sub>) e a sexta pode estar ocupada pelo ligante (oxiHb), ou estar vazia (deoxiHb), no processo biológico. Nas duas formas o ferro da heme está no estado reduzido (FeII). Pequenas moléculas ou íons, tais como NO e CO, podem se ligar ao ferro na sexta posição, que permanece no estado FeII. Outras moléculas ou íons (H<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O) se ligam ao ferro no estado oxidado (FeIII).

Nos dois estados a coordenação do ferro é octaédrica. Na forma oxiHb, o FeII tem spin zero e na forma deoxi tem spin dois. A geometria da heme também varia na oxiHb o átomo de ferro está contido no plano da heme e na deoxiHb, encontra-se afastado 0.5 Å, na direção da F8 (fig. 1.3).

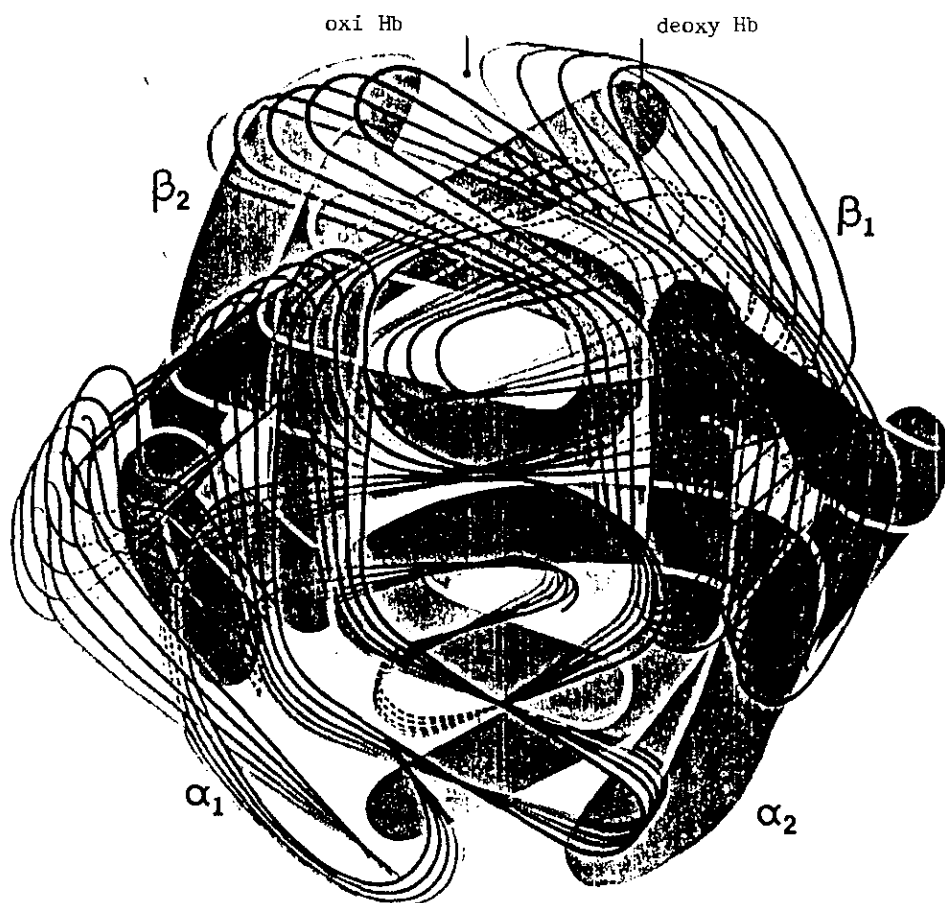


FIGURA 1.3

### 1.1 - ÍON DE FERRO EM HEMOPROTEÍNAS

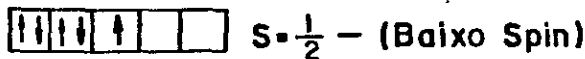
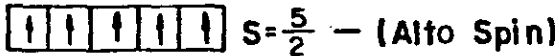
Um átomo de ferro tem 26 elétrons, sendo que 18 estão em camadas fechadas e 8 na configuração orbital  $3d^6 4s^2$ .



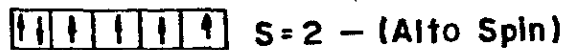
Nas hemoproteínas pode aparecer no estado férrico FeIII, ou ferroso FeII. No primeiro caso a configuração orbital é  $3d^5$  e no último,  $3d^6$ .

A camada 3d consiste de cinco orbitais que podem acomodar no máximo dez elétrons, levando-se em conta seus spins paralelos e antiparalelos como é requerido pelo princípio de Pauli. Quando há menos de dez elétrons, vários arranjos são possíveis, como mostra a figura 1.4.

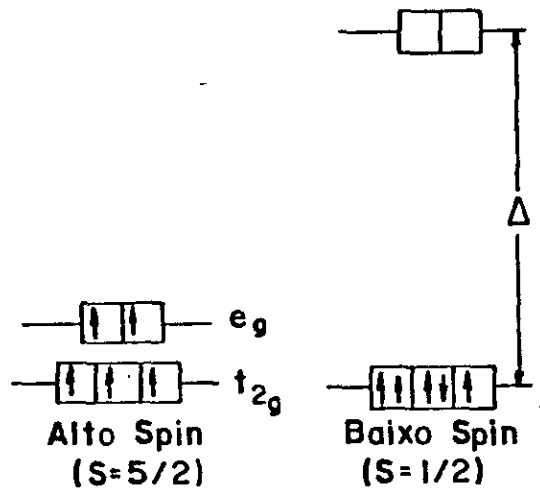
FERRICO ( $Fe^{3+}$ ). ( $3d^5$ )



FERROSO ( $Fe^{2+}$ ) ( $3d^6$ )



(a)



(b)

FIGURA 1.4

A dependência angular das cinco funções de onda ortogonais 3d (orbitais) é representada na figura 1.5. 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 o estado fundamental é pentadegenerado. No campo cristalino o efeito da vizinhança não

é o mesmo sobre todos os orbitais  $d^{(0)}$  e assim a degenerescência é levantada, de modo que o desdobramento dos níveis de energia degenerados deverá ser sensível à simetria da vizinhança.

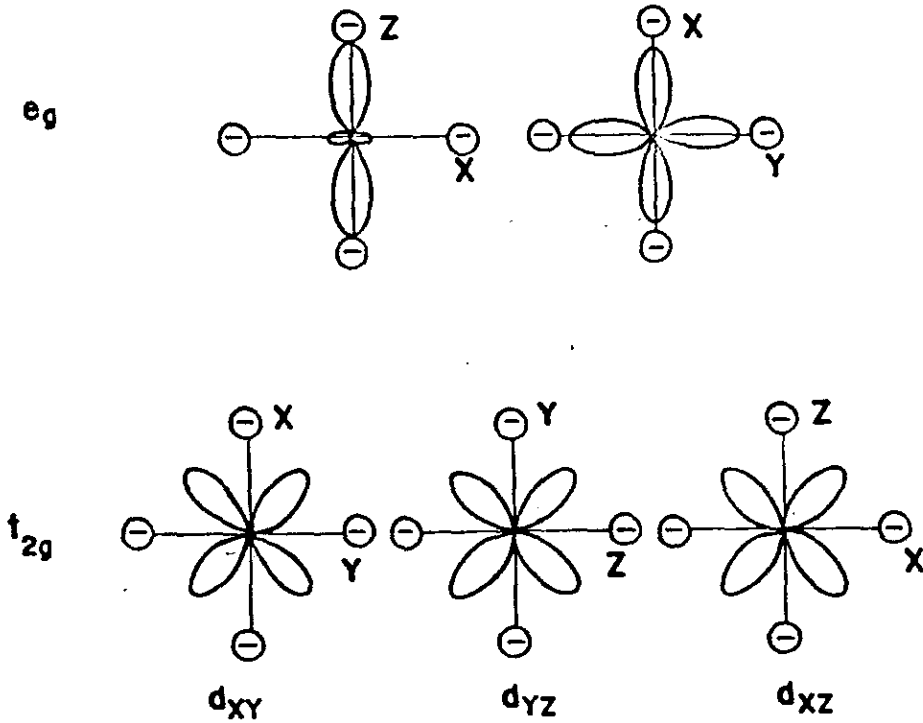


FIGURA 1.5

Numa primeira aproximação, o íon de ferro está octaedricamente coordenado a seis ligantes negativos. Os orbitais d no centro deste octaedro serão desdobrados. Os três orbitais  $t_{2g}$  evitam os vértices negativos do octaedro, enquanto os orbitais  $e_g$  apontam diretamente para as cargas negativas (fig. 1.6). Neste caso, a energia de repulsão coulombiana é

grande e estes orbitais estarão com uma energia maior. A diferença de energia entre os orbitais  $t_{2g}$  e  $e_g$  é chamada parâmetro de campo cristalino ( $\Delta$ ).

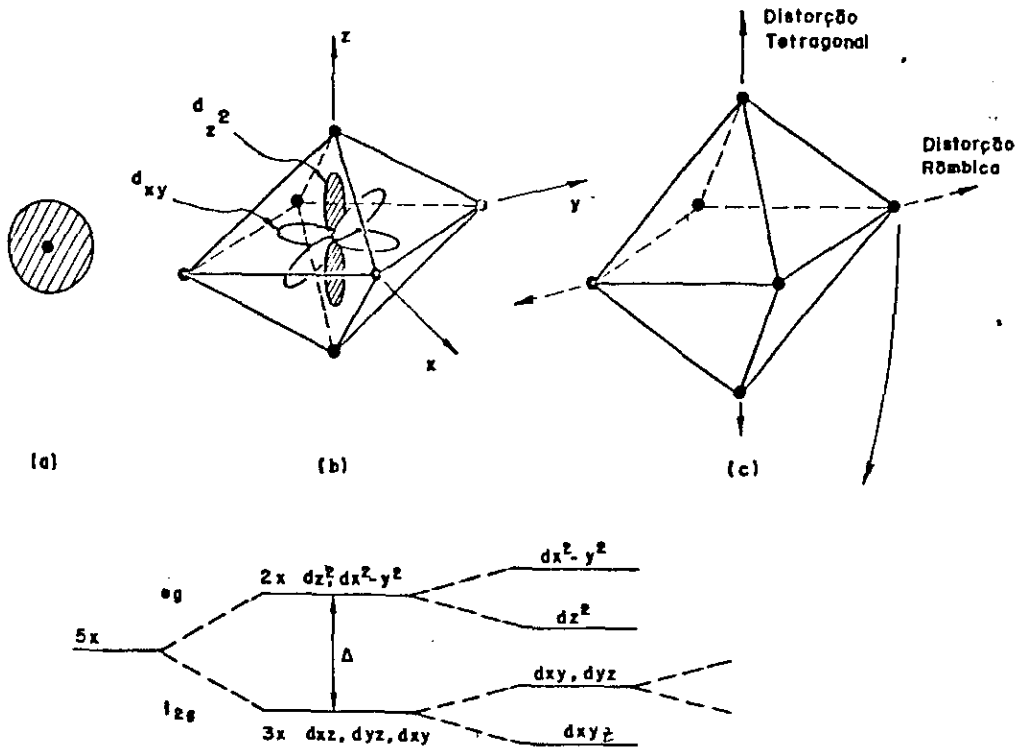


FIGURA 1.6

Dependendo da intensidade do desdobramento do campo cristalino  $\Delta$  pode-se ter uma configuração de spin baixo ou de spin alto; assim, ligantes fortes com campo intenso fornecem uma configuração de spin baixo e ligantes fracos, de spin alto. Na figura 1.4 vemos as ocupações possíveis dos orbitais d pelos elétrons dos íons FeII e FeIII e o efeito do campo cristalino  $\Delta$  no estado de spin do FeIII.

## 1.2 - GLOBINA

A estrutura primária da proteína é definida pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. A cadeia linear na mioglobina está organizada em oito estruturas chamadas hélice  $\alpha$  (estrutura secundária). O arranjo espacial das hélices  $\alpha$  é chamado estrutura terciária. A estrutura quaternária é o resultado do acoplamento de subunidades independentes. Perutz<sup>(9)</sup> determinou a estrutura da Hb através de difração de raios X. A molécula consiste de duas metades idênticas, relacionadas por um eixo de simetria (simetria especular) (fig. 1.7). São três os eixos de simetria, perpendiculares entre si, que se cruzam no centro da molécula. Existe um tipo de Hb com quatro cadeias  $\beta$ , que apresenta a simetria ideal (Hb H- $\alpha$  talassemia).

O empacotamento das cadeias na molécula de Hb é tal que o contato entre cadeias laterais existe entre subunidades diferentes, havendo pouco contato entre as iguais. Os contatos  $\alpha$  e  $\beta$  são de dois tipos: aqueles que não mudam quando a molécula vai da configuração deoxi para a oxi, e os que sofrem as principais mudanças quando há alteração no estado de ligação do ferro. Ligações de hidrogênio e pontes salinas são importantes para manter as subunidades unidas.

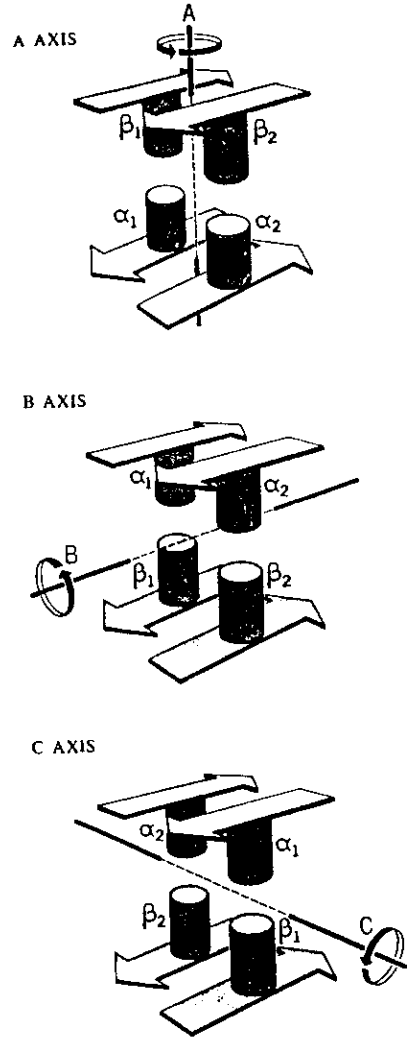
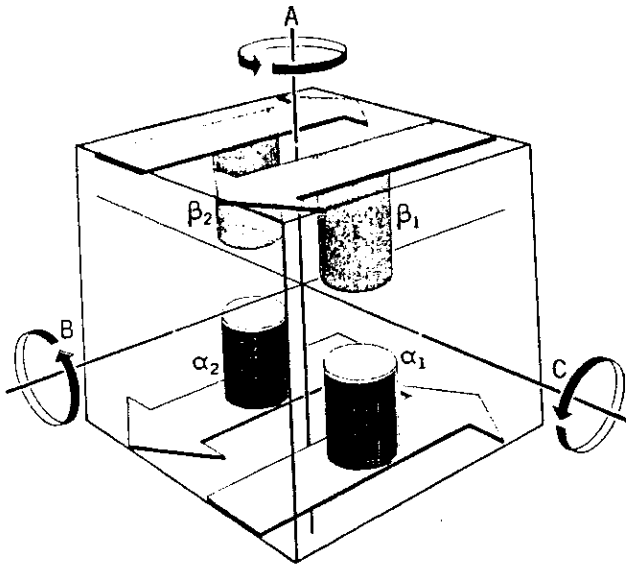


FIGURA 1.7

Existem dois tipos de estruturas ou configurações quaternárias, designadas por R e T (fig. 1.8). Algumas pontes salinas entre cadeias estão ausentes na oxihb, deixando livre as extremidades das cadeias. A conformação é dita relaxada (R), em oposição, à conformação tensa (T) da deoxihb. Na estrutura R, a distância entre os átomos de FeII das cadeias  $\alpha$  é 36 Å e das  $\beta$  é 33 Å. Na estrutura T as distâncias correspondentes são 35 e 40 Å respectivamente <sup>[10]</sup>.

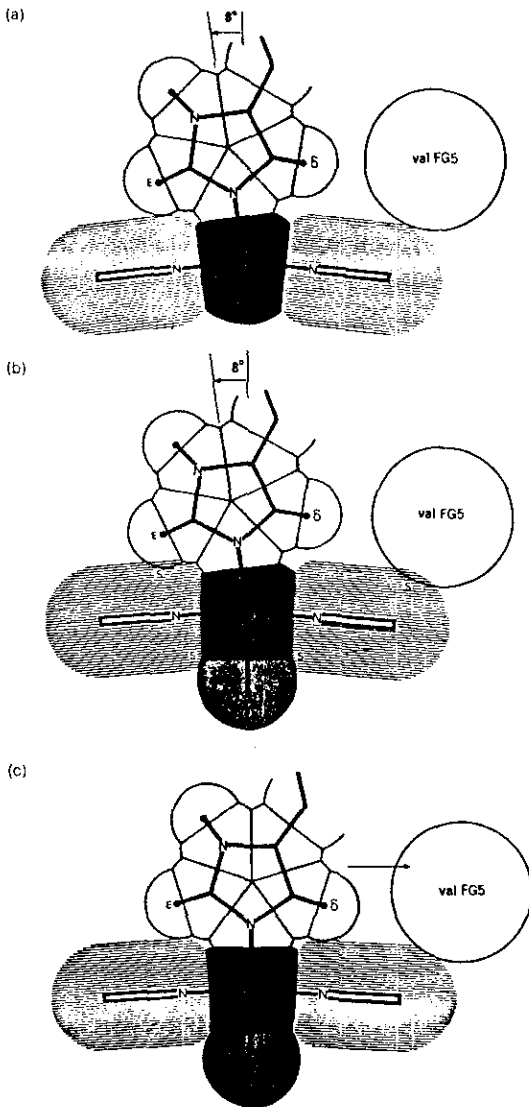


FIGURA 1.8

### 1.3 - RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA

As variações nas estruturas quaternária e terciária devem ser tratadas separadamente. A estrutura terciária pode ser modificada com a presença ou ausência de ligantes, a natureza dos ligantes, a valência e o estado de spin do ferro, pelo pH, fosfatos orgânicos, mutações genéticas, ou modificações químicas.

As propriedades termodinâmicas, tais como a afinidade por um determinado ligante, variam com o equilíbrio entre as estruturas quaternárias R e T <sup>[44]</sup>.

Estudos de raios X mostram que todas as formas, ligadas ou não, da Hb, oxidada ou reduzida, com spin alto ou baixo, cristalizam na estrutura R, de forma isomorfa com a oxiHb. Estes estudos indicam que as duas estruturas quaternárias podem acomodar todos os tipos de estruturas terciárias diferentes<sup>(10)</sup>.

Em solução, as duas estruturas podem ser identificadas por técnicas espectroscópicas. Os espectros da NOHb tem características da estrutura da oxiHb. A adição de inositol hexafosfato (IHP) à NOHb provoca transição para a estrutura T e os espectros são sensíveis à transição<sup>(12)</sup>.

O espectro de RPE ( 77K) da NOHb em solução é uma superposição dos espectros correspondentes a cada orientação do grupo heme-NO em relação ao campo magnético externo<sup>(13)</sup>. O espectro mostra a forma característica de um sistema com simetria rômica. O elétron desemparelhado do NO está parcialmente sobre o ferro da heme e sobre o N $\epsilon$ <sup>(14)</sup>. O espectro é característico da heme hexacoordenada.

A adição de IHP à NOHb induz mudança conformacional, enfraquecendo o campo ligante do ferro e reduzindo a afinidade da proteína pelo ligante. O pH e a presença de inibidores alostéricos induzem uma variação na estrutura eletrônica do sistema N $\epsilon$ -FeII-NO causada pelo nitrogênio da histidina proximal, acompanhada por uma variação na estrutura espacial<sup>(15)</sup>. A mudança espectral foi atribuída à cadeia  $\alpha$  na forma pentacoordenada. O espectro resultante é a soma dos espectros penta e hexacoordenados<sup>(16)</sup>.

Dados de raios X mostram que nos complexos com NO o

ferro é deslocado, na direção do ligante, para fora do plano da heme devido à ligação forte com o NO <sup>(17)</sup>. Este efeito favorece o deslocamento do FeII na direção do NO com adição do IHP, provocando a ruptura da ligação N<sub>e</sub>-FeII.

Nagai et al <sup>(4)</sup> estudaram por RPE e absorção ótica o efeito da estrutura quaternária sobre os espectros das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , à temperatura de 4.2K. Realizaram experiências de fotodissociação com híbridos de NOHb, onde ou a cadeia  $\alpha$ , ou a  $\beta$ , está marcada com NO, na presença, ou ausência de IHP. A figura 1.9 mostra que os espectros dos híbridos com  $\alpha$  NO dependem do estado conformacional da  $\beta$ , enquanto que os espectros de  $\beta$  NO são insensíveis ao estado da  $\alpha$ . O espectro da cadeia  $\alpha$  NO isolada quase não varia com a temperatura, enquanto que para a  $\beta$  NO, o espectro é simétrico a 77K e assimétrico a 4.2K (fig. 1.10). Na presença de IHP, o espectro de absorção ótica fotodissociado da NOHb mostrou uma forma anormal que foi atribuída à unidade  $\alpha$  NO no estado T. A forma anormal pode surgir de um novo estado de spin, ou de uma distorção da conformação da heme.

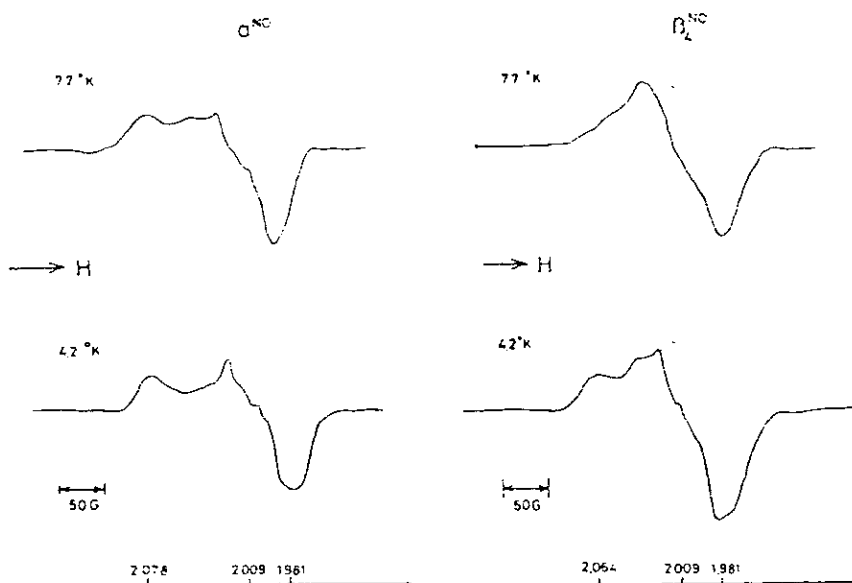


FIGURA 1.9



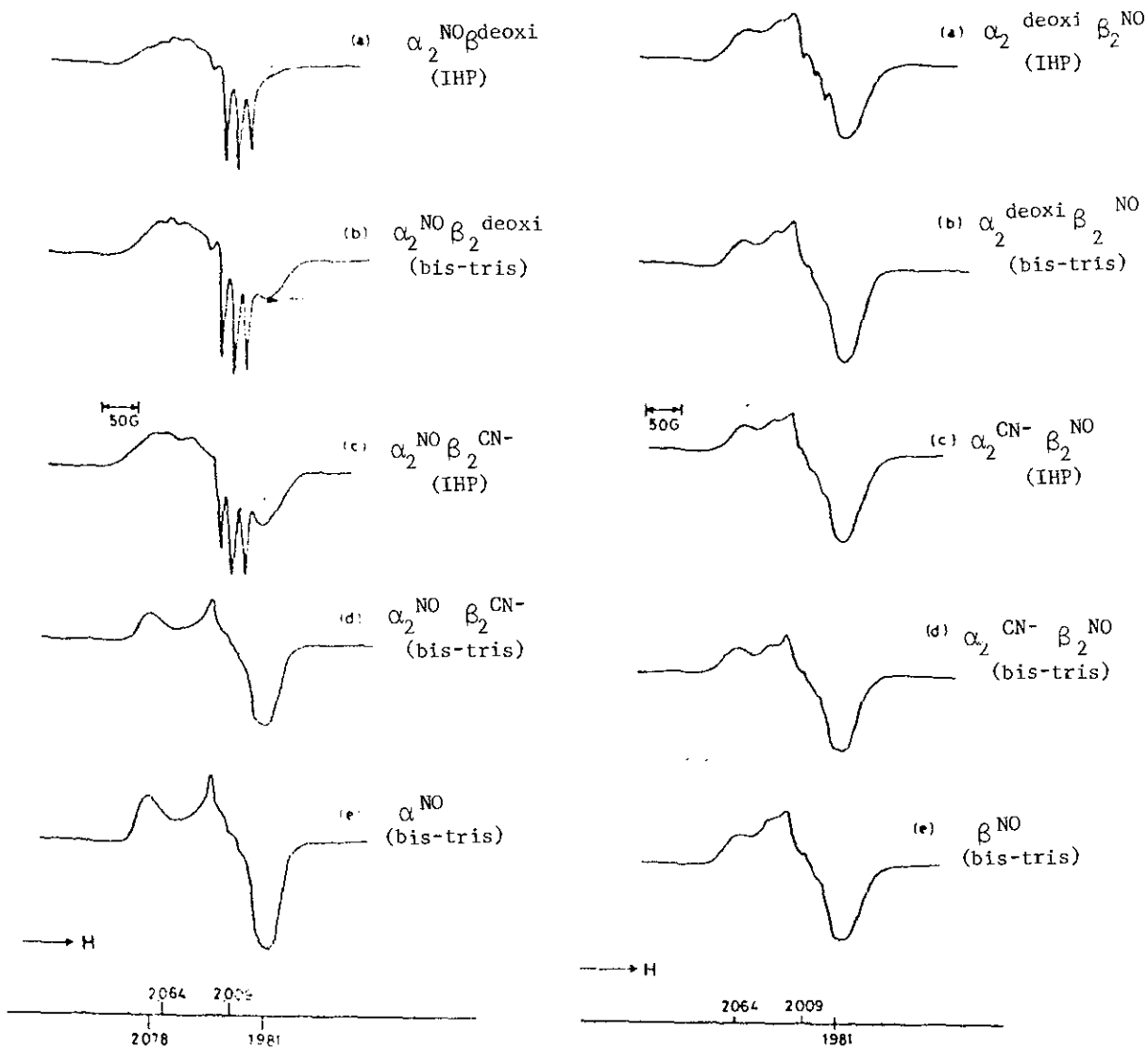


FIGURA 1.10

## CAPITULO 2

### DINÂMICA DE PROTEÍNAS

As primeiras estruturas de cristais de proteínas, determinadas por difração de raios x, foram da metaMb<sup>[19]</sup> e metaHb<sup>[18]</sup>. Estas estruturas revelam posições médias dos átomos nas moléculas. Até 1970 os estudos sobre proteínas foram baseados nestas estruturas estáticas.

Mesmo nos casos em que se sabe que a conformação da proteína muda durante a reação, como é o caso da Hb, esta mudança foi tratada como uma transição abrupta entre duas estruturas rígidas, transição do estado R para o estado T<sup>[19]</sup>.

Nos últimos 15 anos os estudos de proteínas têm incorporado uma nova visão do sistema biológico. Sabe-se agora que os átomos em uma molécula de proteína estão em constante movimento e que a estrutura cristalográfica é uma representação da estrutura média. Os átomos exibem flutuações de alta frequência em torno dessas estruturas. A proteína é um sistema dinâmico cujos detalhes de sua conformação variam constantemente<sup>[20,21]</sup>.

O conhecimento das posições atômicas médias da proteína é o ponto de partida para uma descrição completa da atividade da proteína. Esta descrição dinâmica surgiu dos estudos pioneiros de grupos experimentais e teóricos.

Karplus et al<sup>[20]</sup> têm investigado o movimento

atômico interno das proteínas através de simulações em computadores. Foram produzidos gráficos da Mb onde estão representadas 7 posições intermediárias em intervalos de 5 picosegundos. O estudo da Mb faz crer que tais movimentos devem ocorrer também em outros sistemas<sup>[22]</sup>. Em alguns casos as simulações mostram que os movimentos atômicos são responsáveis pela atividade da proteína<sup>[22]</sup>.

Como um dos resultados do estudo dinâmico de hemoproteínas dois modelos com idéias ortogonais foram propostos. No modelo de Goldstein et al<sup>[28]</sup> flutuações ocorrem dentro de um único poço de potencial multidimensional e são harmônicas ou quase harmônicas e no modelo de Frauenfelder et al<sup>[2,24]</sup> existem múltiplos mínimos locais de potencial ou subestados conformacionais. Neste último caso os movimentos internos correspondem a uma superposição de oscilações dentro do poço de potencial e transições entre eles. Os dois modelos foram aplicados aos resultados experimentais de cinética da COMB produzindo bons resultados.

Experiências de fotodissociação realizadas por Frauenfelder et al<sup>[2]</sup> em COMB demonstraram que o processo de reassociação do ligante para temperaturas abaixo de 180K é não exponencial e observa uma lei de potência. Neste caso a reassociação seria heterogênea e o retorno do ligante ocorreria através de um espectro de energias de ativação. A presença deste espectro seria associada a muitos subestados conformacionais (SC) para Mb. Corroborando com esta idéia, Elber e Karplus<sup>[22]</sup> demonstraram que a superfície de energia potencial da proteína é caracterizada por um grande número de

vales termicamente acessíveis na vizinhança da estrutura nativa.

Outros modelos, alguns baseados em SC, foram propostos para explicar a cinética não exponencial, entre eles citamos os de Agmon e Hopfield<sup>[25]</sup>, Young e Bowne<sup>[26]</sup>, Jortner e Ulstrup<sup>[27]</sup>, Redi e Hopfield<sup>[28]</sup>, Chance et al<sup>[29,30]</sup> e Stein<sup>[31]</sup>

Neste capítulo serão apresentados em detalhes os modelos de Frauenfelder e Chance. Serão discutidas experiências de fotodissociação com os ligantes CO e NO em Hb e Mb.

## 2.1 - SUBESTADOS CONFORMACIONAIS

A estrutura primária das proteínas é formada por ligações covalentes fortes e a estrutura terciária é estabilizada por ligações fracas (pontes de hidrogênio e enxofre) entre partes diferentes da cadeia polipeptídica. Não existem condições de periodicidade que forcem a molécula a uma única estrutura. Em consequência, a proteína pode existir em um grande número de estruturas levemente diferentes SC<sup>(1,31,32)</sup>. Muitos estados fundamentais com energias próximas fazem com que as proteínas tenham características físicas em comum com sistemas desordenados tais como: vidros, vidros de spin e redes neurais. Até o momento não existe uma teoria unificada que leve em consideração tanto os aspectos da estrutura quanto os da dinâmica das hemoproteínas. Entretanto muitas experiências vêm fortalecendo o conceito de SC<sup>(1,3,24+33-38)</sup>

A proteína estudada como protótipo, COMb, exibe dois estados principais: a forma ligada carboxiMb e a não ligada deoxiMb. Cada um desses estados da proteína contém muitos SC que desempenham a mesma função biológica e que diferem em detalhes estruturais. A figura 2.1 mostra a energia de Gibbs na representação do modelo de SC e num sistema quase harmônico.

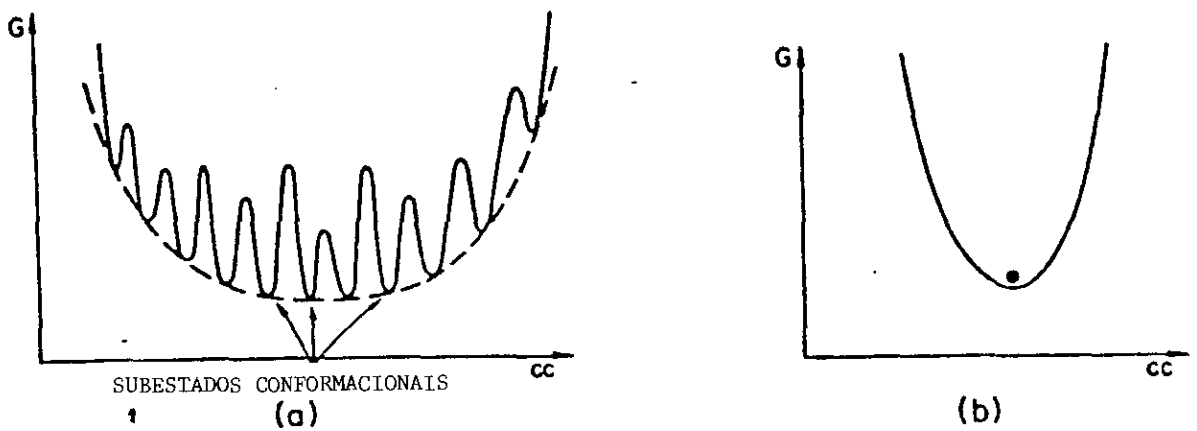


FIGURA 2.1

Nas experiências de espectroscopia de infravermelho<sup>[96,98]</sup> foi estabelecida uma hierarquia de subestados onde cada vale ( $SC_1$ ) da figura 2.2 está subdividido em subestados ( $SC_2$ ), separados por barreiras menores e novamente subdivididos ( $SC_3$ ). Existe uma hierarquia de subestados que se subdividem pelo menos três vezes<sup>[99]</sup>.

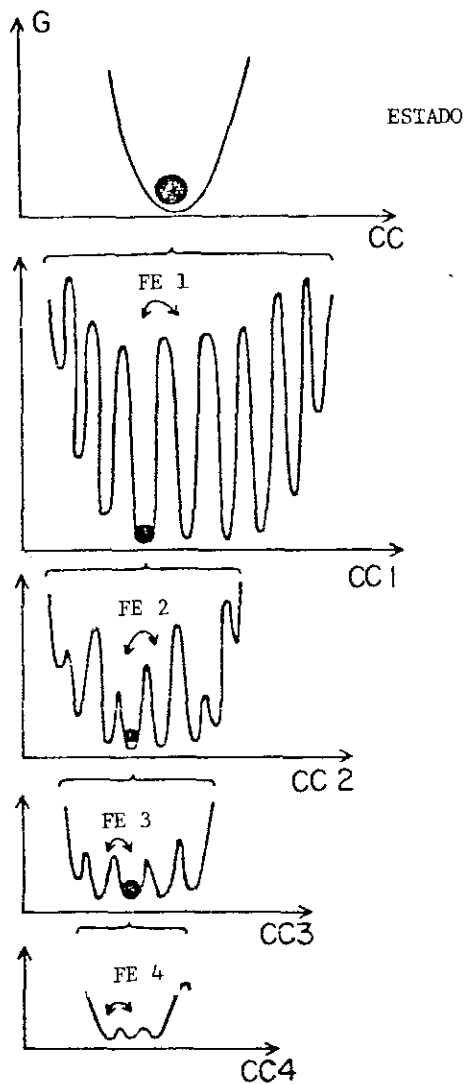


FIGURA 2.2

Uma proteína em repouso à temperatura fisiológica não permanece em um único SC, mas flutua entre eles (flutuações de equilíbrio). A figura 2.3 mostra dois estados da proteína e os correspondentes subestados. Quando a proteína entra em ação, a transição entre os dois estados ocorre através de

movimentos funcionais importantes. As reações da proteína são fenômenos dissipativos, em contraste com a flutuação da proteína em repouso. Estes movimentos podem ser descritos pela termodinâmica de equilíbrio e as duas classes de movimento podem ser relacionadas pelo teorema Flutuação-Dissipação (40,41).

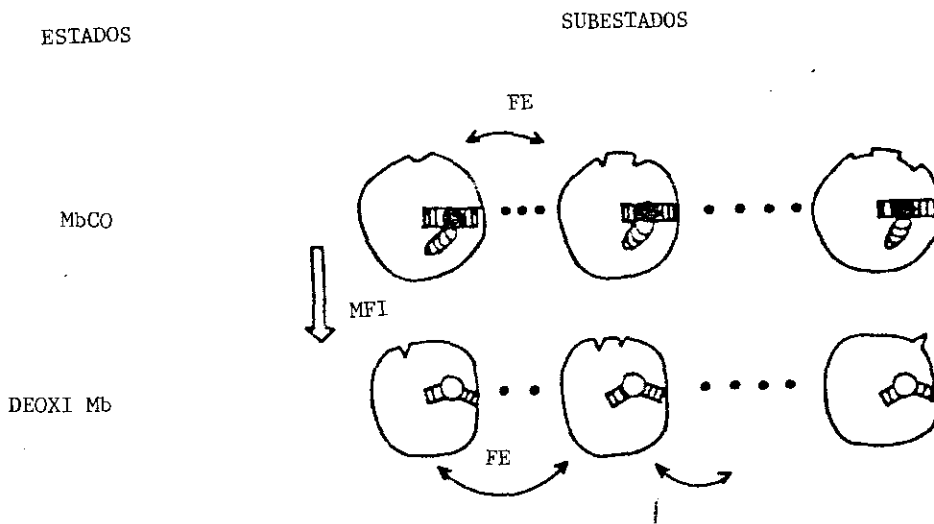


FIGURA 2.3

### 2.1.1- REAÇÃO DA Mb COM CO

A figura 2.4 mostra o caminho da molécula CO do solvente para o bolso da heme e em seguida para o sítio de ligação. A molécula CO executa um movimento browniano no solvente, move-se através da globina, através do bolso da heme





proteína e a reação com o ligante devem ser igualmente considerados. Entretanto tal modelo é suficientemente complexo, e não está formulado nos dias de hoje.

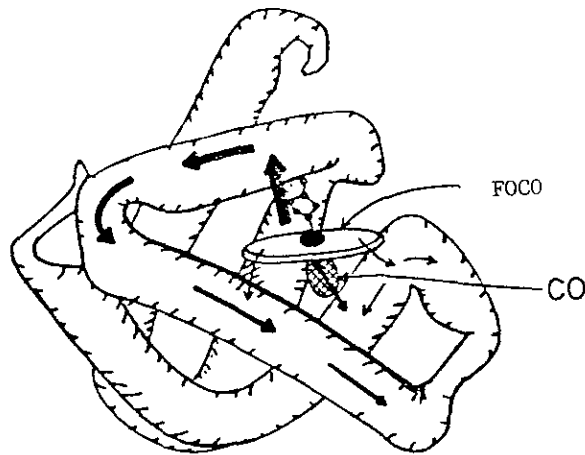


FIGURA 2.6

Nas experiências de fotodissociação com laser pulsado são observados dois comportamentos de acordo com a temperatura<sup>(2)</sup>. Para temperaturas acima de 180K, a reassociação é exponencial ou uma soma de exponenciais (fig.2.7). Acima de 300K todos os ligantes reassociam, vindos do solvente. Quando a temperatura diminui, alguns ligantes retornam antes de chegar ao solvente e o resultado é uma mistura de processos. Abaixo de 180K todos os ligantes

permanecem no bolso da heme e um único processo ocorre, o processo geminado (fig.2.8). A curva de cinética não segue o comportamento de Arrhenius e apresenta uma lei de potência. A interpretação dada a estes resultados é que para temperaturas baixas as moléculas de Mb estão congeladas em diferentes SC que correspondem a diferentes barreiras de energia de ativação. Acima de 300K a proteína flutua entre os SC e a reassociação exponencial corresponde ao retorno do solvente.

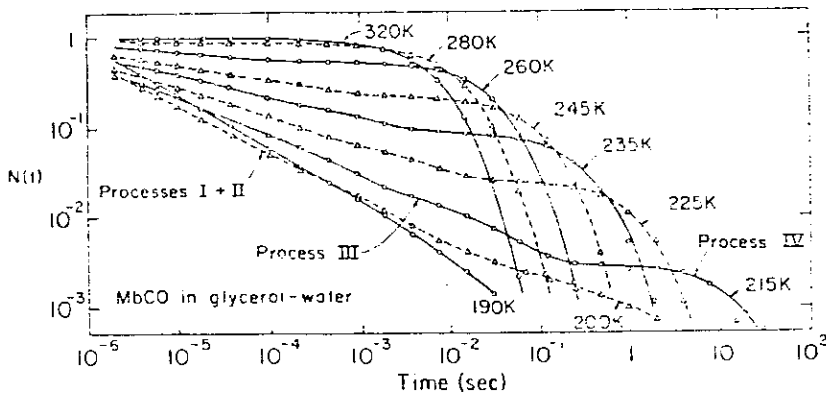


FIGURA 2.7

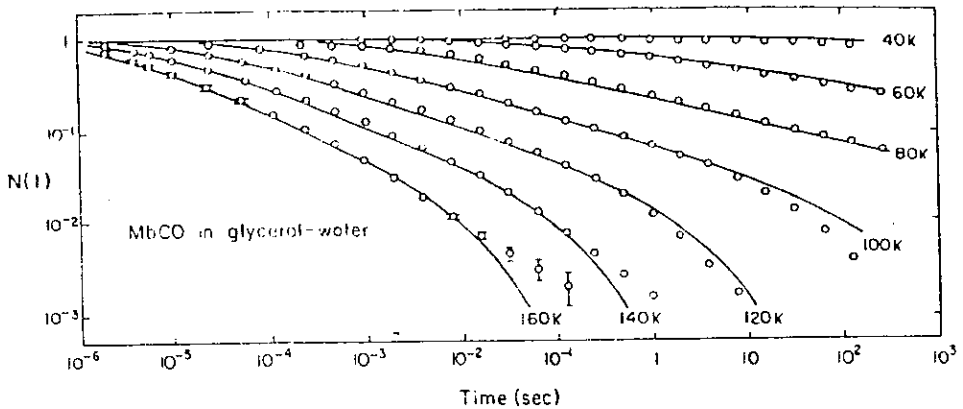


FIGURA 2.8

Outras proteínas e ligantes exibem o mesmo comportamento não exponencial observado para a COMB<sup>[8, 99, 95-42-44]</sup>. Para temperaturas abaixo de 180K a reassociação é caracterizada por uma distribuição de energia de ativação  $g(E)$ . Duas situações podem ocorrer durante a reassociação: as proteínas são um sistema homogêneo que pode exibir o espectro total de energias de ativação, ou um sistema heterogêneo onde cada proteína está presa a uma conformação particular que corresponde a um único valor de energia de ativação. Experiências com pulsos de luz da ordem de microssegundos favorecem a interpretação do sistema heterogêneo. Se as proteínas fossem homogêneas, pulsos sucessivos iriam favorecer subestados de vida mais longa e a amplitude da reassociação deveria decrescer com o tempo (fig. 2.9).

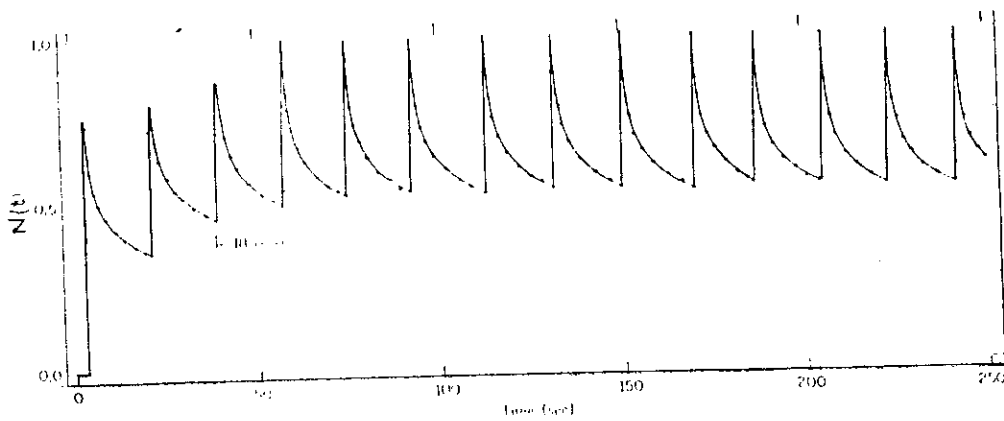


FIGURA 2.9

## 2.1.2 EXPERIÊNCIAS DE RESSOCIAÇÃO COM COMB

Nas experiências de fotodissociação de Frauenfelder et al<sup>[2]</sup> a proteína, em um solvente saturado de ligantes, é colocada em um criostato e a temperatura é ajustada. O sistema está inicialmente no estado ligado (A). Um pulso de laser de 2 micro segundos e 590 nm quebra a ligação covalente do ferro com o ligante, que se move para o bolso da heme e o sistema passa para o estado não ligado (B). O ligante pode reassociar de (B) com razão de retorno  $k_{BA}$  ou escapar para o solvente, se a temperatura está acima de 200K. A reassociação é monitorada acompanhando a intensidade do sinal na banda de Soret (436nm). A variação da intensidade do sinal corresponde a fração de ligantes  $N(t)$  que permanece desligada após o pulso de luz (figuras 2.7 e 2.8). Abaixo de 200K, o ligante retorna de (B) e a curva de cinética tem a forma aproximada da lei de potência:

$$N(t) = (1+t/t_0)^{-n} \quad (2.1)$$

onde  $t_0$  e  $n$  são parâmetros dependentes da temperatura. Se a transição de (B) para (A) é do tipo Arrhenius, a razão de retorno é dada pela relação:

$$k_{BA} = A_{BA} \exp(-E_{BA}/kT) \quad (2.2)$$

onde  $E_{BA}$  é a barreira de energia de ativação,  $A_{BA}$  é o fator de frequência e  $k$ , a constante de Boltzman. No caso de uma única

barreira o retorno do ligante seria uma simples exponencial:

$$N(t) = \exp(-k_{BA} t). \quad (2.3)$$

Para justificar o comportamento não exponencial o grupo de Frauenfelder postulou que para temperaturas baixas as moléculas de proteína possuem diferentes barreiras de energia de ativação. A probabilidade de encontrar a proteína com energia entre  $E_{BA}$  e  $E_{BA} + dE_{BA}$  é  $g(E_{BA}) dE_{BA}$ , tal que:

$$N(t) = \int dE_{BA} g(E_{BA}) \exp(-k_{BA} t) \quad (2.4)$$

A distribuição  $g(E_{BA})$  pode ser obtida através da transformada inversa de Laplace da equação acima:

$$\begin{aligned} N(t) &= kT \int [dk_{BA} g(k_{BA}) \exp(-k_{BA} t)] / k_{BA}, \\ &= kT L(g(k_{BA}) / k_{BA}) \end{aligned} \quad e$$

$$g(k_{BA}) = (k_{BA} / kT) L^{-1} N(t).$$

Substituindo  $N(t)$  pela equação 2.1:

$$L^{-1}(1+t/t_0)^{-n} = [k_{BA}^{n-1} t_0^n / \Gamma(n)] \exp(-t_0 k_{BA}),$$

obtem-se:

$$g(k_{BA}) = [ (k_{BA} t_0)^n \exp(-t_0 k_{BA}) ] / k \Gamma(n). \quad (2.5)$$

Derivando  $g(k_{BA})$  e igualando a zero, o valor de  $k_{BA}$  no pico da distribuição é  $k^p = n/t_0$ . Substituindo  $A_{BA}$  na equação 2.2 por

$n/t_0 \exp(E^P/kT)$  obtém-se a constante de retorno e a distribuição em função de  $E^P$ .

$$g(E_{BA}) = g_0 \exp[\alpha(E^P - E_{BA}) - n \exp(\alpha/n)(E^P - E_{BA})] \quad (2.6)$$

onde  $n = \alpha kT$  e  $g_0$  é uma constante obtida da condição de normalização:

$$\int dE_{BA} g(E_{BA}) = 1$$

As curvas experimentais  $N(t)$  (fig.2.8) para várias temperaturas foram ajustadas pelas equações 2.2, 2.4 e 2.5 com  $\alpha$ ,  $n$ ,  $E^P$  e  $A_{BA}$  como parâmetros. As distribuições obtidas a partir das experiências com Mb, ZHHb (Hb Zurich) e  $\beta$ -Hb com CO estão na figura 2.10. A avaliação dos resultados indica que a distribuição  $g(E_{BA})$  pode ser considerada independente da temperatura para  $T < 200K$ . O fator pré-exponencial  $A_{BA}$  poderia ter também valores dados por uma distribuição. Entretanto os dados experimentais obtidos por este procedimento não justificam esta generalização e este fator foi considerado constante.

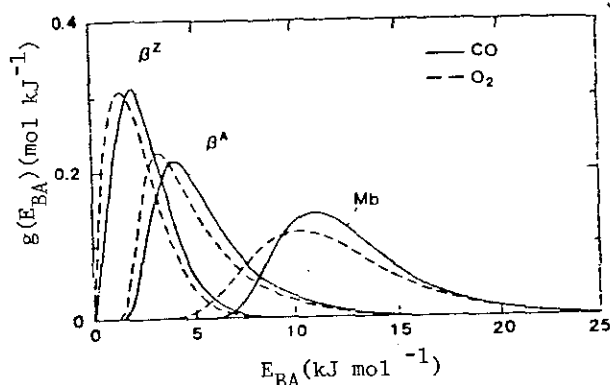


FIGURA 2.10

Para temperaturas altas as proteínas flutuam entre os SC e acima de uma temperatura de relaxação as flutuações são mais rápidas que as razões de retorno e o ligante encontra uma barreira de energia média nas proteínas. A reassociação direta do bolso da heme, processo geminado, torna-se exponencial e a razão de retorno  $k_{BA}$  passa a ser determinada pela média da distribuição  $g(E_{BA})$ .

Abaixo de 80K a reassociação do CO para Mb é mais rápida do que o previsto pelas equações 2.2, 2.4 e 2.5. O comportamento não ativado e independente da temperatura sugere tunelamento intramolecular do ligante CO através da barreira de energia<sup>[45]</sup>. O trabalho realizado com isótopos de CO mostrou que a razão de retorno é dependente da massa<sup>[46]</sup>. Nas experiências com cadeias isoladas da Hb observa-se que abaixo de 10K o retorno é essencialmente independente da temperatura e entre 10K e 30K a razão tende a um valor limite constante<sup>(34,47)</sup>.

A razão de retorno foi calculada no regime de tunelamento molecular através da expressão:

$$k_t = A_t(T) \exp\left[(-\beta/h) 2M(H-E_t)^{1/2} d(E)\right], \quad (2.7)$$

onde M é a massa reduzida do sistema Fe-CO, h a constante de Plank,  $\beta$  um fator constante igual a  $\pi/2$  para barreira parabólica e H e d(E) são a altura e a largura da barreira de energia indicadas na figura 2.11. No modelo, os potenciais A e B estão acoplados aos fonons do sistema. A molécula no poço B tunela através da barreira para o poço A e então decai para o estado fundamental emitindo um ou mais fonons. Para  $T < 10K$  o

tunelamento ocorre onde a barreira é mais larga. Entre 10K e 40K estados excitados de B podem estar ocupados e o tunelamento ocorre onde a barreira é mais estreita. Na equação 2.7, o fator exponencial de Gamow é a probabilidade de haver transição de (B) para (A) e o fator de frequência reflete o mecanismo de relaxação envolvido.

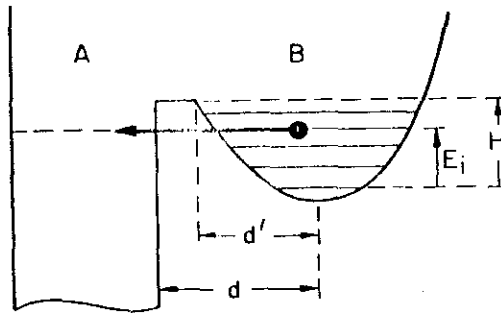


FIGURA 2.11

A frequência com que o ligante tenta passar através da barreira contribui para o fator pré-exponencial, que neste caso é uma função da temperatura. Quando a temperatura tende a zero, a molécula só pode perder energia através da emissão espontânea de um simples fonon e a razão de retorno  $k_i$  torna-se constante.

A largura e a altura da barreira foram relacionadas através da expressão:

$$d(E) = d_0 (E / E^P)^\delta \quad (2.8)$$



que foi substituída na equação 2.7, supondo que a transição ocorre no estado fundamental do sistema ( $H-E_i=E$ ). O resultado é:

$$k_t = A_t(T) \exp(-\gamma E^{\delta+1/2}), \quad (2.9)$$

com  $\gamma = (d_0 \pi 2M^{1/2}) / (2h (E^P)^\delta)$ .

As curvas experimentais  $N(t)$  de reassociação do CO na cadeia  $\beta$ -Hb foram ajustadas com as equações 2.4 e 2.9 e com a distribuição obtida  $g(E)$  no regime de Arrhenius (figura 2.12). Os parâmetros determinados foram  $d_0$  e  $A_t(T)$ .

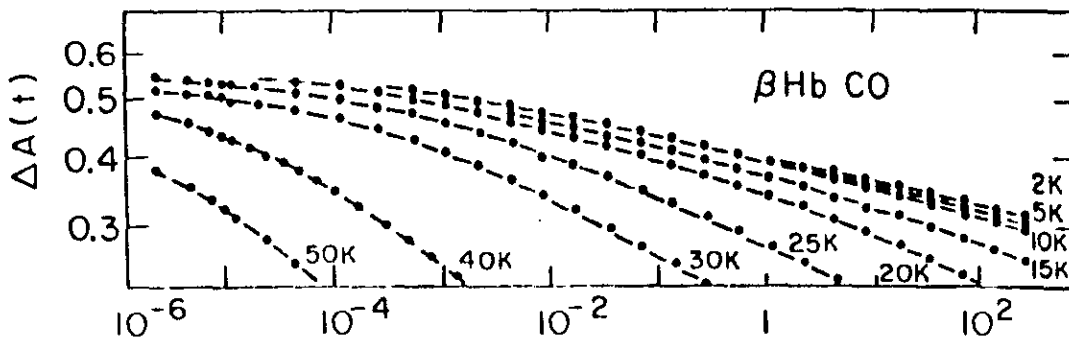


FIGURA 2.12



## 2.2 - EXPERIÊNCIAS DE POWERS E CHANCE

Nestas experiências os resultados foram analisados de acordo com um modelo que considera que estados intermediários discretos COMB ocorrem durante a dissociação e a reassociação do ligante para temperaturas abaixo da temperatura de congelamento  $T_c^{(48,49)}$ . É possível conseguir equilíbrio de concentrações de estados intermediários através da iluminação prolongada e contínua. Para caracterizar as propriedades das populações cinéticas do produto fotodissociado, o grupo utilizou as técnicas de absorção ótica, raios X e espectroscopia Raman.

Para uma temperatura constante, os estados intermediários isolados dependem somente da intensidade da luz e da constante de retorno. As moléculas com velocidades maiores retornam durante a iluminação e contribuem muito pouco para a concentração de equilíbrio. Regulando a iluminação para 50% de fotodissociação e em seguida apagando a luz, o retorno da metade mais lenta foi acompanhado seguindo a variação da intensidade da banda em 765nm. A curva de cinética  $A(t)$  foi ajustada pela soma de duas exponenciais com constantes de retorno  $k_1$  e  $k_2$  e amplitudes  $C_1$  e  $C_2$ :

$$A(t) = C_1 \exp(-k_1 t) + C_2 \exp(-k_2 t) \quad (2.10)$$

os índices 1 e 2 caracterizam duas populações de equilíbrio da metade das moléculas mais lentas.

Neste modelo os autores reconhecem que as proteínas

não são todas idênticas durante a reação, embora, essas diferenças não tenham contribuição mensurável para as constantes de retorno, ou, de outra forma: a variação de cada constante está dentro do erro de determinação e análise. Desta forma o sistema foi considerado homogêneo. O método de múltiplas exponenciais também foi utilizado satisfatoriamente por Iizuka et al <sup>(50)</sup> para interpretar os resultados de cinética do ligante O<sub>2</sub> com a cobalto-Mb e com a cobalto-Hb.

Os resultados obtidos das experiências de cinética estão resumidos na fig. 2.13:

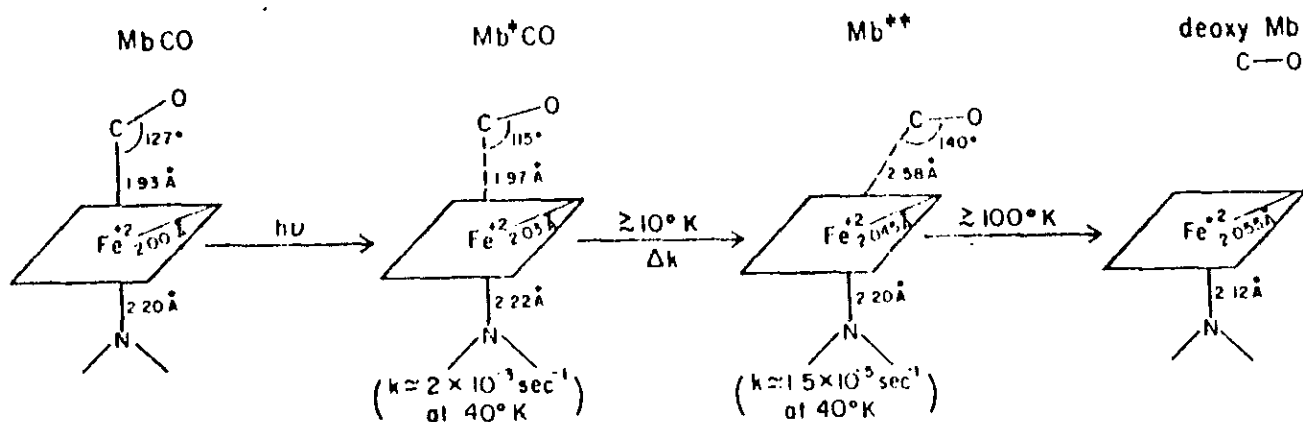


FIGURA 2.13

Mb\*CO é o fotoproduto acumulado por iluminação contínua a 4K. Esta população pode corresponder à população mais rápida a 40K, ou mesmo recombinar tão rápido que não é isolada nesta temperatura. Neste último caso mais dois estados geminados Mb\* e Mb\*\* seriam isolados a 40K, totalizando três

fotoprodutos. O fotoproduto  $Mb^*CO$  mantém a mesma distância entre o ferro e o carbono que o estado ligado  $MbCO$ , enquanto que em  $Mb^{**}$  a distância aumenta cerca de  $0.6 \text{ \AA}$ . Ambos os fotoprodutos são significativamente diferentes da deoxiMb. As duas posições do ligante dentro do bolso da heme correspondem a sítios de baixa afinidade onde o ligante pode permanecer antes de retornar ao ferro.

### 2.3- EXPERIÊNCIAS DE CINÉTICA COM Hb

Experiências de fotodissociação com Hb em temperatura fisiológica são importantes para o estudo da cooperatividade. As experiências com CO são mais abundantes que com o ligante fisiológico  $O_2$  porque seus resultados permitem uma interpretação mais fácil e a reação também exhibe cooperatividade<sup>(51)</sup>.

O desenvolvimento nos anos 70 do laser pulsado de ns e ps possibilitou um grande progresso nas investigações de cinética rápida e a reassociação do CO após fotólise pode ser observada<sup>(52-56)</sup>.

A influência combinada das variações estruturais e da recombinação geminada sobre o mecanismo da reação tem sido investigada através de técnicas variadas<sup>(57-60)</sup>.

A questão importante que se coloca é como a mudança na estrutura quaternária interfere sobre a frequência de entrada (saída) de ligantes na (da) proteína ou sobre a velocidade da ligação heme-CO.

Nas experiências de cinética com um híbrido de Hb

na presença de inibidores alostéricos<sup>[61]</sup>, foi observada uma redução na recombinação geminada e cerca de 90% dos ligantes reassociam na fase bimolecular. Apesar das diferentes frações de reassociação geminada entre as proteínas na forma R e T, a constante de tempo do processo permanece igual, indicando que as propriedades cinéticas não foram afetadas. A extrapolação do comportamento cinético para uma amostra na forma T pura fornece uma expectativa de 1% de recombinação geminada, com a mesma constante de retorno observada para a amostra R<sup>[62]</sup>.

As afinidades diferentes das formas R e T por CO se manifestam na constante de associação média<sup>[63]</sup>. De acordo com as experiências de Murray et al<sup>[62]</sup>, a diferença de afinidade entre as duas estruturas quaternárias é exclusivamente devida ao decréscimo da constante de associação na última etapa do ligante para a heme (fig. 2.14).

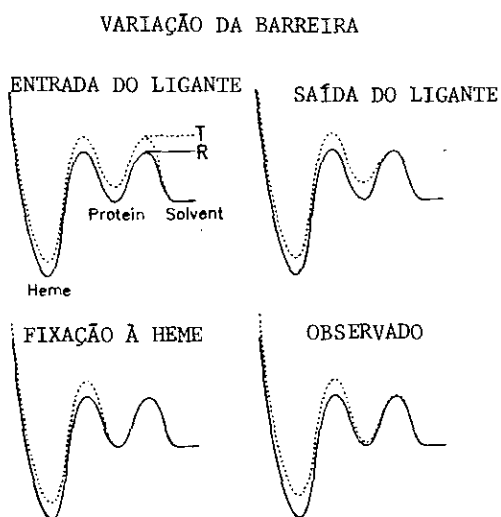


FIGURA 2.14

Os processos geminados que à temperatura ambiente ocorrem em ps, podem ser examinados com detalhes em experiências de baixa temperatura. Neste caso o ligante fica

preso no bolso da heme, impedido de escapar para o solvente.

Cobau et al.<sup>[85]</sup> estudaram a cinética da Hb da carpa com o ligante CO nas temperaturas entre 100 e 180K. As formas R e T foram investigadas e os resultados interpretados em termos dos subestados conformacionais, com o modelo da distribuição de energia de ativação de Agmon e Hopfield. Foram obtidos valores diferentes para as constantes de retorno do CO nas formas R e T da Hb da carpa. Essas diferenças sugerem que pode haver energia de cooperatividade armazenada na conformação.

Os resultados das experiências de temperaturas alta e baixa são coerentes e indicam que a última etapa da reação controla a reatividade.

Experiências de cinética com o ligante NO, têm sido menos frequentes devido ao fato de que a NOHb exibe alta taxa de reassociação geminada, apresentando um produto fotodissociado a 300K de apenas 0.1% , em contraste com 0.8% para O<sub>2</sub>Hb e 50% para COMb<sup>[64]</sup>.

Cornelius et al.<sup>[65]</sup> observaram a evolução do espectro ótico da NOHb, à temperatura ambiente, após um pulso de laser de 8ps. O fotoproduto observado tem vida curta em relação ao CO. Foram observadas duas fases na relaxação da proteína e o espectro transiente é semelhante ao da deoxiHb, indicando que os estados eletrônicos do fotoproduto são iguais ao da deoxiHb e que as diferenças observadas ocorrem devido às mudanças estruturais mais lentas.

Jongeward et al.<sup>[66]</sup> examinaram os efeitos da histidina distal sobre a reação comparando a cinética de recombinação da NOMb de baleia e de elefante. Esta tem uma

glutamina substituindo a histidina distal. Estudos de RPE nestes sistemas<sup>[67]</sup> indicam que a interação do NO é mais fraca com a glutamina que com a histidina. Nos estudos cinéticos com laser pulsado de 70fs a evolução do sinal de absorção ótica apresenta uma relaxação bifásica para a Mb de baleia, e unifásica para Mb de elefante. Neste último caso, a relaxação é mais rápida e o ligante permanece menos tempo no bolso da heme. Os autores sugerem que a histidina atua como um modulador da reação e a natureza bifásica corresponde a duas conformações predominantes da histidina na distribuição de equilíbrio das conformações.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - PREPARAÇÃO DA HEMOGLOBINA

A hemoglobina humana foi obtida a partir de sangue fresco de acordo com o procedimento padrão<sup>[11]</sup>. A hemoglobina foi estocada à  $-20^{\circ}\text{C}$  em solução com 33% de glicerol v/v em pH 8.5. Para cada amostra a quantidade adequada de solução estoque foi preparada com antecedência. Fosfatos orgânicos foram removidos pela passagem em coluna de Sephadex G-25 equilibrada com tampão fosfato 0.1M e pH adequado. A concentração final da proteína foi obtida medindo a absorção ótica no espectrofotômetro CARY modelo 17. Para cada amostra, a solução foi diluída até a concentração desejada com tampão fosfato pH 6,50 ou 6,25.

Gás óxido nítrico (NO) foi preparado reagindo ácido nítrico a 30% com cobre metálico, na ausência de oxigênio, lavado em solução 1M de KOH e armazenado em balão contendo água destilada para evitar que pequenas quantidades de  $\text{NO}_2$  permanecessem no gás.



### 3.2 - PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS SATURADAS COM NO

As soluções de hemoglobina foram deoxigenadas por vácuo num tonômetro. A deoxigenação é verificada visualmente pela mudança de coloração, do vermelho para o arroxeado. O gás NO é injetado em excesso no tonômetro através de seringas clínicas. As amostras foram equilibradas durante cerca de 2 horas e em seguida foi feito vácuo no tonômetro para retirar o excesso de NO. Cada amostra foi então passada para o tubo de quartzo de RPE e nitrogênio gasoso foi injetado no tonômetro para equilibrar as pressões interna e externa. As amostras foram seladas, colocadas na cavidade de RPE e congeladas lentamente em cerca de 60 minutos.

As amostras saturadas com NO e com pH 6.5 foram preparadas em porta-amostras estreitos de 2.16mm de diâmetro interno e nas concentrações 0.2, 0.7 e 1.2mM de ferro. Também foi preparada uma amostra no estado R com pH 6.25 no porta amostra de diâmetro interno 4.20mm com concentração de ferro de 0.4mM. As concentrações finais de ferro das amostras com NO são ligeiramente maiores devido ao vácuo feito para deoxigenar as amostras.

### 3.3 - PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS COM INOSITOL HEXAFOSFATO (IHP)

Medidas de RPE foram feitas em 3 amostras com IHP parcialmente saturadas com NO e pH 6.25: duas amostras T, com 0.37mM de ferro e cerca de 7% de NO e com 0.7mM de ferro e cerca de 8.6% de NO e uma amostra RT, com 0.4mM de ferro e cerca de 14% de NO. Para cada preparação foram usados 2 tonômetros: no 1<sup>o</sup>, Hb saturada com NO foi preparada como descrito na secção anterior e no 2<sup>o</sup>, foi colocada uma solução de Hb mais diluída com excesso de IHP de 3:1 de ferro. Esta solução foi deoxigenada por vácuo e rapidamente 0.5ml da amostra do 1<sup>o</sup> tonômetro foi transferida para o 2<sup>o</sup> por meio de uma seringa clínica de 1ml, sob atmosfera inerte de nitrogênio gasoso. As concentrações citadas acima foram obtidas das relações entre concentrações e volumes iniciais das preparações de cada tonômetro. Após 60 minutos, tempo considerado suficiente para o NO se redistribuir por todas as hemes<sup>(11)</sup>, as amostras foram transferidas para o porta amostras de RPE de diâmetro interno de 4.20mm, equilibradas com nitrogênio gasoso, seladas e congeladas lentamente.

### 3.4 - AMOSTRAS DESIDRATADAS

Foi utilizada metaHb da Sigma Co..Cerca de 10mg da proteína foram depositadas num recipiente de alumínio e colocadas num dessecador contendo pentóxido de fósforo, no qual foi feito vácuo. Dias depois a amostra foi introduzida num tubo de quartzo de RPE que foi selado e o ar retirado com uma seringa clínica. Gás NO foi introduzido no tubo. O tempo de reação esperado foi mais de quatro horas.

### 3.5 - CONTROLE DE TEMPERATURA E SISTEMA DE ILUMINAÇÃO

As experiências foram realizadas a temperaturas criogênicas utilizando um criostato de fluxo de Hélio líquido (HELITRAN LTD-3-110) com controlador de temperatura (APD-E), ambos da Air Products and Chemical. As temperaturas das experiências foram medidas com um termopar de Au-Fe x Chromel preso na parede externa do tubo de quartzo. A flutuação na leitura indica uma variação de cerca de 1K.

As experiências de fotodissociação foram realizadas iluminando a amostra através da janela da cavidade de RPE com uma lâmpada de arco de Xenônio de 1000W da Oriel Corp. of America, Stanford. O feixe de luz passa por um cilindro metálico com abertura de 3.0cm e por um diafragma de controle manual e com abertura de 2.0cm de diâmetro. A distância entre a lâmpada e a amostra é de cerca de 30cm. Foi usada uma solução saturada de sulfato de cobre como filtro de infravermelho. A razão de dissociação (número de fótons por ferro, por segundo) foi estimada considerando as características geométricas e de absorção do filtro em 0.4/s. Para evitar interferência na eletrônica do espectrômetro de RPE, devida à descarga elétrica inicial, quando a lâmpada é ligada, foi adotado o procedimento de bloquear a passagem da luz com o diafragma até estabilizar o sistema de iluminação e o espectrômetro. Aberto o diafragma a amostra permaneceu iluminada até o aparente equilíbrio do sinal de RPE e ainda, durante o registro do espectro.

### 3.6 - MEDIDAS DE RPE

As experiências foram realizadas com um espectrômetro banda-X da VARIAN modelo E-9.

As experiências de fotodissociação foram feitas em baixa potência, para evitar efeitos de saturação. Entre duas experiências a diferentes temperaturas, a amostra foi aquecida até pelo menos 40K, para que o sinal original fosse totalmente recuperado. A reassociação térmica do NO foi observada em algumas amostras parcialmente fotolizadas com a luz. As curvas de cinética foram obtidas com campo magnético fixo.

As curvas de cinética foram digitalizadas à mão ou na mesa Digigraf e todos os espectros apresentados foram digitalizados na mesa Digigraf. As comparações entre os espectros foram feitas usando o programa DIGITAL acoplado à mesa Digigraf gentilmente cedido pelo grupo da Universidade de São Carlos.

Os resultados obtidos de experiências de cinética e das de variação de potência (saturação contínua) foram ajustados aos modelos teóricos pelo método Monte Carlo, minimizando o erro quadrático médio.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS EXPERIMENTAIS

O sinal RPE é o resultado da interação eletrônica entre o íon de ferro FeII e o elétron livre do NO. A luz rompe esta ligação fazendo decrescer o sinal. Um sinal residual permanece devido a moléculas que não foram desligadas ou àquelas que têm retorno rápido. Nenhum sinal devido ao NO dissociado foi encontrado. O espectro foi registrado na região de 3100 G até 3500 G antes de iluminar a amostra e durante o equilíbrio com luz. Cessada a iluminação e estabelecido o equilíbrio, o sinal foi registrado novamente. Os espectros foram comparados e foi observada uma variação na forma de linha, principalmente na região de campo alto. A análise desses espectros sera feita posteriormente.

Na figura 4.1 está indicado o valor de campo magnético, onde a cinética foi registrada para cada amostra de NOHb. Para analisar os resultados experimentais, a amostra saturada com NO, pH 6.5 e 0.2mM de ferro será tomada como padrão.

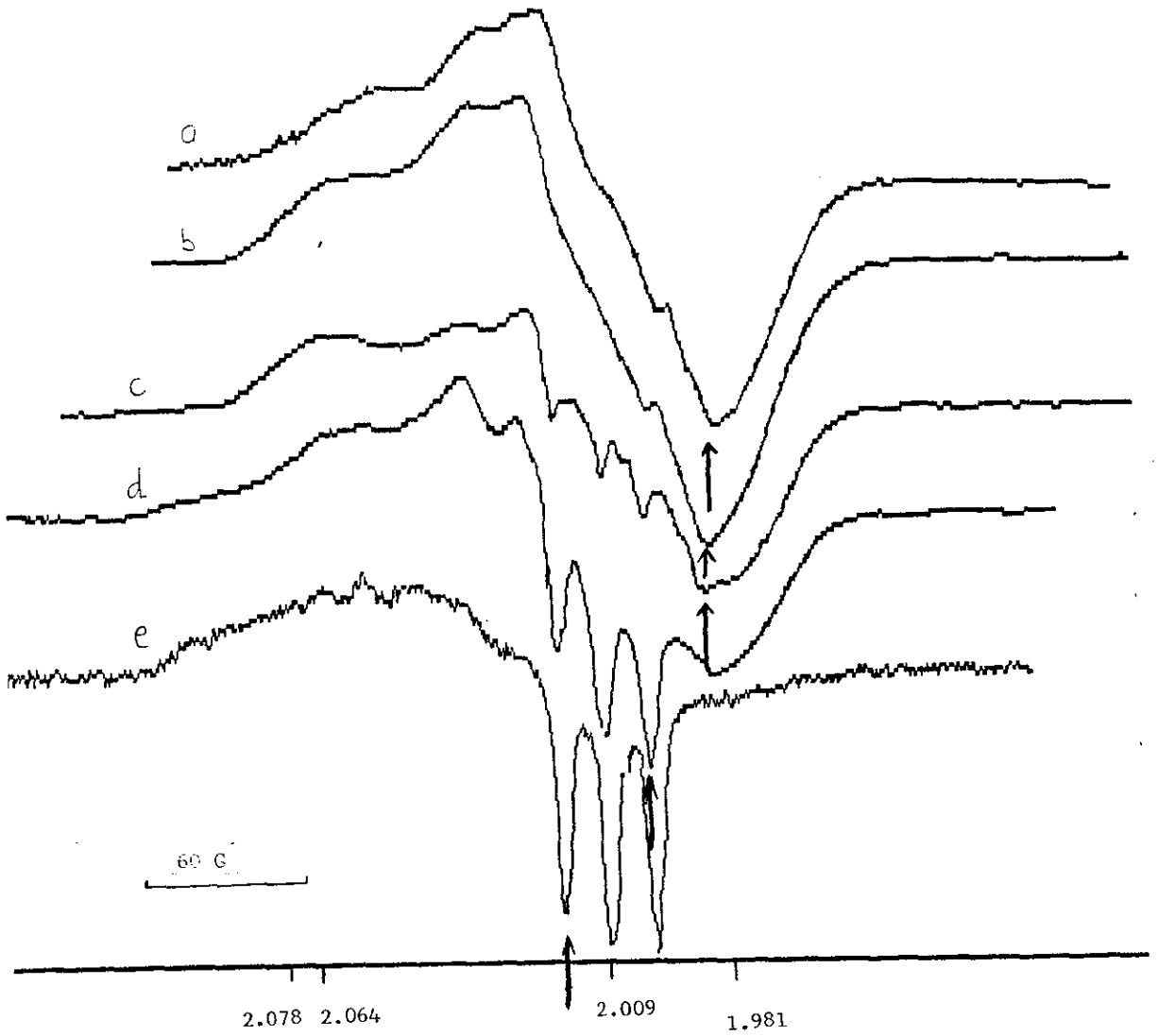


FIGURA 4.1

#### 4.1 - AMOSTRA PADRÃO

A fração de ligantes dissociados no claro  $F_L(t)$  foi obtida dividindo cada ponto da curva de cinética  $\Delta I_L(t)$  (fig.4.2) por  $I_0$ , onde  $I_0$  é a intensidade inicial do sinal em relação a linha de base:

$$F_L(t) = \Delta I_L(t) / I_0 \quad (4.1)$$

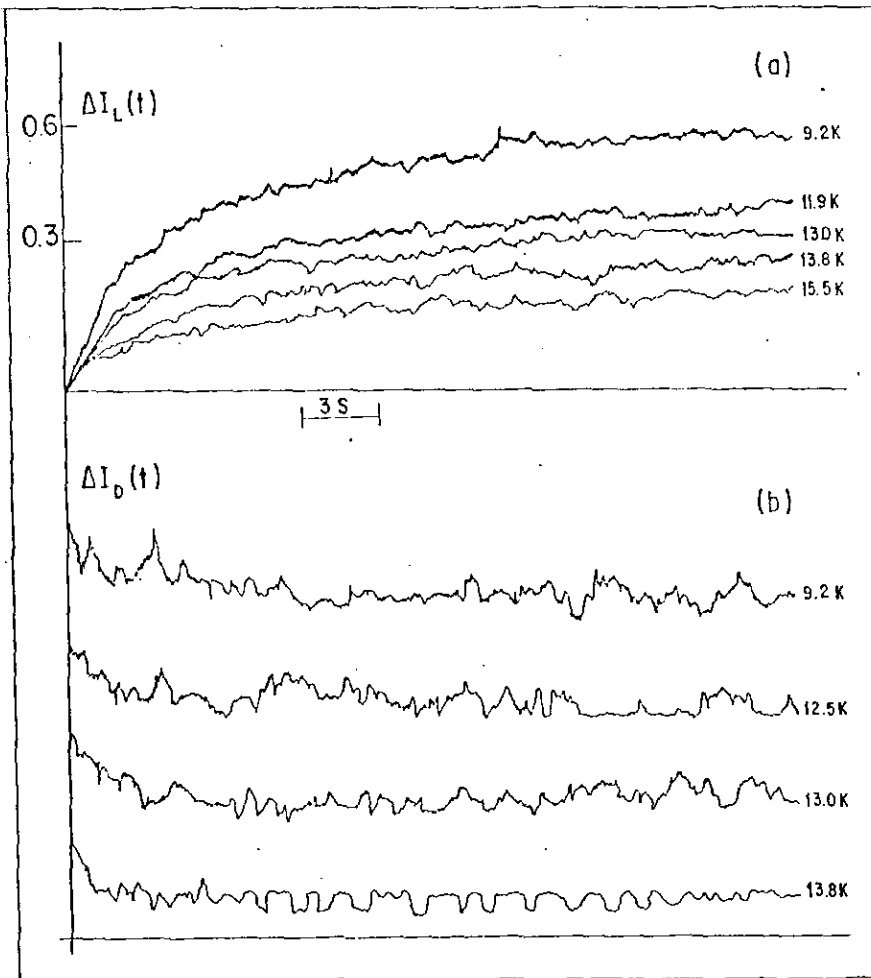


FIGURA 4.2



Na figura 4.3 as curvas experimentais  $F_L(t)$ , no intervalo de temperatura de 6,2K a 15,5K, estão indicadas por símbolos. As linhas contínuas são as curvas teóricas obtidas pelo ajuste dos dados experimentais com a soma de duas exponenciais.

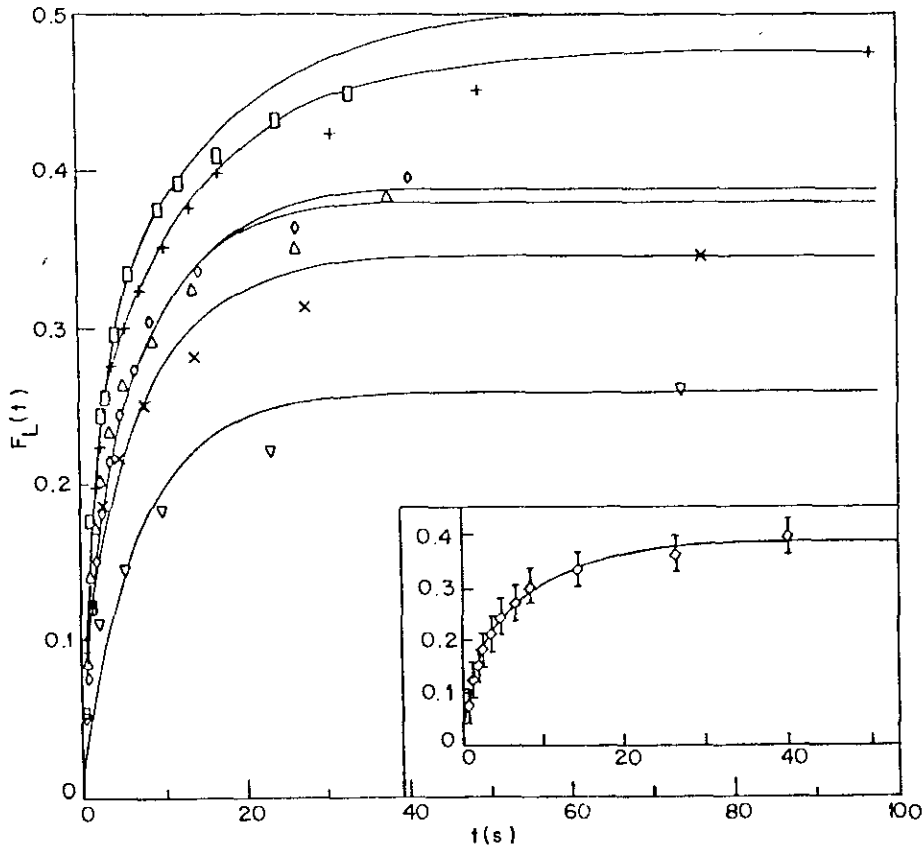


FIGURA 4.3

As curvas também foram analisadas normalizando  $F_L(t)$  à unidade:

$$N_L(t) = \Delta I_L(t) / \Delta I_L(\infty) \quad (4.2)$$

onde  $\Delta I(\infty)$  é a variação da intensidade do sinal no equilíbrio, durante iluminação.

No escuro, uma pequena fração de ligantes retorna ao ferro e a fração normalizada que permanece desligada é:

$$N_D(t) = \Delta I_D(t) / \Delta I(\infty) \quad (4.3)$$

onde  $\Delta I_D(t)$  é a curva experimental de cinética obtida sem luz.

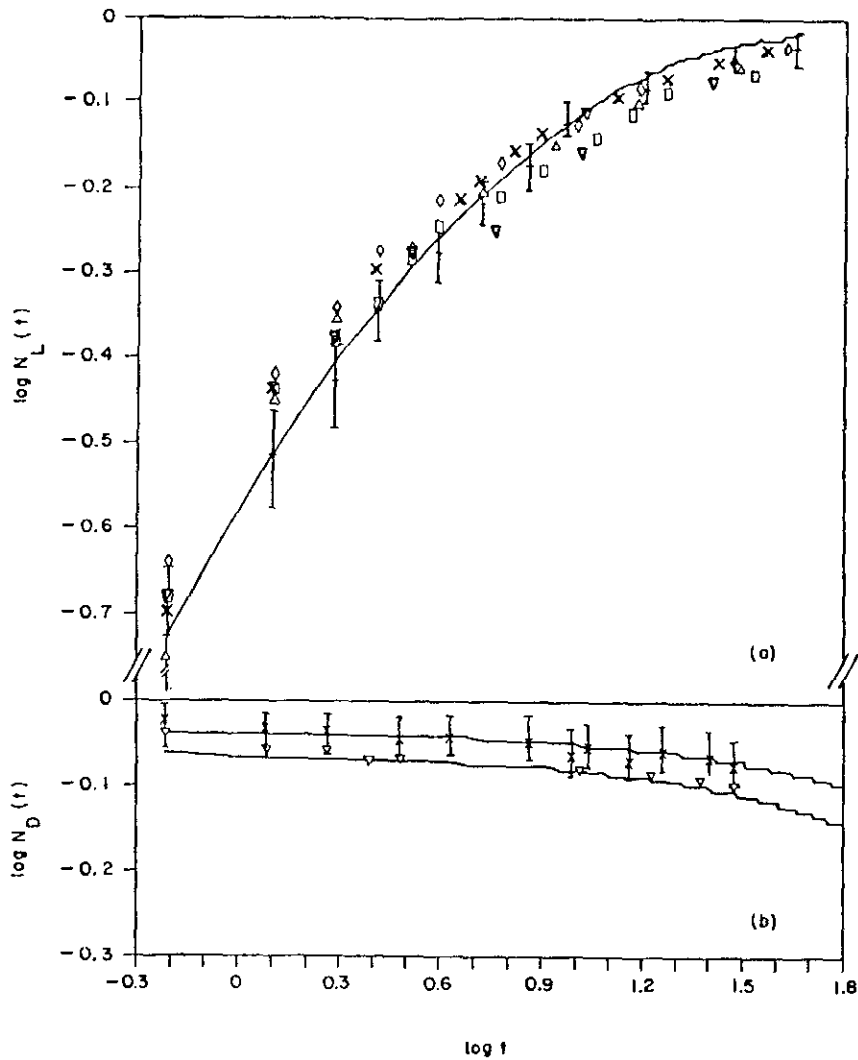


FIGURA 4.4

A figura 4.4 mostra as curvas experimentais normalizadas com e sem luz, representadas pelos símbolos indicados na legenda. A linha contínua é a curva teórica obtida ajustando os dados experimentais ao modelo de subestados conformacionais.

Os erros experimentais indicados nas figuras 4.4 foram estimados levando em conta a incerteza da medida em cada ponto. Os erros são atribuídos principalmente à flutuação de temperatura e à relação sinal-ruído.

As curvas normalizadas na presença de luz apresentaram um comportamento independente da temperatura, dentro do erro experimental estimado. Sem luz, observa-se uma separação das curvas de temperaturas diferentes. Entretanto, devido à variação de  $N(t)$  ser da ordem do erro estimado, os resultados principais foram obtidos analisando as curvas de cinética registradas durante a iluminação. Devido à fraca dependência com a temperatura observada, foi utilizada a hipótese de tunelamento molecular para calcular a razão de retorno. Nas curvas  $F_L(t)$  o valor final  $F(\infty)$  decresce com a temperatura, indicando que uma fração maior de ligantes retorna ao íon de ferro na temperatura mais alta. Acima de 15.5K não foi possível observar nenhuma fração dissociada nestas condições experimentais. Também não foi observada a anulação total do sinal nas temperaturas mais baixas. A maior fração dissociada foi 0.50 para 6.2K. O total dissociado depende da constante de dissociação  $k^*$  e da razão de retorno  $k_L$ . A dissociação total não é observada se uma fração de moléculas tem retorno mais rápido que o tempo de resposta do

RPE (constante de tempo 0.03s).

#### 4.2 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DE AMOSTRAS MAIS CONCENTRADAS

A figura 4.5 mostra as curvas experimentais normalizadas  $N_L(t)$  obtidas para uma amostra com pH = 6.5 e 1.2 mM de ferro para  $T = 11.7K, 14.8K$  e  $16.9K$ . As três curvas estão separadas, em contraste com as curvas normalizadas da amostra padrão, que se superpõem.

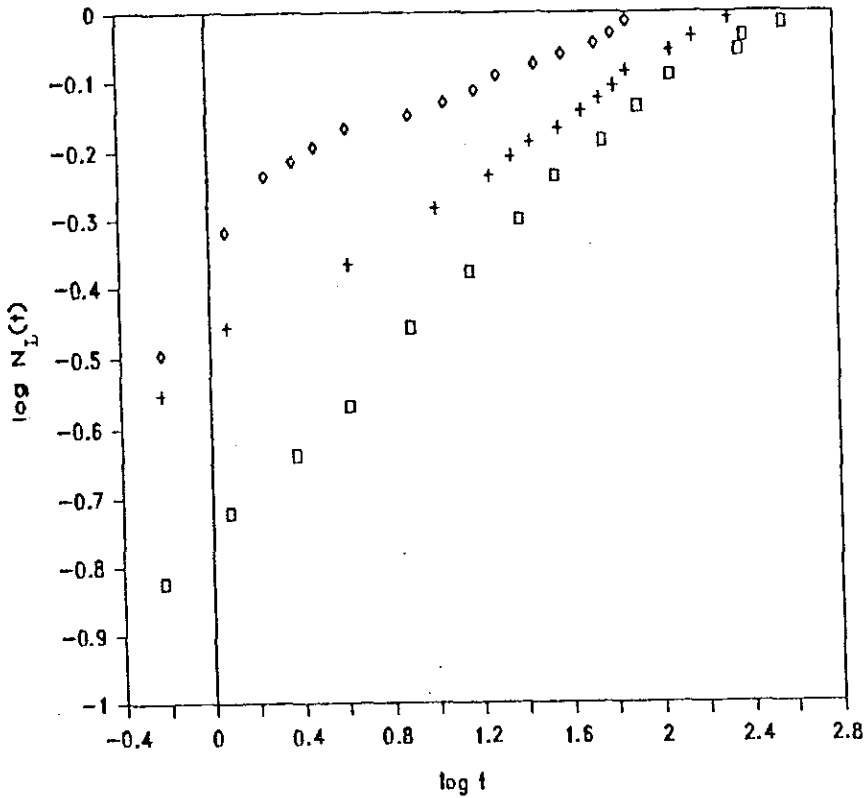


FIGURA 4.5

As figuras 4.6, 4.7 e 4.8 apresentam as curvas das frações dissociadas  $F_L(t)$  para as amostras de NOHb com 0.4mM de

ferro nas conformações R, RT e T. A curva de cinética da amostra T alcança o equilíbrio mais rápido que a da amostra R. É possível observar uma fração dissociada de cerca de 30% para uma temperatura de 19.6K na amostra T, enquanto que na amostra R, a fração dissociada é cerca de 20%, para 12.3K. A maior fração dissociada é cerca de 50% para a amostra R a 5.9K e 70% para a amostra T, a 10.4K. A amostra RT apresenta resultados intermediários.

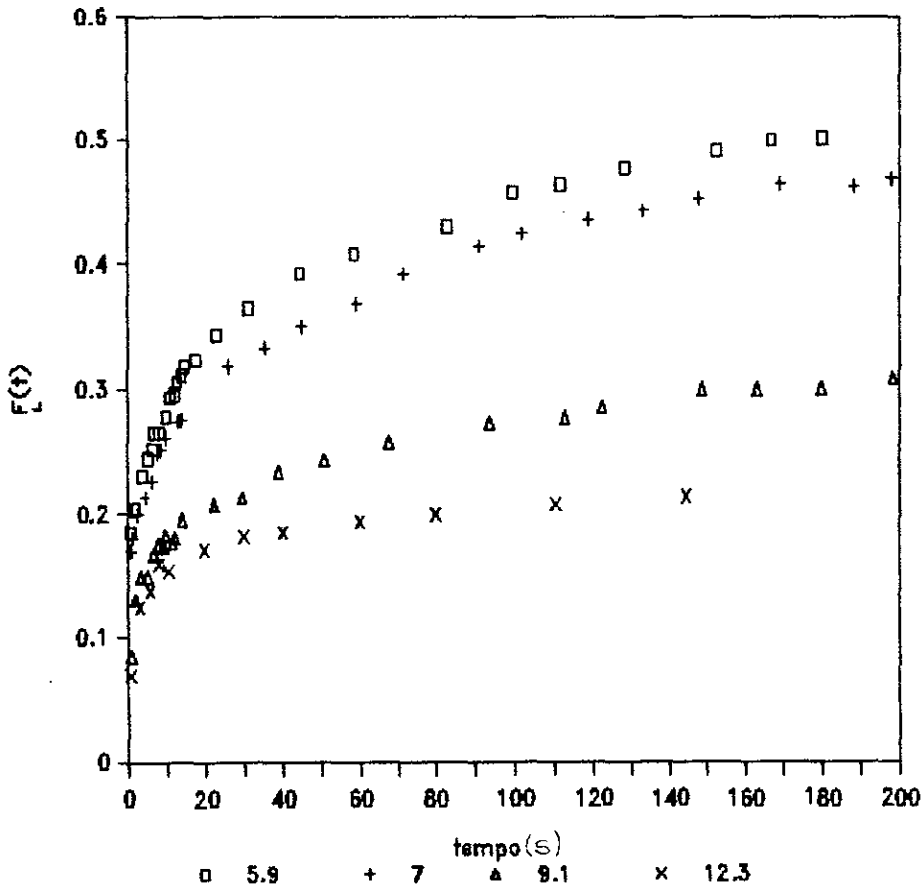


FIGURA 4.6

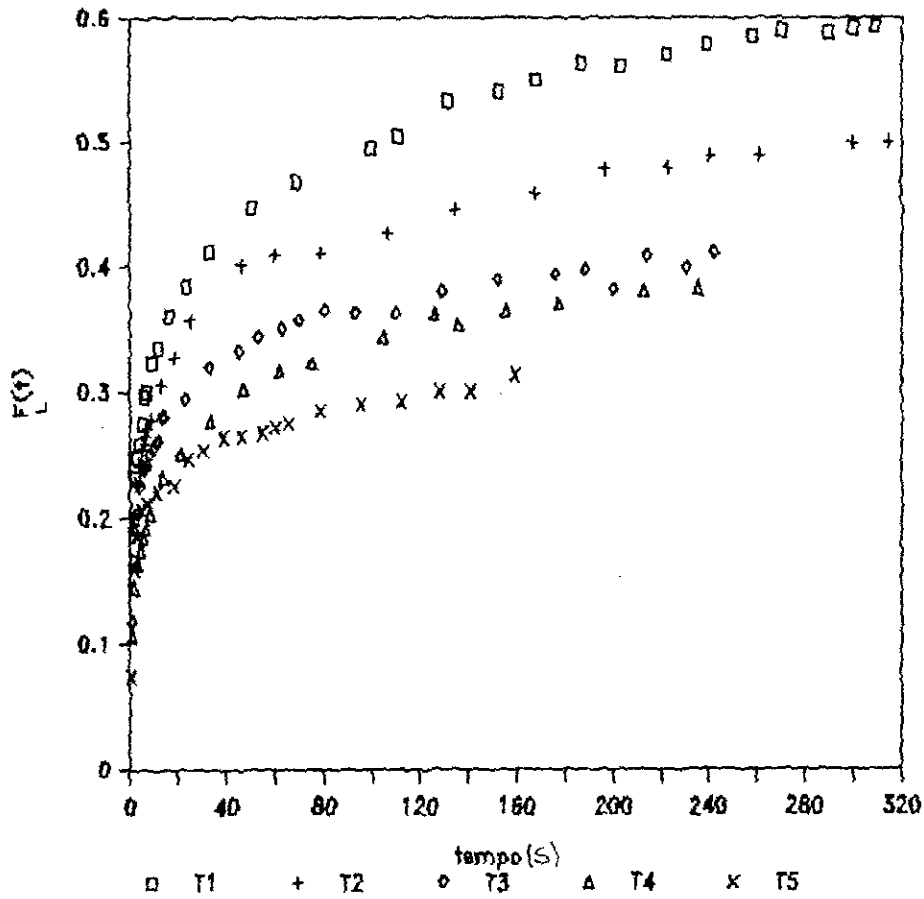


FIGURA 4.7

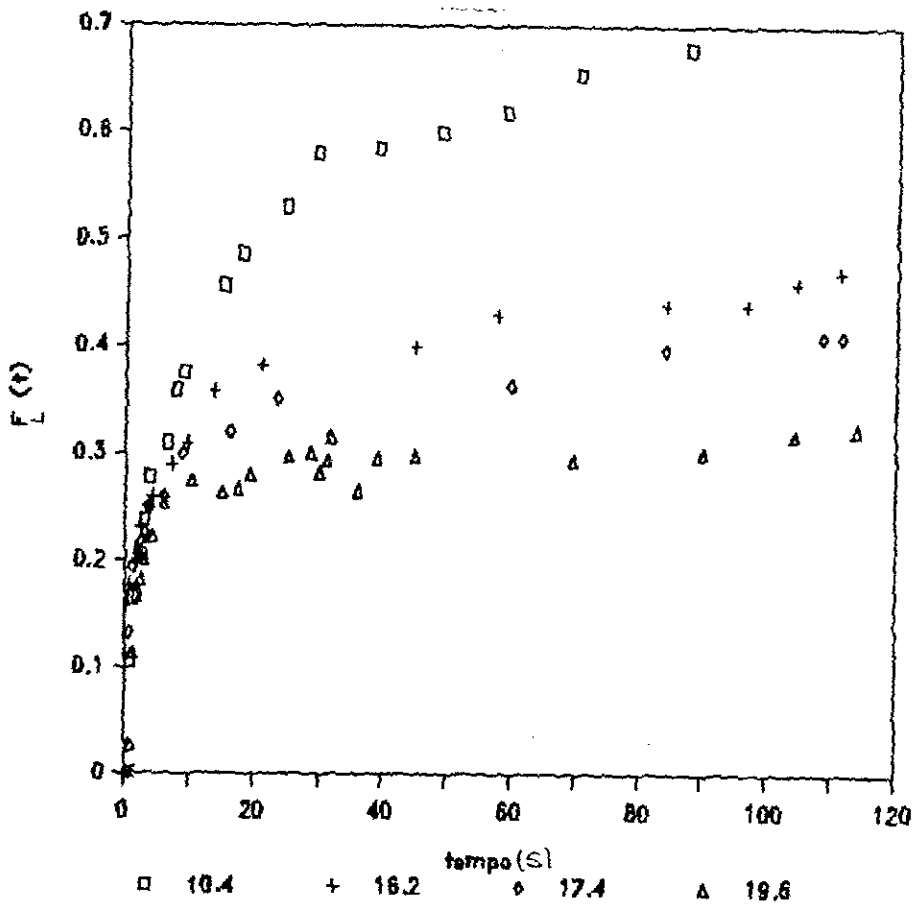


FIGURA 4.8

As figuras 4.9 e 4.10 mostram as curvas experimentais digitalizadas e normalizadas  $N_L(t)$ . As curvas normalizadas da amostra R de 5.9K, 7.0K e 9.1K se superpõem e somente a mais fria é apresentada. A curva de 12.3K está separada das demais. As quatro curvas referentes às quatro temperaturas da experiência com a amostra T estão separadas e foram ajustadas independentemente. As curvas teóricas provenientes dos ajustes estão indicadas na figura 4.10 pelo símbolo +.

Amostra R - Experimental Normalizada

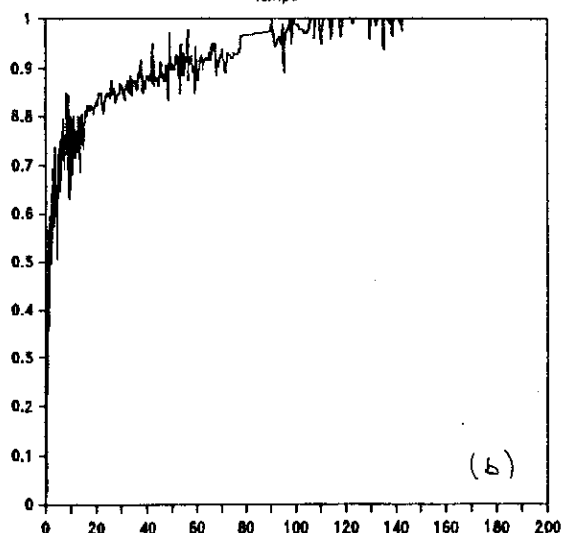
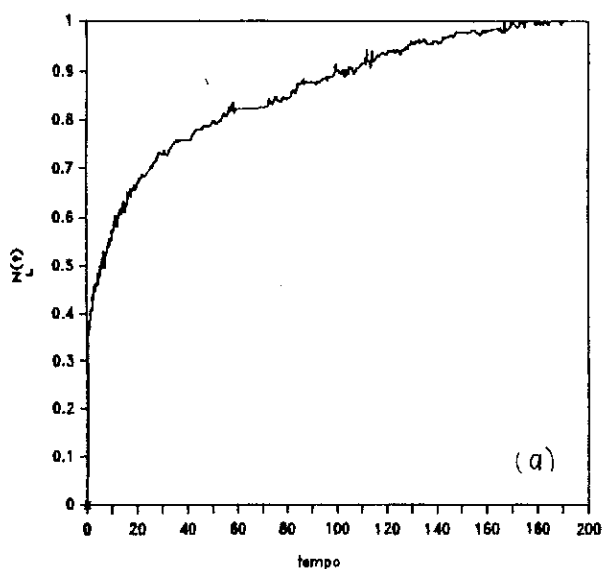
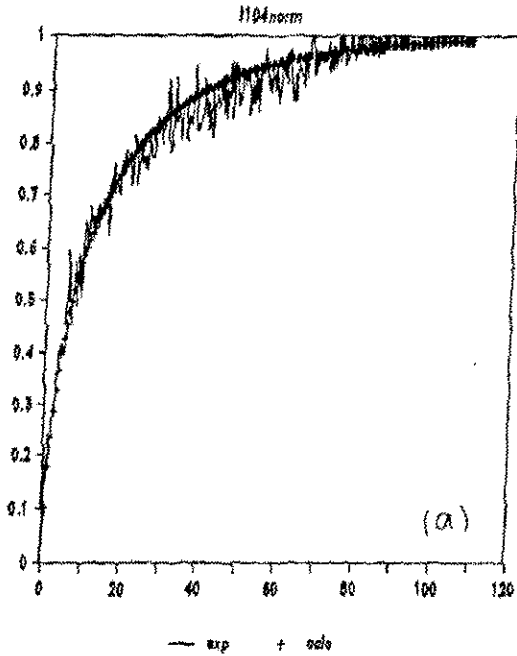
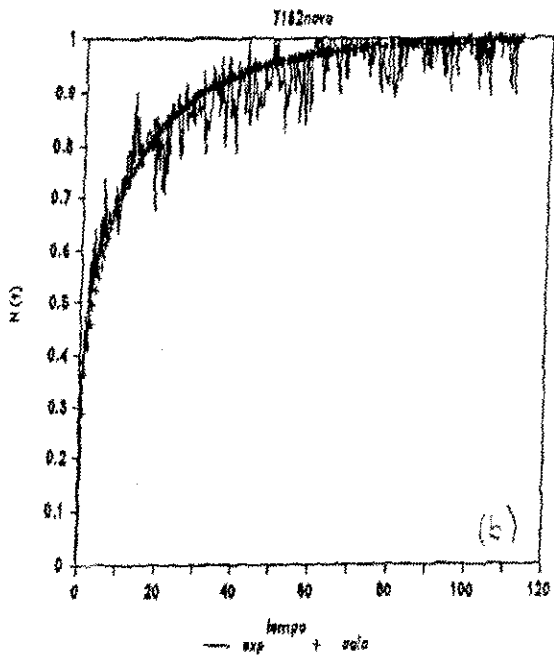


FIGURA 4.9

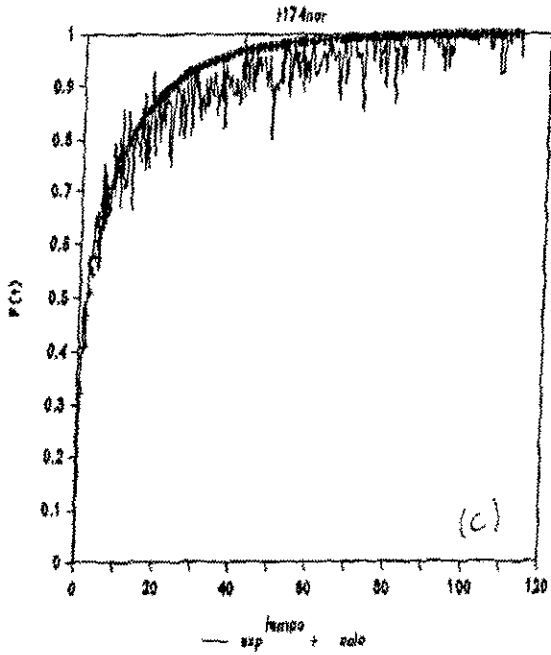
Amostra T - Normalizada



Amostra T - Normalizada



Amostra T - Normalizada



Amostra T - Normalizada

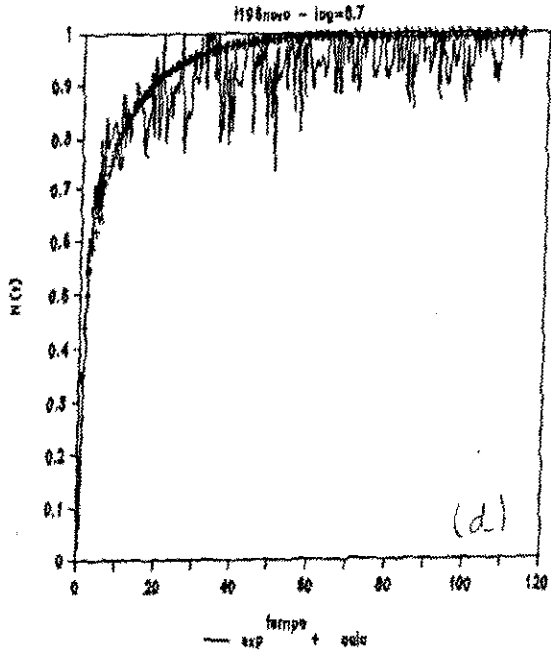


FIGURA 4.10



Na figura 4.11 observamos o efeito do pulso de luz sobre a curva de cinética para uma amostra RT para 10.0K. A fração de ligante que reassocia durante o pulso é constante e é cerca de 20% do total envolvido na dissociação. A curva de cinética praticamente não é modificada pelos pulsos.

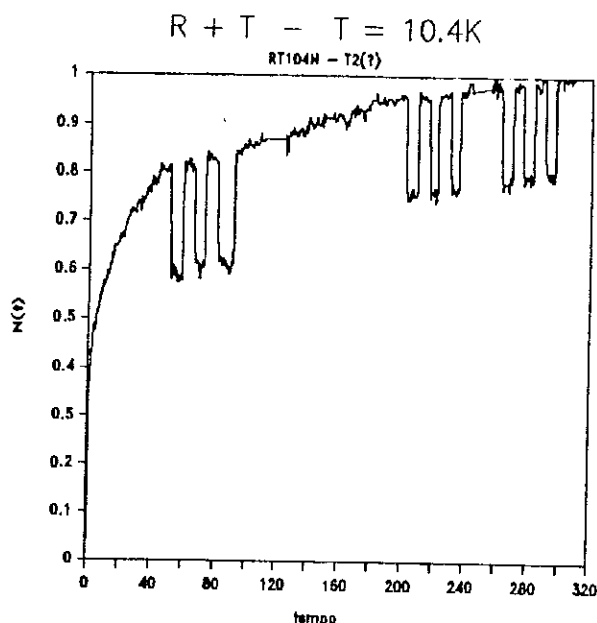


FIGURA 4.11

#### 4.3 - ESPECTROS DE RPE DA AMOSTRA R

A amostra saturada com NO, pH=6.2 e 0.4mM de ferro foi utilizada nas experiências de variação térmica, saturação contínua e fotodissociação.

##### 4.3.1 - VARIAÇÃO TÉRMICA

A figura 4.12 mostra os espectros obtidos no intervalo de temperatura desde 6.3K até 105.3K. Todos os

espectros estão sobrepostos ao de 6.3K (marcado com círculos escuros na figura), para comparação da forma de linha. Os valores de  $g$  indicados na figura foram determinados por Nagai e outros<sup>[4]</sup>, para  $T=4.2K$  e caracterizam o espectro resultante como a soma dos espectros das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas saturadas com NO. O maior valor de  $g = 2.078$  caracteriza a cadeia  $\alpha$  e o valor seguinte  $g = 2.064$ , a  $\beta$ . A linha larga em  $g=1.981$  tem contribuição das duas cadeias e o desdobramento em  $g=2.009$  é o resultado da interação do elétron desemparelhado do NO com o nitrogênio do NO e com o nitrogênio da histidina proximal<sup>[15]</sup>. Nos espectros da figura 4.12 a resolução da linha superhiperfina é favorecida pelo pH e potência baixos. Na figura 4.1 os espectro de duas amostras R foram apresentados e não é visto desdobramento das linhas na amostra padrão que tem pH 6.5 e potência  $1.6 \times 10^{-2}$  mW. A sensibilidade do sinal é menor para amostra padrão que tem a metade da concentração de ferro e cerca de 1/5 do volume da amostra mais concentrada na cavidade de RPE, devido ao diâmetro do porta amostra.

Observando a evolução do espectro com a temperatura (figura 4.12), verifica-se que para as temperaturas mais baixas o espectro perde em intensidade e apresenta um alargamento da linha com o aumento de temperatura até, pelo menos, 22.7K; para 53.7K a largura da linha é igual à inicial e surge uma variação da forma do sinal nos pontos indicados na figura 4.12. Esta diferença se acentua para 105.3K.

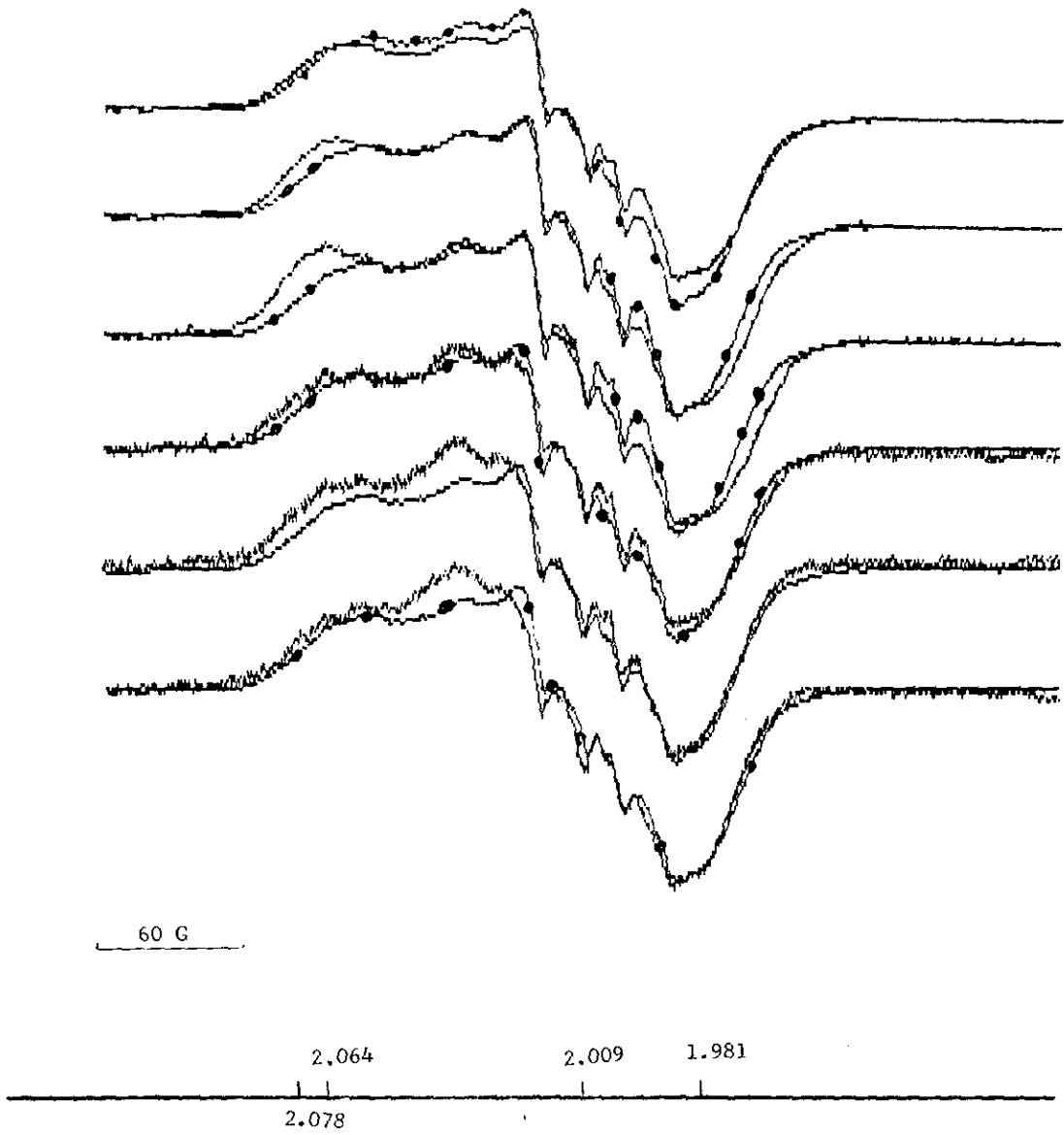


FIGURA 4.12

#### 4.3.2 - SATURAÇÃO CONTÍNUA

A experiência de saturação contínua foi realizada no intervalo de temperatura de 7.5K até 104.6K. A figura 4.13a mostra a evolução dos espectros com a potência, no intervalo de  $1.2 \times 10^{-4}$  mW até  $2.3 \times 10^2$  mW, para  $T=7.5$ K. O espectro para  $2.30 \times 10^2$  mW é uma linha larga cujos valores  $g_A = 2.027$  e  $g_B = 2.004$  foram determinados no máximo e mínimo da intensidade do sinal.

Para verificar se os espectros são combinações de duas espécies, nós chamamos de (A) e (B), os espectros de  $1.2 \times 10^{-4}$  mW e de  $2.3 \times 10^2$  mW e fizemos combinações variando as contribuições de cada espectro, como indicado na figura 4.13b.

O método para medidas de saturação progressiva<sup>(68)</sup> foi utilizado para analisar os resultados experimentais. A partir dos gráficos de intensidade do sinal (I) e de potência (P), na forma  $\log(I/\sqrt{P}) \times \log(P)$ , podemos obter a potência a meia saturação ( $P_{1/2}$ ). As curvas de saturação para cada temperatura foram ajustadas por mínimos quadrados pela expressão:

$$\frac{I}{\sqrt{P}} = \frac{I_{\max}}{\left[1 + \frac{P}{P_{1/2}}\right]^{b/2}} \quad (4.1)$$

onde b é um parâmetro empírico.

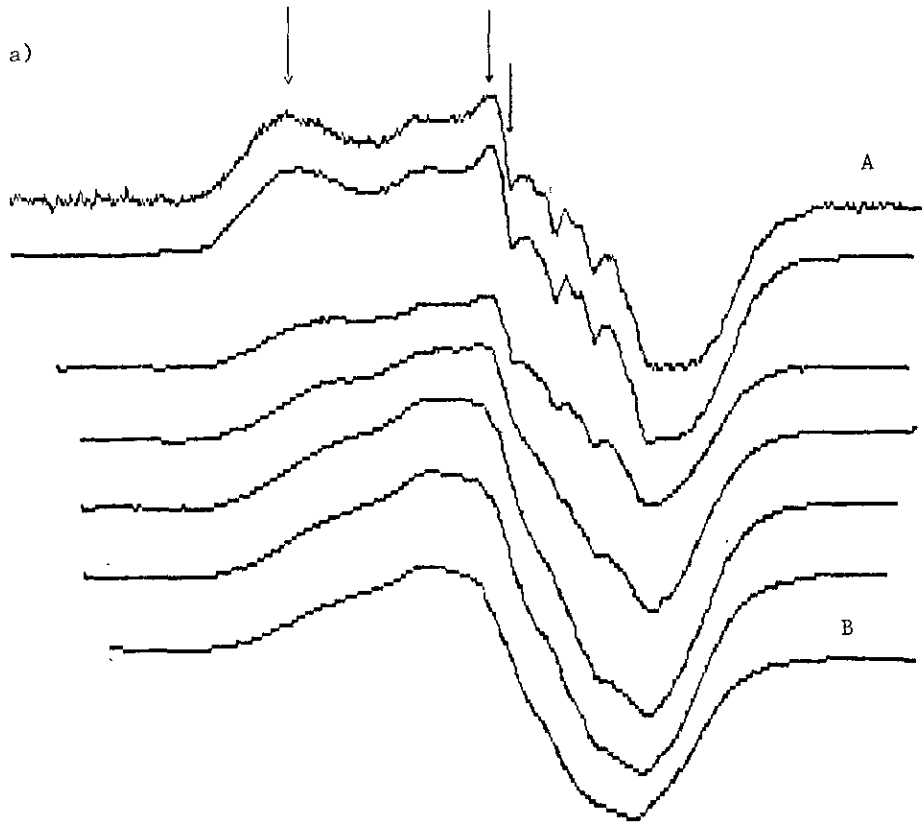
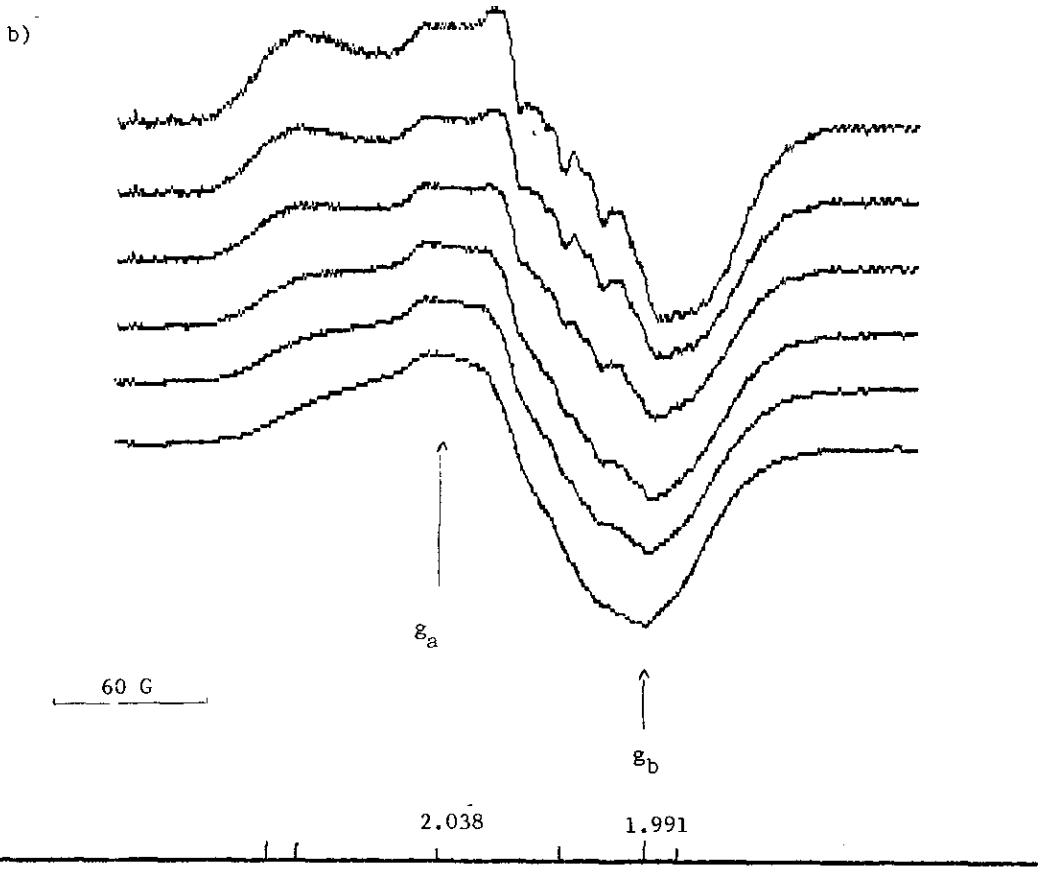


FIGURA 4.13



A intensidade da linha em  $g=2.064$  foi medida em relação à linha de base e a da primeira linha do desdobramento hiperfino foi medida pico a pico. As posições estão indicadas por setas na figura 4.13. O parâmetro  $(b/2)$  obtido do ajuste foi constante para todo o intervalo de temperatura e igual a  $0.57 \pm 0.05$  para a linha hiperfina e  $0.53 \pm 0.04$  para a linha de campo baixo. Estes valores são iguais dentro da faixa de erro.

Os valores de  $P_{1/2}$  obtidos pelo ajuste foram lançados no gráfico  $\log(P_{1/2}) \times \log(T)$  que pode ser observado na figura 4.14. Os dados se ajustam melhor à curva  $P_{1/2} \cong T^n$  com  $n=2.2 \pm 0.2$  para a linha hiperfina e  $n=2.4 \pm 0.2$  para a linha de campo baixo. As retas e os valores de  $n$  foram obtidos diretamente do gráfico.

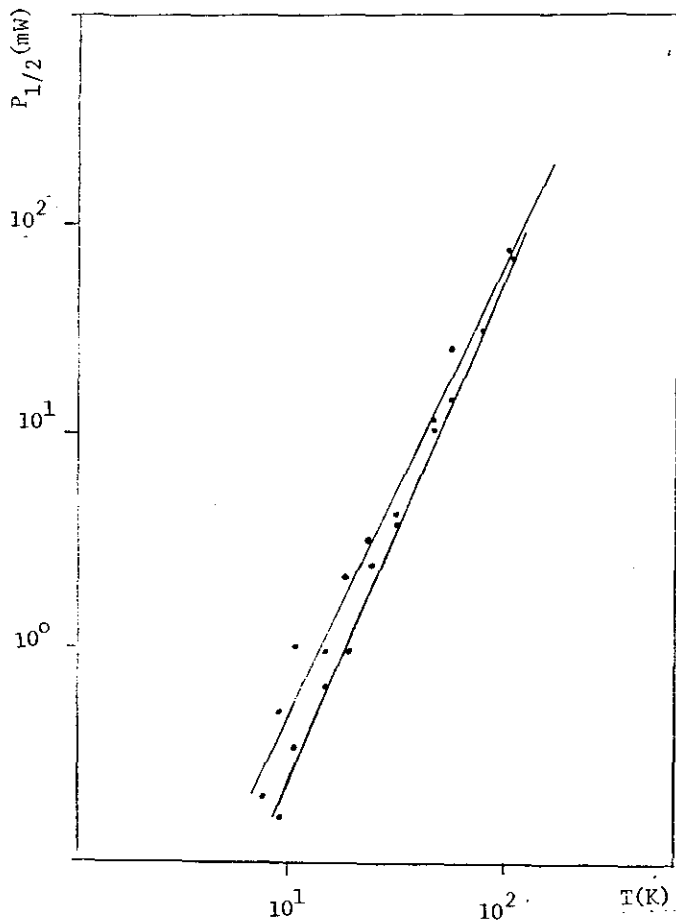


FIGURA 4.14

### 4.3.3 - FOTODISSOCIAÇÃO

Os espectros observados antes de iluminar a amostra ( $S_0$ ) e durante iluminação, no equilíbrio ( $S_e$ ) para cada temperatura foram comparados para verificar se houve alteração da forma de linha. Na figura 4.15 são apresentados os espectros inicial e diferença ( $S_0 - \gamma S_e$ ), com  $\gamma=2$ . Para as duas temperaturas apresentadas, 5.9K e 7.0K, observa-se uma diferença maior entre os espectros na região de campo alto. O fator  $\gamma=2$  indica que metade dos ligantes permanece dissociado no equilíbrio durante iluminação. Para as temperaturas mais altas o fator  $\gamma$  é menor indicando que uma fração menor de ligantes permanece dissociada. Neste caso a diferença entre os espectros é pequena.

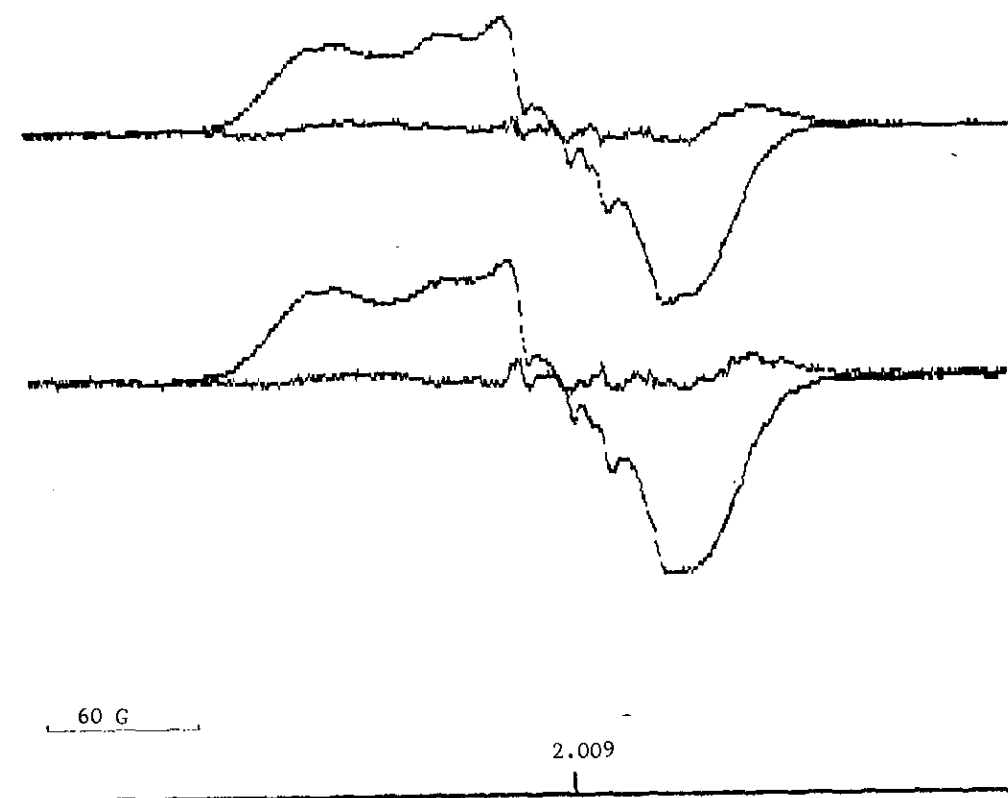


FIGURA 4.15

#### 4.4 - AMOSTRA T

A amostra com IHP e cerca de 9% de NO, com 0.7mM de ferro e pH 6.2 foi utilizada nas experiências de variação térmica e saturação contínua. Nas experiências de fotodissociação foi necessário utilizar uma amostra mais diluída, com 0.37mM de ferro e cerca de 7% de NO.

##### 4.4.1 - VARIACÃO TÉRMICA E SATURAÇÃO

A figura 4.16 mostra os espectros obtidos no intervalo de temperatura de 11.7K até 188.3K com uma potência de  $4.9 \times 10^{-2}$  mW. Estes espectros são típicos do NO ligado ao ferro pentacoordenado<sup>[12]</sup>. O espectro para 188.3K pode ser comparado ao obtido por Louro et al<sup>[11]</sup> para temperatura equivalente com pequena fração de NO. Para as temperaturas mais baixas o espectro é semelhante ao obtido por Nagai et al<sup>[14]</sup> para 4.2K. A intensidade pequena do sinal em  $g=1.981$  indica a contribuição da cadeia  $\beta$  ligada ou  $\alpha$  na conformação R enquanto que o desdobramento é devido ao NO ligado à cadeia  $\alpha$  na forma T. Uma drástica mudança é observada com a variação da temperatura, na região entre  $g=2.038$  e  $g=2.064$ , indicada na figura 4.16 por setas. Podemos observar também que a relação entre as 3 linhas do triplete é alterada com a temperatura.

Chamamos de (C) o espectro de 11.7K e (D) o de 188.3K e fizemos combinações dos dois espectros que estão apresentadas na figura 4.17. As temperaturas intermediárias podem ser bem representadas por estas combinações.



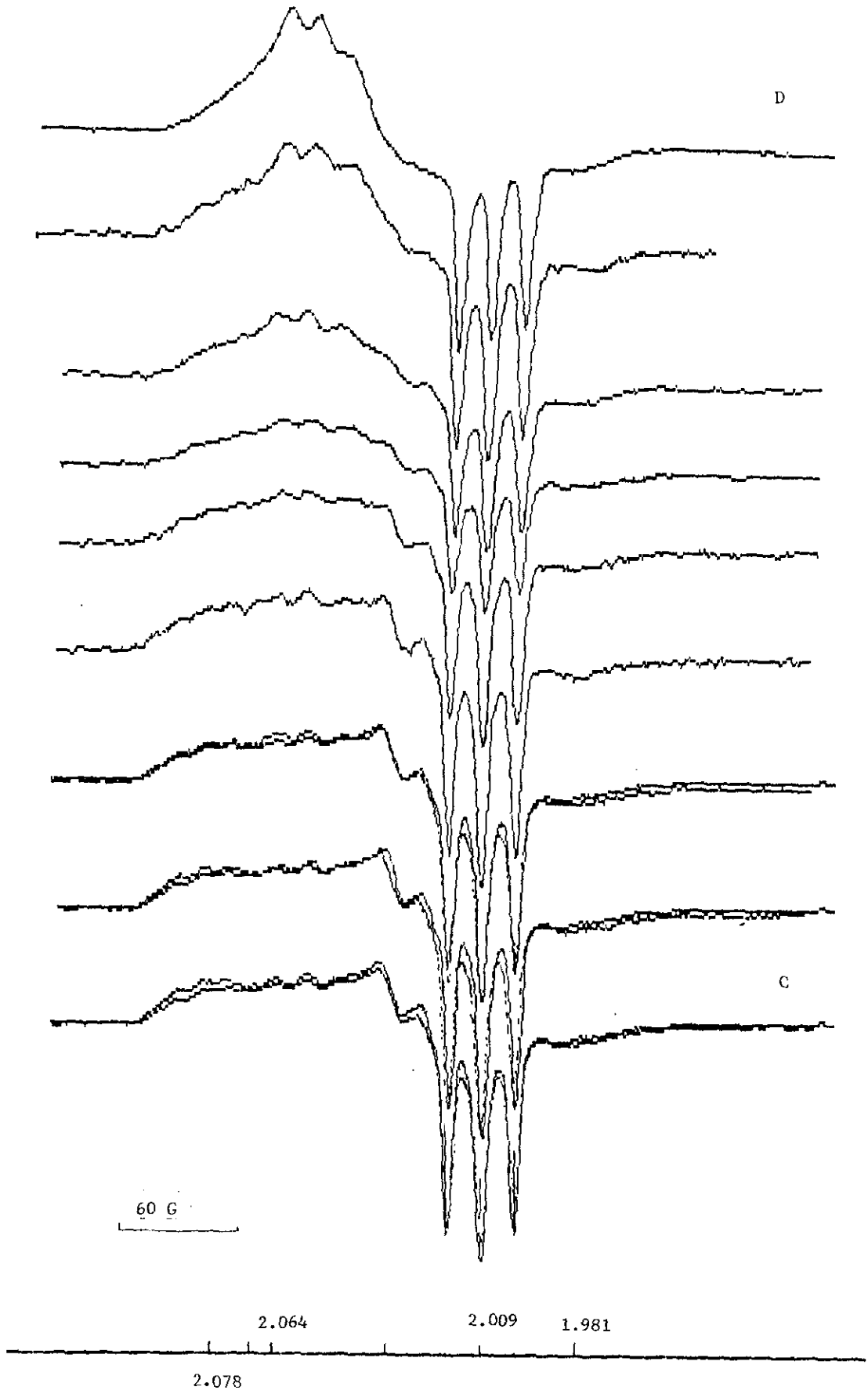


FIGURA 4.16

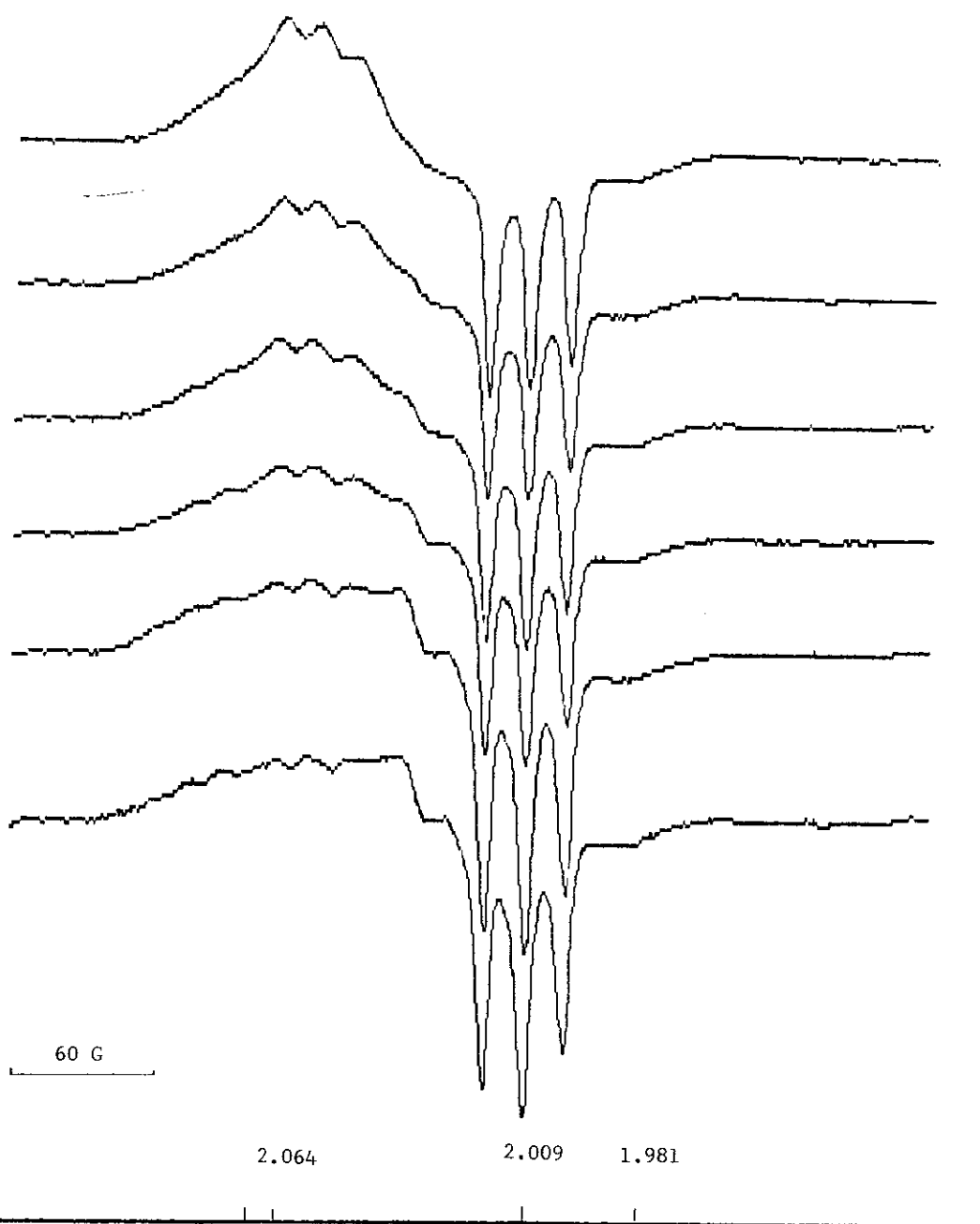


FIGURA 4.17

O mais surpreendente foi verificar também que o espectro do ferro pentacoordenado evolui com a temperatura de forma semelhante à variação de potência (figura 4.18). Na figura 4.18a estão apresentados os espectros para quatro diferentes potências, na temperatura de 11.7K. Na figura 4.18b os espectros foram combinados para representar as potências intermediárias.

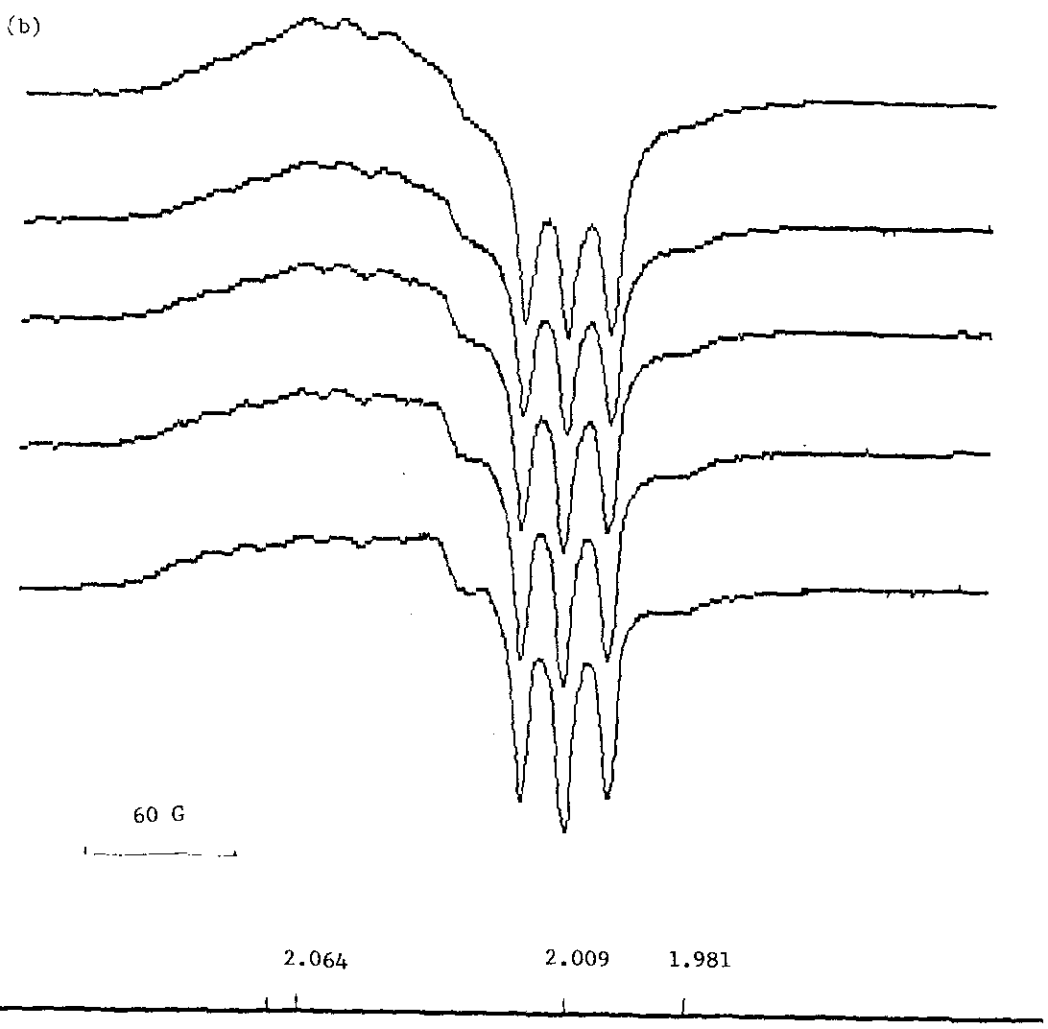
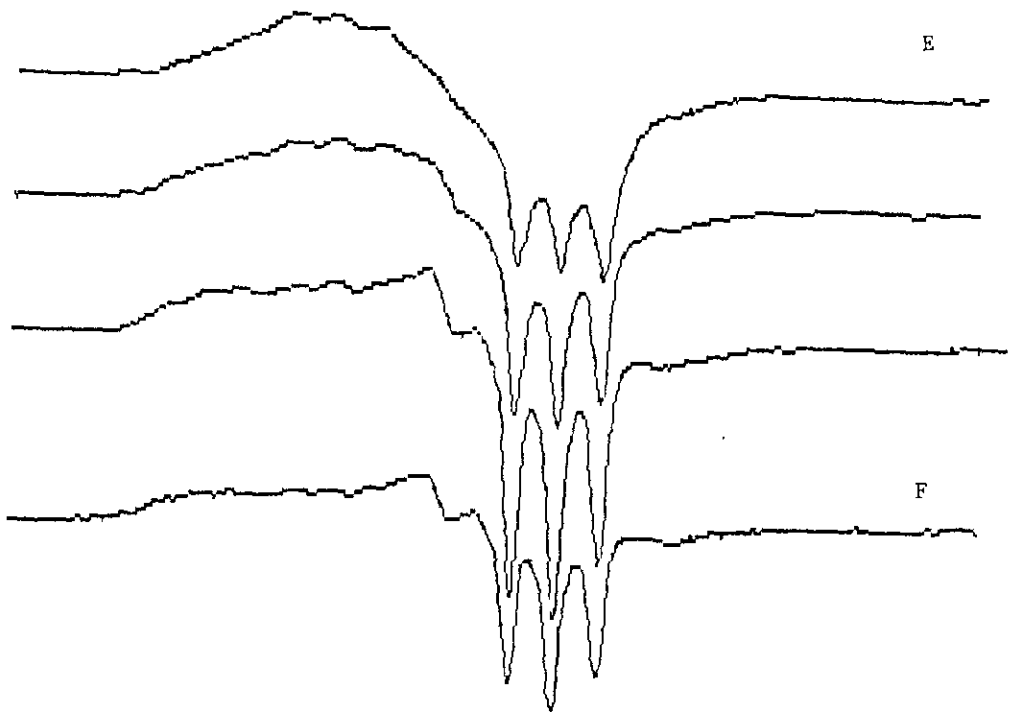


FIGURA 4.18

#### 4.4.2 - FOTODISSOCIAÇÃO

A amostra com IHP, cerca de 7% de NO, e  $0.37\text{mM}$  de ferro e pH 6.2 foi utilizada nas experiências de fotodissociação. A figura 4.19 apresenta os espectros para 10.4K antes da iluminação (a) e no equilíbrio (b). O espectro é mais pobre que o apresentado na variação térmica porque esta amostra está mais diluída e com menos NO ligado. O sinal dissociado foi multiplicado por um fator  $\gamma=2.57$ . Por inspeção visual, nota-se que os espectros apresentam diferenças na região em torno de  $g=2.064$  e a relação entre as intensidades das três linhas hiperfinas é alterada.

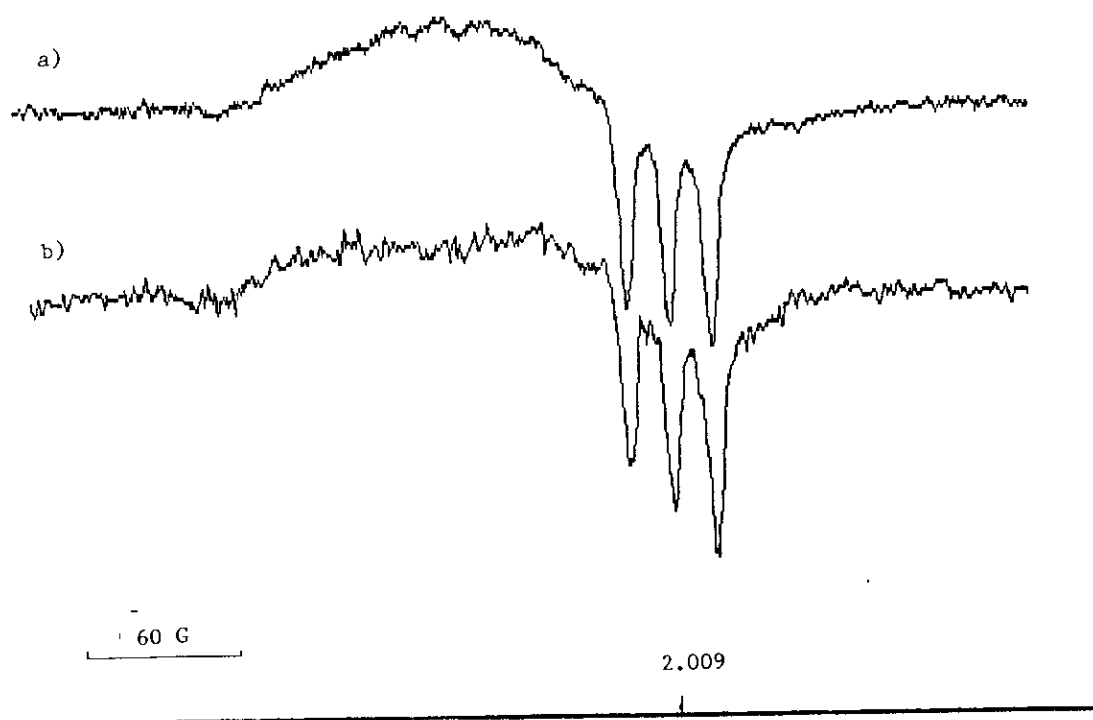


FIGURA 4.19

O fator de dissociação indica que 61% do NO permanece desligado no final da fotodissociação. Esta fração é maior que aquela obtida para a amostra R para uma temperatura mais baixa (7K). Aumentando a temperatura a fração dissociada de NO é menor, e conseqüentemente, as diferenças espectrais diminuem. A figura 4.20 apresenta a diferença entre os espectros (a) e (b) da figura 4.19.

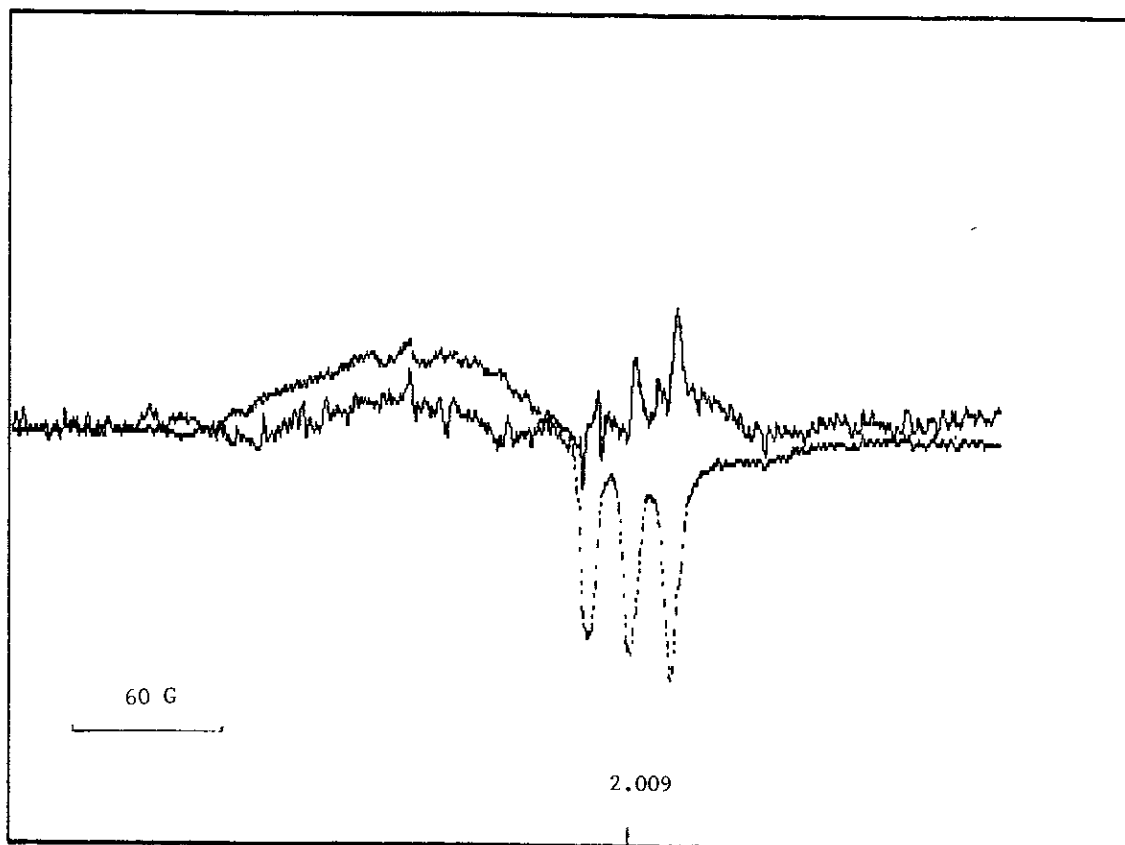


FIGURA 4.20

#### 4.5 - AMOSTRA RT

A amostra com IHP, cerca de 14% de NO, com 0.4mM de ferro e pH 6.2 foi utilizada na experiência de fotodissociação e o espectro para 10.4K está apresentado na figura 4.21 (b).

Combinações dos espectros das amostras R de 10.1K (a) e T de 11.7K (c) estão apresentadas na figura 4.21.

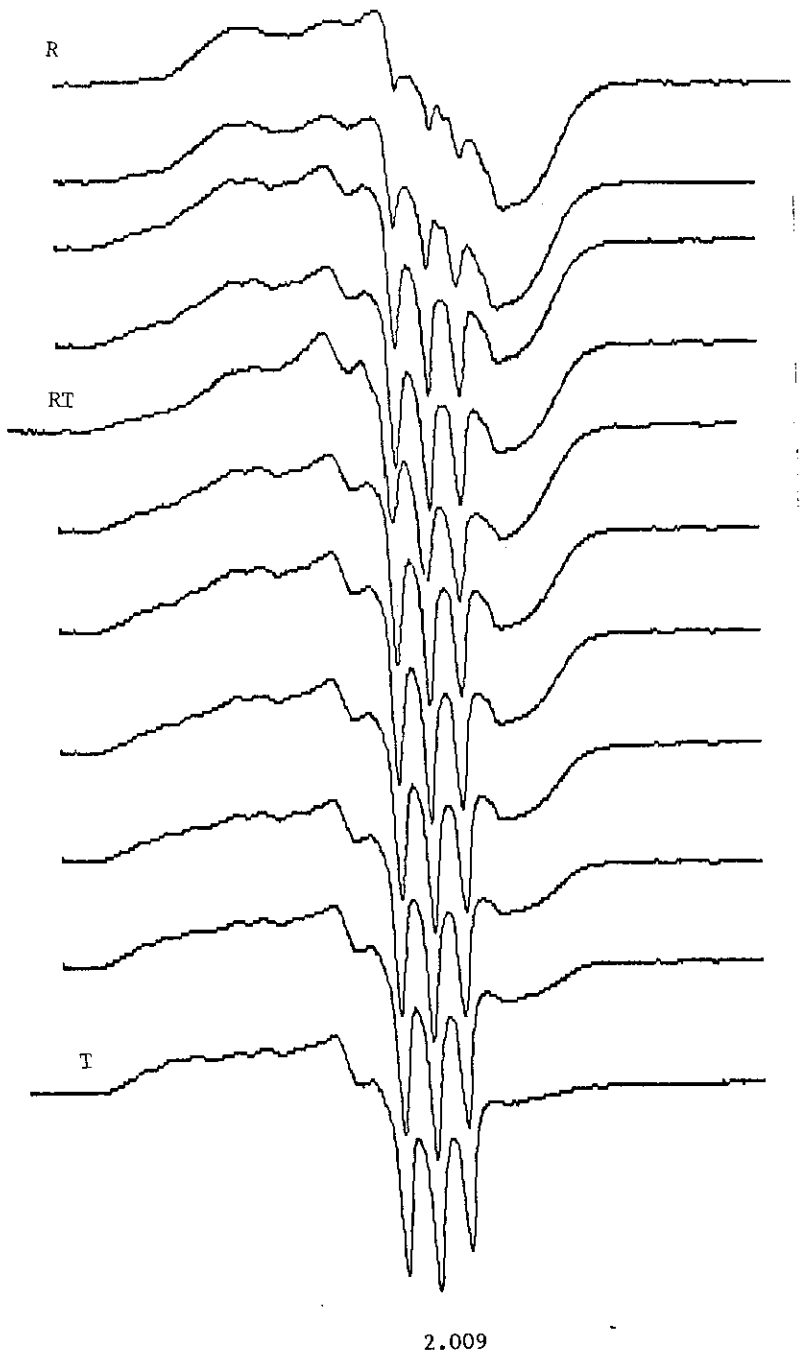


FIGURA 4.21

A diferença entre os espectros inicial e dissociado (figura 4.22) nesta amostra é a soma das variações observadas na T e na R devidas à fotodissociação.

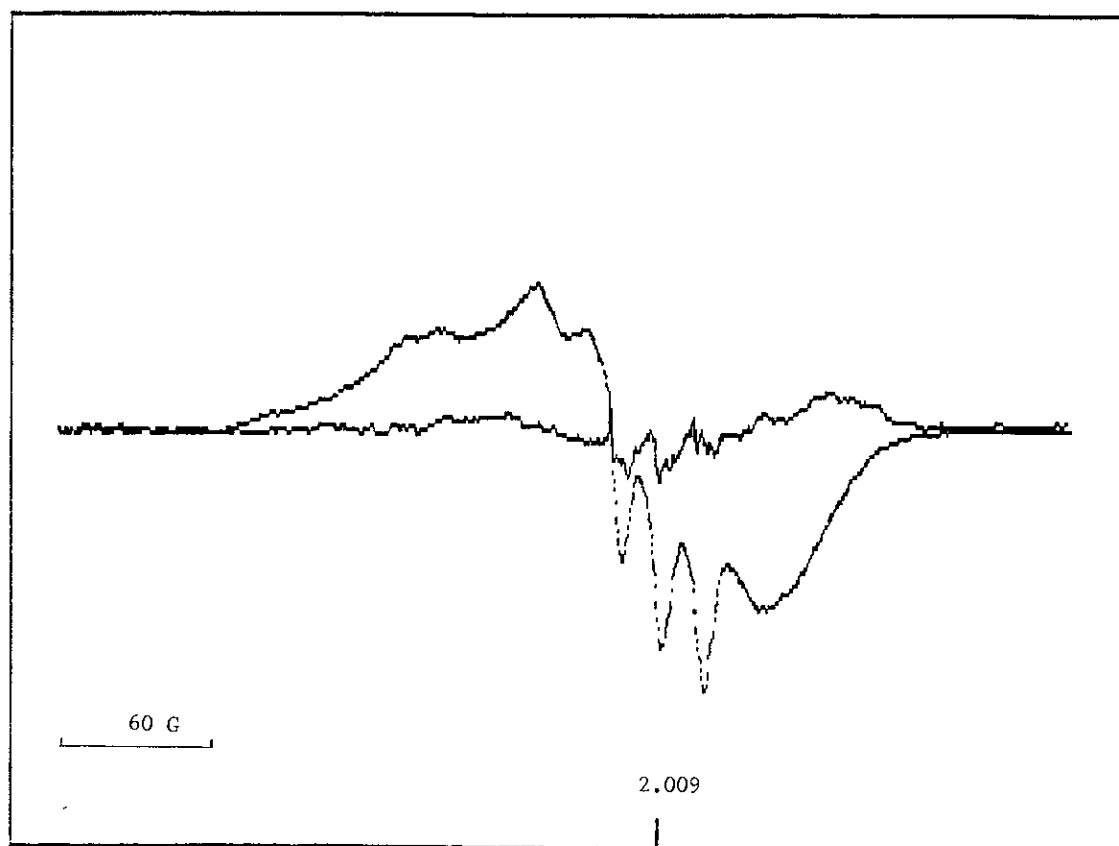


FIGURA 4.22

#### 4.6 - AMOSTRA DESIDRATADA

A figura 4.23 mostra os espectros da NOHb desidratada na região de temperaturas entre 7.5K e 67.0K. A diferença entre os espectros devida à dissociação está apresentada na figura 4.24.

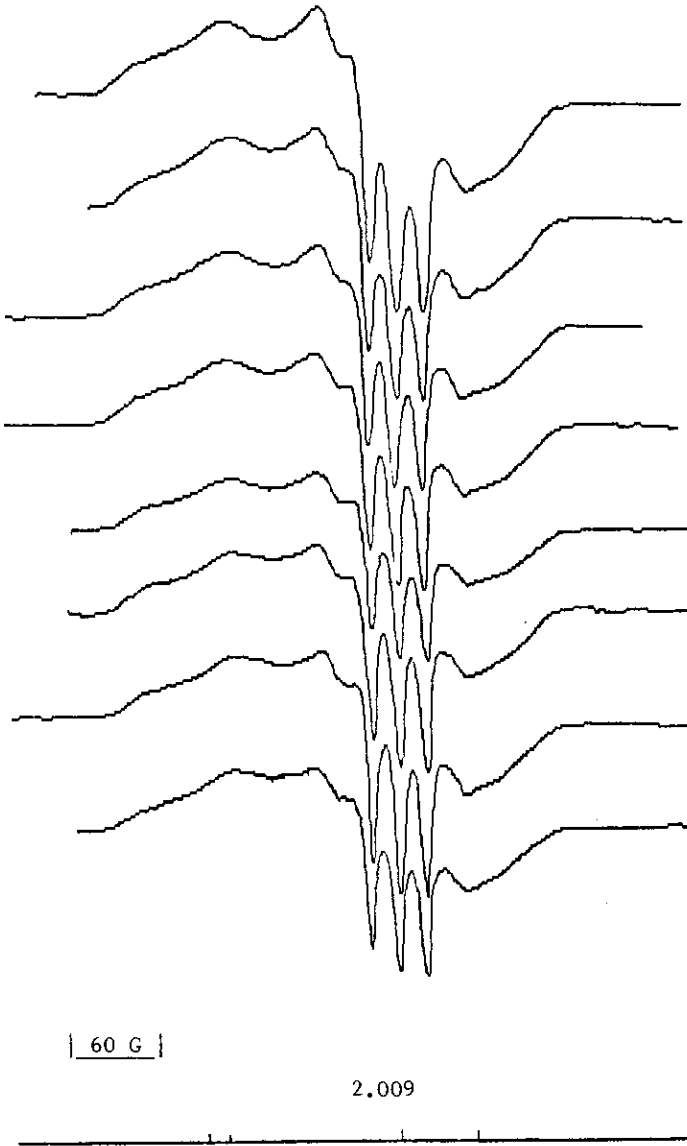


FIGURA 4.23

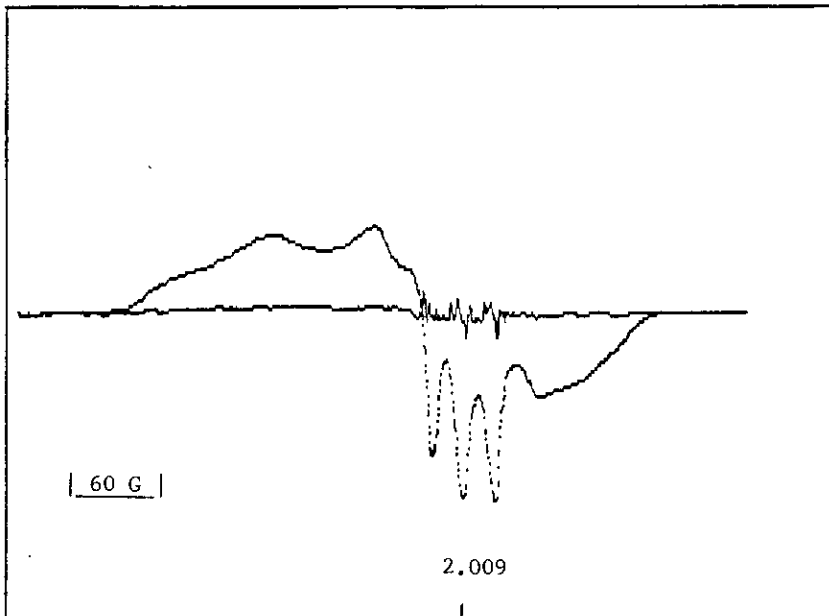


FIGURA 4.24



## CAPÍTULO 5

### DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados da avaliação dos modelos de distribuição de energia de ativação e a aplicação às nossas experiências de cinética por RPE.

Adaptamos o modelo de distribuição de energia para analisar a reassociação dos ligantes durante iluminação. As experiências de cinética realizadas com amostras diferentes são interpretadas de acordo com o modelo proposto e os resultados obtidos comparados. É feita a análise dos espectros de RPE.

#### 5.1 - AVALIAÇÃO DOS MODELOS DE DISTRIBUIÇÃO DE ENERGIA

Com o objetivo de escolher o melhor modelo de distribuição de energia para analisar os nossos resultados de cinética de NOHb, comparamos três modelos aplicados aos resultados experimentais do ligante CO com a Hb da carpa<sup>(95)</sup>. Vamos chamar de modelos A, B e C os modelos de Frauenfelder et al. (secção 2.1), Agmon et al. (apêndice B) e Young et al. (apêndice A), respectivamente.

Os ajustes foram efetuados pelo método de Monte Carlo, minimizando o erro quadrático médio. Os parâmetros da distribuição de cada modelo obtidos do ajuste da curva de  $\log[N(t)] \times \log(t)$  para a temperatura de 100K correspondem ao

conjunto que ajustou melhor as três temperaturas simultaneamente (100K, 140K e 180K).

A tabela 5.1 e a figura 5.1 apresentam os resultados obtidos com o modelo B por Cobau et al. e por nós. O desvio observado entre os dois conjuntos de parâmetros é cerca de 7% e provém das diferenças nos ajustes dos parâmetros  $\Delta$ ,  $f$  e  $D$ , que influenciam pouco na forma da curva. Para o parâmetro  $x_0$  obteve-se o mesmo valor nos dois ajustes.

MODELO B		
	NOSSOS RESULTADOS	Ref. 35
$\log[A(s^{-1})]$	8.6	-----
$D(\text{kcal/mol})$	15.2	16.0
$\Delta(\text{kcal/mol})$	10.3	9.7 + 0.4
$f(\text{kcal/mol.a.u.}^2)$	12.2	13.0 + 0.6
$x_0(\text{a.u.})$	0.87	0.88 + 0.1
$E^P(\text{kcal/mol})$	2.0	1.6
$E_{\min}(\text{kcal/mol})$	0.0	0.0

TABELA 5.1

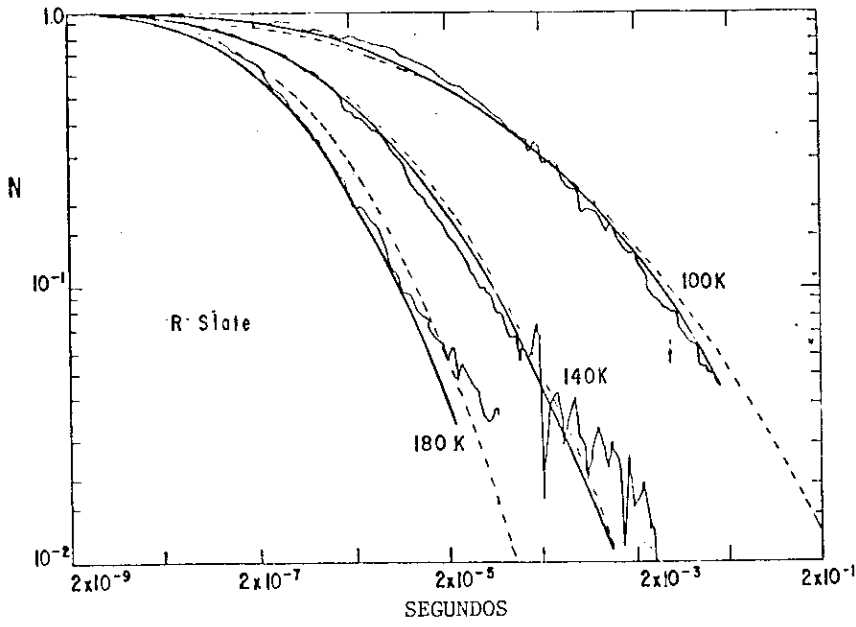


FIGURA 5.1

Os resultados relativos ao modelo C estão na tabela 5.2 e na figura 5.2. A curvatura de  $N(t)$  é definida pelos parâmetro  $\alpha$  e  $n$ .

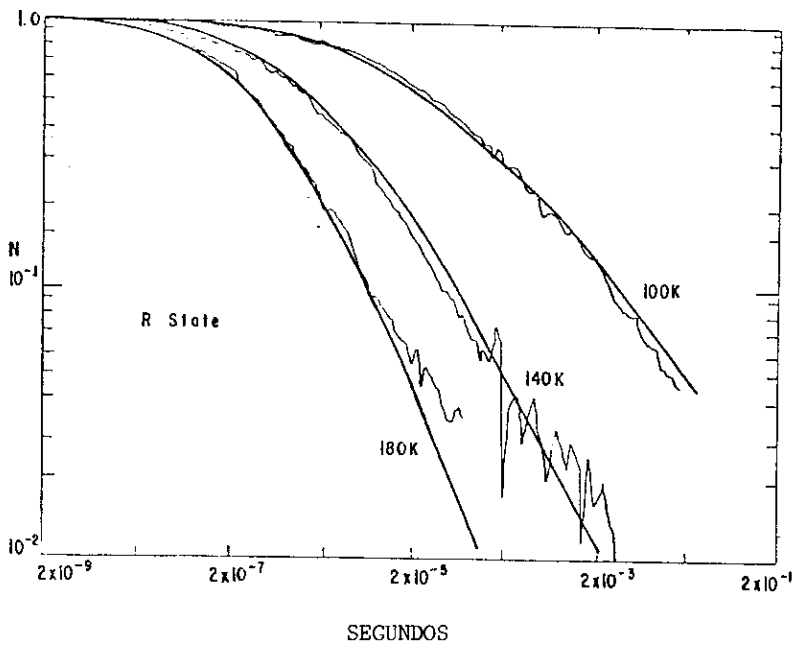


FIGURA 5.2

MODELO C	
$\log[A(s^{-1})]$	8.7
$E_{min}$ (kcal/mol)	0.4
$\alpha_f$ (mol/kcal)	4.0
$\nu$	2.2
$E^p$ (kcal/mol)	1.8

TABELA 5.2

A tabela 5.3 e a figura 5.3 apresentam os resultados do modelo A. Neste caso foram feitos dois ajustes: com os parâmetros  $n$  e  $\alpha$  independentes ( $A_1$ ) e relacionados pela expressão  $n = \alpha RT^*$  ( $A_2$ ). Em  $A_1$  a relação entre  $\alpha$  e  $n$  fornece um valor para  $T^*$  de 515K. Nas experiências para COMB,  $T^* = 120K$  é a temperatura do melhor ajuste<sup>[21]</sup>. Neste caso  $T^*$  para Hb da carpa deveria ser 100K. Apesar desta discrepância, os dois conjuntos de parâmetros ajustam bem as curvas de cinética, que são definidas essencialmente por  $\alpha$  e  $n$ .

MODELO A		
	A.1	A.2
$\log[A(s^{-1})]$	8.7	8.7 <sup>††</sup>
$E^p$ (kcal/mol)	1.9	1.8
$n$	2.8	0.6
$\alpha$ (mol/kcal)	2.8	1.9
$T^*$ (K)	515.	158.
$E_{min}$ (kcal/mol)	0.4	1.

TABELA 5.3

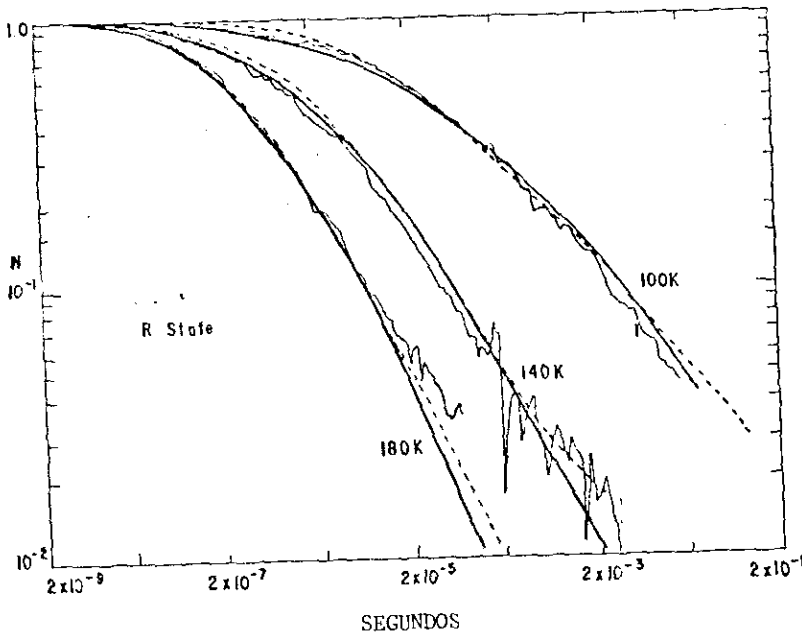


FIGURA 5.3

Na figura 5.4 as quatro distribuições de energia obtidas para cada modelo estão representadas. O valor de  $E^P$  é constante e as diferenças são oriundas dos valores de  $E_{min}$  e da largura da distribuição ( $\lambda$ ) (tabela 5.4). O valor de  $E_{min}$  definido pelo modelo C e calculado nos demais é 2.5 vezes maior em  $A_2$  que nos modelos  $A_1$  e C.  $E_{min}$  é zero no modelo B. A porção inicial de  $g(E)$  corresponde aos processos mais rápidos, que experimentalmente são difíceis de ser detectados.

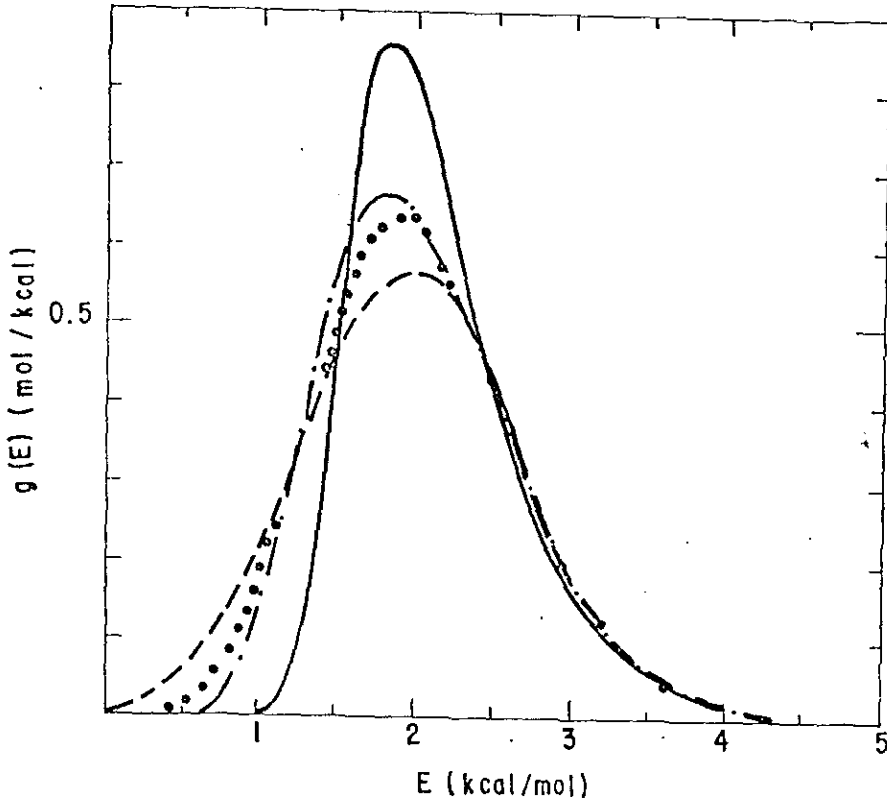


FIGURA 5.4

		$\log(A)$	$E^P$	$E_{min}$	$\lambda$	$g(E)$
		$A(s^{-1})$	kcal/mol			mol/kcal
MOD. A <sup>*</sup>	A.1	8.7 <sup>††</sup>	1.9	0.4	1.5	0.64
	A.2	8.7	1.8	1.	1.	0.86
MOD. B <sup>*</sup>		8.6	2.0	0.	1.6	0.66
MOD. C <sup>†</sup>		8.7	1.8	0.4	1.4	0.67

TABELA 5.4

Os parâmetros mais importantes, por terem significado físico, são  $E^P$  e  $A$ , que são iguais para todos os modelos. Estes resultados indicam que a forma da distribuição

não determina o valor da constante de retorno no pico da distribuição. O centro da distribuição é mais populado e caracteriza a reassociação. Nos extremos onde ocorrem as diferenças, entre as distribuições, a população de moléculas é pequena e esta contribuição pode estar contida no erro experimental. Para todos os modelos discutidos aqui, os parâmetros  $E^P$  e  $A$  são menores para a Hb, quando comparados com aqueles da Mb e a distribuição da Mb é mais larga que a da Hb, sugerindo que a Mb tem um número maior de subestados conformacionais.

Este estudo mostrou que os modelos propostos para a reassociação do CO com a Mb são equivalentes e podem também ser utilizados para a Hb. Neste caso a distribuição de energia associada ao SC é suficiente para refletir as diferenças entre as cinéticas das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ .

Para analisar os nossos resultados experimentais de reassociação do NO com Hb para  $T < 20K$ , escolhemos o modelo de distribuição  $A_1$  que não faz restrição à estrutura eletrônica do ligante, como faz o modelo B.

## 5.2 - MODELO PARA DISSOCIAÇÃO

Nos modelos descritos no capítulo 3, a reassociação dos ligantes foi observada após o pulso de luz. Para analisar a reassociação durante a iluminação estamos propondo um modelo para a dissociação.

Antes de iluminar a amostra, todas as moléculas

estão no estado ligado (A), e contribuem para o sinal paramagnético. Durante a iluminação os ligantes são dissociados do ferro para o estado não ligado (B) à razão  $k^*$ , que depende da concentração da amostra e da intensidade da radiação que chega a ela. Os ligantes em (B) não contribuem para o sinal de RPE. Durante iluminação, uma fração de ligantes retorna a (A) com razão de reassociação  $k_L$  e sem luz, com razão  $k_E$ . A variação da fração de ligantes em (B),  $F_B(t)$ , durante a iluminação é:

$$\frac{dF_B(t)}{dt} = k^* F_A(t) - k_L F_B(t) \quad (5.1)$$

onde  $F_B(t) = 1 - F_A(t)$  e  $F_A(t)$  é a fração de ligantes em A(t). Para  $t=0$ ,  $F_A(0)=1$  e  $F_B(0)=0$ . Fazendo  $F_B=F_L$  a solução da equação acima é:

$$F_L(t) = \frac{k^*}{k^* + k_L} \left[ 1 - \exp [-(k^* + k_L)t] \right] \quad (5.2)$$

Para uma luz muito intensa e colimada, tal como o laser,  $k^* \gg k_L$  e  $F_L(t)$  é determinada apenas por  $k^*$ . Se a intensidade da luz durante a fotólise é relativamente baixa, a cinética é determinada também por  $k_L$ .

A curva experimental de dissociação não é uma exponencial simples, indicando a presença de mais de um processo. A curva experimental de cinética pode ser ajustada pela soma de duas exponenciais, se dois processos com razões de retorno  $k_1$  e  $k_2$  estão presentes:



$$F_L(t) = F_\alpha - (B_1 \exp[-(k_1 + k^*)t] + B_2 \exp[-(k_2 + k^*)t]) \quad (5.3)$$

onde  $F_\alpha = B_1 + B_2$  é a fração de equilíbrio e  $B_{1(2)}$  é a fração de ligantes com razão  $k_{1(2)}$ .

A expressão acima pode ser generalizada se vários processos estão presentes:

$$F_L(t) = F_\alpha - \sum_{i=1}^n B_i \exp[-(k^* + k_i)t] \quad (5.4)$$

onde  $F_\alpha = \sum_i B_i$  e  $B_i$  é a fração de ligantes tendo razão de retorno  $k_i$ .

No modelo de SC, a somatória de exponenciais é substituída por uma integral sobre uma distribuição contínua de termos exponenciais. Se  $P(E) = dE g(E)$  é a fração de moléculas com energia entre  $E$  e  $E + dE$ , então as frações de equilíbrio ( $F_\alpha$ ) e de retorno ( $F_L(t)$ ), devem ser redefinidas:

$$F_\alpha = \int_0^\infty dE g(E) \frac{k^*}{k^* + k_L(E)} \quad (5.5)$$

e

$$F_L(t) = \int_0^\infty dE g(E) \frac{k^*}{k^* + k_L(E)} \left[ 1 - \exp[-(k^* + k_L(E))t] \right] \quad (5.6)$$

A expressão normalizada  $N_L(t)$  é obtida dividindo-se a equação (5.6) por  $F_\alpha$ .

Sem luz, a reassociação pode ser observada e a fração normalizada de ligantes que permanece em (B) é:

$$N_E(t) = \int_{E_0}^{\infty} dE g(E) \exp(-k_E(E)t) \quad (5.7)$$

onde  $k_E(E)$  é a razão de retorno no escuro e  $E_0$  representa o corte na distribuição de energia indicando que as moléculas com barreira de energia menor que  $E_0$  já reassociaram durante a iluminação.

Nossas medidas experimentais foram realizadas na região de temperatura abaixo de 20K, onde o comportamento ativado não é esperado. Tunelamento molecular tem sido proposto para explicar transferência de elétrons, prótons e pequenas moléculas em sistemas biológicos<sup>[45,46,47]</sup>. Esta hipótese está de acordo com os nossos resultados obtidos com a soma de duas exponenciais. A variação de  $k_1$  ou  $k_2$  com a temperatura é muito menor que a esperada pelo processo ativado.

Para ajustar as experiências de cinética com o modelo de distribuição de energias ( $A_1$ ), a expressão de tunelamento molecular para a constante de retorno (equação 3.9) foi utilizada.

### 5.3-ANÁLISE DAS CURVAS DA AMOSTRA PADRÃO

Os parâmetros  $K_1 = k^* + k_{1(2)}$  e  $B = B_1$  (tabela 5.5) foram obtidos do ajuste da curva cinética  $F_L(t)$  (fig. 4.3) com a soma de duas exponenciais (eq. 5.3) e os valores de  $F_\infty$ , das experiências. Os valores  $B(T_i)$ , oscilaram para cada temperatura  $T_i$ .  $B$  é o resultado da média dos  $B(T_i)$ .

Temperature (K)	$F_\infty$	$k_1 (s^{-1})$	$k_2 (s^{-1})$
6.2	0.501	$0.21 \times 10^{-3}$	0.59
9.2	0.475	$0.21 \times 10^{-3}$	0.74
11.9	0.394	$0.41 \times 10^{-1}$	0.74
12.5	0.382	$0.58 \times 10^{-1}$	1.35
13.8	0.336	$0.57 \times 10^{-1}$	1.43
15.5	0.260	$0.71 \times 10^{-1}$	5.60

TABELA 5.5

Na figura 4.4 a curva contínua foi gerada pelos ajustes das curvas experimentais ao modelo de subestados conformacionais no regime de tunelamento. Neste caso os dados experimentais foram normalizados de acordo com a equação 4.2.e com este procedimento, as curvas experimentais normalizadas caíram dentro da faixa do erro experimental, sugerindo um comportamento independente da temperatura na região entre 6.2K e 15.5K. A distribuição de energia obtida está apresentada na figura 5.5. Para cada temperatura as curvas foram fitadas

separadamente e os conjuntos de parâmetros obtidos apresentaram resultados semelhantes, confirmando um comportamento único para estas temperaturas. O ajuste final foi feito com a média dos pontos experimentais das diversas curvas.

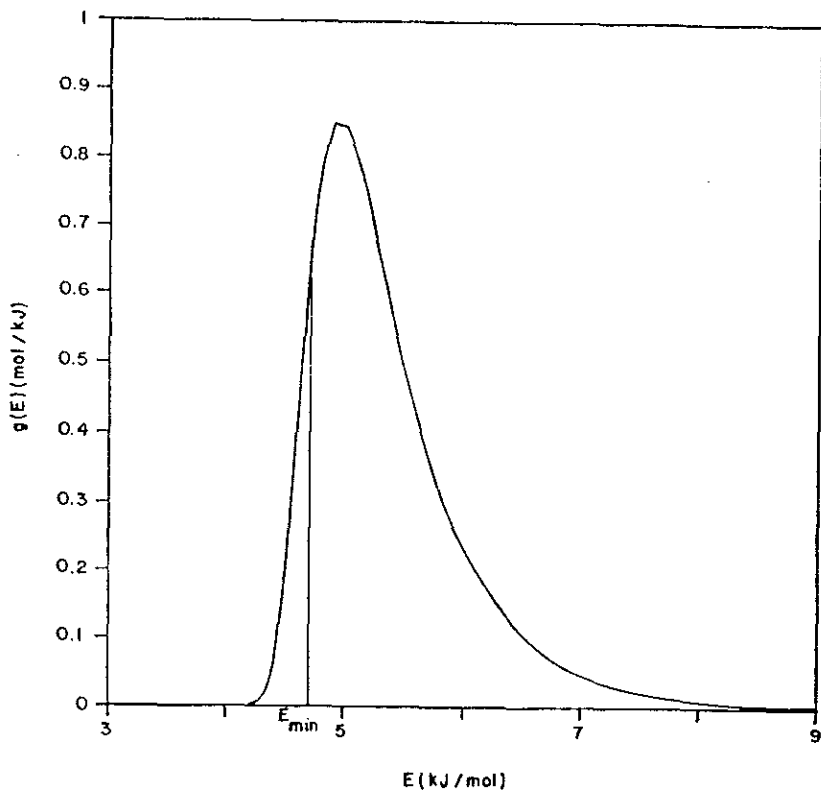


FIGURA 5.5

Para verificar se o processo ativado contribui para a cinética, o ajuste também foi efetuado adicionando-se o termo de Arrhenius à equação 3.9. Verificamos que este procedimento não altera os resultados.

As constantes  $k_1$  e  $k_2$  do modelo de duas exponenciais foram calculadas tomando o valor de  $k^*$  obtido do ajuste com o modelo  $A_1$ . A razão entre as constantes  $k_2$  para as duas temperaturas (13.8K e 15.5K), supondo uma relação de

Arrhenius, fornece uma energia de ativação da ordem de  $10^9$  kJ/mol. Valores típicos de energia de ativação para o CO são: 10 kJ/mol para a Mb, 6.3 kJ/mol para a Hb da carpa e 4.0 kJ/mol para a cadeia  $\beta$  da hemoglobina<sup>[2, 35, 47]</sup>. Estes valores indicam que o processo não é ativado na região de temperatura das nossas experiências.

Sem luz, as curvas de cinética foram ajustadas com a distribuição de energia obtida no claro, com os parâmetros adicionais  $E_0$ ,  $A(T)$  e  $d_0$ . Os resultados de cinética com e sem luz estão na tabela 5.6.

	COM LUZ	SEM LUZ
$E^P$ (kJ/mol)	4.9	4.9
$d_0$ (nm)	0.021	0.049
$\log[ACs^{-1}]$	3.2	4.8*
$k_D$ (s <sup>-1</sup> )	0.074	-----
$E_{min}$ (kJ/mol)	-----	4.7

TABELA 5.6

A diferença entre os valores encontrados para  $d_0$ , no claro e no escuro, pode corresponder a uma mudança na distribuição, de tal forma que  $k_E$  é sempre menor que  $k_L$  para qualquer valor de energia. Para explicar esta diferença, podemos supor que a luz favorece transições entre estados excitados para os quais a largura da barreira é menor que no estado fundamental<sup>[60]</sup>.

Uma outra explicação é que os ligantes fotolizados podem ocupar mais de uma posição na molécula. Os ligantes mais

rápidos retornam durante a iluminação e correspondem a uma distância ferro-ligante menor, enquanto os mais lentos, que retornam no escuro, correspondem a uma distância maior.

Para qualquer valor de energia da distribuição  $k_L$  é sempre maior que  $k_E$ , o que caracteriza dois grupos de moléculas: rápidas e lentas. Nas condições da experiência, as moléculas rápidas podem ser refotolizadas durante o tempo de iluminação de 120s. No escuro, uma pequena fração de ligantes lentos retorna ao ferro enquanto a maior parte permanece presa no bolso da heme.

O valor da barreira de energia no pico da distribuição caracteriza a cinética de retorno do ligante ao ferro. Cornelius et al.<sup>[65]</sup> observaram que o retorno do NO é mais rápido que o do CO, e ocorre com frequência maior. O modelo por eles apresentado, para experiências à temperatura ambiente, tem como hipótese que a barreira externa (do bolso da heme para o solvente) seja igual para os ligantes NO e CO. Como consequência disso, a barreira interna (do ferro para o bolso da heme) é menor para o NO.

Encontramos para a energia do pico 5kJ/mol, que é um valor menor do que aquele obtido para o retorno do CO à Hb da carpa, estando assim de acordo com o modelo de Cornelius. O trabalho de Doetchman et al.<sup>[70]</sup> com RPE de cristal de NOHb fornece uma estimativa do valor da barreira de energia da ordem de 7kJ/mol, que também está coerente com o valor por nós encontrado.

Nossos resultados de cinética indicam que o uso do RPE para temperaturas baixas fornece uma análise coerente da

cinética de dissociação e reassociação para a NOHb. O retorno de ligantes pode ser melhor estudado durante a iluminação com uma adequada relação sinal-ruído. Os resultados foram analisados com o modelo de duas exponenciais, que é uma situação particular do modelo da distribuição e com o modelo da distribuição, incluindo a hipótese de tunelamento. Nos dois casos ficou evidente uma fraca dependência com a temperatura.

#### 5.4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE CINÉTICA

As curvas de cinética da amostra T foram ajustadas ao modelo da distribuição de energia no regime de tunelamento. A distribuição de energia obtida está apresentada na figura 5.6 e os parâmetros de ajuste, na tabela 5.7. O gráfico de  $\log[N(t)] \times \log(t)$  (fig. 5.7) apresenta as curvas teóricas para quatro temperaturas e os pontos experimentais representados por símbolos. Observamos na figura 5.7 que a curva de 10.4K está muito separada das demais. O fator pré-exponencial A ( $s^{-1}$ ) é  $10^{9.5}$  para esta temperatura e  $10^{8.7}$  para 19.6K. Devido a esta diferença ser maior que a compatível com o regime de tunelamento, podemos dizer que o modelo utilizado não é adequado para o ajuste nesta região de temperatura.

A amostra R com 0.4mM de ferro (fig. 4.9) apresentou as curvas normalizadas de cinética de 5.9K, 7.0K e 9.1K superpostas e a curva de 12.3K separada das demais.

As curvas normalizadas de cinética da amostra padrão

(fig. 4.4) são independentes da temperatura na região de 6.2K até 15.5K.

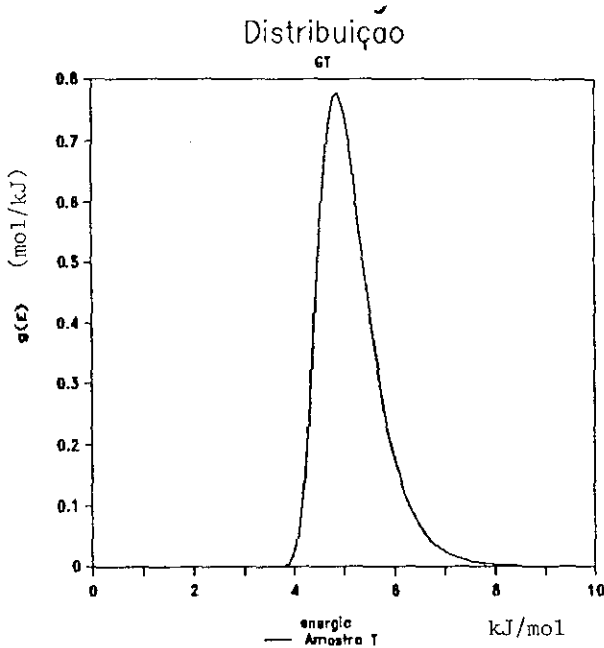


FIGURA 5.6

Comparando os resultados das duas amostras R, podemos concluir que até aproximadamente 10.0K a reassociação é compatível com o regime de tunelamento. Observamos que concentrações maiores que 0.2mM de ferro favorecem a separação das curvas de cinética. A figura 4.5 apresenta a cinética de uma amostra com 1.2mM de ferro para 11.7K, 14.8K e 16.9K, mostrando curvas distintas.

As duas amostras R de 0.2mM e de 0.4mM foram preparadas com pH = 6.5 e 6.2. Desde que o pH induz mudanças na conformação da proteína, este fator também contribui para as diferenças cinéticas.



T (K)	log [A(s <sup>-1</sup> )]
10.4	3.46
16.2	7.89
17.4	8.46
19.6	8.70

$E^P = 4.87 \text{ kJ/mol}$ ,  $d_o = 0.024 \text{ nm}$  e  $k_D = 0.028 \text{ s}^{-1}$

TABELA 5.7

Amostra T -  
Normalizada

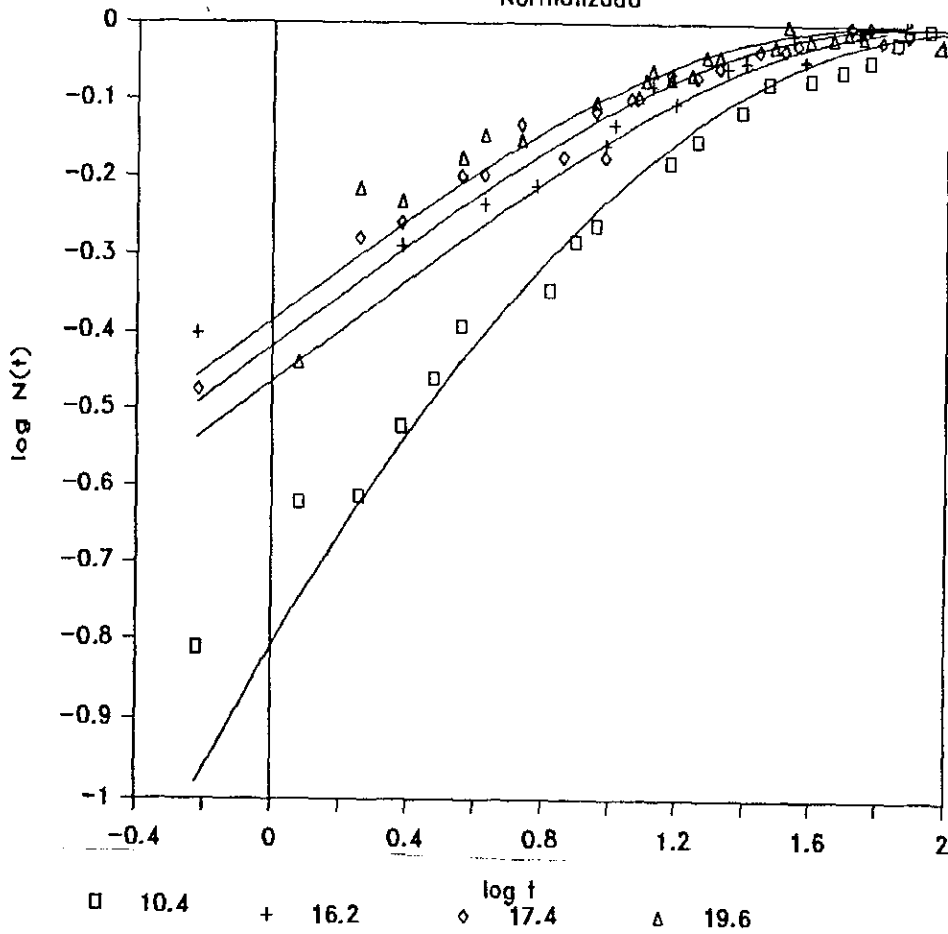


FIGURA 5.7

Comparando as cinéticas das amostras nas conformações R e T, verificamos que é possível observar fração dissociada na amostra T para temperaturas mais altas que na amostra R. Isto significa que a constante de retorno do ligante é maior para a amostra R, para uma dada temperatura (fig. 4.6 e 4.8).

A penetração da luz é dificultada pela concentração maior nas amostras. No caso extremo da amostra desidratada, a fração dissociada é nula (fig.4.24). Duas hipóteses são possíveis: ou a intensidade da luz não é suficiente para dissociar os ligantes, ou o retorno da porção dissociada é tão rápido, que não é possível observar por RPE (constante de tempo 0.03s).

## 5.5 - ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RPE

Durante as experiências de fotodissociação observamos a necessidade de obter variações espectrais com a temperatura e a potência de microonda para avaliar as mudanças na forma de linha. Realizamos então as experiências de variação térmica e de saturação.

Supomos que a luz que dissocia o ligante não diferencia entre cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  ou entre as formas R e T das proteínas, desde que a potência incidente seja suficiente para romper todas as ligações. Entretanto, durante a iluminação ocorre retorno seletivo das moléculas de tal forma que no equilíbrio permanecem dissociados os ligantes com velocidade de reassociação mais lenta. Se a energia de ativação do pico da

distribuição é menor para a cadeia  $\alpha$ , por exemplo, ou para a forma R da proteína, ligantes pertencentes a esta cadeia ou forma devem retornar mais rapidamente ao ferro, mudando a proporção relativa entre os espectros das cadeias ou conformações.

A observação das diferenças entre os espectros nas formas R e T, na dissociação (figs. 4.15, 4.19, 4.20 e 4.22) indica que o grupo de moléculas que permanece ligada ao ferro é diferente do de moléculas desligadas. A variação é mais evidente na estrutura T. Esta variação do espectro não pode ser atribuída a efeitos térmicos porque nesta região de temperatura não há variação da forma de linha por aquecimento, como pode ser observado na figura 4.16. Também tomamos cuidado de realizar a experiência em condições de baixa potência para que não ocorressem efeitos devidos à saturação. Descartadas estas hipóteses, o efeito pode ser atribuído à dissociação diferenciada entre cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . Entretanto o espectro da estrutura T é predominantemente devido à cadeia  $\alpha$  na conformação T. A contribuição de  $\beta$ , que pode ser observada para  $g = 1.981$  é muito pequena e além disso não é observada variação significativa nesta região do espectro. Descartando a hipótese das hemes heterogêneas, a variação observada pode ser atribuída a espécies com conformações distintas ou a uma configuração eletrônica alterada devido ao NO dissociado.

Na estrutura R a variação observada é principalmente na região de campo alto (fig. 4.15). Neste caso existe também uma superposição do efeito térmico (fig. 4.12), o que não nos permite uma interpretação unívoca da variação observada.

O espectro é predominantemente das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  na forma R e como estes sinais são muito parecidos é difícil avaliar mudanças relativas entre as cadeias. As variações observadas na região de desdobramento hiperfino são devidas ao erro na posição relativa dos espectros comparados.

Na estrutura RT (fig. 4.22) o resultado da diferença entre os espectros inicial e dissociado mostra uma superposição das variações ocorridas nas amostras R e T.

Nas experiências de fotodissociação com amostras desidratadas com NOHb não foi observada fração dissociada e os espectros inicial e final são idênticos (fig. 4.24). O efeito da variação de temperatura é menor do que para as amostras em solução.

Os espectros de variação térmica da amostra R, apresentados na figura 4.12 indicam que mais de uma espécie pode estar presente na amostra. A faixa de temperatura em que a experiência foi realizada é insuficiente para determinar as duas espécies.

A experiência de saturação contínua com a mesma amostra R para 7.5K (fig. 4.13) foi interpretada supondo que duas espécies (B) e (A), que predominam a potências alta e baixa, estão presentes. Os espectros das duas espécies são semelhantes aos obtidos para a eritrocruorina de minhoca<sup>[71]</sup> e para NOMb<sup>[72]</sup> para temperaturas alta e baixa.

Como nas experiências de variação de temperatura onde os espectros intermediários são combinações dos espectros extremos os resultados obtidos para potências intermediárias também são misturas dos espectros das potências de  $2.3 \times 10^2$  mW

e de  $1.2 \times 10^{-4}$  mW.

As experiências de variação de temperatura e potência com a amostra T (figs. 4.16, 4.17 e 4.18) foram tratados como uma mistura de duas espécies. Apesar de estarem representados apenas quatro espectros de potências distintas para 11.7K, é possível verificar que as mudanças espectrais são equivalentes àquelas que ocorrem com a variação de temperatura.

Esses resultados sugerem uma relação muito próxima entre os efeitos térmicos e efeitos de saturação do sinal. Doetschman et al.<sup>[70]</sup>, no trabalho com cristal de NOHb, observaram que a evolução espectral com a temperatura acima de 80K, é qualitativamente similar à variação com a potência a 4.2K.

A análise das experiências de temperatura e potência indica que pelo menos duas espécies coexistem nas amostras R e T. A espécie que predomina à temperatura mais alta também predomina para as potências mais elevadas. A espécie que predomina nas temperaturas e potências mais baixas é facilmente saturada nas potências maiores.

O processo de relaxação foi investigado para a amostra R em dois valores de g indicados na figura 4.13. Na figura 4.14 a curva média  $P_{1/2} = C T^{2.8 \pm 0.4}$  foi obtida para os dois valores de g indicando que as duas posições de campo do espectro estão associadas a uma única espécie. Este resultado não é comum nos processos de relaxação de hemoproteínas. O expoente  $n = 1$  (ou  $n = 2$ ) é característico do processo de relaxação direta e predomina para  $T < 3K$ , enquanto que a relaxação Raman predomina para temperaturas mais

altas [78] .

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1 - Comprovamos que no regime de temperaturas baixas, a cinética do estado geminado do NO, observada por RPE, pode ser estudada durante a iluminação da amostra.

2 - Os resultados de cinética obtidos para a amostra padrão no regime de tunelamento são coerentes com os resultados de temperaturas mais altas, no regime de Arrhenius.

3 - A barreira de energia do pico da distribuição ( $E^P$ ) caracteriza a reassociação do NO no estado geminado. O valor obtido para a amostra padrão<sup>(\*)</sup> pode ser comparado com os valores obtidos para COHb da carpa<sup>[95]</sup>, COMb e O<sub>2</sub>Mb<sup>[2]</sup>:

	R-NOHb <sup>(*)</sup>	R-COHb(carpa)	T-COHb(carpa)	COMb	O <sub>2</sub> Mb
$E^P$ (kJ/mol)	4.9	6.3	7.5	10.0	8.4

De acordo com as expectativas, o ligante NO apresenta o menor

valor de  $E^P$ .

4 - Mostramos através do estudo comparativo das três amostras de NOHb nas conformações T, RT e R, que a cinética depende do grau de saturação do ligante. A fração dissociada decresce na ordem T, RT e R, para cada temperatura, indicando que a barreira de energia para a reassociação do ligante decresce na mesma ordem.

5 - Observa-se pequenas diferenças nos espectros de RPE antes e durante iluminação, indicando alterações na configuração eletrônica da(s) espécie(s) paramagnética(s).

6 - Mostramos que o espectro de RPE da conformação intermediária RT da NOHb pode ser obtido pela combinação dos espectros das conformações R e T. Reafirmamos que o RPE permite observar detalhes espectrais que diferenciam as conformações R e T, que são difíceis de ser distinguidas por técnicas óticas.

7 - A variação do espectro da NOHb no estado T com a temperatura pode ser reproduzida com a soma dos espectros para 11K e 180K, indicando que duas espécies paramagnéticas estão presentes na amostra e podem corresponder a dois ângulos diferentes entre as ligações FeII-N-O.

8 - As medidas de saturação da NOHb no estado R a 7.5K, demonstram efeitos de tempo de relaxação diferentes nas diferentes partes dos espectros. A semelhança entre a variação



dos espectros devido ao efeito de saturação da NOHb e ao efeito térmico da NOMb, observada por Morse e Chan<sup>[72]</sup>, pode ser atribuída à diferença dos tempos de relaxação entre as duas espécies observadas, ou à relaxação cruzada sugerida por Doetschman<sup>[70]</sup>.

9 - O resultado obtido das experiências de saturação contínua indica um processo de relaxação anômalo para hemoproteínas e a taxa de relaxação é proporcional à temperatura elevada ao expoente  $2.3 \pm 0.2$  para a faixa de 7.5K a 104K.

.....

Para dar continuidade ao estudo cinético devemos buscar um modelo mais adequado para a análise das experiências de fotodissociação nesta região de temperatura.

A análise dos dados experimentais agora existentes, da cinética das amostras de NOHb, em diferentes conformações, com um modelo mais adequado, nos permitirá avaliar melhor a relação entre a estrutura da proteína e a reação do ligante com a heme, tarefa esta que se revelou estar além dos limites dos modelos empregados neste trabalho.

Para investigar diferenças cinéticas entre as subunidades da Hb, pretendemos estudar as cadeias isoladas  $\alpha$ -Hb e  $\beta$ -Hb. Estudos preliminares foram realizados com as cadeias  $\alpha$ .

Também queremos investigar as diferenças de reatividade da heme em proteínas mutantes.

A influência do solvente sobre o processo de dissociação e reassociação do ligante será também estudada.

Vamos prosseguir com a análise dos espectros de RPE das experiências de fotodissociação, variação térmica e saturação. Os detalhes do processo de relaxação da NOHb serão investigados.

Queremos identificar as espécies paramagnéticas que contribuem par o espectro de RPE e as respectivas diferenças cinéticas. É possível que estas espécies diferentes estejam relacionadas com os subestados conformacionais.

## APÊNDICE A

### MODELO DE YOUNG E BOWNE

Os modelos de Young e Bowne<sup>[26]</sup> e Agmon e Hopfield<sup>[25]</sup> são apresentados nos apêndices A e B. Nestes modelos os subestados são parametrizados pela coordenada da proteína e a distribuição de energia é obtida a partir da distribuição de Boltzman dos SC. O potencial total da proteína tem contribuições oriundas dos potenciais de reação  $V(r)$  e conformacional  $V(x)$ . Este descreve as flutuações entre os subestados. No modelo de Young e Bowne  $V(x)$  é não harmônico, em contraposição ao modelo de Agmon e Hopfield em que  $V(x)$  é harmônico.

No modelo de Young e Bowne a probabilidade de distribuição de energia é considerada independente da temperatura abaixo de um certo valor de congelamento  $T_c$  e dependente quando acima. Neste caso ocorrem transições entre os SC e o ligante escapa para o solvente. O potencial da reação depende só da coordenada ( $r$ ) na ausência dos SC. Três estados do sistema proteína-ligante são possíveis: estado ligado (A), estado não-ligado (B) e o estado de transição (\*). Se não há subestados presentes, a transição de (B) para (A) é exponencial e ocorre através da curva de potencial indicada na figura A.1 por  $x = 0$  com barreira de energia  $E_0$ . Se há SC

presentes estes são parametrizados por  $x$ . Durante a fotodissociação e a reassociação a coordenada  $x$  permanece fixa e as transições entre os subestados são descritas por um potencial não harmônico sugerido pelas experiências de difração de raios  $X^{(1)}$ .

$$V_c^i(x) = f^i x^{1/n} \quad (A.1)$$

onde o índice  $i$  representa os estados (A), (B) e (\*) e  $(f)$  e  $(n)$  são dois parâmetros.

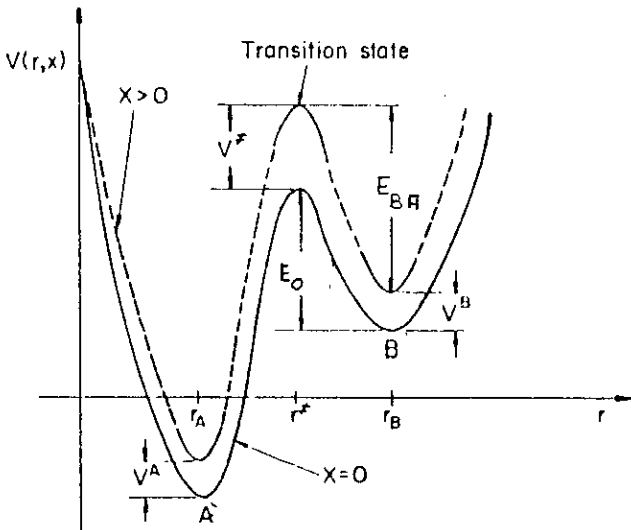


FIGURA A.1

A transição de (B) para (A) na curva  $x \neq 0$  ocorre através da barreira  $E_{BA}$ :

$$\begin{aligned} E_{BA} &= V^*(x, r_*) - V^B(x, r_B) \\ &= x^{1/n} (f^* - f^B) - E_0 \end{aligned} \quad (A.2)$$

onde  $E = [ V(r_*) - V(r_B) ]$  e  $f^* > f^B$ .

A distribuição de equilíbrio das conformações  $x$  é determinada pelo potencial  $\tilde{V}^i(x)$ . A população de subestados com coordenada  $x \neq 0$ , para uma temperatura fixa, de acordo com a distribuição de Boltzmann, é:

$$P(x, T) = C(T) x^2 \exp [ - f x^{1/n} / RT ] \quad (A.3)$$

onde  $C(T) = (f / RT)^{3n} / n \Gamma(3n)$ ,  $f = f_A (f_B)$  e  $T = T_c (T)$  se  $T \leq T_c (T > T_c)$ .

Se  $g(E_{BA}, T) dE_{BA}$  representa o número de subestados com barreira entre  $E_{BA}$  e  $E_{BA} + dE_{BA}$ , então:

$$g(E_{BA}, T) dE_{BA} = P(x, T) dx \quad (A.4)$$

e a distribuição de energia obtida para  $T \leq T_c$  é  $g(E_{BA})$ :

$$g(E_{BA}) = C (E_{BA} - E_0)^{3n-1} \exp [-\alpha(E_{BA} - E_0)] \quad (A.5)$$

onde  $\alpha = f_A / (f_* - f_B) RT_c$  e  $C = \alpha^{3n} / \Gamma(3n)$ .

A energia do pico da distribuição  $E^P$  é obtida derivando a equação A.5 e igualando a zero:

$$E^P = [ E_0 + (3n-1) ] / \alpha \quad (A.6)$$

A distribuição de energia (eq. A.5) foi obtida das curvas de cinética  $N(T)$  da figura 2.8, ajustadas pelas equações 2.2, e 2.4, com os seguintes parâmetros de ajuste:  $A_{BA}$ ,  $E_0$ ,  $n$

e  $\alpha$  (fig.A.2).

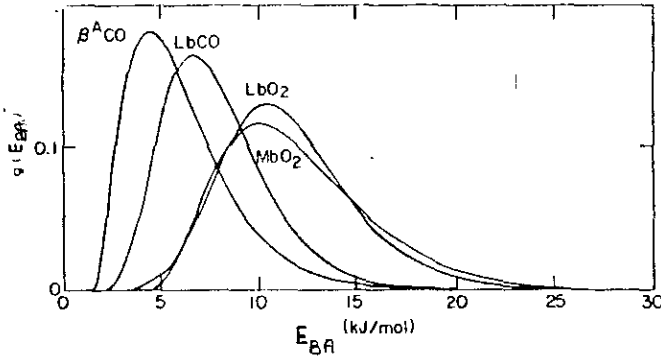


FIGURA A.2

Para as temperaturas maiores que 200K podem ser consideradas duas possibilidades:  $f_A = f_B = f$  ou  $f_A \neq f_B$ . No primeiro caso, a distribuição é dependente do tempo e obtida pela equação A.5 substituindo  $T$  por  $T_c$  (fig.A.3). No segundo caso os estados (A) e (B) tem duas distribuições de conformações dependentes do tempo. Para a descrição deste segundo caso seria necessária uma teoria que descrevesse concomitantemente o movimento do ligante através da proteína e as transições entre os subestados.

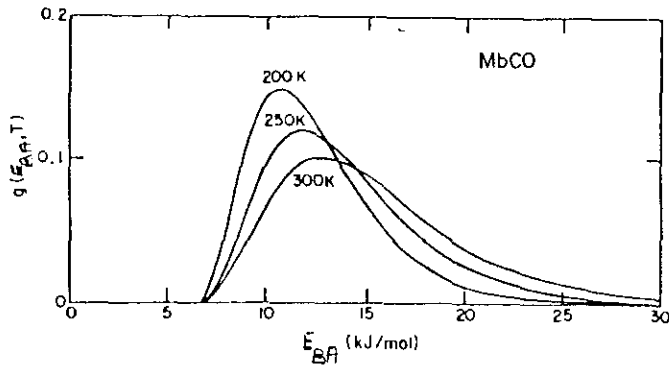


FIGURA A.3

Acima das temperaturas de relaxação (300K) a proteína flutua entre os subestados e a constante de retorno satisfaz à relação de Arrhenius (eq.2.2).

APÊNDICE B

MODELO DE AGMON E HOPFIELD

Neste modelo cada proteína com configuração  $x$  tem uma constante de reação  $k(x)$ . No estado ligado (A) o ferro está submetido a um campo ligante forte e o spin total é  $S=0$ . O potencial é dado pela curva de Morse:

$$V_A(r) = D [\exp(-2\beta r) - 2\exp(-\beta r)] \quad (B.1)$$

onde  $\beta$  e  $D$  são parâmetros que definem a curvatura e a profundidade do poço de potencial. No estado desligado (B) o ferro está submetido a um campo ligante fraco e seu spin total é  $S=2$ . O potencial é repulsivo e dado pela expressão:

$$V_B(r) = D \exp(-\beta r) - \Delta \quad (B.2)$$

com o parâmetro  $\Delta$  indicado na figura B.1.

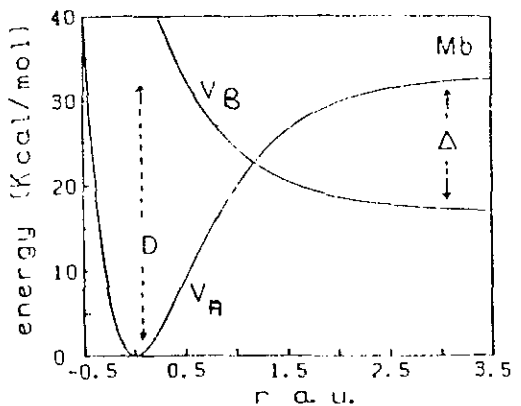


FIGURA B.1



Na intersecção das duas curvas a degenerescência é removida por um elemento de matriz de transição que determina se a reação é adiabática ou não<sup>(20)</sup>. O potencial conformacional é harmônico e o valor de equilíbrio da coordenada é  $x$  para o estado (B) e  $x-x_0$  para o estado (A).

A reação ocorre através das superfícies de energia:

$$V^A(r,x) = V^A(r) + 1/2 f (x-x_0)^2$$

$$V^B(r,x) = V^B(r) + 1/2 f x_0^2 \quad (B.3)$$

onde  $f$  é um parâmetro.

A energia de intersecção  $V(r^*,x)$  é determinada pela intersecção das superfícies de potencial (A) e (B).

A barreira de energia  $E_{BA}$  é obtida pela diferença entre  $V^B(r^*,x)$  e  $V^B(x,x)$ :

$$E_{BA} = D \exp(-\beta r^*) \quad (B.4)$$

Igualando as energias de (A) e (B) na intersecção das curvas, obtém-se:

$$x = (x_0/2) + (\Delta / fx_0) - (E / fx) (3 - E_{BA}/D) \quad (B.5)$$

Para  $T < T_c$  a coordenada  $x$  está fixa e a fração  $P(x)$  de moléculas em (A) (distribuição de conformações) é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$P(x) = (f/2\pi kT_C)^{1/2} \exp[-f(x-x_0)^2/2kT_C] \quad (B.6)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann.

A distribuição de energia é obtida substituindo as equações B.5 e B.6 em A.4 com  $T = T_C$ :

$$g(E_{BA}) = |(2E_{BA}/D) - 3| (1/fx_0) (f/2\pi kT_C)^{1/2} \exp[-(x-x_0)^2/2kT_C] \quad (B.7)$$

As equações 2.2, 2.4 e B.7 foram ajustadas às curvas  $N(t)$  da figura 2.8 e os parâmetros  $A_{BA}$ ,  $D$ ,  $\Delta$ ,  $f$  e  $x_0$  foram determinados.

Crescendo a temperatura, a coordenada conformacional varia e o movimento ao longo de  $x$  pode ser descrito por uma equação de difusão. A difusão é um grau de liberdade adicional e foi denominada difusão perpendicular à coordenada da reação. Matematicamente é caracterizada por uma variação lenta em  $k(x)$ . O potencial harmônico  $V(x)$  restringe o movimento à vizinhança de  $x=0$ , resultando na difusão limitada.

Este modelo concorda com os resultados experimentais apenas para as temperaturas baixas.

REFERÊNCIAS

- 01- H. Hartmann, F. Parak, W. Steigemann, J. A. Petsko, D. R. Ponzi e H. Frauenfelder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (1982) 4967
- 02- R. H. Austin, K. W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder e I. C. Gunsalus, Biochemistry, 14 (1975) 5355
- 03- R. LoBrutto, Y. H. Wei, S. Yoshida, H. L. Van Camp, C. P. Scholes e T. E. King, Biophys. J., 45 (1984) 473
- 04- K. Nagai, H. Hori, S. Yoshida, H. Sakamoto e H. Morimoto, Biochim. Biophys. Acta, 532 (1978) 17
- 05- L. J. El-Jaick, E. Wajnberg, G. Bemski e M. P. Linhares, Int. J. Biol. Macromol., 10 (1988) 185
- 06- M. P. Linhares, L. J. El-Jaick, G. Bemski e E. Wajnberg, Int. J. Biol. Macromol., em vias de publicação
- 07- R. E. Dickerson e I. Geis, Hemoglobin, The Benjamin / Cummings Pub. Co., Inc., Menlo Park, California, (1983)
- 08- G. Feher, Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology, 1<sup>a</sup> ed., Gordon & Breach (1970).
- 09- M. F. Perutz, Sci. Am. (1964)64
- 10- M. F. Perutz, J. V. Kilmartin, K. Nagai, A. Szabo e S. R. Simon, Biochemistry, 15 (1976) 378
- 11- S. R. W. Louro, P. C. Ribeiro e G. Bemski, Biochim. Biophys. Acta, 670 (1981) 56
- 12- H. Rein, O. Ristau e W. Scheler, FEBS Letters 24 (1972) 24

- 13- H. Kon, J. Biol. Chem 243 (1968) 4350
- 14- H. Kon e N. Kataoka, Biochemistry 8 (1969) 4757
- 15- J. C. Maxwell e W. S. Caughey, Biochemistry, 15 (1976) 388
- 16- A. Szabo e M. F. Perutz, Biochemistry 15 (1976) 4427
- 17- W. R. Scheidt e M. E. Frisse, J. Am. Chem. Soc.,  
97 (1975) 17
- 18- J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G.  
Hart, D. R. Davies, DE. C. Phillips e V. C. Shore, Nature,  
185 (1960) 422
- 19- J. Monod, J. Wyman e J. P. Changeaux, J. Mol. Biol.,  
12 (1965) 88
- 20- M Karplus e J. A. McCammon, Sci. Amer 254 (1986) 30
- 21- A. McCammon, Rep. Progr. Phys., 47 (1984) 1
- 22- R. Elber e M. Karplus, Science, 235 (1987) 318
- 23- W. Bialek e R. F. Goldstein, Biophys. J., 48 (1985) 1027
- 24- R. H. Austin, K. W. Beeson, S. S. Chan, P. G. Debrunner, R.  
Donning, L. Eisenstein, H. Frauenfelder e T. M. Nordlund, Rev.  
Sci. Instr., 47 (1976) 445
- 25- N. Agmon e J. J. Hopfield, J. Chem. Phys., 79 (1983) 2042
- 26- R. D. Young e S. F. Bowne, J. Chem. Phys. 81 (1984) 3730
- 27- J. Jortner e J. Ulstrup, J. Am. Chem. Soc., 101 (1979) 3744
- 28- M. H. Redi e B. S. Gerstman, Biophys. J. 35 (1981) 471
- 29- L. Powers, B. Chance, M. Chance, B. Campbell, J. Friedman,  
S. Khalid, C. Kumar, A. Naqui, K. S. Reddy e Y. Zhou,  
Biochemistry, 26 (1987) 4785
- 30- D. L. Stein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 (1985) 3670
- 31- H. Frauenfelder, F. Parak e R. D. Young, Ann. Rev. Biophys.

Bioeng. 17 (1988) 451

- 32- H. Frauenfelder, G. A. Petsko e D. Tsernoglou, *Nature*,  
280 (1989) 558
- 33- N. Alberding, R. H. Austin, S. S. Chan, L. Eisenstein, H.  
Frauenfelder, I. C. Gunsalus e T. M. Nordlund,  
*J. Chem. Phys.* 65 (1976) 4701
- 34- N. Alberding, S. S. Chan, L. Eisenstein, H. Frauenfelder,  
D. Good, I. C. Gunsalus, T. N. Nordlund, M. F. Perutz,  
A. H. Reynolds e L. B. Sorensen, *Biochemistry*, 17 (1978) 43
- 35- W. G. Cobau, J. D. LeGrange, R. H. Austin, *Biophys. J.*,  
47 (1985) 781
- 36- A. Ansari, J. Berendzen, S. F. Bowne, H. Frauenfelder, I.  
E. T. Iben, T. D. Sauke, E. Shyamsunder e  
R. D. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 5000
- 37- A. Ansari, E. E. DiIorio, D. D. Dlott, H. Frauenfelder, I.  
E. T. Iben, P. Langer, H. Roder, T. D. Sauke e E.  
Shyamsunder, *Biochemistry*, 25 (1986) 3139
- 38- A. Ansari, J. Berendzen, D. Braunstein, B. R. Cohen, H.  
Frauenfelder, M. K. Hong, I. E. T. Iben, J. B. Johnson, P.  
Ormos, T. B. Sauke, R. Scholl, A. Schulter, P. J.  
Steinbach, J. Vittitow e R. D. Young, *Biophys. Chem.*,  
26 (1987) 337
- 39- H. Frauenfelder, *Comments Mol. Cell. Biophys.*, 3 (1986) 347
- 40- R. Kubo, *Rep. Prog. Phys.*, 29(1966) 255
- 41- M. Suzuki, *Prog. Theor. Phys.*, 56 (1967) 77
- 42- W. Doster, D. Beece, S. F. Bowne, E. E. DiIorio, L.

- Eisenstein, H. Frauenfelder, L. Reinisch, E. Shyamsunder, K. H. Winterhalter e K. T. Yue, *Biochemistry*, 21 (1982) 4831
- 43- D. D. Dlott, H. Frauenfelder, P. Lander, H. Roder, E. E. DiIorio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983) 6239
- 44- H. Roder, J. Berendzen, S. F. Bowne, H. Frauenfelder, T. B. Sauke, E. Shyamsunder e M. B. Weissman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(1984) 2359
- 45- J. Jortner, *Tunneling in Biological Systems*, Ed. B. Chance, D. C. DeVault, H. Frauenfelder, R. A. Marcus, J. R. Schrieffer e M. Sutin, Academic Press, (1979) 627
- 46- J. D. Alben, D. Beece, S. F. Bowne, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, D. Good, M. C. Marden, P. P. Moh, L. Reinisch, A. H. Reynolds e K. T. Yue, *Phys. Rev. Lett.*, 44 (1980) 1157
- 47- N. Alberding, R. H. Austin, K. W. Beeson, S. S. Chan, L. Eisenstein, H. Frauenfelder e T. M. Nordlund, *Science*, 192 (1976) 1002
- 48- B. Chance, R. Fischetti e L. Powers, *Biochemistry*, 22 (1983) 3820
- 49- L. Powers, J. L. Sessler, G. L. Woolery e B. Chance, *Biochemistry*, 23 (1984) 5519
- 50- T. Iizuka, H. Yamamoto, M. Kotani e T. Yonetani, *Biochem. Biophys. Acta*, \_\_\_ (1974) 182  
T. Iizuka, H. Yamamoto, M. Kotani, T. Yonetani, *Biochem. Biophys. Acta*, 371 (1974) 126
- 51- E. R. Henry, J. Hofrichter, J. H. Sommer e W. A. Eaton,

- Photochem. Photobiol., Ed. A. H. Zewail, Harwood Acad. NY,  
(1983) 791
- 52- D. A. Duddell, R. J. Morris e J. T. Richards,  
Biochem. Biophys. Acta, 621 (1980) 1
- 53- B. Alpert, S. ElMohni, L. Lindqvist e F. Tfibel, Chem.  
Phys. Lett. 64 (1978) 11
- 54- J. M. Friedman e K. B. Lyons, Nature, 284 (1980) 570
- 55- B. I. Greene, R. M. Hochstrasser, R. B. Weisman e  
W. A. Eaton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 5255
- 56- D. A. Chernoff, R. M. Hochstrasser e A. W. Steeler,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (1980) 5606
- 57- L. Lindqvist, S. ElMohni, F. Tfibel e B. Alpert, Nature,  
288 (1980) 729
- 58- K. B. Lyons e J. M. Friedman, Hemoglobin and Oxygen  
Binding, Eds. C. Ho, W. A. Eaton, J. P. Collman, G. H. Gibson,  
J. S. Leigh, E. Margoliash, J. K. Moffat e W. R. Scheidt,  
Elsevier/North-Holland, NY, 1982
- 59- J. M. Friedman, R. A. Stepnoski, M. Stavola, M. R. Ondrias  
e R. L. Cone, Biochemistry, 21 (1982) 2022
- 60- J. L. Martin, A. Migus, C. Poyart, Y. Lecarpentier,  
A. Antonetti e A. Orszag, Biochem. Biophys. Res. Commun.,  
107 (1982) 803
- 61- J. Hofrichter, E. R. Henry, J. H. Summer, R. Deutsch,  
M. Ikeda-Saito, T. Yonetani e W. A. Eaton, Biochemistry,  
24 (1985) 2667
- 62- L. P. Murray, J. Hofrichter, E. R. Henry e W. A. Eaton,  
Biophys. Chem. 29 (1988) 63

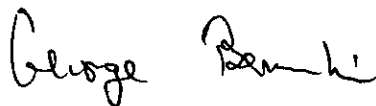
- 63- A. Szabo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 2108
- 64- Q. W. Gibson e B. M. Hoffman, J. Biol. Chem.  
254 (1979) 4691
- 65- P. A. Cornelius, R. M. Hochstrasser e A. W. Steele,  
J. Mol. Biol., 163 (1983) 119
- 66- K. A. Jongeward, J. C. Marsters, M. J. Mitchell, D. Magde e  
V. S. Sharma, Biochem. Biophys. Res. Commun.,  
140 (1986) 962
- 67- D. E. Bartnicki, H. Mizukami e A. E. Romero-Herrera,  
J. Biol. Chem., (1983) 1599
- 68- E. Wajnberg, Tese de Doutorado, PUC, (1984)
- 69- H. Frauenfelder, Tunneling in Biological Systems, *idem*,  
(1979) 627
- 70- D. C. Doetschman e S. G. Utterback, J. Am. Chem. Soc.,  
103 (1981) 2847
- 71- I. Caracelli, N. C. Meirelles, M. Tabak, O. Baffa e O. R.  
Nascimento, Biochem. Biophys. Acta, 955 (1988) 315
- 72- R. H. Morse e S. I. Chan, J. Biol. Chem. 255 (1980) 7876
- 73- H. J. Stapleton, Comm. Mol. Cell. Biophys., 3 (1986) 321



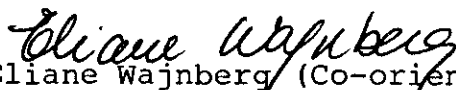
"ESTUDOS DE FOTODISSOCIAÇÃO DA NITROSIL-HEMOGLOBINA POR  
RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA"

MARÍLIA PAIXÃO LINHARES

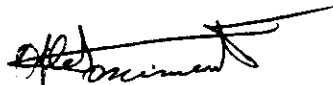
Tese de Doutorado apresentada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, fazendo parte da Banca Examinadora os seguintes professores:



George Bemski (Presidente)




Eliane Wajnberg (Co-orientadora)



Otaciro Rangel Nascimento



Sonia Renaux Wanderley Louro



Henrique Gomes de Paiva Lins de Barros



Paulo Mascarello Bisch